

**Vergleichende globale Proteomanalyse
zur Identifizierung von
Mechanismen der Chemotherapieresistenz
in Keimzelltumoren**

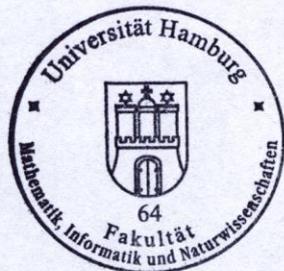
Dissertation

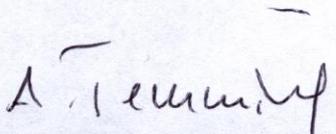
**zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Department Biologie,
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von
Stephanie Gläser
aus Bad Harzburg**

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herr Professor Dr. C. BOKEMEYER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. T. DOBNER
Tag der Disputation: 28. Mai 2010

Hamburg, den 14. Mai 2010




Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

Inhalt

Abkürzungen	VII
Englisches Glossar	X
Kapitel 1 Einleitung.....	1
1.1 Keimzellen und ihre Entwicklung beim Mann	1
1.2 Testikuläre Keimzelltumoren	2
1.3 Histologie der Typ II-Keimzelltumoren	3
1.4 Extragonadale Keimzelltumoren (EGKZT)	4
1.5 Charakteristika von Keimzelltumoren.....	5
1.6 Risikofaktoren	6
1.7 Cisplatin und die Bildung von Cisplatin-Addukten.....	6
1.8 Cisplatin und Keimzelltumoren.....	7
1.9 Wirkmechanismen bei Sensitivität gegenüber Cisplatin.....	8
1.10 Wirkmechanismen bei Resistenz gegenüber Cisplatin	10
1.11 Untersuchungen zu Cisplatin-unabhängigen Therapieansätzen mit „small molecule inhibitors“	13
1.11.1 Sunitinib (SU11248, Sutent®).....	13
1.11.2 Temsirolimus (CCI-779, Torisel®)	14
1.11 Proteom und Proteomics.....	15
1.12 Ziel der Arbeit.....	16
Kapitel 2 Material und Methoden	17
2.1 Geräte	17
2.2 Verbrauchsmittel	17
2.3 Chemikalien, Kits, Antikörper und Enzyme	18
2.3.1 Chemikalien	18
2.3.2 Kits.....	18
2.3.3 Enzyme und weitere Reagenzien	18
2.4 Zellkulturmedien und Zusätze	19
2.5 Zelllinien.....	19
2.6 Protein- und DNS-Standards	20
2.7 Antikörper.....	20

2.7.1	Primäre Antikörper	20
2.7.2	Sekundäre Antikörper	21
2.8	Zytostatika.....	21
2.9	Primer	22
2.10	Software.....	23
2.11	Zellkultur	24
2.11.1	Auftauen von Zellen	24
2.11.2	Kultivierung und Trypsinierung von adhären- ten Keimzelltumor- Zelllinien.....	24
2.11.3	Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau	24
2.11.3.1	Neubauer-Zählkammer	25
2.11.3.2	ViCell™ Counter	25
2.11.4	Kryokonservierung von Zellen.....	25
2.11.5	Präparation von Zellen für weiterführende Experimente	25
2.11.6	Generierung von Cisplatin-resistenten Zelllinien.....	25
2.11.7	Zytotoxizitätstest (MTT-Assay).....	26
2.11.8	Zellwachstum	27
2.11.9	Kombinationsversuche.....	27
2.12	Proteinchemische Methoden.....	27
2.12.1	Proteinisolation aus Zellen	27
2.12.1.1	für die 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	27
2.12.1.2	für die Western-Blot-Analyse	27
2.12.2	Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen..... (Bradford-Methode).....	28
2.12.3	2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.12.3.1	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	29
2.12.3.2	Äquilibrierung der IPG-Streifen	29
2.12.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	30
2.12.3.4	Färbung der Polyacrylamidgele	31
2.12.3.5	Geldokumentation der 2D-PAGE-Gele	31
2.12.3.6	Software-basierte Auswertung der 2D-PAGE-Gele	31
2.12.3.7	Extraktion von Proteinen aus 2D-PAGE-Gelen.....	32
2.12.4	MALDI-TOF Massenspektrometrie	32
2.12.5	Eindimensionale (1D)-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34

2.12.6	Immuno-Blot-Analyse (Western-Blot).....	35
2.12.7	Chemilumineszenz-Detektion	35
2.13	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.13.1	RNS-Isolierung mit TRIzol™	36
2.13.2	cDNS-Synthese mit reverser Transkriptase	36
2.13.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	36
2.13.4	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.13.5	Durchflusszytometrie	38
2.13.5.1	Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid (PI).....	38
2.13.5.2	Nachweis einer Caspase-3-Aktivierung	39
2.13.5.3	Oberflächenmarkeranalyse	40
2.14	Immunhistochemische Untersuchungen	41
2.14.1	Zytospins.....	41
2.14.2	Gewebeproben und immunhistochemische Analyse	41
Kapitel 3	Ergebnisse.....	42
3.1	Charakterisierung der verwendeten Keimzelltumorzelllinien.....	42
3.1.1	Wachstumsverhalten und Populationsverdopplung	42
3.1.2	Oberflächenmarkeranalyse	44
3.1.3	Charakterisierung der Cisplatin-sensitiven Keimzelltumor-Zelllinien auf Proteomebene	46
3.1.3.1	NCCIT und NTERA-2.....	46
3.1.3.2	NTERA-2 und 2102EP.....	49
3.1.3.3	NCCIT und 2102EP	50
3.1.3.4	Cellular Retinoic Acid Protein 1 (CRABP1).....	52
3.1.3.5	Vergleich der Seminomzelllinie TCam-2 mit den Embryonalkarzinom- ... Zelllinien NTERA-2, 2102EP und NCCIT	54
3.2	Cisplatin-induzierte Apoptose in Keimzelltumoren <i>in vitro</i>	57
3.2.1	Bestimmung der IC ₅₀ -Dosis von Cisplatin mit Hilfe des MTT-Assays ..	57
3.2.2	Molekulare Wirkung von Cisplatin auf Keimzelltumor-Zelllinien	58
3.2.2.1	Zellzyklusanalyse	58
3.2.2.2	Nachweis einer Caspase-3-Aktivierung	59
3.2.2.3	Western-Blot-Analyse zur Spaltung von PARP.....	60
3.2.3	Effekt einer Cisplatinbehandlung auf das Proteommuster von NTERA-2-2102EP-, NCCIT- und TCam-2-Zellen	62

3.2.4	Rolle des MAPK-Signalwegs in der Apoptoseinduktion bei Cisplatin- sensitiven Keimzelltumorzellen	66
3.3	Proteomvergleich der sensitiven und der resistenten Keimzelltumorzelllinien unter der Behandlung mit Cisplatin.....	68
3.3.1	Cisplatin-sensitive Zellen (unbehandelt) und Cisplatin-resistente Zellen (unbehandelt).....	68
3.3.2	Cisplatin-resistente Zellen (unbehandelt) und Cisplatin-resistente Zellen (IC ₅₀ -Dosis von Cisplatin).....	70
3.3.3	Cisplatin-sensitive (jeweilige IC ₅₀ -Dosis von Cisplatin) und Cisplatin- resistente Zellen (jeweilige IC ₅₀ -Dosis von Cisplatin).....	73
3.4	„Small molecule inhibitors“: Sunitinib und Temsirolimus	75
3.4.1	Bestimmung der IC ₅₀ -Dosis von Sunitinib und Temsirolimus mit MTT und Zellzählung.....	75
3.4.2	Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit Sunitinib und Temsirolimus ...	76
3.4.3	Sunitinib	77
3.4.3.1	Identifikation von differentiell exprimierten Proteinen bei NTERA-2- Zellen nach Behandlung mit Sunitinib.....	77
3.4.3.2	Expressionsanalyse von bekannten Zielproteinen von Sunitinib in KZT- Zelllinien.....	79
3.4.3.3	Effekt der Kombinationsbehandlung von Sunitinib und Cisplatin auf das Zellwachstum von KZT-Zelllinien in vitro.....	80
3.4.4	Temsirolimus.....	81
3.4.4.1	Identifikation von differentiell exprimierten Proteinen bei NTERA-2- Zellen nach Behandlung mit Temsirolimus	81
3.4.4.2	Expressionsanalyse von bekannten Zielproteinen von Temsirolimus in KZT-Zelllinien.....	83
3.4.4.3	Effekt der Kombinationsbehandlung von Temsirolimus und Cisplatin auf das Zellwachstum von KZT-Zelllinien in vitro	84
Kapitel 4 Diskussion.....		86
4.1	Allgemein	86
4.2	Die Analyse des Proteoms.....	87
4.3	Gemeinsamkeiten und Unterschiede der verwendeten KZT-Zelllinien .	90
4.4	Mechanismen und Proteine der Chemotherapieresistenz	93
4.4.1	Molekulare Chaperone.....	95
4.4.2	Proteine des Zytoskeletts.....	96
4.4.3	Annexine	97

4.4.4	Proteine des Redox-Metabolismus	97
4.4.5	Kalzium-bindende Proteine	98
4.5	„Small molecule inhibitors“: Sunitinib und Temsirolimus	100
	Kapitel 5 Zusammenfassung	102
	Literaturverzeichnis	104
	Danksagung	114
	Anhang	115

Abkürzungen

ad	Auffüllen auf (ein Volumen von)
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATRA	all-trans-Retinsäure
bp	Basenpaare (Nukleinsäuren)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHAPS	3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5´-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig)
DTT	3-Dithiothreitol
EC	embryonal carcinoma = Embryonalkarzinom
ECL	verbesserte Chemilumineszenz
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera = und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FKS	Fötale Kälberserum
for	forward; vorwärts
g	Gramm
ggf	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff; Salzsäure
IC	inhibitorische Konzentration
IHC	Immunhistochemie
IPG	immobilisierter pH-Gradient
kb	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
l	Liter
lag-	Verzögerungs-
log-	Logarithmische- oder Exponential-
ln	natürlicher Logarithmus
M	molar
m	milli-; -meter
μ	mikro-
mAb	monoklonaler Antikörper
max.	maximal
MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight
MeOH	Methanol
MilliQ	Reinstwasser
min	Minute(n)
mol	Mol
MW	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PI	Propidiumjodid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	reverse; rückwärts
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde(n)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
Su	Sunitinib
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
Tem	Temsirolimus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (engl.: unit)
u.a.	unter anderem
Ü/N	über Nacht

UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
WB	Western-Blot
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel
2D-PAGE	zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Englisches Glossar

accession	Zugriff
coverage	Sequenzabdeckung
fold change	Regulationsstärke
forward	vorwärts
primer	Oligonukleotid, das als Start-Fragment für eine DNS-Synthese dient
scatter	Streubereich
semi-dry	Halbtrocken
reverse	rückwärts
well	Loch/Schale in Gewebe-/Zellkulturplatte

Kapitel 1 Einleitung

1.1 Keimzellen und ihre Entwicklung beim Mann

Keimzellen, die auch als Gameten (Geschlechtszellen) bezeichnet werden, sind haploide Zellen, die der geschlechtlichen Fortpflanzung dienen, während diploide somatische Zellen für den Aufbau des Körpers verantwortlich sind. In der Keimbahnentwicklung entstehen Keimzellen aus sogenannten primordialen Keimzellen (Urkeimzellen), die beim Embryo in der fünften bis sechsten Woche gebildet werden (Surani 2001). Das Vorhandensein von primordialen Keimzellen kann über den Nachweis von spezifischen Proteinmarkern, wie OCT3/4 (*octamer-binding transcription factor 3/4*), AP (alkalische Phosphatase) und VASA geführt werden (Honecker et al. 2004b; Rajpert-De Meyts 2006). Die primordialen Keimzellen wandern während der Gastrulation (Embryogenese) aus dem Epiblast (Vorläufer der drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm) entlang der Mittellinie des Körpers bis zur Keimleiste, die in der weiteren Entwicklung die Gonaden (Keimdrüsen) bildet. In den Gonaden findet in Abhängigkeit vom Geschlecht des Embryos und der entsprechenden Mikroumgebung die Weiterentwicklung in die pluripotenten Keimzellen (Gametogenese) statt. Eine Voraussetzung für diese Wanderung ist u.a. die Anwesenheit des Stammzelloktors c-Kit (Besmer et al. 1993; Blume-Jensen et al. 2000). Beim Mann kann die Keimzellentwicklung nur stattfinden, wenn ein chromosomaler XY-Status und damit auch das SRY-Gen vorliegt, welches für den Transkriptionsfaktor *TDF* (*testis-determining factor*) kodiert (Shalet 2009). Bei Fehlen des Y-Chromosomes und damit bei Fehlen von *TDF* wird die Oogenese eingeleitet und ein weiblicher Phänotypus entsteht. Neben den Keimzellen sind zwei weitere Zelltypen ein wichtiger Bestandteil für die Gameto- und später Spermatogenese. Dies sind zum einen die Sertoli-Zellen, die ebenfalls wie die Keimzellen intratubulär lokalisiert sind und dort eine Stützfunktion haben. Zudem bilden sie die Blut-Hoden-Schranke, deren Aufgabe der Schutz der Spermien vor z.B. Giftstoffen ist. Eine weitere Funktion ist die Bildung von Inhibin, einem Protein, welches durch Interaktion mit FSH (follikelstimulierendes Hormon) die Spermatogenese reguliert (Simoni et al. 1999). Als dritter Zelltyp sind die Leydig-Zellen von Bedeutung, die im Interstitium (Zwischengewebe) des Hodens zu finden sind. Diese sind für die Testosteronbildung während der Embryogenese und nach Eintritt der Pubertät verantwortlich und somit auch für die Stimulation der

testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) bezeichnet und wurde erstmals 1972 von Skakkebaek beschrieben. CIS-Zellen repräsentieren phänotypisch neoplastisch entartete Gonozyten (primordiale Keimzellen) (Jorgensen et al. 1995) und sind durch Expression embryonaler Stammzellmarker wie alkalische Phosphatase (AP), c-Kit, OCT3/4, NANOG, AP-2 γ und UTF1 charakterisiert (Oosterhuis et al. 2005). Lokalisiert sind CIS-Zellen in der Basalmembran der Tubuli seminiferi in direkter Nachbarschaft zu den Sertoli-Zellen (Oosterhuis et al. 2003).

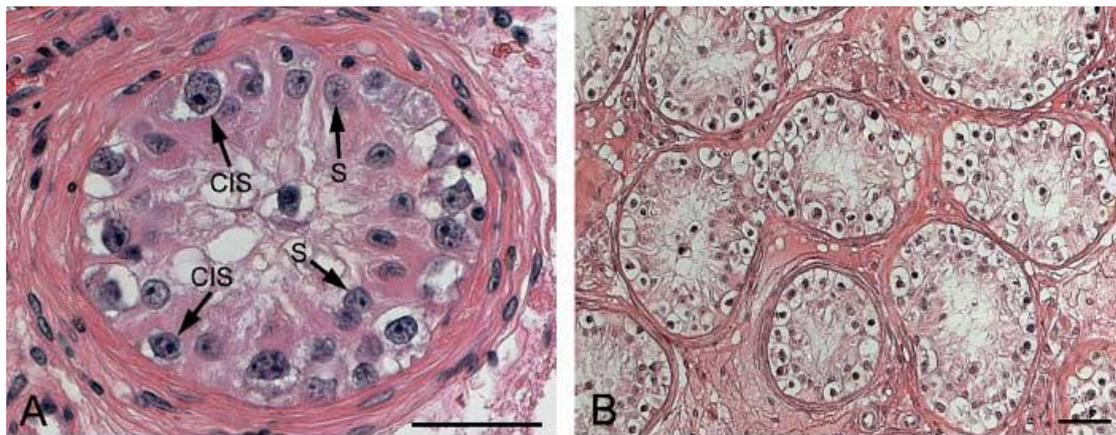


Abbildung 2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer Hodenbiopsie zur Verdeutlichung von CIS-Zellen. (A) Sichtbar ist ein Tubulus seminiferus mit der Kennzeichnung von CIS-Zellen (CIS-Pfeile) und Sertoli-Zellen (S-Pfeile). (B) Darstellung einer größeren Anzahl von Tubuli seminiferi (aus Hoei-Hansen et al. 2005).

1.3 Histologie der Typ II-Keimzelltumoren

Histologisch und auch klinisch werden Typ II-Keimzelltumoren in Seminome und Nicht-Seminome unterteilt (Chaganti et al. 2000; Honecker et al. 2004a). Seminome sind in 50% aller Keimzelltumoren vertreten, während Nicht-Seminome 40% ausmachen. Die restlichen 10% sind gemischte KZT die sowohl aus einer Seminom-, als auch aus einer Nicht-Seminom-Komponente bestehen. Morphologisch betrachtet bestehen Seminome aus Zellen, die den primordialen Keimzellen und CIS-Zellen gleichen und dem Tumor ein einheitliches Erscheinungsbild verleihen. Zudem kann eine erhöhte Expression von Beta-Humanes-Choriongonadotropin (beta-HCG) nachgewiesen werden. Dem gegenüber stehen die Nicht-Seminome, die aus histologisch verschiedenen Komponenten bestehen, wie das Embryonalkarzinom, das Teratom, der Dottersacktumor und das Chorionkarzinom. Als Unterscheidungsmerkmal zwischen Seminomen und Nicht-Seminomen kann die Expression von AFP (alpha-Foetoprotein) bei Dottersacktumoren und CD30 bei Embryonalkarzinomen herangezogen werden. Im Gegensatz zu Nicht-Seminomen

produzieren Seminome AFP nicht und zeigen deshalb auch keine erhöhten Serumwerte von AFP (Horwich et al. 2006).

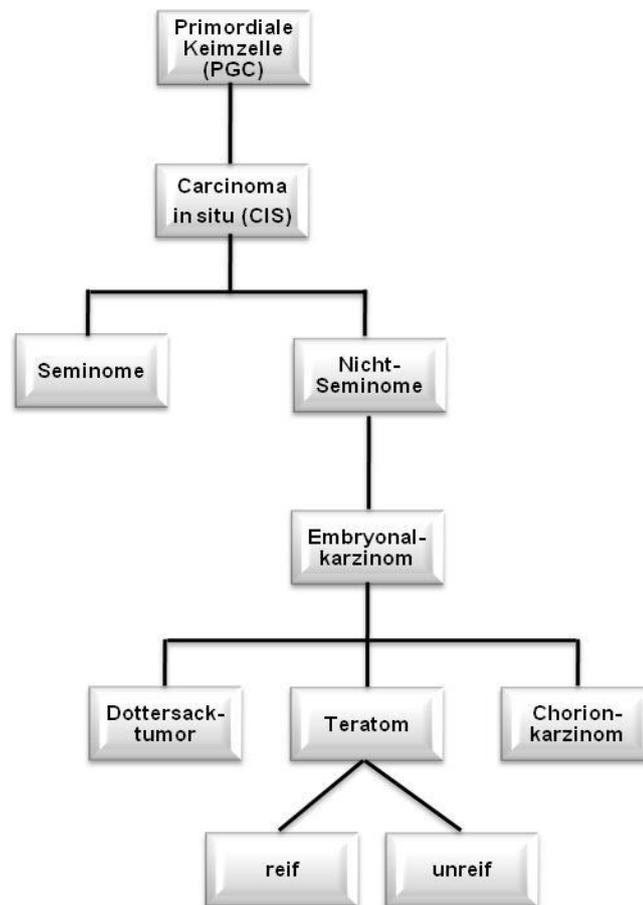


Abbildung 3: Entwicklungsstufen des testikulären Keimzelltumors ausgehend von einer primordiales Keimzelle (PGC).

1.4 Extragonadale Keimzelltumoren (EGKZT)

Neben den Gonaden (Hoden bzw. Ovarien) können Keimzelltumoren auch an außerhalb der Gonaden gelegenen Stellen entlang der Mittellinie des Körpers auftreten. Diese sogenannten extragonadalen Keimzelltumoren haben ihren vermuteten Ursprung in der Wanderungstrecke der primordiales Keimzellen während der Embryogenese (Wylie 1999) und treten in rund 5% aller Fälle von Keimzelltumoren auf. Das Mediastinum (Mittelfellraum), das Retriperitoneum („hinter dem Bauchfell“) oder das zentrale Nervensystem (besonders die Zirbeldrüse und die Neurohypophyse) sind hierbei die am häufigsten betroffenen Regionen. Histologisch identisch wie gonadale KZT werden extragonadale KZT in Seminome und Nicht-Seminome klassifiziert, wobei Teratome mit 43% den größten Anteil (gefolgt von den

Seminomen) bei mediastinalen KZT haben (McKenney et al. 2007). Als Ursprung der extragonadalen Keimzelltumoren sind bei retroperitonealer Lokalisation zum einen fehllokalisierte primordiale Keimzellen möglich, als auch Metastasen gonadaler Tumoren, die im Hoden nicht mehr nachweisbar sind. Bei extragonadalen Tumoren im Mediastinum werden dagegen ausschliesslich fehlgewanderte primordiale Keimzellen mit Apoptosedefekt als Ursprung vermutet (Chaganti et al. 1994). Die Vermutung, dass EGKZT ebenso wie gonadale KZT eine aberrante Keimzelle als Ursprungszelle haben, wird zytogenetisch durch den Verlust des langen Arms, wie auch die multiplen Kopien des kurzen Arms von Chromosom 12 gestützt (Chaganti et al. 2000).

1.5 Charakteristika von Keimzelltumoren

Für die Identifikation von testikulären Keimzelltumoren stehen heutzutage diverse Proteinmarker zur Verfügung, wie z.B. der Transkriptionsfaktor OCT3/4, der auch unter der Bezeichnung POU5F1 (POU class 5 homeobox 1) bekannt ist. OCT3/4 ist spezifisch nachweisbar in CIS-Zellen, Seminom- und Embryonalkarzinomzellen, während Teratome, Dottersacktumore und Chorionkarzinome negativ für diese Proteine sind (Looijenga et al. 2003a). Dieses Protein ist essentiell für eine normale Embryonalentwicklung und hat regulatorische Funktionen in der embryonalen Stammzelle. Die Kombination von OCT3/4 mit den Proteinen SOX2 (SRY-box 2) und NANOG ist charakteristisch für ein Embryonalkarzinom (de Jong et al. 2005). Alle drei Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die u.a. für die Selbsterneuerung von Stammzellen und die Pluripotenz verantwortlich sind.

Ein weiterer interessanter Faktor ist das Protein c-Kit (CD117, Stammzellfaktor-Rezeptor), das in der Proliferation und der Differenzierung von Stammzellen eine wichtige Rolle spielt. CIS-Zellen, Seminome und primordiale Keimzellen weisen eine positive Expression dieses Proteins auf (Rajpert-De Meyts et al. 1994).

In der klinischen Diagnostik werden insbesondere Tumormarker wie Alpha-Foetoprotein (AFP), Beta-Humanes-Choriongonadotropin (beta-HCG) und Laktatdehydrogenase (LDH) berücksichtigt.

Auf zytogenetischer Ebene sind diverse Über-, bzw. Unterrepräsentationen von Chromosomen bei testikulären Typ II-Keimzelltumoren bekannt. Eine Zunahme des kurzen Arms von Chromosom 12 ist z.B. charakteristisch für invasive Typ II-Keimzelltumoren. Dieses sogenannte Isochromosom 12p (i(12p)n ist aber auch in Seminomen und Nicht-Seminomen in extragonadalen Lokalisationen nachweisbar

(Looijenga et al. 2003b). In CIS-Zellen konnte diese chromosomale Veränderung dagegen nicht nachgewiesen werden (Summersgill et al. 2001). Weitere für TKZT typische chromosomale Aberrationen konnten am langen und kurzen Arm von Chromosom 1, dem langen Arm von Chromosom 6 und am Chromosom 20 nachgewiesen werden, sowie Veränderungen bei den Geschlechtschromosomen.

1.6 Risikofaktoren

Neben einer Anamnese von Kryptorchidismus (Lageanomalie des Hodens) und einer familiären Prädisposition (Gundy et al. 2004) gelten auch weitere Syndrome, die mit Infertilität assoziiert sind, wie z.B. das Klinefeltersyndrom, als bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung von testikulären Keimzelltumoren. Des Weiteren werden exogene Einflüsse wie Chemikalien, virale oder bakterielle Infektionen, ein Östrogenüberschuss in der frühen Schwangerschaft oder auch ein Trauma des Hodens als mögliche Ursachen angenommen.

1.7 Cisplatin und die Bildung von Cisplatin-Addukten

Die zytostatische Wirkung von Cisplatin (*cis*-Diamindichlorplatin(II)) wurde im Jahre 1961 von Barnett Rosenberg eher zufällig bei einem Experiment mit *Escherichia coli*-Bakterien entdeckt (Rosenberg 1973). Das eigentliche Ziel des Versuchs war das Wachstum der Bakterien in einer ammoniumchloridhaltigen Nährlösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes zu beobachten, welches mit Hilfe einer Platinelektrode erzeugt wurde. Dabei entstand an dieser Elektrode mittels Oxidation Cisplatin, woraufhin die *E.coli*-Bakterien ihre Teilungsfähigkeit verloren. Die Reaktion auf molekularer Ebene wird folgendermaßen beschrieben, dass in wässrigen Lösungen die beiden Chloridionen vom zentralen Platin dissoziieren und zwei Hydroxidionen, die dort binden, Cisplatin in einen aktiven Status transformieren (Pinto et al. 1985). Erst dieses aktivierte Cisplatin hat die Fähigkeit mit nukleophilen Gruppen der DNS, der RNS, von Proteinen oder thiolgruppenhaltigen Molekülen (z.B. Glutathion) Addukte zu bilden (Pascoe et al. 1974). Dabei entstehen zum einen Vernetzungen benachbarter Basenpaare innerhalb eines DNS-Stranges (1,2-Intrastrang-Addukte), Vernetzungen über ein Basenpaar hinweg und innerhalb eines DNS-Stranges (1,3-Intrastrang-Addukte), Vernetzungen benachbarter Basenpaare beider DNS-Stränge (1,2-Interstrangvernetzungen), aber auch intermolekulare Addukte von DNS und Proteinen über Cisplatin, sowie Mono-Addukte (Eastman 1983; 1986).

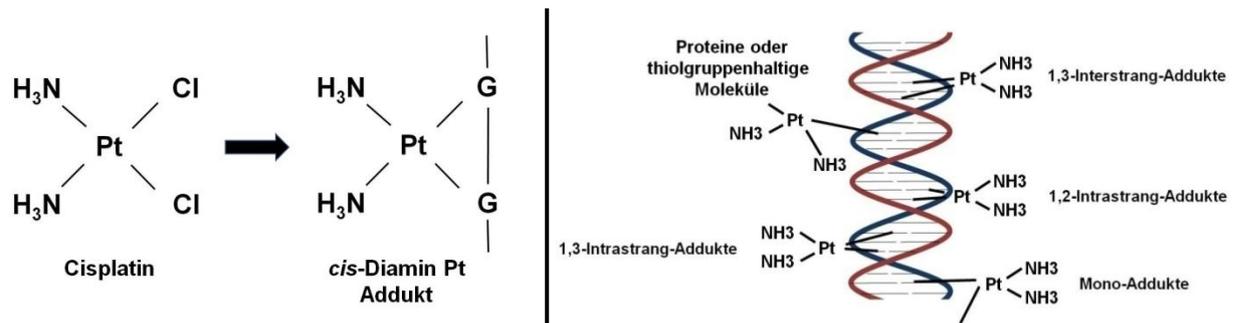


Abbildung 4: Cisplatin und Cisplatin-DNS-Addukte

Links: Strukturformel von Cisplatin; ungebunden und als Cisplatin-DNS-Addukt; Rechts: Darstellung der verschiedenen Vernetzungsmöglichkeiten von Cisplatin mit der DNS, sowie anderen Proteinen oder Molekülen.

1.8 Cisplatin und Keimzelltumoren

Keimzelltumoren sind durch den Einsatz von Cisplatin-haltiger Kombinationschemotherapie in der Tumorthherapie seit 1974 zu einer der am erfolgreichsten zu behandelnden Tumorentitäten geworden. Sie sind 2-4mal sensitiver gegenüber zytostatischen Substanzen als viele andere Tumorzellen (Oosterhuis et al. 1984; Parris et al. 1988). Auch andere Tumoren, wie Kopf-Hals-Tumoren, Bronchialkarzinome und das Zervixkarzinom werden mit Cisplatin behandelt, das das am meisten verwendete Zytostatikum darstellt (Chaney et al. 2004; Chaney et al. 2005).

Cisplatin-basierte Therapien sind neben der Radiotherapie und der Chirurgie heutzutage Standard bei der Behandlung von Keimzelltumoren (Schmoll et al. 2004). Im Normalfall bestehen diese Kombinationen aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin (PEB) oder Ifosfamid (PEI) und erzielen Heilungsraten von über 80% beim metastasierten Keimzelltumor (Williams et al. 1987). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Heilungschance von der Histologie, dem Grad der Metastasierung (Stadium), sowie von der Höhe der Tumormarker abhängig ist. So haben z.B. Patienten mit einer guten Prognose eine 90%ige Chance auf Heilung (Jones et al. 2003). Der embryonale Ursprung von testikulären Keimzelltumoren wird als Ursache für die hohe Sensitivität gegenüber DNS-zerstörenden Substanzen (Bestrahlung und Chemotherapie) angesehen (Hong et al. 2004), wobei Seminome höchst sensitiv auf beide Behandlungsformen reagieren, während Nicht-Seminome weniger auf Strahlentherapie, aber hochsensibel auf Chemotherapie ansprechen.

1.9 Wirkmechanismen bei Sensitivität gegenüber Cisplatin

Die Applikation von Cisplatin erfolgt intravenös in physiologischer Kochsalzlösung, wobei hier die hohe Chloridionenkonzentration von über 100 mM die beiden Chlor-Liganden des Cisplatin stabilisiert. In diesem ungeladenen und inaktiven Zustand passiert das Cisplatinmolekül die Zellmembran mittels Diffusion, kann aber auch über eine aktive Aufnahme durch Membranproteine oder über Transmembranpumpen in das Zytosol gelangen. Hier wurde eine mögliche Beteiligung am Transmembran-Transport von Kupferionen gezeigt (Ishida et al. 2002). Dagegen ist das vollständige Fehlen von Exportpumpen mit einer spezifischen Cisplatin-Affinität in der Zellmembran ein möglicher Bestandteil der Prozesse, der für die Chemotherapiesensitivität verantwortlich ist. Die in der Zelle vorliegende geringere Chloridionenkonzentration führt dann zur Hydrolyse und somit zur Aktivierung von Cisplatin (siehe 1.7). Durch die Bindung des nun aktivierten Cisplatins an die DNS, RNS und thiolgruppenhaltige Proteine werden, wie zuvor beschrieben, Addukte ausgebildet, auf die die Zelle mit verschiedenen Reparaturmechanismen reagiert. Obwohl nur ca. 1% des Cisplatin mit der genomischen DNS reagiert, wird die zytotoxische Wirkung in erster Linie auf die dabei entstehenden Schäden zurückgeführt (Eastman 1990).

Die Detektion von DNS-Schäden erfolgt über sogenannte Erkennungsproteine (*damage recognition proteins*), die über den Transkriptionsfaktor p53 einen Zellzyklusarrest initiieren, der der Zelle Zeit gibt, Reparaturmechanismen durchzuführen. Das normalerweise instabile p53 wird dabei über Phosphorylierungen posttranslational stabilisiert, akkumuliert in der Zelle und induziert die Produktion von p21 (CDK-Inhibitor 1). Dieses Protein inhibiert sowohl den CyclinD/Cdk4/6-Komplex als auch den CyclinE/Cdk2-Komplex, die für die Freisetzung der E2F-Transkriptionsfaktor-Familie verantwortlich sind. Diese Transkriptionsfaktor-Familie ist wiederum für die Weiterführung des Zellzyklus verantwortlich. Nach erfolgreicher Reparatur nimmt die Konzentration von p53 in der Zelle wieder ab, die Produktion von p21 wird eingestellt und die Zelle geht wieder in den normalen Zellzyklus. Es konnte gezeigt werden, dass TKZT ein höheres Expressionslevel von Wildtyp-p53 aufweisen als andere Tumoren, bei denen p53 zudem noch in über 50% der Fälle mutiert ist (Heimdal et al. 1993; Peng et al. 1993). Dieses Ergebnis unterstützt die Tatsache der außergewöhnlichen guten Chemosensitivität (Kerley-Hamilton et al. 2005). Die Reparatur der DNS-Schäden erfolgt in erster Linie mit Hilfe des

„*Nucleotide-Excision-Repair* (NER)“-Systems (Reed 1998), aber auch mit Hilfe von Reparaturmechanismen wie dem „*Base Excision Repair* (BER)“ und „*Mismatch Repair* (MMR)“. So konnte nachgewiesen werden, dass TKZT eine geringere DNS-Reparatur-Kapazität haben, die u.a. mit einer geringeren Proteinexpression bestimmter Proteine des NER assoziiert ist (Koberle et al. 1997; Welsh et al. 2004). Obwohl der Großteil der DNS-Schäden durch den NER behoben wird, können die Proteine des „*Mismatch-Repair*“-Systems ebenfalls DNS-Addukte spezifisch binden und reparieren. Sobald diese Proteine aber in ihrer Funktion eingeschränkt sind, entwickelt sich eine Resistenz gegen Cisplatin (Aebi et al. 1996; Fink et al. 1996) und es kann eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) nachgewiesen werden. Untersuchungen bei refraktären TKZT wiesen in 20-40% der Fälle eine MSI auf, so dass hier eine mögliche Rolle in der Resistenzentwicklung vermutet wird (Mayer et al. 2002; Honecker et al. 2009).

Ist eine vollständige Reparatur der DNS-Schäden nicht möglich, wie es bei Keimzelltumoren vermutlich der Fall ist, so werden die Produktion und die Akkumulation von p53 nicht gestoppt und es folgt eine Aktivierung des intrinsischen Caspase-9/Apoptosom-Signalwegs. Dieser führt dann zur Induktion des programmierten Zelltods, der Apoptose (Trimmer et al. 1998; Zamble et al. 2002). Neben dem intrinsischen Apoptosesignalweg, in den u.a. p53, Proteine der Bcl-2-Familie und Caspase-9 eingebunden sind, spielt auch der extrinsische Apoptosesignalweg eine Rolle bei der Chemosensitivität. Auf diesem Weg erfolgt über das Fas/FasL-System eine Ligandenbindung von externen Faktoren (z.B. Zytokinen und Wachstumsfaktoren) an sogenannte Todesrezeptoren, die im weiteren Verlauf dann über die Aktivierung von Caspase-8 die Apoptose induzieren. Die Effekte der Bildung von Cisplatin-RNS-Addukten ist bislang dagegen nicht vollständig aufgeklärt, hat aber anscheinend keinen größeren Effekt auf das Zellschicksal. Als ein weiterer Mechanismus zur Erklärung der Chemosensitivität ist die geringe Detoxifikationsfähigkeit von Keimzelltumorzellen zu benennen. Thiolgruppenhaltige Proteine wie Glutathion und Metallothionein besitzen die Fähigkeit zur Bindung und Inaktivierung von Cisplatin. Untersuchungen zum Akkumulationsverhalten von Cisplatin zeigten im Vergleich zwischen TKZT-Zelllinien und Cisplatin-resistenten Kolonkarzinom-Zelllinien keinen signifikanten Unterschied. Zudem wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Glutathion-Konzentration im Vergleich zu anderen Tumoren bei KZT sehr gering ist (Sark et al. 1995). Die Expression von

Metallothionein und die Glutathion-S-Transferase dagegen wies vergleichbare Level zu anderen Tumoren auf (Masters et al. 1996; Mayer et al. 2003a).

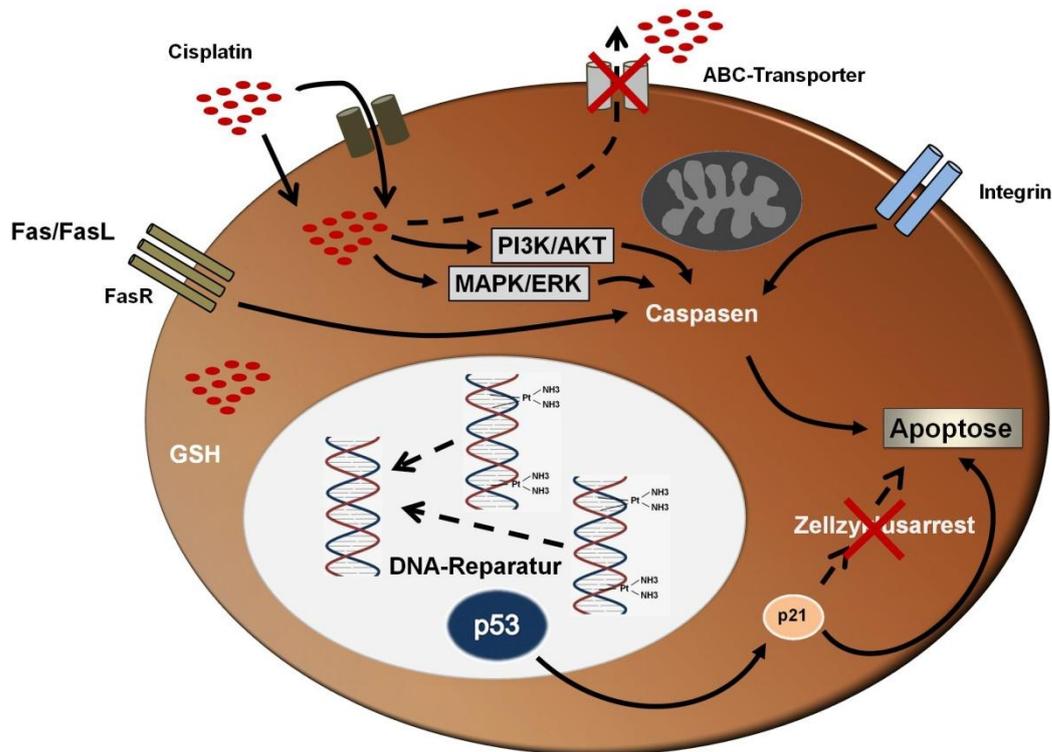


Abbildung 5: Übersichtsdarstellung zur Verdeutlichung von Faktoren und Mechanismen, die möglicherweise eine Rolle bei der Sensitivität gegenüber Cisplatin spielen.

1.10 Wirkmechanismen bei Resistenz gegenüber Cisplatin

Trotz der bereits erwähnten hohen Heilungsrate bei TKZT tritt in 20% aller Fälle eine intrinsische oder eine erworbene Chemotherapieresistenz auf. Daraus resultiert eine sehr schlechte Prognose hinsichtlich Therapiefähigkeit und Chance auf Heilung. Mögliche Ursachen in der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin sind in allen zellulären Vorgängen zu suchen, die auch für die Sensitivität verantwortlich sind. Als mögliche Mechanismen der Resistenzentwicklung sind somit verschiedene Szenarien denkbar.

Ist die Aufnahme bzw. das Eindringen von Cisplatin in die Zelle nicht möglich, so kann eine Resistenz bereits durch das Nicht-Erreichen des Wirkortes entstehen. Dies kann zum einen durch das Fehlen von Transportproteinen wie z.B. CTR1, das normalerweise für die Aufnahme von Kupfer in die Zelle verantwortlich ist, geschehen. Beim Ovarialkarzinom konnte außerdem gezeigt werden, dass durch eine vermehrte Einlagerung von Kollagen in die Zellmembran eine Störung der

passiven Diffusion folgt (Sherman-Baust et al. 2003). Unter diesem Aspekt ist auch ein möglicherweise erhöhter Efflux z.B. über ABC-Transporter oder „*Multi-drug-resistance*“ (MDR)-Proteine zu berücksichtigen (Borst et al. 2000). Allerdings konnten bei fünf Exportproteinen der MDR-Familie (MRP1, MRP2, PGP, BCRP und LRP) keine signifikanten Unterschiede zwischen sensitiven und resistenten TKZT-Zellen festgestellt werden (Mayer et al. 2003a).

In 1.9 wurde bereits die Detoxifikationsfähigkeit durch Proteine wie Glutathion und Metallothionein beschrieben. Eine mögliche Resistenzentwicklung wäre gegeben, wenn die Bindung von Cisplatin durch diese Proteine gehemmt oder sogar völlig inhibiert wäre, oder zumindest ein geringerer Expressionslevel nachgewiesen werden könnte. Wie bereits zuvor erwähnt, konnten jedoch zwischen sensitiven und refraktären TKZT-Zelllinien und Tumorproben keine Unterschiede in der Expression von Metallothionein und der Glutathion-S-Transferase gefunden werden (Masters et al. 1996; Mayer et al. 2003a). Weiterhin ist der Einschluss von Cisplatin in Einschlußkörperchen (*vaults*) denkbar. Beim Transport in den Nukleus und bezüglich der „Erreichbarkeit“ der DNS konnten allerdings keine besonderen Differenzen im Vergleich zu anderen Tumoren nachgewiesen werden (Masters et al. 2003).

Eine weitere Erklärung der Chemoresistenz ist eine erhöhte Toleranz gegenüber DNS-Schäden, die durch die Addukt-Bildung mit Cisplatin entstanden sind. Dazu kann es durch eine fehlerhafte Erkennung dieser Schäden, sowie über eine verstärkte Initiierung und Durchführung der DNS-Reparatur, in erster Linie durch das „*Nucleotide-Excision-Repair*“-System (de Laat et al. 1999), kommen. Als Folge dieser Toleranz wird die Initiierung des programmierten Zelltods verhindert und so ein Überleben der Zelle trotz zytostatischer Behandlung gewährleistet. Kommt es trotzdem zur Induktion von Apoptose, können Änderungen in der Proteinexpression oder auch Defekte bzw. Mutationen innerhalb dieser Signalkaskade für ein Scheitern des Apoptose-Programms verantwortlich sein. Hierzu gehören z.B. die Überexpression anti-apoptotischer Proteine, wie Proteine der Bcl-2-Familie oder eine Störung der Caspase-9-Funktion (Mueller et al. 2003).

Weiterhin ist die Regulation und Expression des Transkriptionsfaktors p53 und seine Rolle bei einer Resistenzentwicklung bei TKZT Gegenstand diverser Untersuchungen. Ein Vergleich zwischen der TKZT-Zelllinie NTERA-2 mit einem funktionellen p53 und der Zelllinie NCCIT mit einem mutierten p53 konnten keine signifikanten Unterschiede in der Sensitivität nachweisen. Auch konnte eine

Inaktivierung von p53 in der Zelllinie NTERA-2 keine Cisplatin-Resistenz auslösen (Burger et al. 1999). Demnach ist der p53 Status scheinbar nicht bestimmend für die Resistenzentwicklung (Masters et al. 2003).

Als weitere mögliche Ursachen für die Resistenzentwicklung werden noch weitere Punkte diskutiert. Hierzu zählt zum einen eine vermehrte Expression oder die Aktivierung von Hitzeschockproteinen. Diese verleihen der Zelle durch die Stabilisierung zellulärer Proteine eine erhöhte Toleranz gegenüber Stress auslösenden Faktoren, zu denen auch die Behandlung mit einer zytotoxischen Substanz gehört. Eine Interaktion des Hsp70 (*Heat shock protein 70*) mit bestimmten Proteinen der Apoptose-Kaskade kann beispielsweise die gesamte Apoptose blockieren (Saleh et al. 2000; Ravagnan et al. 2001). Untersuchungen von Schenk zeigten einen möglichen Zusammenhang zwischen Sensitivität bzw. Resistenz von TKZT und dem Level der Serine/Arginin-reichen proteinspezifischen Kinase (SRPK1) (Schenk et al. 2004).

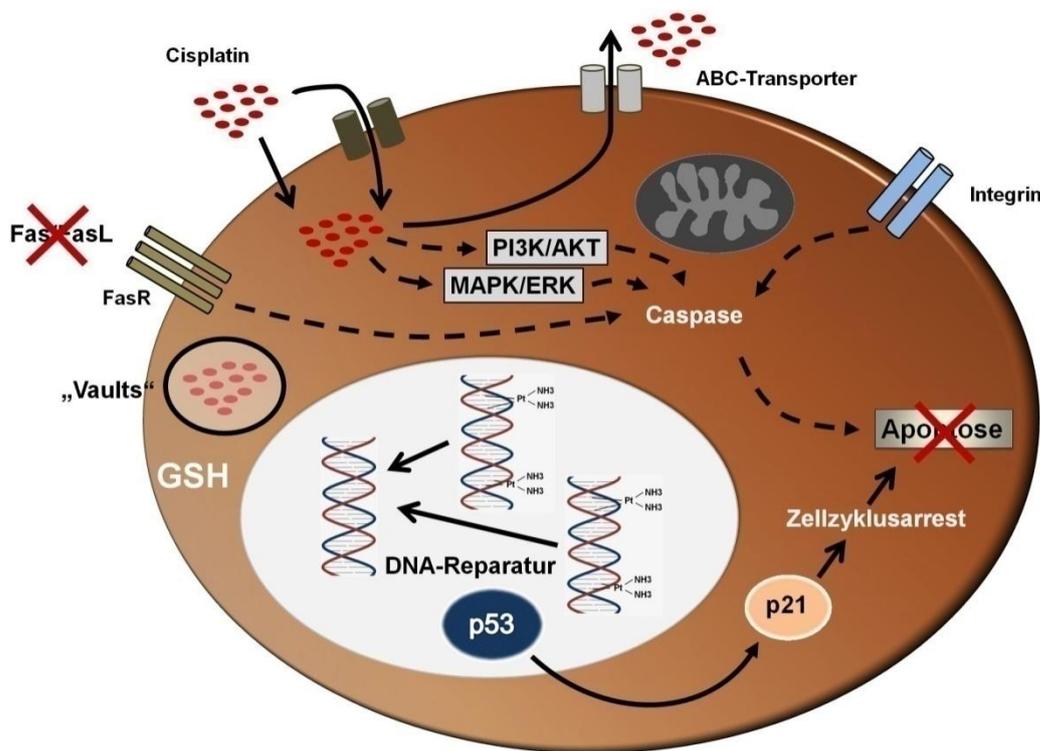


Abbildung 6: Übersichtsdarstellung zur Verdeutlichung von Faktoren und Mechanismen, die möglicherweise eine Rolle bei der Resistenz gegenüber Cisplatin spielen.

1.11 Untersuchungen zu Cisplatin-unabhängigen Therapieansätzen mit „small molecule inhibitors“

Trotz der hohen Heilungsrate durch Cisplatin bei metastasierten Keimzelltumoren, erleiden doch 10-30% aller Patienten einen Rückfall aufgrund einer nicht vollständigen Remission oder einem Rezidiv. Da die genauen Mechanismen der Sensitivität bzw. der Resistenz von Cisplatin bis heute nicht vollständig geklärt werden konnten, ist die Untersuchung neuer zielgerichteter Medikamenten mit alternativen zellulären Angriffspunkten ein wichtiger Schritt, um Wirkansätze zu identifizieren und um neue Therapiestrategien („targeted therapy“) zu entwickeln. Hierbei sind insbesondere alternative Therapieansätze mit sogenannten „small molecule inhibitors“ interessant, die auf molekularer Ebene angreifen (Ebbing et al. 2008; Riese et al. 2009; Schrader et al. 2009). Dazu gehören Substanzen, wie z.B. Sunitinib, Temsirolimus und Everolimus. Im klinischen Alltag wurden bereits Studien zur Wirksamkeit von Sunitinib bei Cisplatin-refraktären Keimzelltumoren durchgeführt, davon eine unter der Leitung der Onkologie des UKE Hamburg und der „Deutschen Hodentumorstudienengruppe“, die derzeit ausgewertet wird. Eine weitere Studie unter der Leitung von D. Feldman am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center ist bereits publiziert (Feldman et al. 2009). Eine Studie mit einem mTOR-Inhibitor, Everolimus, in derselben Indikation ist derzeit in Vorbereitung.

In dieser Arbeit wurde der Effekt einer Behandlung mit Sunitinib bzw. Temsirolimus auf Keimzelltumorzelllinien primär auf Proteomebene untersucht.

1.11.1 Sunitinib (SU11248, Sutent®)

Sunitinib ist ein Multi-Kinase-Inhibitor, der zur Behandlung Imatinib-resistenter gastrointestinaler Stromatumore (GIST) und metastasierter Nierenzellkarzinome eingesetzt wird. Durch die Bindung von Sunitinib an Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*), FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*), RET (*rearranged during transfection protooncogen*) und c-Kit werden zelluläre Prozesse wie die Zellproliferation (Chow et al. 2007) und die Angiogenese (Mendel et al. 2003) gehemmt. Sowohl *in vivo*-, als auch *in vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass Sunitinib über eine Inhibition der STAT3- und AKT-Signalwege bei Nierenzellkarzinomzellen und Medulloblastomen Apoptose induziert und das Wachstum stoppt kann (Yang et al. ; Xin et al. 2009).

1.11.2 Temsirolimus (CCI-779, Torisel®)

Ein wichtiger Kontrollpunkt in der Zelle, der insbesondere an der Steuerung der Zellproliferation, der Angiogenese, dem Zellzyklus und der Zellteilung beteiligt ist, ist der Enzymkomplex mTORC-1 (*mammalian target of rapamycin complex-1*). Die Regulation und Interaktion mit mTOR erfolgt durch einzelne Proteine oder auch durch Signalkaskaden, wie z.B. PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oder dem Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/AKT Signalweg. Mutationen, die diese Proteine betreffen, resultieren in einer gesteigerten Aktivität von mTOR und somit auch in einer vermehrten Zellproliferation und Angiogenese.

Rapamycin (Sirolimus), ein makrolytisches Lacton aus *Streptomyces hygroscopicus* mit fungiziden, immunsuppressiven und wachstumshemmenden Eigenschaften, wurde in den frühen 80er Jahren des 20. Jahrhunderts als antikanzerogene Substanz entdeckt (Douros et al. 1981). Temsirolimus ist ein wasserlösliches Esterderivat von Rapamycin, welches bereits in der Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom eingesetzt wird. Die Inhibition des mTOR-Proteins durch Temsirolimus resultiert u.a. in der Hemmung des Zellzyklus und der anschließenden Induktion des Zelltods (Apoptose). Funktionell bildet Temsirolimus mit dem Immunophilin FKBP-12-Protein einen Komplex, der an mTOR bindet und so die Aktivität des Proteins inhibiert (Hay et al. 2004). Für die Behandlung von metastasiertem Nierenzellkarzinom wurde Temsirolimus 2007 von der „US Food and Drug Administration“ (FDA) und der „European Medicines Agency“ (EMA) zugelassen.

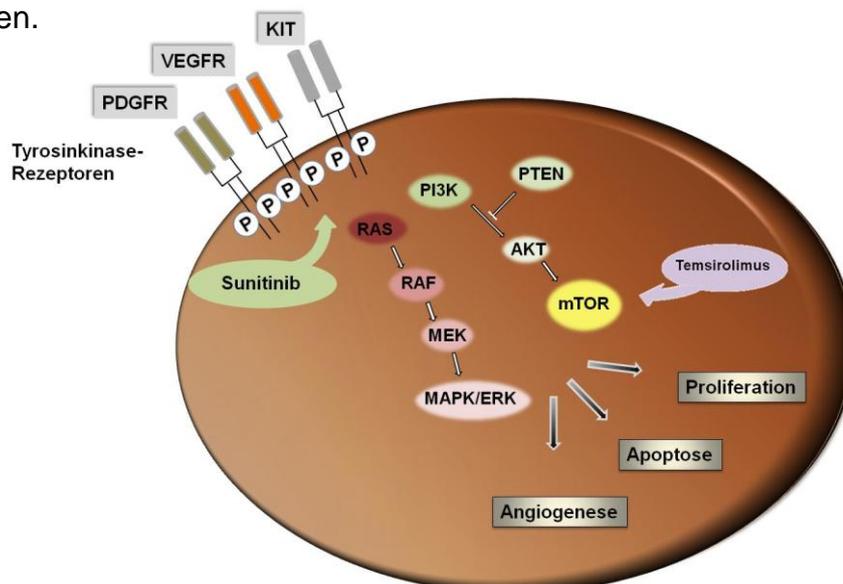


Abbildung 7: Schematische Darstellung der zellulären Angriffspunkte von Sunitinib und Temsirolimus.

1.11 Proteom und Proteomics

Unter dem Begriff „Proteom“, der erstmals 1994 von Marc Wilkins geprägt wurde, wird die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle vorhanden sind, definiert. Das Proteom ist entgegen dem Genom hochgradig dynamisch und variiert abhängig von den physiologischen und pathologischen Zuständen eines Organismus. So unterscheidet sich die Proteinzusammensetzung verschiedener Gewebe- und Zelltypen sowohl qualitativ wie auch quantitativ und unterliegt Schwankungen abhängig von Parametern wie z.B. Alter, Geschlecht, Ernährungszustand, Lebensstil, Medikation und Tagesrhythmus. Die Analyse des Proteoms komplettiert neben den Genom- und Transkriptomanalysen das Gesamtbild eines Organismus auf molekularer Ebene. So können Änderungen in der Translation, die abhängig vom Zell- und Gewebetyp sind, wie posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierungen, Glykosylierungen oder Acetylierungen) mittels einer Proteomanalyse untersucht werden.

Der Begriff „Proteomics“ umfasst die praktische und theoretische Analyse des Proteoms. Dazu gehören in erster Linie Methoden wie die 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die die Auftrennung der Proteine ermöglicht und die anschließende visuelle und softwareunterstützte Bildanalyse, um Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den zu analysierenden Proteinproben zu detektieren. Die weiterführende Identifizierung wird dann mit Hilfe der Massenspektrometrie durchgeführt, woran sich eine Datenbankrecherche, z.B. mit SwissProt und Mascot, anschließt.

1.12 Ziel der Arbeit

Das Verständnis der tumorbiologischen Mechanismen, die einerseits der generell hohen Cisplatin-Sensitivität von TKZT zu Grunde liegen und andererseits der Faktoren, die die Resistenz verursachen, ist von besonderem Interesse, um das Therapiemanagement für Tumorpatienten zu verbessern. Die Ursachen des Therapieversagens, das fast ausschließlich bei Patienten mit Nicht-Seminomen beobachtet wird, sind bisher ungeklärt. Daher ist die Aufdeckung der relevanten Faktoren und Mechanismen, die bei resistenter Erkrankung auftreten, unabdingbar, um die Heilungsaussichten der meist jungen Patienten zu verbessern.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, auf der Ebene der Proteine, u.a. mittels hochauflösender 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der Massenspektrometrie, molekulare Faktoren, die im Rahmen der zytostatischen Behandlung von Keimzelltumorzelllinien eine Rolle spielen, zu identifizieren. Die Untersuchungen wurden hierzu in drei Stufen gegliedert.

Die erste Stufe umfasste die Analyse der Mechanismen der primär hohen Chemotherapiesensitivität. Hierzu wurden Zelllinien mit Cisplatin in einer apoptoseinduzierenden Dosis behandelt. Über den Vergleich der Proteinexpressionsprofile dieser behandelten Zellen mit denen der unbehandelten Zellen, sollten die für die Apoptoseinduktion relevanten Faktoren und Mechanismen identifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden mit der Behandlung von Zelllinien mit subletalen Dosen Cisplatin chemoresistente Tochterzelllinien erzeugt. Im Anschluss wurden diese resistenten Zelllinien mit den parentalen Zelllinien verglichen, um Mechanismen zu identifizieren, die beim Verlust der inherent hohen Chemosensitivität von Keimzelltumoren auftreten können.

In einem dritten Schritt erfolgten dann noch weitere Untersuchungen mit sogenannten „neuen“ Substanzen, wie Sunitinib und Temsirolimus, an den Cisplatin-sensitiven wie –resistenten Zelllinien. Als Ergänzung zu den bis dahin gefundenen Ergebnissen wurde abschließend im Einzelnen ein genaueres Augenmerk auf interessante Kandidaten aus den Proteomanalysen gelegt und diese mittels Western Blot-Analyse näher untersucht.

Kapitel 2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
2D Elektrophorese-Anlage	Protean Plus	BIO-RAD
2D-PAGE-Scanner	Densitometer GS-800	BIO-RAD
Agarose-	Mini Sub Cell GT	BIO-RAD
Gelelektrophoresekammer	Wide Mini Sub Cell GT	BIO-RAD
Blotkammer	Trans-Blot SD SemiDry Transfer Cell	BIO-RAD
Brutschrank		Heraeus
Ettan™ Digester		GE Healthcare
Ettan™ SpotPicker		GE Healthcare
Fokussierungskammer	PROTEAN IEF cell	BIO-RAD
Geldokumentationsanlage	EagleEye II	Stratagene
Kamera-Set / Kompakt Digital	Powershot A620 AxioCam MRc5	Canon/Zeiss
Massenspektrometer	Ettan™ MALDI-TOF	GE Healthcare
Mikroskope		Krüss, Zeiss Zeiss
	Axiovert 40C Axiophot2	
PCR-Temperaturcyclus	MyCycler; iCycler	BIO-RAD
Photometer	Nanodrop, ND 1000 Wallac Victor ² DU 530	PeqLab Perkin-Elmer Beckman
Röntgenfilmentwickler	HyperProcessor	Amersham
Sicherheitswerkbank	Herasafe	Heraeus
Spannungsquelle	PowerSupplie, EV 261 PowerPac	Consort BIO-RAD
Wasserdeionisierungs- anlage	MilliQ Plus	Millipore
WesternBlot- Elektrophorese-Gerät	Mini-PROTEAN 3	BIO-RAD
Zellzählgerät	Vi-Cell™ XR	Beckman-Coulter

2.2 Verbrauchsmittel

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Gebrauchswaren

Bezeichnung	Hersteller
Blotting Papier (extra dick)	BIO-RAD
Einwegspritzen	Becton Dickinson
Filterpapier	Schleicher&Schüll
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Sterilspritzenfilter (0.22 µM)	Roth
Zellkulturmaterial	Sarstedt

2.3 Chemikalien, Kits, Antikörper und Enzyme

2.3.1 Chemikalien

Verwendete Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Applichem, Becton Dickenson, Biochrom, BIO-RAD, Calbiochem, Fermentas, Fluka, GE Healthcare, Invitrogen, JT Baker, Merck, PAA, Pharmacia, Roche, Roth, Sigma-Aldrich, Stratagene und Thermo.

Der Reinheitsgrad der Chemikalien entsprach *“pro analysi (p.a.)”*.

2.3.2 Kits

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Kits

Bezeichnung	Katalog-Nummer	Hersteller
Enhanced Chemiluminescence Kit	32106	Pierce
Vectastain ABC Elite Kit	PK-7200	Vector Laboratories

2.3.3 Enzyme und weitere Reagenzien

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Enzyme und Reagenzien

Bezeichnung	Katalog-Nummer	Hersteller
REDTaq [®] DNS Polymerase	R2648	Sigma-Aldrich
DreamTaq Green Master Mix	K1081	Fermentas
DNAse 1	AMPD1	Sigma-Aldrich
RevertAid [™] M-MuLV RT	EP0441	Fermentas
Oligo(dT)18 Primer	K1612	Fermentas
10 mM dNTP Mix	R0192	Fermentas
Bradford Assay Reagent	500-0006	BIO-RAD
Ribonuclease A	7156.1	Roth

2.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Zellkulturmedien und ihre Zusätze

Medium (Invitrogen)	Zusätze (Gibco BRL)	für Zelllinie
DMEM + GlutaMAX™-I	10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin	NTERA-2
DMEM/F-12 (1:1)	10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin 200 mM	2102EP & NCCIT
RPMI-1640 + GlutaMAX™-I	10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin	TCam-2
Einfriermedium	Kat.-Nr.	Hersteller
Cryo-Safe I	KM-11-V	c c pro

Alle Medien für die Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt und bei 4°C gelagert.

2.5 Zelllinien

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten humanen Keimzelltumorzelllinien

Zelllinie	Typ	Charakteristika	Quelle
NTERA-2	Nicht-Seminom (Teratokarzinom)	adhärente Epithelzellen mit deutlichen Einlagerungen (Granula), pluripotent	DSMZ
2102EP	Nicht-Seminom (Teratokarzinom + Dottersacktumor)	adhärent, nullipotent	Zur Verfügung gestellt von P. Andrews (Sheffield, UK)
NCCIT	Nicht-Seminom (Teratokarzinom)	adhärente Epithelzellen, pluripotent, p53 mutiert	ATCC
TCam-2	Seminom	adhärent, bisher einzige Zelllinie mit gesicherten Seminom-Eigenschaften	Zur Verfügung gestellt von L.Looijenga (Rotterdam, NL)

NTERA-2, 2102EP und TCam-2 sind alle primären Ursprungs eines testikulären Keimzelltumors, während NCCIT einem mediastinal gelegenen extragonadalen Keimzelltumor entstammen.

Die Lagerung der Zelllinien erfolgte in Aliquots in flüssigem Stickstoff.

2.6 Protein- und DNS-Standards

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Marker

Bezeichnung	Größenbereich	Typ	Kat.-Nr.	Hersteller
Smart Ladder	200 – 10000 bp	DNS-Marker	MW-1700-10	Eurogentech
High Range Rainbow	14.3 – 220 kDa	Protein-Marker	RPN756	GE Healthcare
High Range Rainbow	12 – 225 kDa	Protein-Marker	RPN756E	GE Healthcare
Roti [®] -Mark Standard	14.3 – 200 kDa	Protein-Marker	T851.1	Roth

2.7 Antikörper

2.7.1 Primäre Antikörper

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Klonalität	Wirt	Bestellnummer	eingesetzte Konzentration	Assay	Hersteller
AKT	pAb	Kaninchen	9272	1:1000	WB	Cell Signaling
p-AKT	mAb	Kaninchen	4060	1:1000	WB	Cell Signaling
Caspase-3	pAb	Kaninchen	9662	1:1000	WB	Cell Signaling
Caspase-3	mAb	Kaninchen	550821		FACS	BD
CD30	mAb	Maus	M0751	1:40	IHC	DAKO
CD117	pAb	Kaninchen	A4502	1:500	IHC	DAKO
CD133	mAb	Maus	130-090-422	1:50	IHC	MACS
CRABP1	mAb	Maus	MA3-813	1:5000	WB	Affinity Bio Reagents
CRABP2	pAb	Ziege	sc-10065	1:1000	WB	SantaCruz
CRBP1	pAb	Kaninchen	sc30106	1:1000	WB	SantaCruz
Ebp1	pAb	Kaninchen	07-397	1:5000	WB	Millipore
ERK 1/2	pAb	Kaninchen	V114A	1:1000	WB	Promega
p-ERK 1/2	pAb	Kaninchen	sc-23759-R	1:1000	WB	SantaCruz
Galectin-1	mAb	Maus	ab58085	1:600 1:100	WB/ IHC	abcam
GAPDH	mAb	Maus	G041	1:5000	WB	abm
Grp75	mAb	Kaninchen	3593	1:1000	WB	Cell signaling
GSTP1	mAb	Maus	sc-66000	1:1000 1:200	WB/ IHC	SantaCruz
MEK 1/2	pAb	Kaninchen	9122	1:1000	WB	Cell signaling

p-MEK 1/2	pAb	Kaninchen	9121	1:1000	WB	Cell signaling
P70S6	mAb	Kaninchen	1494-1	1:1000	WB	epitomics
PARP	pAb	Kaninchen	9542	1:1000	WB	Cell Signaling
PYGB/M	mAb	Maus	sc-51922	1:1000 1:500	WB/ IHC	SantaCruz
PTEN	mAb	Maus	04-035	1:1000	WB	Millipore
α -Tubulin	mAb	Maus	T5168	1:5000	WB	Sigma-Aldrich
Vimentin	mAb	Maus	sc-66002	1:500	WB	SantaCruz
IgG1		Maus	551436		FACS	BD

2.7.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Bestellnummer	eingesetzte Konzentration	Assay	Hersteller
anti-Maus IgG-HRP	NXA931	1:10000	WB	GE Healthcare
anti-Kaninchen IgG-HRP	7074	1:5000	WB	Cell Signaling
anti-Ziege IgG-HRP	ab6885	1:5000	WB	abcam
Kaninchen anti-Maus	E0464	1:200	IHC	Dako
Schwein anti-Kaninchen	E0353	1:200	IHC	Dako

2.8 Zytostatika

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Zytostatika

Zyto- statikum	Molekulargewicht (MW)	Arzneistoffgruppe	Menge / Konzentration	Lösungs- mittel
Cisplatin	300,1 g/mol	Platin-Derivat	3.4 mM	NaCl
Sunitinib	398,5 g/mol	Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor	25 mM	DMSO
Temsirolimus	1030.3 g/mol	mTOR-Inhibitor	10 mM	DMSO

Bezugsquellen:

Cisplatin wurde über die Apotheke des UKE bezogen; Sunitinib und Temsirolimus wurden im Rahmen wissenschaftlicher Kooperationen direkt von den Herstellerfirmen als Reinsubstanz für Laborzwecke bezogen.

2.9 Primer

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Primersequenzen

Primer	Protein	Sequenz 5´ - 3´
GAPDH for	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TGC ACC ACC AAC TGC TTA
GAPDH rev		GAT GCA GGG ATG ATG TTC
CRABP1 for	Cellular retinoic acid protein1	CCT TGC GAG CTC AGA GTG T
CRABP1 rev		GAC TTC GAA ACC GTG CAA AT
CRABP2 for	Cellular retinoic acid protein2	TGC TGA GGA AGA TTG CTG TG
CRABP2 rev		CCC ATT TCA CCA GGC TCT TA
TPI1 for	Triosephosphate Isomerase (Tim)	GAA GCC CAG TAA CTG CCC TTT C
TPI1 rev		AAA TCC CAC CAC GCC TTC CAT C
GNB1 for	Guanine nucleotide-binding protein G(I/G(S)/G(T) beta subunit 1	TAC GTG TCG CCT CTA TGA CC
GNB1 rev		TCC AGA GCA GAA AGC AGT CC
CLIC1 for	Chloride intracellular channel 1 variant	TCA ACC CCC TCC ATT TTC TC
CLIC1 rev		CCC CCA TTT CTT TCC CTC ATC
ANXA1 for	Annexin A1	CCC CTA TCC TAC CTT CAA TCC
ANXA1 rev		GCA GAG CTA AAA CAA CCT CC
TUBB for	Tubulin beta	CAA CTC TAC CTC CCT CAC TC
TUBB rev		GCA ACA GCA AAA GGA AGA AAT G
KRT8 for	Keratin 8	TCC TCA GGC AGC TAT ATG AAG
KRT8 rev		TTG GCA ATA TCC TCG TAC TGT G
INA for	Internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	ACT TCC CTA ACA CTT ACC CC
INA rev		AAC AAA TCC TGC ATC AGC C
CAPZA1 for	F-actin capping protein alpha-1 subunit variant	CAT CAC TCG GCT TTC TTC C
CAPZA1 rev		CTA TCT TCA CAG GCG TGA AC
FABP5 for	Fatty-acid-binding protein, epidermal (E-FABP) (Psoriasis-associated)	GCG AAA AAT GGG CGC AAT GG
FABP5 rev		ATC CCA CTC CTG ATG CTG AAC
ALDH1B1 for	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	CCT ATC TAA CCC CCA ACC AC
ALDH1B1 rev		ACA CAG ACA AGG AAA AGC AC
GSS for	Glutathione synthetase	CCA GAA AAG TTG TGT CTC CC
GSS rev		CCT ACC ACT CAG TCC TAT CC
CKB for	Creatine kinase	CAC CCA GAT TGA AAC TCT CTT C
CKB rev		AGA ACT TCT CAT GCT TGC CC
PSMB4 for	Prosomebeta-subunit	CGT TTC CGC AAC ATC TCT C
PSMB4 rev		TCT CTC CAT CAG CAT AGC C
Erp60 for	ER-60 protein	CCT GAA GTC TGA ACC TAT CCC
Erp60 rev		GTT CTT ACA GTG ACC ACA CC
DPYSL3 for	Dihydropyrimidinase-like 3	GAT TTG TTT GAC TCC CCT CC

DPYSL3 rev		TCA ACA CAA TAT ACA ACA CCC C
HNRPH1 for	HNRPH1 protein	TCT TAG CCA CGC AGA AGT C
HNRPH1 rev		TTC AAC AAA AGC CTC GCC
RUVBL2 for	RuvB-like 2 (EC 3.6.1.-) (48-kDa TATA box-binding protein-interacting protein)	AAG GGT ACA GAA GTG CAG G
RUVBL2 rev		TTG AGT TCG TTG AAG AGG AAG
HNRPF for	HNRPF protein	AAC TTC TTC TCT CCT CTC AAC C
HNRPF rev		CGT AAC AGC CAC TCA CTG AC
PHB for	Prohibitin	ACA CAG CCT TCC TTC TGC TC
PHB rev		TGC TCC CCA GTC CAT CAC ATA C
TRA1 for	Tumor rejection antigen (gp96) 1 variant	GAC CAC TCG AAT CGA ACA C
TRA1 rev		GTT TTC CTT TTC TCC CCC TC
PARK7 for	Parkinson disease 7	GGA GCA GAG GAA ATG GAG AC
PARK7 rev		TTC ACA GCA GCA GAC TCA G
TRAP1 for	TRAP1	GCA CCC GCA ACA TCT ACT AC
TRAP1 rev		CCT GTC CTC AAA CTT CTC CTC
C1QBP for	Human pre-mRNS splicing factor SF2p32, complete sequence.	ATC TCC TGC TGA GTC TTC C
C1QBP rev		GGT GAC AAA GTC ATA CAG GTG
SERPINB9 for	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	CCA CCC TTT CCT TTT CTT CAT C
SERPINB9 rev		TCT GCC CTC ATC TTT GCA C
NP for	Purine nucleoside phosphorylase	CAT TCT ACT GCC TCA GCC TC
NP rev		ACA CAC ACA CAA AAC CCC C
RPLPO for	RPLPO	TTG TGT TCA CCA AGG AGG AC
RPLPO rev		GAC TCT TCC TTG GCT TCA AC
IMPDH2 for	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	CCC TTT CTC ACC ATC CCT TTC
IMPDH2 rev		AAG CCC CTT GTC TTC AAC C
RAD23A for	RAD23 homolog A	TGG ATG TGA GTG ATG GGT GG
RAD23A rev		GGG GTG GAG TGT AAT GT
STAM for	Signal transducing adaptor molecule	ATC CCA GCC AGG CGC CAG TA
STAM rev		CCT CCG GGC TGA GGC AGA GT

2.10 Software

Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Softwareprogramme

Software	Version	Hersteller
PDQuest	8.0.1	BIO-RAD
Delta2D	3.6	Decodon
CellQuest	5.2.1	Becton-Dickenson
CalcuSyn	2.0	BIOSOFT
AXIOVISION	4.6	Zeiss

2.11 Zellkultur

2.11.1 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden für ungefähr 2 min im Wasserbad aufgetaut, in 5 ml 37°C warmen Medium aufgenommen und dann für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die pelletierten Zellen in frischem Medium vorsichtig resuspendiert und in einer 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät.

2.11.2 Kultivierung und Trypsinierung von adhärennten Keimzelltumor-Zelllinien

Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 2 – 3 Tage für eine max. Konfluenz von 80 – 90%. Nach Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Zugabe von 37°C warmem Trypsin.

Tabelle 13: Übersicht über die eingesetzten Trypsinmengen

Zellkulturflasche (cm ²)	Trypsin (ml)
25	0.5
75	1
175	2

Das Einwirken des Trypsins erfolgte für 2 – 3 min im Brutschrank. Durch wiederholtes „Klopfen“ der Zellkulturflaschen wurde die Wirkung des Enzyms unterstützt. Die abgelösten Zellen wurden anschließend mit 10 ml Medium („Abstopp-Reaktion“) vom Flaschenboden abgespült und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden dann im Verhältnis 1:4 bzw. 1:5 mit Medium verdünnt und in frischem Medium ausgesät.

2.11.3 Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau

Um standardisierte Bedingungen bei der Durchführung der Experimente in der Zellkultur zu gewährleisten, wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und/oder einem ViCell™ Counter gezählt. Bei beiden Zählmethoden kam die Trypanblau-Methode zur Untersuchung der Vitalität der Zellen zur Anwendung.

2.11.3.1 Neubauer-Zählkammer

Bei der Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl der zu zählenden Zellsuspension 1:5 mit Trypanblau-Lösung (0.2% (w/v) in MilliQ-H₂O) gemischt und davon 10 µl in die Neubauer-Kammer pipettiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden am Mikroskop vier Großquadrate ausgezählt und daraus das arithmetische Mittel bestimmt. Unter Berücksichtigung der zuvor verwendeten Verdünnungen wurde anschließend die Gesamtzellzahl berechnet.

2.11.3.2 ViCell™ Counter

Für die Zellzahlbestimmung am ViCell™ Counter wurden 0.5 ml bzw. 1 ml der zu untersuchenden Zellsuspension gemessen. Die entsprechende Zellzahl wurde vom Meßgerät in $(x) \times 10^6 / \text{ml}$ ($x = \text{Zellzahl}$) angegeben. Diese Zellzahl wurde mit der vorhandenen Zellsuspensionsmenge multipliziert, um die Gesamtzellmenge zu erhalten. Für die Zellzahlbestimmung der Zellwachstums- und Kombinationsassays wurden alle vorhandenen Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und anschließend gemessen.

2.11.4 Kryokonservierung von Zellen

Nach einer maximalen Kultivierungszeit über 10 Passagen wurden die Zelllinien wieder eingefroren. Die zuvor trypsinieren und gewaschenen Zellen wurden in einer Zellzahl von $1 - 3 \times 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen in einem speziellen Einfriermedium (Cryo-Safe I, Oberdorla, Deutschland) eingefroren. Der Einfriervorgang erfolgte mit Hilfe von einem „Cryo 1°C Freezing Container“ (Nalgene, Roskilde, Dänemark) bei -80°C. Nach 24h wurden die Zellen dann in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.11.5 Präparation von Zellen für weiterführende Experimente

Für weiterführende Experimente, wie z.B. 2D-PAGE, Western-Blot, RNS-Untersuchungen und FACS-Analysen, wurden die entsprechenden Zellen wie zuvor beschrieben trypsinieren und zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Wasch- und Zentrifugationschritt mit kaltem (4°C) PBS. Den nachfolgenden Untersuchungen entsprechend wurden die pelletierten Zellen weiterbehandelt.

2.11.6 Generierung von Cisplatin-resistenten Zelllinien

Die Cisplatin-resistenten Zelllinien NTERA-2-R, 2102EP-R und NCCIT-R wurden ausgehend von ihren parentalen Cisplatin-sensitiven Zelllinien NTERA-2, 2102EP und NCCIT generiert. Über einen Zeitraum von 18 Monaten wurden der Zellkultur

subletale Dosen Cisplatin, beginnend mit der jeweiligen IC_{10} -Dosis, zugesetzt. Bei Erreichen einer 50%igen Letalität der Zellen wurde die Zugabe von Cisplatin ausgesetzt und es folgte eine Erholungsphase über 3 Passagen. Die Zellen der einzelnen Behandlungsstufen wurden kryokonserviert.

2.11.7 Zytotoxizitätstest (MTT-Assay)

Zur Bestimmung der IC_{50} -Dosis (Konzentration eines Agens, bei der 50% der Zellen absterben) von Cisplatin, Sunitinib und Temsirolimus bei den verwendeten Keimzelltumorzelllinien wurde ein MTT-Test durchgeführt. Dieser basiert auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu violetten Formazankristallen. Die enzymatische Spaltung des MTT in wasserunlösliche blau-violette Formazankristalle findet nur in lebenden Zellen durch membrangebundene, mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen statt. Die Experimente wurden in 96-well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Pro well wurden 6×10^3 Zellen (TCam-2-Zellen: 30×10^3 Zellen) in einem Volumen von 150 μ l Medium ausgesät. Pro Konzentrationsstufe wurden 6 Ansätze durchgeführt. Nach 24h Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO_2 wurden die zu analysierenden Substanzen in einer Konzentrationsreihe von 0.4 μ M bis 25.6 μ M in einem Volumen von 50 μ l pro well zugegeben (Endvolumen pro well 200 μ l). Als Kontrolle wurde entweder nur Medium oder das Lösungsmittel der Substanzen in der höchsten eingesetzten Konzentrationsmenge der Substanzen verwendet. Die Inkubationszeit betrug 48h. Im Anschluss wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 200 μ l einer MTT-Medium-Lösung (Endkonzentration 0.5 mg/ml) ersetzt. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37°C, 5% CO_2 für 3h. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die MTT-Medium-Lösung wieder vorsichtig abgesaugt und die Formazankristalle in 100 μ l DMSO gelöst. Die Absorption des entstandenen Formazans wurde photometrisch bei 570 nm im Wallac 1420 Victor² Multilabel Reader (Perkin-Elmer, Waltham, USA) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CalcuSyn-Software (www.biosoft.com).

MTT-Stocklösung

5 mg/ml in PBS;
sterilfiltriert mit 0.22 μ M Spritzenfilter

MTT-Medium-Mix

2.4 ml MTT-Stocklösung
+ 21.6 ml Medium

2.11.8 Zellwachstum

Für die Bestimmung des Zellwachstums unter dem jeweiligen Einfluss von Cisplatin, Sunitinib und Temsirolimus bzw. zur Bestimmung der Populationsverdopplungszeit, wurden nach Behandlung die Zellen mit Trypan-Blau angefärbt und die vitalen Zellen gezählt. In 6-well-Platten wurden 2×10^5 Zellen pro well in einem Volumen von 3 ml Medium ausgesät. Die weitere Durchführung sowie die verwendeten Konzentrationen erfolgten analog dem MTT-Assay. Nach 48h Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und im ViCell™ Counter gezählt.

2.11.9 Kombinationsversuche

Um den Effekt einer Konzentrationsbehandlung von Cisplatin und Sunitinib bzw. Temsirolimus zu analysieren wurden beide Substanzen in Kombination mit Cisplatin *in vitro* untersucht. Für dieses Experiment wurden die jeweiligen IC_{10} , IC_{25} , und IC_{50} Konzentrationen, basierend auf den vorangegangenen Versuchen, verwendet, um die Cisplatin-sensitiven und –resistenten Zelllinien alleine und in Kombination zu behandeln. Die Ergebnisse der mit der Monotherapie behandelten Zellen wurden mit den Ergebnissen der Kombinationsbehandlung verglichen und mit Hilfe des Student´s t-Test auf Signifikanz überprüft.

2.12 Proteinchemische Methoden

2.12.1 Proteinisolation aus Zellen

2.12.1.1 für die 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die wie unter 2.11.5 angegeben geernteten Zellen wurden in einem denaturierendem Harnstoff-Lysepuffer (9 M Urea, 4 % CHAPS (w/v), 1 % Pharmalyte (v/v), 1 % DTT (w/v) und 1 % Bromphenolblau (w/v)) in einem Gesamtvolumen von 450 µl lysiert. Anschließend wurde das Proteinlysate bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

2.12.1.2 für die Western-Blot-Analyse

Die Lyse der Zellen erfolgte äquivalent zu der Proteinisolation für die 2D-PAGE. Als Lysepuffer wurde ein RIPA-Puffer mit folgender Zusammensetzung verwendet: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 1% Nonidet P-40 (v/v), 0.25 % Na-Desoxycholat (10%) (w/v), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1 mM Natriumorthovanadat (Na_3VO_4), 1 Tablette / 10 ml Complete - Proteaseinhibitoren (Aprotinin/Leupeptin).

Für die Detektion von phosphorylierten Proteinen wurden die Proteinlysate mit einem speziellen Lysepuffer nach Herstellerprotokoll (Cell Lysis Buffer 10x, #9803, Cell Signaling, Danvers, USA) hergestellt.

2.12.2 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen (Bradford-Methode)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proteinlysate wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt (Bradford 1976). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bildung eines blauen Komplexes aus Coomassie Brilliant Blue G-250 und Proteinen in einem pH-Bereich von 0 bis 1. Der Farbstoff bindet hauptsächlich an basische Aminosäure-Reste.

Als Standard-Proteinlösung für die Eichreihe wurde eine BSA-Stocklösung verwendet. Für die Eichreihe im Bereich von 0 – 10 µg/µl wurden zwei Lösungen (A und B) zusammengefügt. Der verwendete Lysepuffer entsprach dem Lysepuffer der Zellproben. Die Probenvorbereitung gliederte sich weiterhin in 2 Schritte. Zuerst wurden die zu messenden Proben angesäuert. Hierfür wurden 30 µl der entsprechenden Probe/Eichlösung/Blank mit 30 µl 0.1 M HCl-Lösung und 240 µl H₂O gemischt. Danach wurden 25 µl der Lösung aus dem Ansäuerungsschritt mit 875 µl der filtrierten und verdünnten Bradford-Lösung (Protein Assay Reagent, BIORAD) zusammengefügt und im Photometer bei 595 nm nach einer 5 minütigen Inkubationszeit gemessen.

BSA-Stocklösung	100 mg/ml
Lösung A	100 µl BSA-Stammlösung + 900 µl Lysepuffer
Lösung B	100 µl H ₂ O + 900 µl Lysepuffer
Bradford-Lösung	1:5 mit H ₂ O verdünnt filtriert mit 0.22 µM Faltenfilter

2.12.3 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

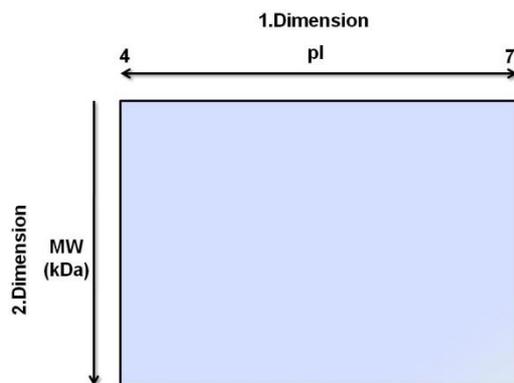


Abbildung 8: Schematische Darstellung der 2D-PAGE

Die 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese besteht aus den folgenden Einzelschritten:

- 1.Dimension: Isoelektrische Fokussierung
- Äquilibration der IPG-Streifen
- 2.Dimension: SDS-PAGE
- Coomassie-Färbung

2.12.3.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Isoelektrische Fokussierung ist die Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres isoelektrischen Punktes. Der isoelektrische Punkt eines Proteins ist der pH-Wert, bei dem die Summe aller Ladungen der sauren und basischen Aminosäuren des Proteins gleich Null und somit nach außen neutral ist.

Für die Isoelektrische Fokussierung wurden Streifen mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG; GE Healthcare, Uppsala, Schweden) im pH-Bereich 4-7 verwendet. Die Streifen wurden mit den Proteinlysaten über einen Zeitraum von ungefähr 24 h rehydratisiert und im Anschluß unter steigender Spannung in einer PROTEAN IEF-Kammer (BIO-RAD, München) über einen Zeitraum von ca. 18h fokussiert (Tabelle 14). Die Lagerung der fokussierten IPG-Streifen erfolgte bei -80°C in geschlossenen Kunststoffröhrchen.

Tabelle 14: Programm der Isoelektrischen Fokussierung

Programmschritt	Zeit	Volt (V)
Einlaufzeit	4 Stunden	250
Einlaufzeit linear	15000 Voltstunden	10000
weitere Laufzeit	99000 Voltstunden	10000
Schutz	12 Stunden	500

2.12.3.2 Äquilibration der IPG-Streifen

Um die rehydratisierten IPG-Streifen auf die Puffer-Verhältnisse der 2.Dimension anzupassen, wurden diese zuvor äquilibriert. Die IPG-Streifen aus der 1.Dimension wurden zunächst 15 min in Äquilibrationpuffer A (Reduktionsreagenz) und nach

dem Dekantieren des Puffers anschließend 15 min in Äquilibriumspuffer B (Alkylierungsreagenz) inkubiert.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Äquilibriumslösung

Substanz	Endkonzentration
10M Urea	6 M
SDS	4% (w/v)
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	50 mM
Aufgeteilt und jeweilige Zugabe von:	
Lösung A:	
DTT	1% (w/v)
Lösung B:	
Iodacetamid	4.8% (w/v)

2.12.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse und Größenbestimmung in der 2.Stufe der 2D-PAGE wurden Proteine mittels SDS-PAGE im diskontinuierlichen Puffersystem (Laemmli et al. 1970) ohne Sammelgel aufgetrennt. Hierfür wurden 25 x 20.5 cm große und 1.5 mm dicke 15%ige Polyacrylamidgele in der PROTEAN Plus Multi-Casting Chamber (BIO-RAD, München, Deutschland) gegossen. In dieser Kammer ist das gleichzeitige Gießen von 12 Gelen möglich. Die zuvor äquilibrierten IPG-Streifen wurden dann luftblasenfrei auf die Oberkanten der Polyacrylamidgele gelegt und zur Fixierung mit erhitzter 0.6%iger wässriger Agarosegellösung (angefärbt mit Bromphenolblau zur Kontrolle der Lauffront) überschichtet. Als Proteinmarker wurde Roti[®]-Mark Standard verwendet. Dieser wurde vor der Fixierung mit Agarose auf ein 0.5 cm² großes Filterpapier aufgetragen und neben dem IPG-Streifen platziert.

Tabelle 16: Zusammensetzung der 15%igen Polyacrylamidgele

Substanz	Endkonzentration
40% Acrylamid	15% (v/v)
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	0.375 M
100% Glycerin	4-5% (v/v)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0.1% (w/v)
TEMED	0.05% (v/v)

Tabelle 17: Zusammensetzung des 10x SDS-Laufpuffers

Substanz	Endkonzentration
Glycin	9.6 M
Tris-Base	1.2 M
SDS	173 mM

Die so präparierten Platten wurden vertikal in der mit SDS-Laufpuffer (1x) gefüllten PROTEAN Plus Laufkammer angeordnet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 20°C und 120 V für etwa 18 h, bis zum Erreichen der Bromphenolblau-Lauffront der unteren Gelkante.

2.12.3.4 Färbung der Polyacrylamidgele

Tabelle 18: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung

Substanz	Endkonzentration
Coomassie G250	0.2% (w/v)
konz. Schwefelsäure	5.5% (v/v)
H ₂ O	4000 mL
<i>ü.N. rühren und anschließende Filtration</i>	
10 M NaOH	2.5 mM (v/v)
100% Trichloressigsäure (TCA)	7.75% (v/v)

Die Färbung der 2D-PAGE-Gele erfolgte bei RT in Coomassie Brilliant Blue G-250 über 24h unter leicht schwenkenden Bedingungen auf einem Schüttler. Das Entfärben der Gele erfolgte über einen Zeitraum von mindestens 48h mittels MilliQ-H₂O, welches mehrfach gewechselt wurde. Um das Austrocknen der Gele zu verhindern und damit eine längere Haltbarkeit zu gewährleisten, wurden diese anschließend in durchsichtige Folie eingeschweißt und im Folgenden kühl und lichtgeschützt gelagert.

2.12.3.5 Geldokumentation der 2D-PAGE-Gele

Für die Dokumentation und spätere Auswertung wurden die Coomassie-gefärbten 2D-PAGE-Gele einzeln mit Hilfe eines Densitometer GS-800 (BIO-RAD, München) eingescannt und dokumentiert.

2.12.3.6 Software-basierte Auswertung der 2D-PAGE-Gele

Um die Proteinmuster der einzelnen Zelllinien auszuwerten bzw. die Versuchsansätze vergleichen zu können, wurden zwei ähnliche Softwareprogramme verwendet, die die quantitativen Spotintensitäten auf den Gelen bestimmen und

innerhalb eines Experiments miteinander vergleichen können. Zum einen stand hierfür die Auswertungssoftware PDQuest Advanced (BIO-RAD, München) zur Verfügung, sowie die Delta2D Software (Decodon, Greifswald). Beide Auswertungsprogramme wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet. Als Ausschlussparameter für differentiell exprimierte Proteine wurde eine mindestens 2-fache Regulation, sowie eine statistische Signifikanz von $\geq 95\%$ angenommen.

2.12.3.7 Extraktion von Proteinen aus 2D-PAGE-Gelen

Für die Identifizierung des Proteinspots mittels MALDI-TOF-MS wurde dieser Spot aus dem entsprechenden Gel entweder manuell auf dem UV-Tisch oder automatisiert mit Hilfe des Ettan™ SpotPicker ausgestochen. Die Gelstücke wurden im Anschluß an das manuelle Ausstechen steril in jeweils 150 μl MilliQ-H₂O (96-well-Platte) verwahrt. Nach dem automatisierten „Picken“ wurden die Gelstücke ebenfalls in einer 96-well-Platte gesammelt und im direkten Anschluß für den „Im-Gel-Verdau“ vorbereitet.

2.12.4 MALDI-TOF Massenspektrometrie

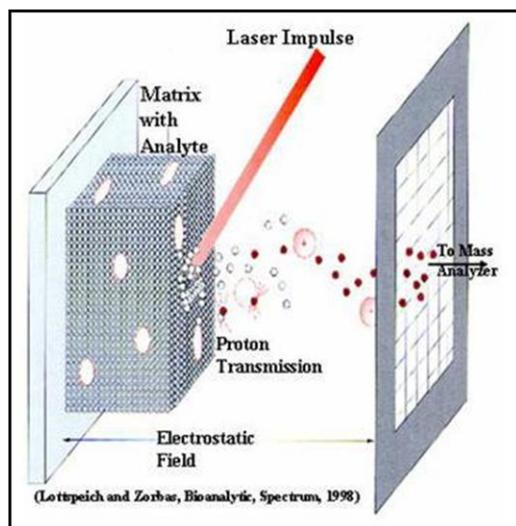


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight- Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-MS (**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption Ionisation – **T**ime **O**f **F**light- Massenspektrometrie) dient zur Massenbestimmung von Proteinen mit einer Genauigkeit von bis zu 0.001 Promille. In der sogenannten Kokristallisation werden die Proteine zuerst in Kristalle von UV-absorbierenden Molekülen eingebaut. Hierbei werden Protonen auf die Proteine übertragen, die anschließend im Vakuum durch einen UV-Laser Puls explosionsartig freigesetzt werden. Die protonierten Proteine, die sich nun in der gasförmigen Phase befinden, werden in einem elektrischen Feld beschleunigt. Zwei Proteine unterschiedlicher Ladung aber gleicher Masse fliegen dabei unterschiedlich schnell, wobei alle Ionen aber die gleiche Wegstrecke durch den TOF fliegen. Durch die unterschiedlichen Massen-/Ladungsverhältnisse und den daraus resultierenden Geschwindigkeiten, erreichen die Ionen den Detektor zu unterschiedlichen Zeiten.

Diese Zeiten werden gemessen und ausgewertet. Um bei der MALDI-TOF auswertbare Ergebnisse zu bekommen, dürfen in der Proteinlösung keine störenden Substanzen, wie z.B. Salze, vorhanden sein (Cohen et al. 1996).

Ein Teil der differentiell exprimierten Proteinspots (in erster Linie aus den Proteomics-Vergleichen der Cisplatin-sensitiven Zelllinien untereinander) wurden eigenständig am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II (UKE Hamburg) an einem Ettan™MALDI-TOF-Massenspektrometer bearbeitet und identifiziert. Die aus den Coomassie-gefärbten Gelen ausgestochenen Gelstücke wurden in eine 96-well-Platte überführt und mit MilliQ-H₂O und 50% Acetonitril (ACN; in MilliQ-H₂O) gewaschen. Der „Im-Gel-Verdau“ mit Trypsin (10 µl/Probe, 4h; Promega, Mannheim), sowie die Waschschriffe wurden automatisch in einem Ettan™Digester (alle Ettan-Geräte: Amersham-Biosciences, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Der Überstand mit den Peptiden aus dem Trypsin-Verdau wurde in eine neue 96-well-Platte überführt und konnte sogleich für das Spotten auf die MALDI-Träger verwendet werden. Gespottet wurden 0.3 µl eines Gemisches aus 1 µl Peptidüberstand und 1 µl α-Cyano-4-Hydroxymzimtsäure-Matrix. Nach einer Trocknungszeit der Proben von ca. 10 min konnten die MALDI-TOF-Messungen durchgeführt werden. Die Messungen wurden im Positiven-Ionen-Reflektor-Modus bei einer ansteigenden Spannung von 23kV und pulsverzögerter Ionenextraktion gemessen. Die Kalibrierung erfolgte extern mit einem Kalibrierungsmix (PepMix5, Laser BioLabs, Frankreich). Alle Peptidproben wurden als monoisotopische Massen gemessen. Der Datenbankabgleich (NCBI nr, SwissProt) der gemessenen Peptidspektren erfolgte mit der MASCOT-Software (Matrix Science Ltd, London, UK).

Die Identifikation der Proteinspots aus allen weiteren Proteomvergleichen wurde im Rahmen einer Kooperation von Frau Dr. Simone Venz (Universität Greifswald) durchgeführt. Die Methoden der Probenvorbereitung und die Messparameter sind bei (Eymann et al. 2004; Ummanni et al. 2008) beschrieben. Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) aufgenommen. Dazu wurden die Proben in eine α-Cyano-4-Hydroxymzimtsäure-Matrix eingebettet. Die Datenbanksuche der gemessenen Spektren wurde mit der GPS Explorer Software v3.6 (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt und anschließend mit der SwissProt rel.56.1 Datenbank mit Hilfe der Mascot Suchmaschine 2.2 (Matrix Science Ltd,

London, UK) abgeglichen. Dabei galten Peptidmischungen mit einem Wert ≥ 55 für SwissProt als positiv identifiziert.

2.12.5 Eindimensionale (1D)-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur weiteren Analyse der differentiell regulierten Protein wurde die eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet (Laemmli et al. 1970). Zudem konnten mit dieser Methode die Expression z.B. diverser Signalwegproteine näher untersucht werden. Die zu untersuchenden Proben aus 2.12.1.2 wurden in einem Verhältnis 1:4 mit Ladepuffer (20% Glycerol (v/v), 1% DTT (w/v), 20% 1M Tris-HCl pH 6.7 (v/v), 0.08% Bromphenolblau (v/v)) gemischt, für 5 min bei 99°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Vor dem Auftragen der Proben (maximales Probenvolumen: 30 μ l) wurden die 15%igen SDS-PAGE-Gele in die Mini-PROTEAN 3 Kammer gespannt, die anschließend mit SDS-Laufpuffer (1x; siehe Tabelle 17) aufgefüllt wurde. Als Proteinmarker wurde ein vorgefärbter Rainbow-Marker (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) verwendet. Zum Einwandern der Proben in das 4%ige Sammelgel wurde zunächst eine Spannung von 65 V gewählt. Die folgende Trennung der Proteine erfolgte bei 120 V.

Tabelle 19: Zusammensetzung des 15%igen Trenngels

Substanz	Endkonzentration
30% Acrylamid	15% (v/v)
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	1 M
20% SDS	0.13% (v/v)
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0.1% (v/v)
TEMED	0.05% (v/v)

Tabelle 20: Zusammensetzung des 4%igen Sammelgels

Substanz	Endkonzentration
30% Acrylamid	4% (v/v)
0.5 M Tris/HCl pH 6.8	0.22 M
20% SDS	0.18% (v/v)
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0.1% (v/v)
TEMED	0.05% (v/v)

2.12.6 Immuno-Blot-Analyse (Western-Blot)

Das Proteinmuster der SDS-Gele wurde im Semi-Dry-Blot-Verfahren mit Hilfe einer Trans-Blot SD Semi-Dry Elektrophorese Kammer auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) übertragen. Die Aktivierung der Membran erfolgte für 15 s in MeOH, gefolgt von einem Waschschrift in MilliQ-H₂O (2 min) und einem Äquilibrierungsschritt in kaltem Transfer-Puffer (5 min). Der Transfer erfolgte bei 20 V über 25-30 min bei RT.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Semi-Dry-Transfer-Puffers

Substanz	Endkonzentration
Tris	0.6% (w/v)
Glycin	0.3% (w/v)
SDS	0.04% (w/v)
MeOH	20% (v/v)

Die Kontrolle des Transfers war durch den vorgefärbten Proteinmarker möglich. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die PVDF-Membran zu vermeiden, wurde diese nach dem Transfer zunächst 15 s in MeOH und anschließend für 2 h bei RT in Blocking-Puffer (entweder in 5% Magermilch in PBS/Tween oder in 5% BSA in TBS/Tween; abhängig vom Antikörper) inkubiert. Die Antikörperinkubation erfolgte ü.N. bei 4°C auf einem Schüttler. Im Anschluss an die Inkubation des Primärantikörpers wurde der entsprechende Sekundärantikörper für 1h bei RT inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgten immer drei Waschschriffe mit jeweils 5 min Inkubationszeit in PBS/Tween bzw. TBS/Tween. Als Ladungskontrolle diente eine im Anschluss an die erste Detektion durchgeführte Inkubation mit einem GAPDH-Antikörper für 1h bei RT und dem entsprechenden Sekundärantikörper (1h, RT), mit nachfolgender Detektion mittels ECL-Kit.

2.12.7 Chemilumineszenz-Detektion

Um den jeweiligen gebundenen Sekundärantikörper zu detektieren, wurde das Pierce® ECL-Detektions-Kit (Thermo, Rockford, USA) verwendet. Dabei wird das im Kit vorliegende Substrat Luminol durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase oxidiert. Das dabei emittierte Licht dient zur Schwärzung eines Röntgenfilms (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Für die Dokumentation wurden die Röntgenfilme eingescannt.

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 RNS-Isolierung mit TRIzol™

Zu den in 2.11.5 pelletierten Zellen wurde 1 ml TRIzol™-Reagenz zugegeben und bis zur vollständigen Lyse der Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden 200 µl Chloroform pro 1 ml TRIzol™ hinzupipettiert, vermischt und wiederum für 3 min inkubiert. Die nach einem Zentrifugationschritt von 14000 rpm bei 4°C nach 15 min erhaltene wässrige Phase wurde nach Zugabe von 500 µl Isopropanol für 10 min bei RT inkubiert. Das nach erneutem Zentrifugieren (gleiche Bedingungen wie zuvor) erhaltene Pellet wurde dann zweimal mit eiskaltem 75%igem Ethanol gewaschen und anschließend in 30 µl DEPC-Wasser gelöst (10 min bei 55°C).

Im direkten Anschluss an die RNS-Isolierung erfolgte ein DNS-Verdau. Die RNS wurde bei -80°C gelagert.

2.13.2 cDNS-Synthese mit reverser Transkriptase

Zur Herstellung von cDNS aus der isolierten RNS wurde diese mittels des Enzyms Reverse Transkriptase umgeschrieben. Hierzu wurden 1 µg RNS mit 1 µl Oligo(dT)-Primer und 1 µl dNTP gemischt und auf 12 µl mit H₂O aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 65°C für 5 min inkubiert und im Anschluss direkt auf Eis gebracht. Es folgte nun die Zugabe von 4 µl Puffer (5x), 1 µl RNase-Inhibitor, 1 µl H₂O und 1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase. Die Umschreibung in cDNS erfolgte bei 42°C für 50 min, gefolgt von einer Enzyminaktivierung bei 70°C für 15 min.

2.13.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Anreicherung definierter Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (Saiki et al. 1985). Die dabei eingesetzten Oligonukleotide (Primer), die zum 5'- bzw. 3'- Ende der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, dienen in dieser Reaktion als Startermoleküle für die thermostabilen DNS-Polymerasen, die einen DNS-Einzelstrang zu einem DNS-Doppelstrang polymerisieren können. Der von den Primern flankierte DNS-Abschnitt wird in jedem Zyklus verdoppelt. Die einzelnen Schritte einer PCR umfassen die Denaturierung der DNS, die Primeranlagerung („Annealing“), die Primerverlängerung („Elongation“) und wiederum die Denaturierung. Eine sich an die Reaktion anschließende Extensionszeit dient zur endgültigen Vervollständigung aller Fragmente. Nach Ablauf der PCR wird die

Reaktion auf 4°C gekühlt, um noch eventuelle unspezifische Reaktionsabläufe zu vermeiden. Für die PCR wurde das REDTaq-Kit (Sigma-Aldrich, München) verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsbestandteile ist in Tabelle 22 dargestellt und das verwendete Programm ist in Tabelle 23 zu sehen.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

Bestandteil	Menge
REDTaq Mix	12.5 µl
Template (cDNS)	1 µl
Primer-Mix	1 µl
MilliQ	10.5 µl

Tabelle 23: PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Reaktionsabschnitt
1	95 °C	1 min	Denaturierung
2	95 °C	1 min	Denaturierung
3	55 °C	1 min 25-30x	Annealing
4	72 °C	1 min	Elongation
5	72 °C	10 min	Elongation
6	4 °C	∞	

2.13.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Analyse, Identifikation und präparativen Reinigung von DNS-Fragmenten. Die Wanderungseigenschaften der DNS werden dabei von ihrer Größe und Konformität bestimmt (Fisher et al. 1971).

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Hierfür wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und auf Handwärme wieder heruntergekühlt. Nach der Zugabe der Ethidiumbromidstocklösung (Endkonzentration 1 µg/ml) wurde das Gel zum Polymerisieren in die Gelelektrophoresekammer gegossen. Nach dem Einsetzen in die Elektrophorese-Apparatur wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet und die DNS-Proben, zuvor mit Ladepuffer gemischt, wurden in die Probenaschen des Gels pipettiert. Als Größenstandard wurde der SmartLadder (Eurogentech, Köln) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V bis das Bromphenolblau des Ladepuffers ca. 75% der Gellauffläche durchlaufen hat. Die unter UV-Beleuchtung sichtbaren DNS-Banden wurden anschließend fotografiert und dokumentiert.

TAE-Puffer	Tris/HCl	40 mM
(Tris-Acetat-EDTA)	Natriumacetat	20 mM
	EDTA	1 mM
	Mit Essigsäure (95%) auf pH 8.2 einstellen	
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	10 mg/ml

2.13.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist eine Methode, mit der Antigene auf der Oberfläche oder innerhalb der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden können. Zudem können weitere Parameter der Zelle, wie z.B. die Zellgröße (FSC, *forward scatter*) und die Granularität (Gestalt und Konformität der inneren Strukturen; SSC, *side scatter*) erfasst und beurteilt werden. Hierfür passieren die zu analysierenden Zellen in einer fokussierten Trägerflüssigkeit einzeln einen Argonlaserstrahl, der die für den entsprechenden Assay spezifischen verschiedenfarbigen Fluoreszenzfarbstoffe bei 488 nm zur Lichtemission anregt. Die hierdurch emittierten Lichtimpulse passieren dann spezifische Filter, die wiederum von Photozellen detektiert werden und charakteristisch für die einzelnen Farbstoffe sind. Die entsprechenden Emissionsbereiche liegen für Fluorescein (FITC) bei 530 nm, für Phycoerythrin (PE) bei 585 nm und für Propidiumjodid (PI) bei 650 nm. Um eine mögliche Autofluoreszenz der Zellen von den Fluoreszenzfarbstoffsignalen abgrenzen zu können, muss die Messung durch eine Negativkontrolle (ohne Fluoreszenzfarbstoff) komplettiert werden. Die Messung, sowie die Auswertung erfolgten mit Hilfe der CellQuest Software. Das verwendete FACS-Gerät war ein FACSCalibur (Software und Gerät von Becton Dickenson, Heidelberg).

2.13.5.1 Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid (PI)

Bei der Zellzyklusanalyse besteht ein linearer Zusammenhang zwischen DNS-Gehalt und Fluoreszenzintensität. Propidiumjodid interkaliert in die DNS und färbt auf diese Weise die Zellen an, die dann im FACS-Gerät gemessen werden können. Aufgrund der Bindung von PI an doppelsträngige DNS ist es möglich, die Zellen den detektierten Fluoreszenzsignalen entsprechend den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zuzuordnen: G0/1: diploider Chromosomensatz (1n); G2 tetraploider

Chromosomensatz ($2n$), S: zwischen di- und tetraploider Chromosomensatz (zwischen $1n$ und $2n$). Zellen, deren DNS nach der Aktivierung des apoptotischen Programms fragmentiert wurde und die sich in einem mittleren bis späteren Stadium der Apoptose befinden, weisen einen geringeren DNS-Gehalt auf als diploide Zellen der G₀/1-Phase. Diese Zellen sind in der Zellzyklusanalyse mit PI als Sub-G₀/1-Peak sichtbar. Da PI unspezifisch bindet und daher auch doppelsträngige RNS detektiert werden kann, ist es notwendig, die Zellen vor FACS-Analyse mit RNase zu behandeln, um Messfehler durch eventuell in der Probe vorhandene doppelsträngige RNS auszuschließen.

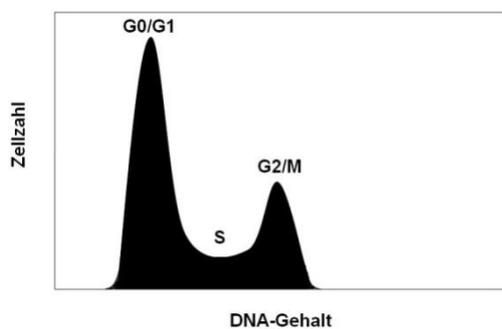


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Zellzyklus in einer FACS-Analyse mit PI-Färbung

Die in 2.11.5 vorbereiteten Zellen wurden im Vorfeld in 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol resuspendiert und bei -20°C gelagert. Für die Messung wurden die Zellen bei 1500 rpm für 5 min und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und anschließend in 1 ml PBS gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt und Absaugen des PBS, wurde das Zellpellet mit 200 μl Propidiumjodidlösung gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min (dunkel; 4°C) wurde pro Probe 200 μl PBS zugegeben und die Zellsuspension in das FACS-Röhrchen überführt.

Tabelle 24: Zusammensetzung der Propidiumjodidlösung

Bestandteil	Endkonzentration
PI-Stocklösung (5 mg/ml)	0.02% (v/v)
RNase (10 mg/ml)	0.1% (v/v)
in PBS	

2.13.5.2 Nachweis einer Caspase-3-Aktivierung

Cysteinproteasen, besser bekannt unter dem Namen „Caspasen“, sind Enzyme, die insbesondere bei apoptotischen Vorgängen eine Rolle spielen. Die meisten Caspasen werden als inaktive Zymogene (Proenzyme) synthetisiert und werden innerhalb des Apoptose-Programms mittels einer bereits aktivierten Caspase gespalten und dadurch aktiviert. Daneben ist auch eine autokatalytische Aktivierung durch Initiatorcaspasen, zu denen die Caspasen-8 und -9 gehören, möglich.

Die Aktivierung der Effektorcaspase 3 erfolgt in einem frühen Stadium der Apoptose. Dabei entsteht aus dem inaktiven Proenzym (32 kDa) ein aktives Heterodimer (17 und 12 kDa Untereinheit). Das aktivierte Caspase-3-Enzym kann dann mit Hilfe der FACS-Analyse und einem spezifischen Antikörper gemessen werden. Um eine Autofluoreszenz der Zellen oder einen Messeffekt durch den Antikörper auszuschließen, wurden unbehandelte Kontrollzellen zusätzlich zu der Caspase-3-Färbung ohne Zugabe eines Antikörpers und mit einer Isotyp-Kontrolle gemessen.

Fixierung der Zellen

Die Fixierung der in 2.11.5 vorbereiteten Zellen erfolgte mit 300 µl 2% Paraformaldehyd (w/v), pH 7.4, bei 37°C für 10 min. Nach einer Abkühlungsphase (1 min, auf Eis) und einem Zentrifugationsschritt (1500 rpm, 5 min) wurde die Fixierungslösung abgesaugt. Um die intrazelluläre Antikörperfärbung zu ermöglichen, wurden die fixierten Zellen in 90% Methanol in PBS (v/v) (Permeabilisierung der Membran) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

Antikörperfärbung

Nach dem Zentrifugieren und Absaugen der Permeabilisierungslösung wurden die fixierten Zellen in 300 µl 0.5% BSA in PBS (w/v) gewaschen, zentrifugiert und abgesaugt. Die Zellen wurden dann in 50 µl des Waschpuffers resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Die Zugabe von 1 µl Caspase-3-Antikörper (bzw. IgG-Antikörper), sowie die Inkubation (1h, RT, dunkel) erfolgte im Anschluss. Die Messung der Zellen wurde nach einem erneuten Waschschrift und der Aufnahme in 300 µl PBS durchgeführt.

2.13.5.3 Oberflächenmarkeranalyse

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der Oberflächenmarkerexpression der Antigene CD30, CD117 (c-kit) und CD133 bei den in dieser Arbeit verwendeten Keimzelltumorzelllinien wurden freundlicherweise von Frau Christiane Horn (FACS Routinelabor, II.Medizinische Klinik, UKE Hamburg) durchgeführt.

2.14 Immunhistochemische Untersuchungen

2.14.1 Zytospins

Für die Präparation von Zytospins wurden die Zellen wie in 2.11.5 angegeben vorbereitet und anschließend in 500 µl kaltem PBS resuspendiert. Von jeder Zelllinie wurden 10 Zytospins gefertigt. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension bei 750 rpm für 5 min auf Objektträger zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol (-20°C, 5 min) und kaltem Aceton (4°C, 10 s) fixiert. Die Zytospin-Objektträger wurden ü.N. getrocknet und dann mit Antikörpern gegen CD30, CD117 oder CD133 inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion mit dem spezifischen sekundären Antikörper, sowie mittels der alkalischen Phosphatase-Anti-Alkalischen Phosphatasetechnik, kombiniert mit einer Neu-Fuchsin-Färbung.

2.14.2 Gewebeproben und immunhistochemische Analyse

Die immunhistochemische Untersuchung der Expression der Glutathion-S-transferase 1 (GSTP1), der Glycogenphosphorylase (PYGB/M) und von Galectin-1 (LGALS1) wurde an Bouin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (5 Seminome und 4 Nicht-Seminome) durchgeführt. Die Färbungen wurden mit Hilfe eines Vectastain ABC Elite Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Von dem Gewebe wurden 6 µm dicke Schnitte hergestellt, die ü.N bei 4°C mit den Primärantikörpern inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen sekundären Antikörper. Als Gegenfärbung wurde mit Hämatoxilin gefärbt und als Negativkontrollen wurde jeweils ein Gewebeschnitt nach gleichem Protokoll, aber ohne Primärantikörper mit behandelt.

Kapitel 3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der verwendeten Keimzelltumorzelllinien

Für eine fundierte und detailgetreue Interpretation der Ergebnisse der folgenden Proteomanalysen wurden die verwendeten Zelllinien per se nicht nur auf der Proteomebene, sondern auch in Bezug auf Charakteristika wie Wachstumsverhalten, bereits bekannte Markerproteine oder auch auf ihre Expression auf mRNA-Ebene hin untersucht.

3.1.1 Wachstumsverhalten und Populationsverdopplung

Zellen bzw. Zelllinien unterscheiden sich in unzähligen Merkmalen. Darunter fallen nicht nur molekularbiologische Charakteristika, wie z.B. Unterschiede in der Gen- und Proteinexpression, sondern auch ganz „offensichtliche“ Parameter, wie die Morphologie der einzelnen Zelle oder das Wachstumsverhalten einer Zellpopulation.

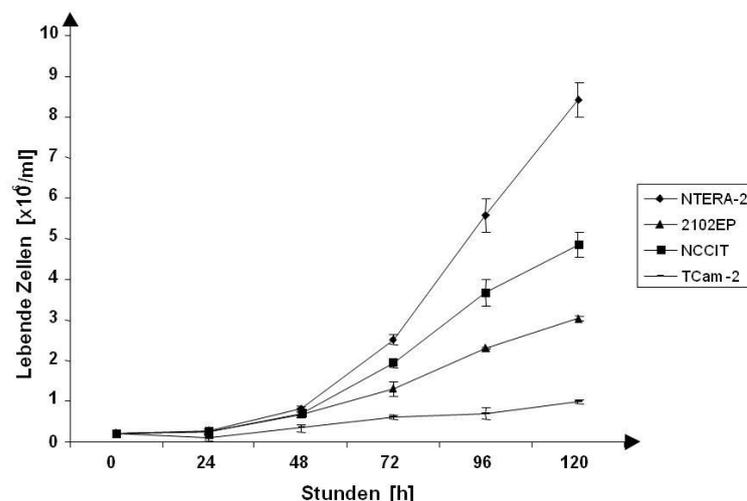


Abbildung 11: Wachstumskurven der EC-Zelllinien und TCam-2

Die Wachstumskurven der verwendeten Cisplatin-sensitiven Zelllinien und der Seminom-Zelllinie wurden durch die Zählung der lebenden Zellen über einen Zeitraum von 120h bestimmt.

Die Zellzählungen der verwendeten Zelllinien zeigten über die Versuchsdauer von 120h, besonders im Vergleich zwischen den EC-Zelllinien NT2, 2102EP und NCCIT und der Seminom-Zelllinie TCam-2, deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten. Die EC-Zelllinien gelangten nach der lag-Phase, einer Verzögerungsphase der Zellproliferation nach dem Aussäen, in die log-Phase. In dieser Phase proliferierten die Zellen unter nicht limitierten Bedingungen und konstanter Verdopplungszeit. Während die EC-Zelllinien bereits nach 48h in die log-Phase übergingen, war bei der Seminom-Zelllinie TCam-2 erst bei ungefähr 96h Kultivierungszeit ein leichter Anstieg in der Zellproliferation zu beobachten (Abbildung 11).

Für die Bestimmung der Populationsverdopplungszeiten wurde die folgende Formel verwendet:

$$PD = \frac{\ln d_{Ende} - \ln d_{Start}}{\ln 2}$$

d_{Ende} : Zellzahl am letzten Tag des Experiments

d_{Start} : Zellzahl der ausgesäten Zellen am ersten Tag des Experiments

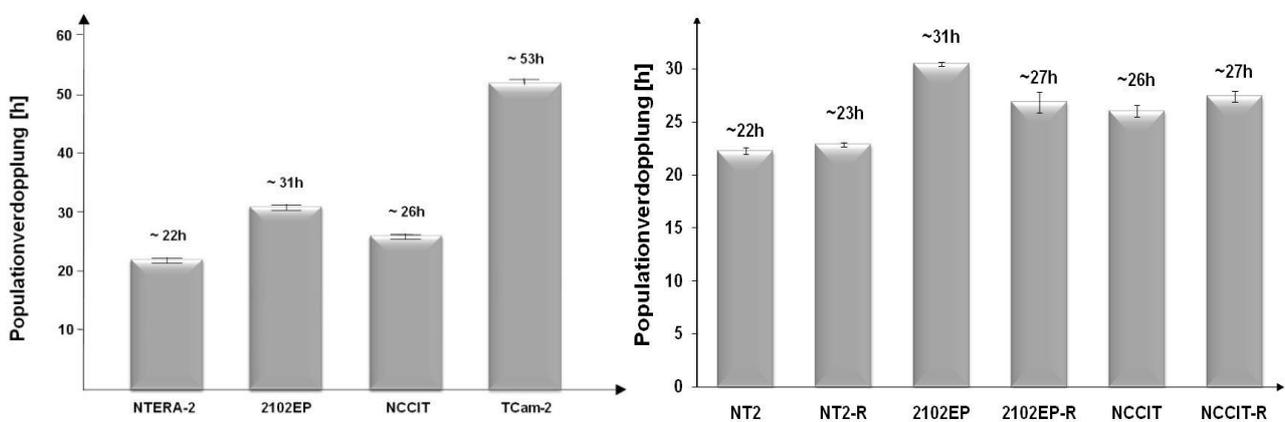


Abbildung 12: Populationsverdopplung

Populationsverdopplungszeiten der sensitiven Embryonalkarzinom-Zelllinien im Vergleich mit der Seminom-Zelllinie TCam-2 (links) und der Cisplatin-sensitiven EC-Zelllinien im Vergleich mit den Cisplatin-resistenten Tochterzelllinien (rechts). Anhand der Anzahl der zu Beginn des Versuchs ausgesäten Zellen und der definierten Versuchsdauer wurde die Populationsverdopplungszeit berechnet.

Im direkten Vergleich zwischen den Cisplatin-resistenten Zelllinien und den parentalen Zelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten und dementsprechend auch nicht bei den Populationsverdopplungszeiten festgestellt werden. Während sich die Cisplatin-sensitiven und -resistenten Embryonalkarzinom-Zelllinien in durchschnittlich 26h verdoppelten, wiesen die TCam-2-Zellen mit 53h eine mehr als zweifach höhere Verdopplungszeit auf.

3.1.2 Oberflächenmarkeranalyse

Embryonalzellkarzinome und Seminome können in der HE-Färbung teilweise schwer zu differenzieren sein. Die Differenzierung zwischen einem Embryonalkarzinom und einem Seminom ist aufgrund der unterschiedlichen Therapieansätze aber klinisch wichtig.

Mit den Zellmembranproteinen CD30 und CD117 stehen zwei Marker zur Verfügung, anhand derer eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Tumortypen möglich ist. Während ein Embryonalkarzinom generell CD30+ und CD117- ist, weist ein Seminom einen CD30-/CD117+ -Phänotyp auf (Pallesen et al. 1988; Izquierdo et al. 1995; Hittmair et al. 1996). Das Transmembran-Glycoprotein CD133 (PROM1) wurde zudem als ein weiteres Markerprotein für Seminome identifiziert (Gashaw et al. 2007).

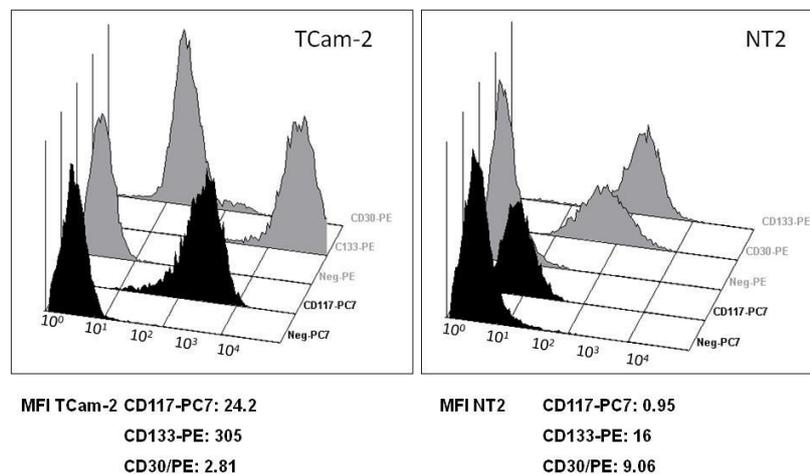


Abbildung 13: Expression von CD30, CD117 und CD133 bei TCam-2 und NTERA-2 (FACS). Die entsprechenden MFI-Werte (mean fluorescence intensity) sind unterhalb des zugehörigen Schaubilds sichtbar.

Mittels der durchflusszytometrischen Analyse der Zelllinien TCam-2 und NTERA-2 konnten die entsprechenden Phänotypen CD30-/CD117+ für die Seminom-Zelllinie TCam-2 und CD30+/CD117- für die Embryonalkarzinomzelllinie NTERA-2 nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte die Zelllinie TCam-2 die für ein Seminom charakteristische positive Expression des Transmembran-Glycoproteins CD133 (Abbildung 13), welches auch als Stammzellmarker (auch in Tumoren) gilt. Interessanterweise zeigten die EC-Zelllinien eine bislang unbekannte Expression von CD133.

Der direkte Vergleich der Oberflächenmarkerexpression von CD30, CD117 und CD133 zwischen den Cisplatin-sensitiven und -resistenten Embryonalzellkarzinomen zeigte bei allen drei Zelllinien eine geringere Expression der untersuchten

Proteinmarker. Insbesondere zeigten die NCCIT-R-Zellen einen deutlichen Expressionsabfall der Marker CD30 und CD117. In Abbildung 14 ist die Expression der Proteinmarker zu sehen.

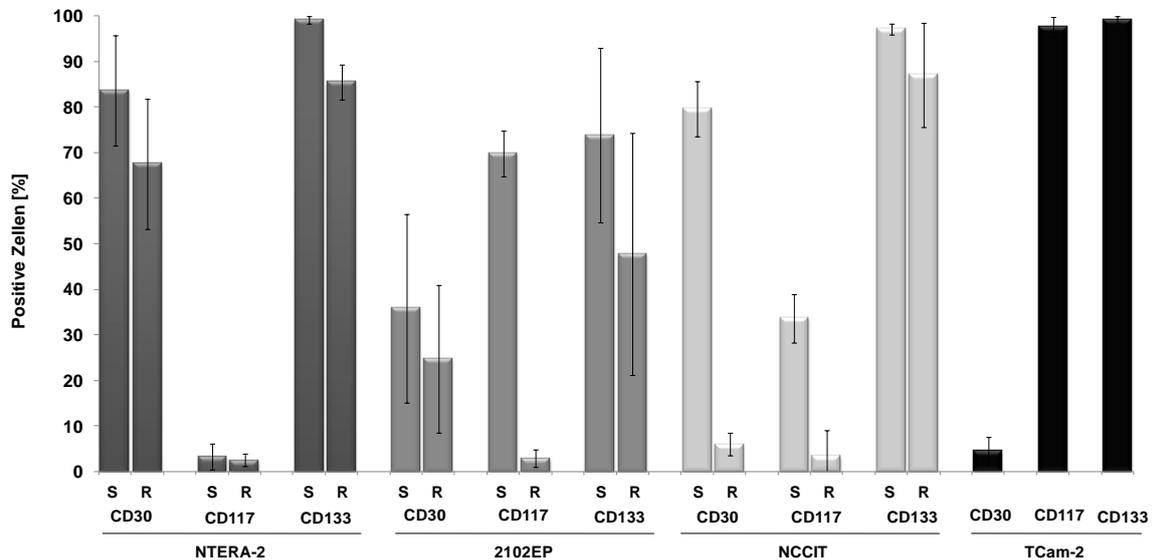


Abbildung 14: Expression von CD30, CD117 und CD133 im Vergleich zwischen den jeweils drei Cisplatin-sensitiven (S) und –resistenten (R), sowie den TCam-2-Zellen. Die Analyse wurde jeweils an drei voneinander unabhängigen Zellproben mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt.

Um die entsprechende Expression der Oberflächenproteine mit einer weiteren Methode bestätigen zu können, wurden Zytoprin-Präparate angefertigt, die mit spezifischen Antikörpern gegen CD30 und CD117 gefärbt wurden (Abbildung 15).

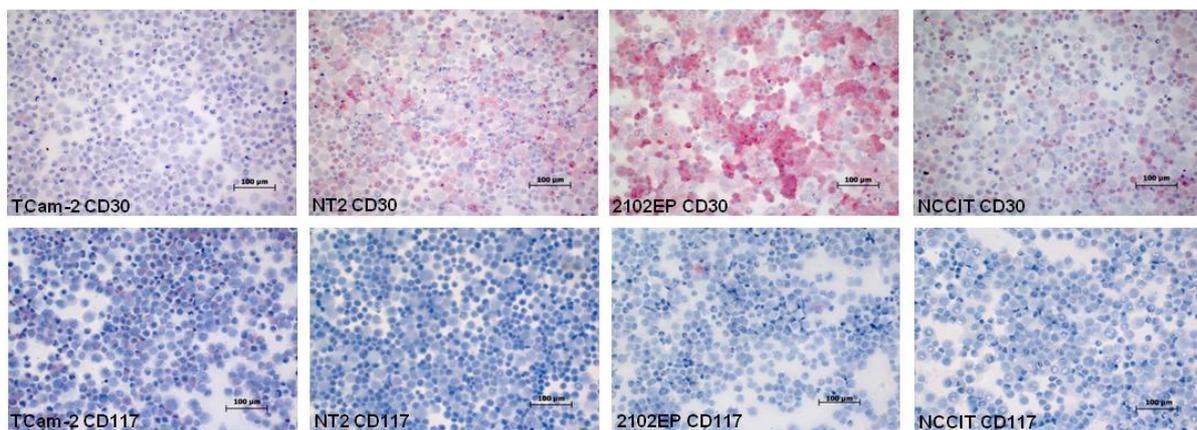


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD30 und CD117 bei den EC-Zelllinien NTERA-2 (NT2), 2102EP und NCCIT, sowie bei der Seminom-Zelllinie TCam-2.

Dabei konnten die zuvor beschriebenen Expressionsmuster der Seminom-Zelllinie TCam-2 (CD30-/CD117+) und der drei Embryonalkarzinom-Zelllinien NTERA-2, 2102EP und NCCIT (CD30+/CD117-) bestätigt werden.

3.1.3 Charakterisierung der Cisplatin-sensitiven Keimzelltumor-Zelllinien auf Proteomebene

Die globale Proteinexpression im Vergleich der verschiedenen Zelllinien erfolgte zu Beginn der Analysen, um mögliche Änderungen in der Proteinexpression durch die Behandlung mit verschiedenen Substanzen im Weiteren interpretieren und einordnen zu können. Hierfür wurden von jeder Zelllinie drei Polyacrylamidgele mit je 1.5 mg Protein angefertigt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Um Qualitäts- und Farbintensitätsunterschiede für die spätere Auswertung auszuschließen, wurden nur Polyacrylamidgele aus einem 2D-PAGE-Lauf miteinander verglichen. Als weitere Qualitätsparameter wurde die Auflösung des Proteinlysats sowohl in der ersten, als auch in der zweiten Dimension berücksichtigt. Die Auswertung bestimmter Areale auf den Polyacrylamidgelen, zu denen insbesondere die Randbereiche bei pH 4 und 7 gehörten, waren trotz konstanter Versuchsbedingungen eher aufwendig. Hier wurde die eindeutige Zuordnung der Proteinspots schon durch geringste Schwankungen auch innerhalb eines Experiments erschwert. Daher war im Anschluss an die Software-basierte Auswertung eine genaue Nachbearbeitung mit Hilfe der Programme erforderlich, um möglichst jeden Spot korrekt zuordnen zu können.

Um einen genauen Überblick über die Proteommuster der verwendeten Zelllinien zu bekommen und wie bereits oben erwähnt, mögliche Unterschiede auf der 2D-PAGE-Ebene zu identifizieren, wurden alle drei Embryonalzellkarzinom-Zelllinien untereinander, sowie gesammelt als Gruppe mit der Seminomzelllinie TCam-2 verglichen.

3.1.3.1 NCCIT und NTERA-2

Der Proteomvergleich der EC-Zelllinien NCCIT und NTERA-2 war besonders in Hinsicht auf Unterschiede bei p53-assoziierten Proteinen interessant, da NCCIT-Zellen im Gegensatz zu NT2-Zellen aufgrund einer Leserastermutation im p53-Gen ein inaktives p53-Protein aufweisen. Zudem hat die Zelllinie NCCIT ihren Ursprung in einem extragonadalen Keimzelltumor.

Für die 2D-PAGE-Analyse wurden Zellen in der log-Phase der Zellkultur geerntet und wie bereits beschrieben präpariert.

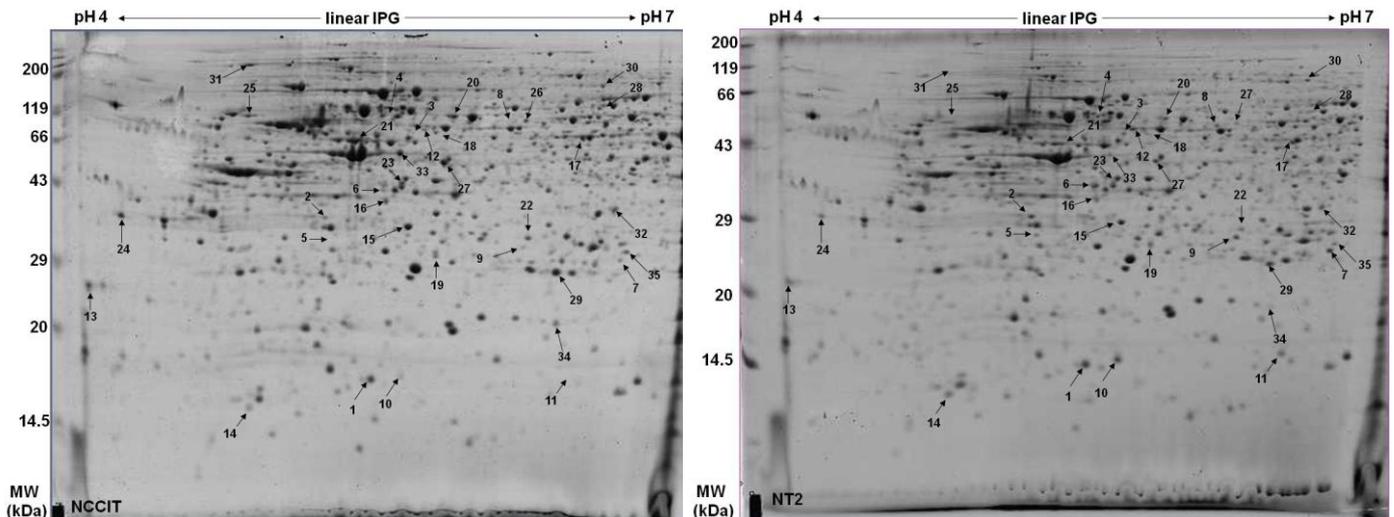


Abbildung 16: 2D-PAGE-Gele des Proteomvergleichs von unbehandelten NCCIT- und NTERA-2-Zellen.

Die im Vergleich zwischen beiden Zelllinien als differentiell exprimierte und mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten stehen in Tabelle 25.

Tabelle 25: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich der Zelllinien NCCIT und NTERA-2

Spot auf Gel	fold change	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	Coverage (%)
NTERA-2 höher						
1	2.2	CAG33298.1	CRABP1	15.7	5.3	66.4
2	2.2	BAD97099.1	chloride intracellular channel 1 variant	27.3	5.1	44.4
3	2.3	NP_002264.1	keratin 8	53.7	5.5	29.6
4	2.5	CAI16744.1	internekin neuronal intermediate filament protein, alpha	55.5	5.3	27.3
5	2.8	P04083	annexin A1	22.7	5.4	32.0
6	2.9	AAB88188.1	beta tubulin	39.0	4.7	25.1
7	2.9	AAH01348.1	HNRPH1 protein	50.0	5.9	23.8
8	3.3	gi 49258360 pdb 1OF7 H	Chain H, The Structure Of Human Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase In Complex With The Antidipsotropic Inhibitor Daidzin	55.0	5.7	14.0
9	3.7	AAP36086.1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	57.7	6.4	17.6
10	5.5	P29373	CRABP2	15.7	5.5	*
11	81.6	Q01469	Fatty-acid-binding protein, epidermal (E-FABP) (Psoriasis-associated)	15.4	6.8	48.0
NCCIT höher						
12	2.0	Q9Y230	RuvB-like 2 (EC 3.6.1.-) (48-kDa TATA box-binding protein-interacting protein)	51.2	5.5	16.0
13	2.1	gi 23308579	inactive progesterone receptor, 23 kD	19.0	4.4	32.0
14	2.1	BAD96946.1	F-actin capping protein alpha-1 subunit variant	33.1	5.4	36.4
15	2.1	P35232	prohibitin	29.8	5.6	47.4
16	2.2	gi 34650074	hypothetical protein LOC51031	33.6	5.4	38.0
17	2.2	CAA47179.1	enolase	49.9	5.8	13.3
18	2.3	CAB93423.1	GSS	52.5	5.7	35.2
19	2.4	AAB31085.1	prosoma beta-subunit; HSBpros26	26.0	5.7	46.4
20	2.4	AAC51518.1	ER-60 protein	57.2	5.9	36.0
21	2.5	P52597	HNRPF protein	46.0	5.4	26.0
22	2.6	CAA66808.1	enoyl-CoA hydratase	31.9	8.9	26.6
23	2.6	P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I/G(S)/G(T) beta subunit 1	38.0	5.6	32.0
24	3.1	AAAT3055.1	Human pre-mRNA splicing factor SF2p32, complete sequence.]	31.3	4.7	32.0
25	3.1	BAD92771.1	tumor rejection antigen (gp96) 1 variant	66.2	5.1	14.8
26	3.1	AAAG1298.1	transfer RNA-Trp synthetase	53.4	5.7	21.7
27	3.3	gi 4758906	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	43.0	5.6	43.0
28	3.4	AAH39006.1	Dihydropyrimidinase-like 3	62.4	6.0	17.4
29	3.4	CAB52550.1	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	20.0	6.3	37.6
30	4.1	AAC24722.1	TRAP1	70.6	6.6	28.7
31	6.9	AAK74072.1	heat shock protein gp96 precursor	90.4	4.8	15.1
32	7.2	AAV68044.1	purine nucleoside phosphorylase	32.3	6.5	37.7
33	7.4	gi 180570	creatine kinase	42.9	5.3	23.0
34	8.5	AAV14958.1	Unknown	18.5	6.3	27.2
35	13.8	P60174	Triosephosphate Isomerase (Tim)	26.8	6.5	6.5

Im Anschluss an die 2D-PAGE (Abbildung 16) folgte die Auswertung der Polyacrylamidgele mit der Software PDQuest, die im Vergleich zwischen NCCIT- und NTERA-2-Zellen insgesamt 66 differentiell regulierte (mindestens zweifache

Regulation) Proteinspots zeigte. Von diesen 66 Proteinspots konnten massenspektrometrisch 35 Proteine (53%) eindeutig identifiziert werden. Von den identifizierten Proteinspots zeigten jeweils 24 Spots bei den NCCIT-Zellen und 11 Spots bei den NTERA-2-Zellen eine stärkere Expression (Tabelle 25).

Die im Vergleich zwischen NCCIT und NTERA-2 identifizierten Proteine wurden weiterhin auf Genebene mittels semiquantitativer RT (Reverse Transkriptase)-PCR untersucht. Diese Analyse vermittelt einen Überblick darüber, ob das zu untersuchende Gen auf mRNS-Ebene überhaupt bzw. in geringerer oder größerer Kopienzahl vorhanden ist.

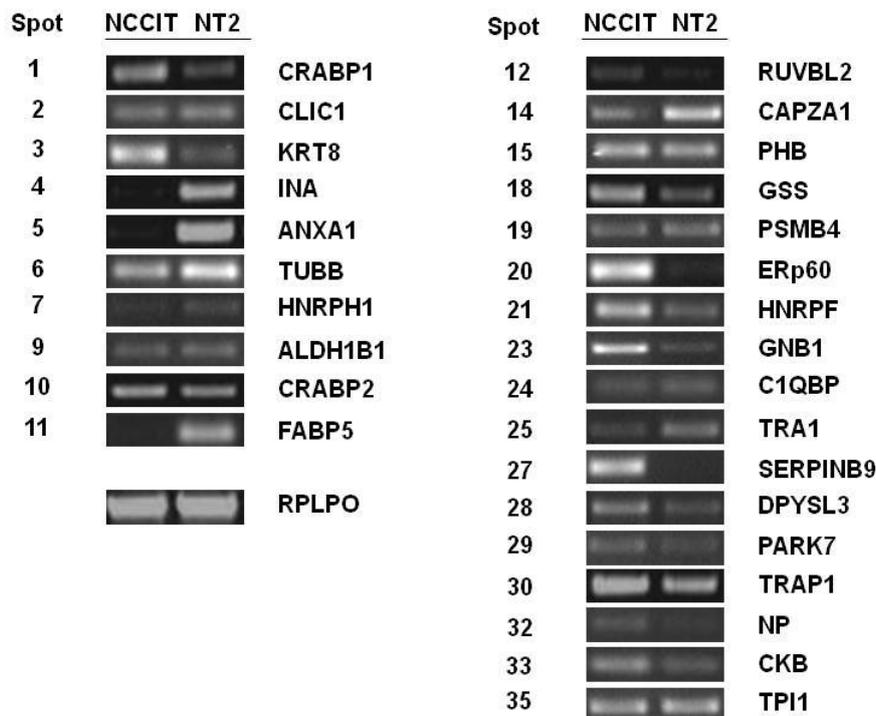


Abbildung 17: Analyse der differentiell regulierten Proteine aus dem Proteomvergleich NCCIT und NTERA-2 auf mRNS-Ebene.

Die Spotnummern entsprechen denen in Tabelle 25. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte gegen RPLP0.

Von den 35 identifizierten Proteinen gelang für 27 Proteine (77%) auf Genebene ein Nachweis mittels RT-PCR. Dabei wurden Unterschiede bei 17 Proteinen (63%) in der mRNS-Expression beobachtet, die auch mit den Unterschieden in der Proteinexpression korrespondierten. Dies deutet darauf hin, dass die Mehrzahl der Proteine auf der Transkriptionsebene reguliert wird. Die Proteine, bei denen die Protein- und die mRNS-Expression nicht übereinstimmen, werden vermutlich über die Translation oder auch posttranslationale Modifikationen reguliert.

3.1.3.2 NTERA-2 und 2102EP

Beim Vergleich zwischen NTERA-2 und 2102EP wurden zwei Zelllinien mit einem gonadalen Ursprung, sowie einem funktionellem p53-Protein analysiert. Auch hier erfolgte die Auswertung der Polyacrylamidgele (Abbildung 18) mit der PDQuest-Software.

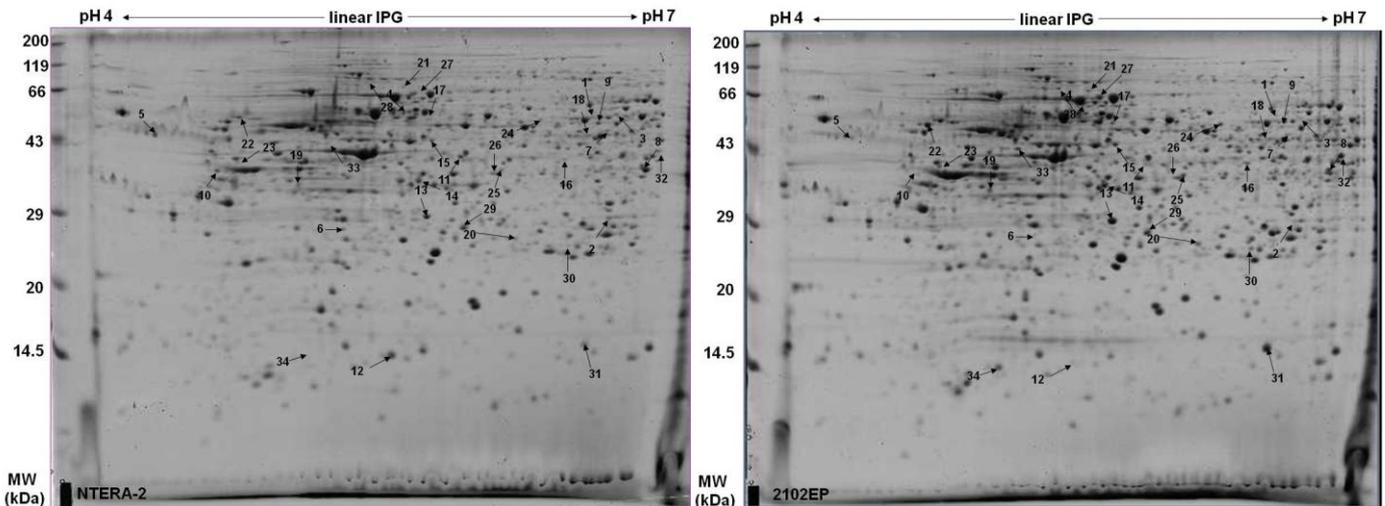


Abbildung 18: 2D-PAGE-Gele von unbehandelten NTERA-2- und 2102EP-Zellen.

Die im Vergleich zwischen beiden Zelllinien als differentiell exprimierte und mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten stehen in Tabelle 26.

Tabelle 26: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich der Zelllinien NTERA-2 und 2102EP

Spot auf Gel	fold change	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	Coverage (%)
NTERA-2 höher						
1	2.2	O94925	Splice isoform GAC, Glutaminase kidney isoform, mitochondrial precursor	66.3	8.1	22
2	2.5	AAH08310.1	Phosphomannomutase 2	28.4	6.4	29
3	2.5	Q14195	Dihydropyrimidinase related protein-3 (DRP-3)	62.3	6.0	17
4	2.5	CAI16744.1	Interneuron neuronal intermediate filament protein, alpha	55.5	5.3	27
5	2.6	AAP35472.1	calumenin [Hs]	37.2	4.5	38
6	2.8	P04083	annexin A1	22.7	5.4	32
7	3.5	Q8NI51	zinc-finger protein CTCF-T	75.6	8.6	16
8	3.7	CAI16496.1	annexin A1	38.9	6.6	32
9	3.9	P30837	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial precursor (ALDH class 2)	57.7	6.4	21
10	4.3	AAH18991.1	HDGF protein [Homo sapiens]	26.9	4.7	29
11	11.5	AAP35319.1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	43.0	5.6	34
12	41.3	CAG33298.1	CRABP1	15.7	5.3	66
2102EP höher						
13	2.1	P35232	prohibitin	29.8	5.6	57
14	2.2	AAH00439.1	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	39.6	6.2	27
15	2.2	AAH09586.1	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	53.3	5.9	18
16	2.2	AAP35651.1	galactokinase 1	42.7	6.0	37
17	2.2	AXX32750.1	FK506 binding protein 4 [synthetic construct]	52.1	5.3	30
18	2.2	P23526	Splice isoform from Adenosylhomocysteinase	48.1	6.4	27
19	2.4	O43396	Thioredoxin-like 1	32.6	4.8	41
20	2.5	CAG29359.1	GRB2	25.2	6.1	38
21	2.7	P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial precursor (Complex I-75kDa) (CI-75kDa)	80.5	5.9	21
22	2.9	P07237	Protein disulfide-isomerase precursor (EC 5.3.4.1)	57.5	4.8	17
23	3.0	BAD96361.1	tetratricopeptide repeat domain 1 variant	33.9	4.8	22
24	3.1	P23381	tryptophanyl-tRNA synthetase isoform b	49.2	5.8	27
25	3.1	AAH73991.1	ENO1 protein	37.3	5.9	23
26	3.2	P50213	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha precursor Stress-70 protein, mitochondrial precursor (75 kDa glucose regulated protein)	40.0	6.5	
27	3.3	P38646	(GRP 75)	73.9	5.9	22
28	3.4	gil14250668	Cortactin, isoform b	57.6	5.2	21
29	4.6	AAB31085.1	prosome beta-subunit; HSBpros26	25.9	5.7	28
30	5.6	NP_054817.2	peroxiredoxin 3 isoform b	26.1	7.1	26
31	6.2	AAP36117.1	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	15.5	6.6	47
32	6.3	Q99729-02	Splice isoform 3 from Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A/B	30.7	5.4	22
33	10.8	BAD97061.1	p47 protein isoform a variant	40.5	5.0	30
34	85.4	gil42542978 pdb 1GZW B	Chain B, X-Ray Crystal Structure Of Human Galectin-1	14.9	5.3	59

Als mindestens zweifach differentiell reguliert wurden beim Vergleich NTERA-2 mit 2102EP insgesamt 119 Proteinspots bestimmt. Davon konnten lediglich 34 Proteine

(29%) massenspektrometrisch identifiziert werden. Von diesen 34 Proteinen waren 12 Proteine bei den NTERA-2-Zellen und 22 Proteine bei den 2102EP-Zellen höher exprimiert (Tabelle 26).

3.1.3.3 NCCIT und 2102EP

Mit NCCIT stand in diesem Vergleich wieder die p53-mutierte und extragonadale Embryonalkarzinom-Zelllinie der Zelllinie 2102EP, die einen gonadalen Ursprung, sowie ein intaktes p53-Protein aufweist, gegenüber. Wie bereits bei den beiden vorangegangenen Experimenten wurde auch hier die Auswertung der Polyacrylamidgele (Abbildung 19) mit PDQuest durchgeführt.

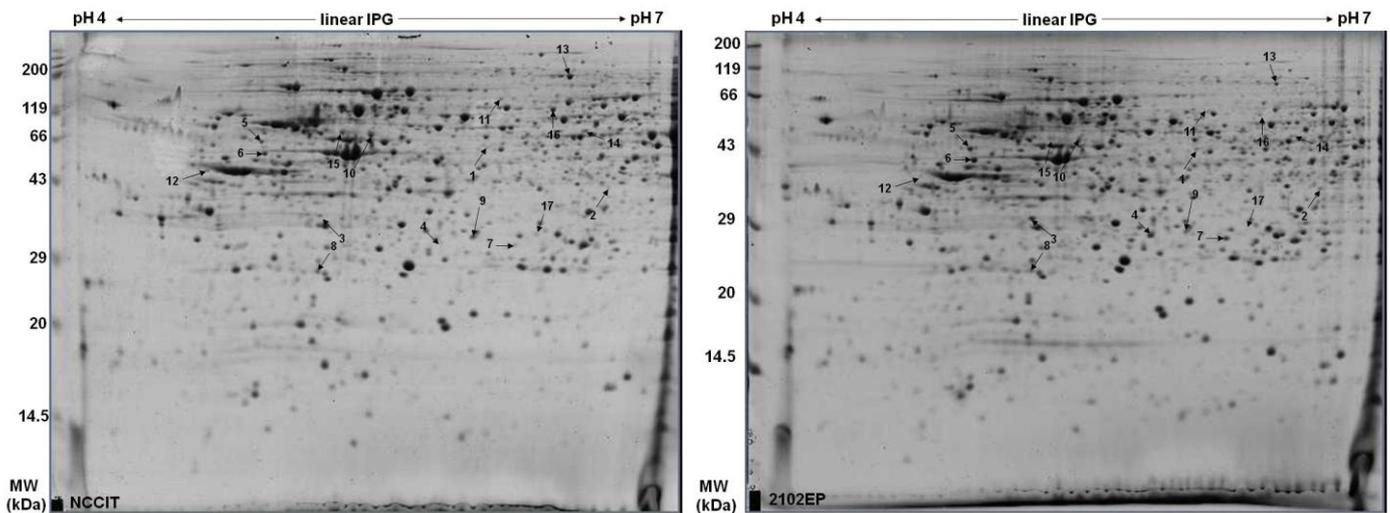


Abbildung 19: 2D-PAGE-Gele von unbehandelten NCCIT- und 2102EP-Zellen

Die im Vergleich zwischen beiden Zelllinien als differentiell exprimierten und mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten sind in Tabelle 27 zu sehen.

Insgesamt wurden bei diesem Experiment 74 Proteinspots als mindestens zweifach differentiell reguliert nachgewiesen, von denen aber nur 17 Proteine (23%) eindeutig identifiziert werden konnten. Davon waren 10 Proteine bei NCCIT und 7 Proteine bei 2102EP stärker exprimiert.

Tabelle 27: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich der Zelllinien NCCIT und 2102EP

Spot auf Gel	fold change	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	Coverage (%)
2102EP höher						
1	2.3	AAH01951.1	Proliferation-associated 2G4, 38kDa	38.3	7.2	28
2	2.4	CAI41098.1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	35.3	6.5	17
3	2.6	AAD26137.1	nuclear chloride channel	27.3	5.0	66
4	2.6	Q13162	Peroxiredoxin 4 (EC 1.11.1.15) (Prx-IV) (Thioredoxin peroxidase AO372)	30.8	5.9	33
5	2.6	AAA52388.1	gamma enolase	44.6	4.9	40
6	3.3	Q96H53	HSPA8 protein	64.8	5.4	29
7	4.6	gij15928913	Unknown	21.2	5.6	39
NCCIT höher						
8	2.2	CAG46622.1	RBM8A	20.0	5.5	41
9	2.7	P30040	Endoplasmatic reticulum protein ERp29 precursor	29.0	6.8	26
10	2.7	CAB66543.1	Actin-like protein 6A	47.8	5.5	28
11	2.8	gij57863257	T-complex protein 1 isoform a	60.9	6.0	27
12	3.0	gij12804995	hepatoma-derived growth factor (high-mobility group protein 1-like)	28.3	4.7	27
13	3.5	P15311	villin 2	69.3	6.5	28
14	4.2	P05455	Lupus La Protein (Sjogren syndrome type B antigen) (SS-B)	47.0	6.7	26
15	5.8	Q53FS0	actin-like 6A isoform 1	48.0	5.4	34
16	10.1	Q14195	Dihydropyrimidinase related protein-3 (DRP-3)	62.3	6.0	20
17	11.5	Q9NVS9	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase	30.3	6.6	26

Für eine übersichtlichere Darstellung der differentiell regulierten Proteine aus den vorangegangenen Proteomvergleichen wurden diese in die fünf biologischen Funktionsgruppen Metabolismus, Apoptose, Transkription/Translation, Zytoskelett und Signalübertragung/Transport eingeordnet. Die Einteilung erfolgte aufgrund bekannter Daten zu diesen Proteinen, die in Datenbanken wie SwissProt (www.expasy.org) und NCBI (PubMed) recherchiert wurden.

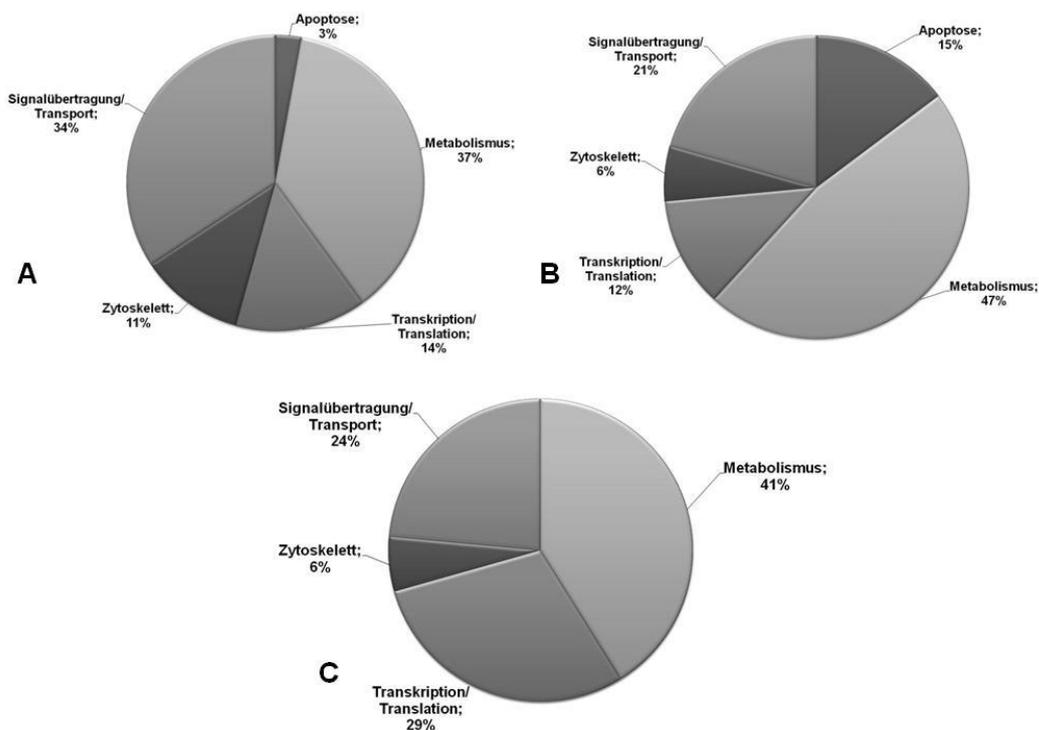


Abbildung 20: Klassifizierung der mindestens zweifach regulierten Proteine in biologische Funktionsgruppen bei (A) NCCIT und NTERA-2, (B) NTERA-2 und 2102EP und (C) NCCIT und 2102EP zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit.

3.1.3.4 Cellular Retinoic Acid Protein 1 (CRABP1)

Das Cellular Retinoic Acid Protein 1 (CRABP1), welches zu der Familie der intrazellulären Lipid-bindenden Proteine gehört, wurde bei zwei der vorangegangenen Vergleiche als differentiell reguliert identifiziert. Während NTERA-2- und NCCIT-Zellen CRABP1 exprimierten, konnte das Protein in den 2102EP-Zellen nicht nachgewiesen werden. Frühere Untersuchungen zeigten, dass NTERA-2-Zellen, im Gegensatz zu 2102EP-Zellen, die Fähigkeit besitzen, in der Gegenwart von Retinolsäure (ATRA) zu differenzieren (Andrews 1982; Matthaei et al. 1983; Andrews 1984). Zwar konnte die genaue Funktion des CRABP1-Proteins bislang nicht geklärt werden, aber es wird neben der Bindung und dem Transport von Retinolsäure in den Zellkern auch eine Beteiligung an der Regulation des Retinolsäurelevels in der Zelle vermutet (Boylan et al. 1992; Fiorella et al. 1994; Ong 1994). Aufgrund der vorliegenden Fakten wurden nähere Untersuchungen mit den Methoden RT-PCR, Western-Blot und Mini-2D-Blots durchgeführt.

Für die Analyse auf Genebene wurde RNS der verwendeten Embryonalkarzinom-Zelllinien isoliert und mittels semiquantitativer RT-PCR und CRABP1-spezifischen Primern untersucht. Von jeder Zelllinie wurden drei voneinander unabhängige Proben analysiert.

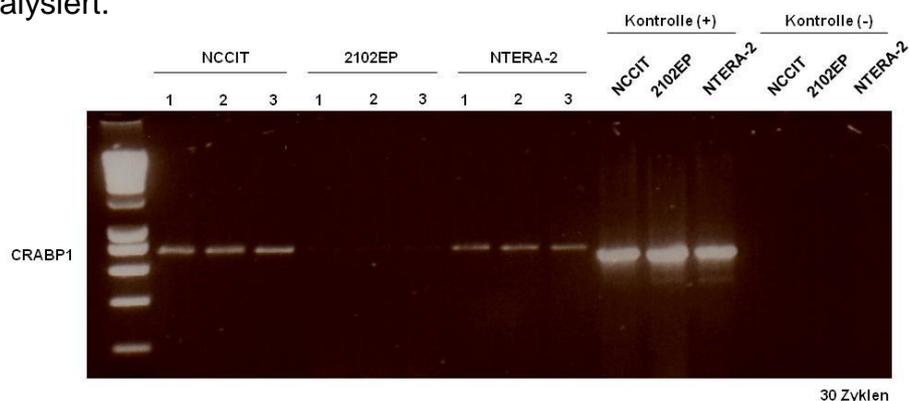


Abbildung 21: RT-PCR Analyse mit Primern für CRABP1.

CRABP1 wurde als differentiell reguliertes Protein in der 2D-PAGE-Analyse und Massenspektrometrie identifiziert. Für die Analyse wurde 150ng cDNS eingesetzt. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet. Eine Negativkontrolle ohne cDNS wurde parallel durchgeführt.

Die RT-PCR-Analyse bestätigte das gleiche Expressionsmuster analog der Ergebnisse der 2D-PAGE. Während in den Zelllinien NTERA-2 und NCCIT CRABP1 nachgewiesen werden konnte, zeigte 2102EP keinerlei CRABP-1-Expression.

Um die genaue Lokalisation und Expression des in der 2D-PAGE-Analyse gefundenen differentiell regulierten Proteins CRABP1 zu bestätigen, wurden

sogenannte Mini-2D-PAGE-Gele der Zelllinien NTERA-2 und 2102EP nach dem Western-Blot-Prinzip mit anschließender Antikörper-Detektion hergestellt.

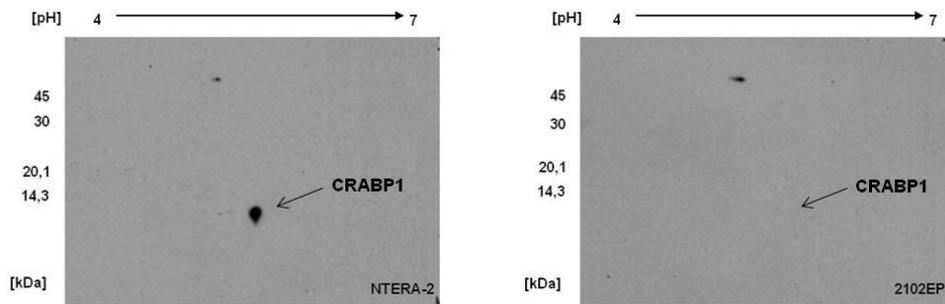


Abbildung 22: Mini-2D-Analyse mit einem spezifischen Antikörper gegen CRABP1. Es wurden 20 µg Proteinlysate pro Gel aufgetragen. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet (mittig im oberen Drittel der Gele lokalisiert).

Auch die Mini-2D-PAGE-Analyse bestätigte die Ergebnisse der 2D-Analyse und der RT-PCR. Es konnte eine deutliche Expression von CRABP1 bei NTERA-2, dagegen keine Expression bei 2102EP gezeigt werden.

3.1.3.5 Vergleich der Seminomzelllinie TCam-2 mit den Embryonalkarzinom-Zelllinien NTERA-2, 2102EP und NCCIT

Nach den Proteomvergleichen der Embryonalkarzinom-Zelllinien NTERA-2, 2102EP und NCCIT untereinander, wurden diese drei Zelllinien als repräsentative Gruppe von Nicht-Seminomen mit vornehmlich Embryonalzellkarzinom-Charakter auf Proteomebene mit der Seminomzelllinie TCam-2 verglichen. Da TCam-2 die derzeitige einzige etablierte Seminomzelllinie darstellt, war hier ein Gruppenvergleich nicht möglich.

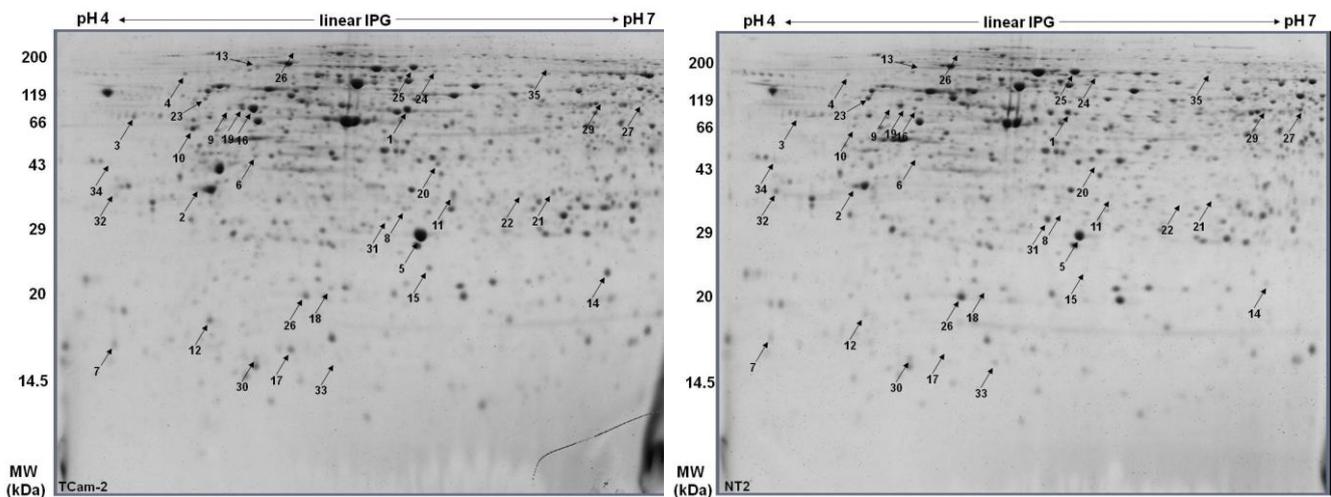


Abbildung 23: 2D-PAGE-Gele von unbehandelten TCam-2- und NTERA-2-Zellen

Die im Vergleich zwischen beiden Zelllinien als differentiell exprimierte und mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten stehen in Tabelle 28.

Insgesamt wurden in diesem Proteomvergleich 37 Proteine als mindestens zweifach differentiell reguliert gefunden, von denen 36 Proteine (97%) massenspektrometrisch identifiziert werden konnten. Dabei waren 23 Proteine bei TCam-2 stärker und 13 Proteine niedriger exprimiert (Tabelle 28).

Tabelle 28: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich der Zelllinien TCam-2 mit den EC-Zelllinien NTERA-2, 2102EP und NCCIT

Spot auf Gel	fold Change	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	peptide count
TCam2 höher						
1	2.21	P15311	Ezrin - Homo sapiens (Human)	69370	5.94	18
2	2.22	P67936	Tropomyosin alpha-4 chain - Homo sapiens (Human)	28504	4.67	17
3	2.34	O43852	Calumenin precursor - Homo sapiens (Human)	37084	4.47	17
4	2.55	O43491	Band 4.1-like protein 2 - Homo sapiens (Human)	112519	5.34	12
5	2.56	P09211	Glutathione S-transferase P - Homo sapiens (Human)	23341	5.43	13
6	2.87	P29692	Elongation factor 1-delta - Homo sapiens (Human)	31103	4.9	15
7	2.97	P60660	Myosin light polypeptide 6 - Homo sapiens (Human)	16919	4.56	14
8	5.61	Q13162	Peroxiredoxin-4 - Homo sapiens (Human)	30521	5.86	14
9	5.73	P09104	Gamma-enolase - Homo sapiens (Human)	47239	4.91	30
10	6.65	Q15293	Reticulocalbin-1 precursor - Homo sapiens (Human)	38866	4.86	14
11	7.24	P07339	Cathepsin D precursor - Homo sapiens (Human)	44524	6.1	20
12	10.22	P43487	Ran-specific GTPase-activating protein - Homo sapiens (Human)	23296	5.19	5
13	11.05	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 - Homo sapiens (Human)	65978	8.16	13
14	11.80	P23528	Cofilin-1 - Homo sapiens (Human)	18491	8.22	14
15	12.50	Q9BV57	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase - Homo sapiens (Human)	21485	5.43	12
16	14.24	P09104	Gamma-enolase - Homo sapiens (Human)	47239	4.91	29
17	14.76	P09382	Galectin-1 - Homo sapiens (Human)	14706	5.34	14
18	16.05	Q95881	Thioredoxin domain-containing protein 12 precursor - Homo sapiens (Human)	19194	5.24	10
19	16.58	P09104	Gamma-enolase - Homo sapiens (Human)	47239	4.91	28
20	17.04	P12429	Annexin A3 - Homo sapiens (Human)	36353	5.63	26
21	408.27	P11216	Glycogen phosphorylase, brain form - Homo sapiens (Human)	96635	6.4	19
22	684	P11216	Glycogen phosphorylase, brain form - Homo sapiens (Human)	96635	6.4	24
TCam2 niedriger						
23	2.27	Q09028	Histone-binding protein RBBP4 - Homo sapiens (Human)	47626	4.74	16
24	2.46	P50579	Methionine aminopeptidase 2 - Homo sapiens (Human)	52858	5.57	27
25	2.48	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	73635	5.87	25
26	2.63	Q4V328	GRIP1-associated protein 1 - Homo sapiens (Human)	95931	5.08	34
27	3.05	P05455	Lupus La protein - Homo sapiens (Human)	46808	6.68	15
28	3.93	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 - Homo sapiens (Human)	16821	5.08	15
29	4.64	P30520	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2 - Homo sapiens (Human)	50066	6.13	25
30	6.15	P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	16764	6.3	6
31	7.38	P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 - Homo sapiens (Human)	24808	5.33	15
32	14.40	Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	31343	4.4	12
33	24.51	Q9BRA2	Thioredoxin domain-containing protein 17 - Homo sapiens (Human)	13932	5.4	10
34	27.90	Q13765	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha - Homo sapiens (Human)	23370	4.52	9
35	41.02	Q14195	Dihydropyrimidinase-related protein 3 - Homo sapiens (Human)	61924	6.04	17

Die in dem vorliegenden Proteomvergleich untersuchten EC-Zelllinien NTERA-2, 2102EP und NCCIT wurden als Gruppe im Vergleich mit der TCam-2-Zelllinie analysiert, daher wurden die Expressionsintensitäten der einzelnen Proteine lediglich durch einen Mittelwert in der Delta2D-Auswertung berücksichtigt. Zur weiteren Analyse der Zelllinien-spezifischen Expression wurden drei Proteine ausgewählt. Neben der Glykogenphosphorylase (PYGB/M), die eine Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel spielt, wurde die Glutathion-S-Transferase P1 (GSTP1) näher untersucht. GSTP1 ist am Prozess der Glykogenolyse (Abbau von Glykogen) beteiligt und besitzt außerdem die Fähigkeit, Cisplatin an Glutathion zu binden und dadurch zu inaktivieren. Diese Detoxifikationsfähigkeit per se und die hohe Expression des Proteins wurde als Erklärung für die inherent hohe Chemosensitivität von Keimzelltumoren angenommen (Masters et al. 1996; Mayer et al. 2003b). Als drittes Protein wurde Galectin 1 analysiert. Galectin 1 ist an zellulären Prozessen wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Angiogenese beteiligt und ist in vielen Tumorentitäten hochreguliert (Demydenko et al. 2009).

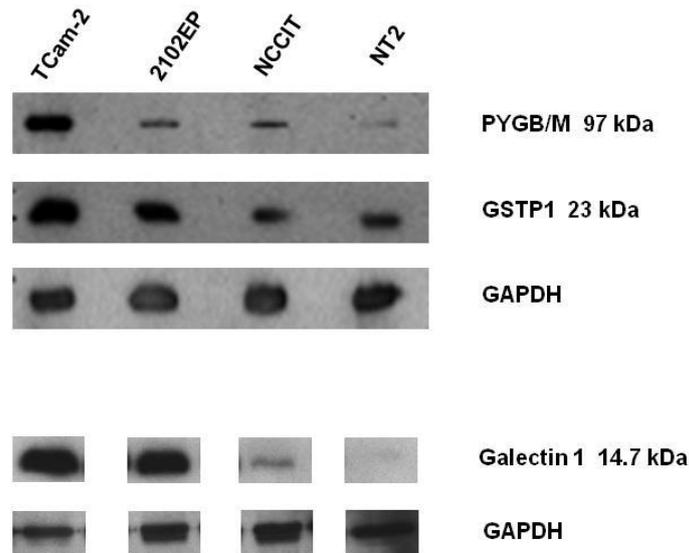


Abbildung 24: Nachweis von drei differentiell exprimierten Proteinen mittels Western-Blot-Analyse aus dem Proteomvergleich TCam-2 und EC-Zelllinien. Die Proteine Glykogenphosphorylase (PYGB/M), Glutathion-S-Transferase P1 (GSTP1) und Galectin 1 wurden als mindestens 2-fach differentiell reguliert identifiziert. Es wurde 20 µg Proteinlysate aufgetragen. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet.

Die stärkere Expression der drei Proteine in den TCam-2-Zellen konnte mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Während NTERA-2-, 2102EP- und NCCIT-Zellen nur eine geringe bzw. keine Expression von PYGB/M und Galectin 1 (NTERA-2 und NCCIT) aufwiesen, wurde Galectin 1 von den 2102EP-Zellen in einer vergleichbaren Intensität wie in den TCam-2-Zellen exprimiert. Die Expression von GSTP1 wies in den drei EC-Zelllinien ein vergleichsweise ähnliches Niveau auf, das aber eindeutig schwächer war, als bei den TCam-2-Zellen.

3.2 Cisplatin-induzierte Apoptose in Keimzelltumoren *in vitro*

3.2.1 Bestimmung der IC₅₀-Dosis von Cisplatin mit Hilfe des MTT-Assays

Um die Wirkung von Cisplatin bzw. weiterer Substanzen auf Keimzelltumoren *in vitro* untersuchen und vor allem auch miteinander vergleichen zu können, wurden die verwendeten Zelllinien der entsprechenden IC₅₀-Dosis über einen Zeitraum von 48h ausgesetzt. Im Vorfeld der Experimente wurden die IC₅₀-Werte für jede Zelllinie mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt (Tabelle 29). Eine bereits früher in einem anderen Labor durchgeführte IC₅₀-Bestimmung für Cisplatin an den Cisplatin-sensitiven Zelllinien NTERA-2, 2102EP und NCCIT konnte so bestätigt werden (Koch et al. 2003).

Tabelle 29: IC₅₀-Werte und die entsprechende Standardabweichung der Cisplatin-sensitiven Embryonalkarzinom-Zelllinien und ihrer Cisplatin-resistenten Tochterzelllinien für Cisplatin

IC ₅₀ [µM]	Cisplatin
NTERA-2	0.4 (+/- 0.1)
NTERA-2-R	5 (+/- 0.2)
2102EP	0.8 (+/- 0.2)
2102EP-R	5 (+/- 0.3)
NCCIT	1.7 (+/- 0.1)
NCCIT-R	4.5 (+/- 0.2)

Mit einer IC₅₀-Dosis von 0.4 µM zeigten die NTERA-2-Zellen die höchste Chemosensitivität auf Cisplatin. Die 2102EP- und NCCIT-Zellen wiesen mit 0.8 µM bzw. 1.7 µM eine höhere Toleranz gegenüber Cisplatin auf.

Wie bereits in 2.11.6 beschrieben, wurden ausgehend von den Cisplatin-sensitiven Keimzelltumorzelllinien Cisplatin-resistente Tochterzelllinien generiert. Diese wiesen bei NTERA-2-R mit einem IC₅₀-Wert von 5 µM einen mehr als 12-fach höheren IC₅₀-Wert auf (2102EP-R: ~6-fach und NCCIT-R: ~3-fach).

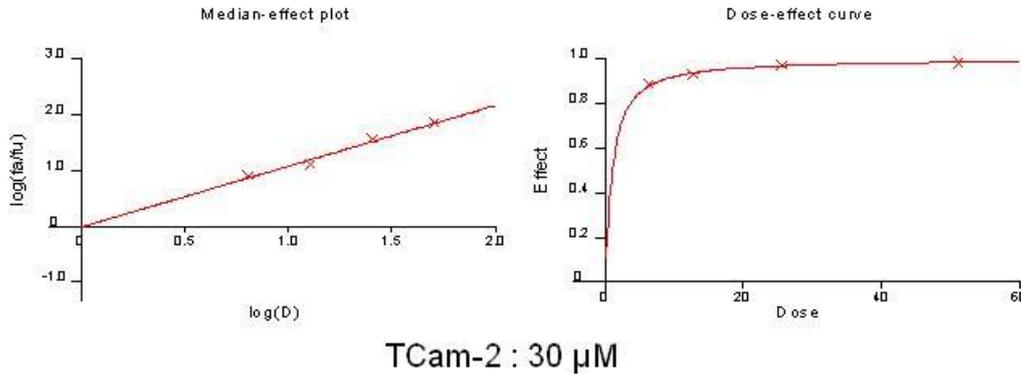


Abbildung 25: Auswertungsgrafiken einer MTT-Messung der Seminomzelllinie TCam-2 mit Cisplatinbehandlung. Der „Median-effect plot“ und die „Dose-effect curve“ werden von der CalcuSyn-Software anhand der photometrisch gemessenen Daten einer MTT-Messung erstellt.

Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Seminomzelllinie TCam-2 resultierte in einem Wert von 30 μ M, der damit 30mal höher liegt, als der Durchschnittswert der Cisplatin-sensitiven EC-Zelllinien. Dieser hohe Wert bei der Zelllinie steht im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Tumoren, da dort Seminome im Allgemeinen besonders sensitiv auf eine Chemotherapie mit Cisplatin ansprechen.

3.2.2 Molekulare Wirkung von Cisplatin auf Keimzelltumor-Zelllinien

Das Ziel der Untersuchungen zum Zellzyklusverhalten, die Analyse zur Caspase-3-Aktivierung und die Spaltung von PARP galt dem Nachweis des Effekts von Cisplatin auf Zellzyklusregulation und Apoptose.

3.2.2.1 Zellzyklusanalyse

Frühere Untersuchungen haben nach Cisplatin einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase bei NTERA-2- und 2102EP-Zellen gezeigt. Jedoch wurden die Zellen bei diesen Experimenten nur für 2h mit einer Cisplatin-Dosis von 10 μ M behandelt und anschließend noch für 48h ohne Cisplatin inkubiert (Mueller et al. 2006). Die Zellzyklusanalysen in dieser Arbeit wurden dagegen analog der Behandlung für die Proteomanalysen durchgeführt. Die Cisplatin-sensitiven, wie auch die Cisplatin-resistenten Zellen wurden mit der entsprechenden IC_{50} -Dosis über 48h behandelt und wurden anschließend sofort fixiert. In Abbildung 26 ist der Zellzyklus ohne und nach Behandlung am Beispiel der Zelllinien NTERA-2 und NTERA-2-R zu sehen.

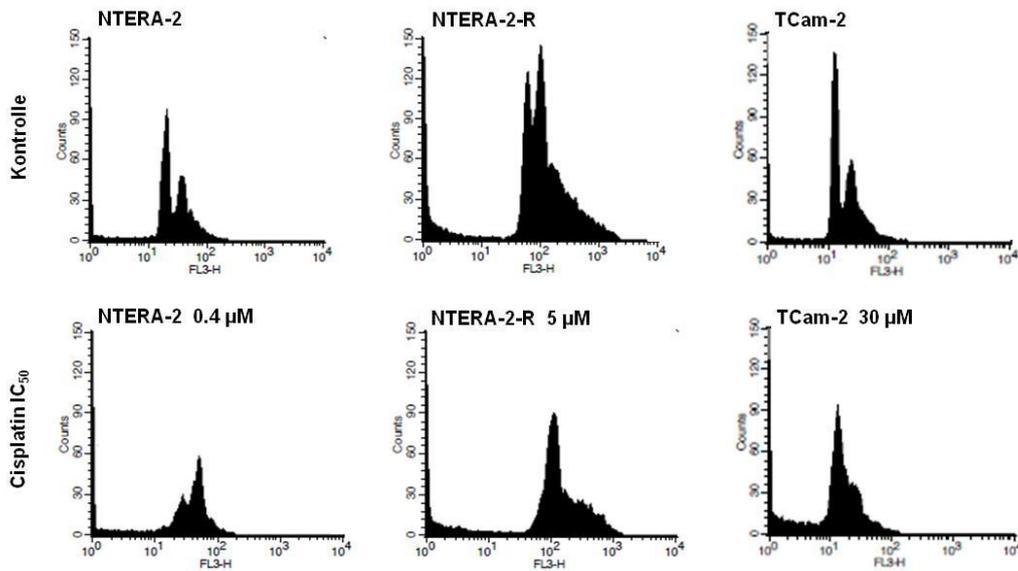


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus von NTERA-2-, NTERA-2-R- und TCam-2-Zellen.

Die Zellen wurden nach 48h ohne Behandlung (oben) und mit der jeweiligen IC_{50} -Dosis von Cisplatin behandelt (unten) mit 70%igem Ethanol fixiert und für die Messung mit Propidiumjodid gefärbt.

Die Zellzyklusanalysen der EC-Zelllinien zeigten auch mit den zuvor beschriebenen Behandlungsparametern einen G2/M-Arrest der behandelten Zellen. Die höhere Toleranzgrenze gegenüber Cisplatin änderte das Zellzyklusverhalten bei den Cisplatin-resistenten Zellen nicht. Allerdings arretierten die Cisplatin-resistenten Zellen auch erst bei der entsprechend höheren IC_{50} -Behandlung in der G2/M-Phase, während niedrigere Konzentrationen keinen Effekt zeigten. Auf die Behandlung mit der IC_{50} -Dosis von Cisplatin reagierte die Seminomzelllinie TCam-2 entgegen den EC-Zelllinien mit einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase.

3.2.2.2 Nachweis einer Caspase-3-Aktivierung

Zur Initiierung der Apoptose wird mittels Spaltung die inaktive Pro-Caspase-3 in einen aktiven Zustand versetzt. In der Folge treten Chromatin-Kondensation, DNS-Fragmentation oder auch morphologischen Veränderungen wie das „Blebbing“ auf (Porter et al. 1999). Eine häufig genutzte Nachweismethode für die Aktivierung der Caspase-3 ist die Durchflusszytometrie.

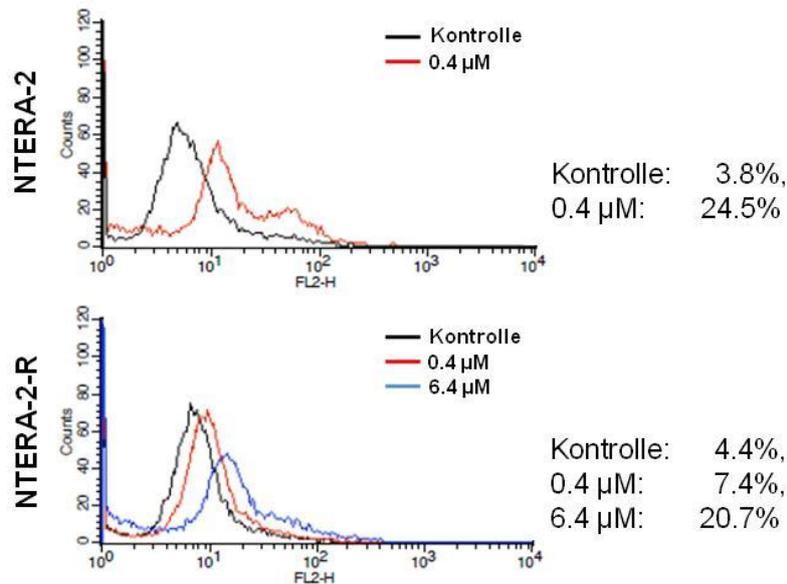


Abbildung 27: Caspase-3-Aktivierung bei NTERA-2- und NTERA-2-R-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin.

Die Zellen wurden nach 48h ohne Behandlung (schwarz) und nach Behandlung mit der IC_{50} -Dosis von Cisplatin der sensitiven NTERA-2-Zellen und mit einer Dosis, die im Bereich der IC_{50} -Dosis der NTERA-2-R-Zellen liegt, fixiert und gemessen. Der prozentuale Anteil aktiven Caspase-3-Proteins ist neben der Abbildung dokumentiert.

In Abbildung 27 ist die durchflusszytometrische Analyse der Caspase-3-Aktivierung bei NTERA-2- und NTERA-2-R-Zellen nach Behandlung mit den entsprechenden IC_{50} -Dosen von Cisplatin zu sehen. Die Cisplatin-sensitiven Zellen zeigten nach der Behandlung mit 0.4 µM Cisplatin einen Anteil von aktivem Caspase-3-Protein von über 20%, während die Cisplatin-resistente Zelllinie NTERA-2-R erst bei einer Dosis von 6.5 µM einen vergleichbaren Effekt aufwies.

3.2.2.3 Western-Blot-Analyse zur Spaltung von PARP

Neben der Aktivierung von Caspase-3 kann auch die Spaltung von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) als Nachweis von Apoptose herangezogen werden. PARP ist ein chromatin-assoziiertes nukleäres Reparaturenzym, welches DNS-Strangbrüche erkennt und in der Initiierung der DNS-Reparatur eine Rolle spielt. Die Spaltung von PARP findet schon in einem frühen Apoptosestadium statt und kennzeichnet den irreversiblen Punkt des geplanten Zelltods. PARP wird durch das aktive Caspase-3-Protein in zwei stabile Fragmente (N-terminale DNS-bindende Domäne 24kDa und C-terminales Fragment mit der katalytischen und der Automodifikationsdomäne 85 kDa) gespalten und verliert damit seine katalytische

Aktivität. Die Wirkung von Cisplatin auf PARP in den Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinien wurde auf Western-Blot-Ebene untersucht.

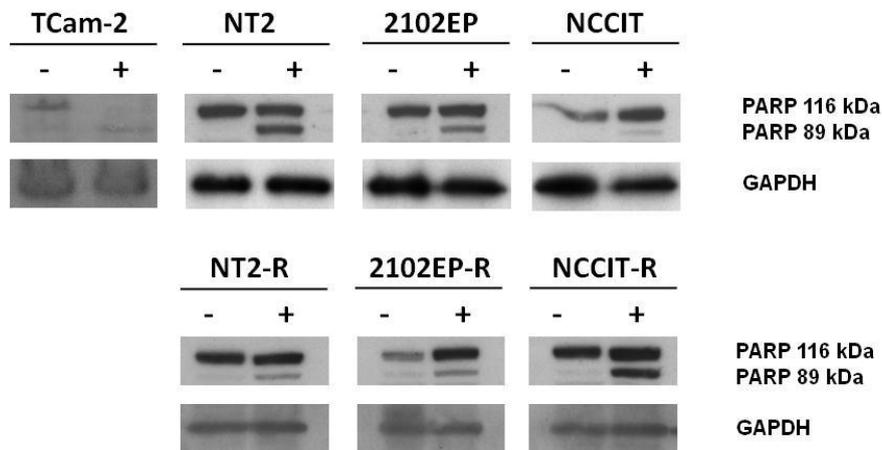


Abbildung 28: Spaltung von PARP als Nachweis der Cisplatin-induzierten Apoptose. Die Zelllinien wurden mit der entsprechenden IC_{50} -Dosis von Cisplatin über einen Zeitraum von 48h behandelt. Der Nachweis der durch Apoptose induzierten PARP-Spaltung erfolgte mittels Western-Blot-Analyse und einem spezifischen Antikörper gegen PARP. Es wurde 30 μ g Proteinlysate aufgetragen und als Ladungskontrolle wurde ein Antikörper gegen GAPDH verwendet.

Sowohl in den Cisplatin-sensitiven, als auch in den Cisplatin-resistenten Keimzelltumor-Zelllinien wurde die Spaltung von PARP nach der Behandlung mit Cisplatin nachgewiesen.

3.2.3 Effekt einer Cisplatinbehandlung auf das Proteommuster von NTERA-2-, 2102EP-, NCCIT- und TCam-2-Zellen

Um die Wirkung von Cisplatin auf das Proteommuster in Keimzelltumor-Zelllinien untersuchen zu können, wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mit der entsprechenden IC_{50} -Dosis von Cisplatin über einen Zeitraum von 48h behandelt. Der Vergleich wurde gegen unbehandelte Kontrollzellen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte bei allen Vergleichen der Apoptoseinduktion von Cisplatin-sensitiven Zellen mit der Auswertungssoftware PDQuest.

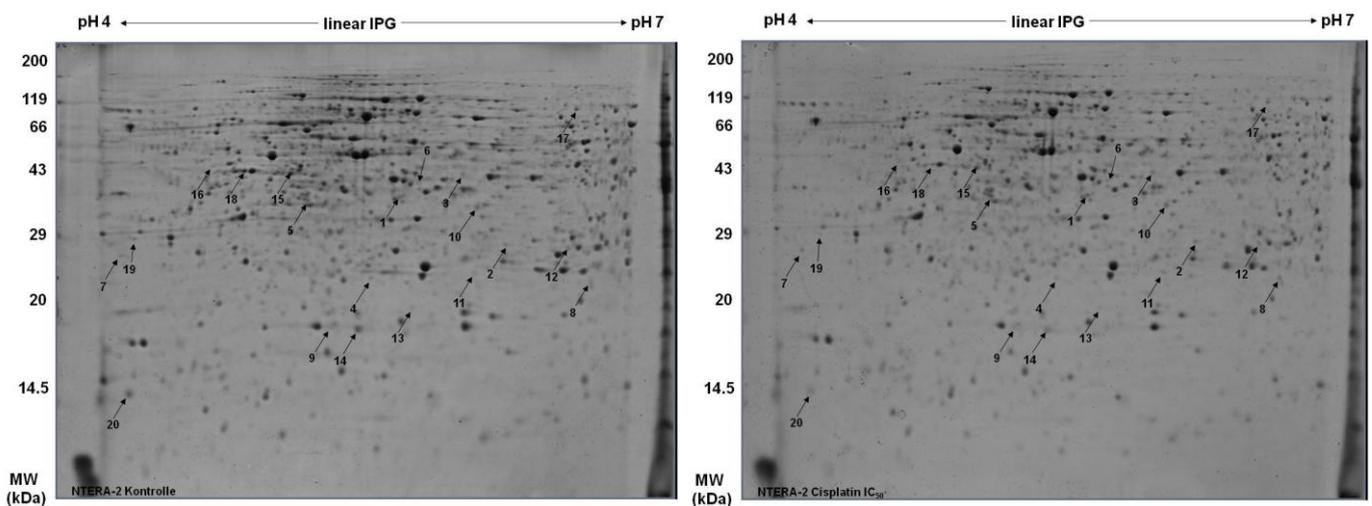


Abbildung 29: 2D-PAGE-Gele von unbehandelten und Cisplatin-behandelten NTERA-2-Zellen. Die im Vergleich zwischen den Kontroll- und den mit der IC_{50} -Dosis von Cisplatin (48h) behandelten Zellen als differentiell exprimierten und mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten sind in Tabelle 30 zu sehen.

Die Auswertung der NTERA-2-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin ergab insgesamt 36 Proteine, die mindestens zweifach reguliert waren. Davon konnten 20 Proteine (56%) ausgewertet und identifiziert werden. Nach Cisplatinbehandlung waren 13 Proteine stärker und 7 Proteine geringer exprimiert.

Tabelle 30: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich NTERA-2 Kontrollzellen und NTERA-2 Cisplatin IC₅₀-behandelte Zellen

Spot auf Gel	fold change	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	Coverage (%)
NTERA-2 IC₅₀-behandelt höher						
1	2.1	P19338	CDNA FLJ45706 fis, clone FEBRA2028457, highly similar to Nucleolin	65.9	4.2	25
2	2.2	Q9UCV6	M2-type pyruvate kinase	58.5	8.4	18.5
3	2.3	Q53FT9	Enolase 1 variant	47.5	7.0	16.6
4	2.4	Q99627	COP9 signalosome complex subunit 8	23.2	5.0	62
5	2.5	NP_001060	Tubulin beta 2	49.8	4.5	55
6	2.7	Q13509	Tubulin beta-3 chain	50.4	4.6	53
7	2.7	P50502	Hsc70-interacting protein	41.3	4.9	17
8	2.8	P07900	HSPCA protein	49.6	5.4	14.0
9	3.3	P06576	ATP-synthase beta subunit	56.9	5.4	11.2
10	3.5	P30101	55 kDa protein	54.9	6.9	42
11	3.6	P31943	HNRPH1	49.5	5.9	7.6
12	4	Q58J86	Elongation factor 2	40.3	5.8	15.4
13	4.2	P23381	Tryptophanyl-tRNA synthetase	53.1	6.5	13
NTERA-2 IC₅₀-behandelt niedriger						
14	2.6	P53999	Activated RNA polymerase II transcription cofactor 4	14.3	9.6	21.3
15	2.7	P07910	HNRPC protein	25.2	4.6	17.7
16	2.8	P08670	Vimentin	53.5	4.8	58
17	2.9	P49368	60 kDa protein	60.4	6.4	59
18	3.4	P06748	Nucleophosmin	32.8	4.7	15.0
19	4	P16234	PDGFRA protein	24.4	4.4	9.6
20	4.7	P23434	PREDICTED: similar to Glycine cleavage system H protein, mitochondrial precursor isoform 1	18.8	4.6	26

Der Proteomvergleich der apoptoseinduzierten 2102EP-Zellen wies 29 differentiell regulierte Proteine auf, von denen 14 Proteine (48%) massenspektrometrisch identifiziert werden konnten. Davon waren jeweils 7 Proteine stärker bzw. schwächer nach der Behandlung mit Cisplatin exprimiert (Tabelle 31).

Tabelle 31: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich 2102EP Kontrollzellen und 2102EP Cisplatin IC₅₀-behandelte Zellen

Spot auf Gel	fold change	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	Coverage (%)
2102EP IC₅₀-behandelt höher						
1	2.1	P60174	Triosephosphat isomerase	50.5	5.4	40
2	2.6	P05387	60S acidic ribosomal protein P2	11.7	4.1	48
3	2.6	O75832	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10	24.4	6.0	42
4	2.8	P34932	Heat shock 70 kDa protein 4	94.3	4.9	9
5	2.9	P06733	Enolase 1	47.2	7.4	28
6	3.3	P04083	Annexin A1	38.6	7.0	44
7	3.9	P20700	Lamin B1	66.3	4.8	26
2102EP IC₅₀-behandelt niedriger						
8	2.3	P05091	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	56.4	7.0	35
9	2.3	P17812	CTP synthase 1	66.7	6.4	19
10	2.5	Q9UQ80	Proliferation associated protein 2G4	43.7	6.5	33
11	2.5	Q59H77	Chaperonin containing TCP1 subunit 3 isoform b	60.5	6.4	38
12	2.7	P06733	Enolase 1	47.2	7.4	47
13	2.8	P60709	Actin, cytoplasmic	41.7	5.1	20
14	4.5	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89.2	4.8	23

Im Fall der NCCIT-Zelllinie wurden 15 Proteine nach der Cisplatinbehandlung mit einer mindestens zweifachen Regulation gefunden. Von diesen 15 Proteinen waren 5 Proteine (33%) auswertbar bzw. identifizierbar (Tabelle 32).

Tabelle 32: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich NCCIT Kontrollzellen und NCCIT Cisplatin IC₅₀-behandelte Zellen

Spot auf Gel	fold change	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	Coverage (%)
NCCIT IC₅₀-behandelt höher						
1	2.3	P29762	CRABP1	15.4	5.0	71
2	4.1	P24534	Elongation factor 1-beta	24.6	4.2	41
NCCIT IC₅₀-behandelt niedriger						
3	2.2	Q9UMS4	Pre-mRNA-splicing factor 19	55.1	6.5	16
4	2.4	P25705	ATP-synthase subunit alpha	59.7	9.5	23
5	2.4	Q9UNZ2	Isoform 1 of NSFL1 cofactor p47	40.5	4.7	37

Die TCam-2-Zellen wiesen nach der Apoptoseinduktion mit Cisplatin insgesamt 73 differentiell regulierte Proteine auf. Davon konnten 60 Proteine (82%) identifiziert werden. Nach der Cisplatinbehandlung waren 18 Proteine stärker und 42 Proteine schwächer exprimiert (Tabelle 33).

Tabelle 33: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich TCam-2 Kontrollzellen und TCam-2 Cisplatin IC₅₀-behandelte Zellen

Spot auf Gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	peptide count
höher							
1	2.1	243	Q15293	Reticulocalbin-1 precursor	38.9	4.9	13
2	2.1	400	P07237	Protein disulfide-isomerase precursor	57.1	4.8	30
3	2.1	635	P11021	78 kDa glucose-regulated protein precursor	72.3	5.1	38
4	2.1	333	P35232	Prohibitin	29.8	5.6	22
5	2.1	304	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	70.9	5.4	24
6	2.2	261	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	61.0	5.7	18
7	2.7	543	P30101	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	56.7	6.0	28
8	3.1	532	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49.2	5.9	28
9	3.2	280	P63261	Actin, cytoplasmic 2 - Homo sapiens (Human)	41.8	5.3	14
10	3.2	380	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	61.0	5.7	26
11	3.2	160	Q9UBS4	DnaJ homolog subfamily B member 11 precursor	40.5	5.8	21
12	3.8	314	P19105	Myosin regulatory light chain 2, nonsarcomeric	19.8	4.7	11
13	4.8	182	P27797	Calreticulin precursor	48.1	4.3	16
14	5.1	631	P11021	78 kDa glucose-regulated protein precursor	72.3	5.1	39
15	5.3	69	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial precursor	73.6	5.9	16
16	9.0	177	P22570	NADPH:adenodoxin oxidoreductase, mitochondrial precursor	53.8	8.7	16
17	11.5	61	P07437	Tubulin beta chain	49.6	4.8	11
18	376	286	P04792	Heat shock protein beta-1	22.8	6.0	12
niedriger							
19	2.2	347	P63261	Actin, cytoplasmic 2	41.8	5.3	17
20	2.3	264	Q13813	Spectrin alpha chain, brain	28.4	5.2	24
21	2.5	250	P54727	UV excision repair protein RAD23 homolog B - Homo sapiens (Human)	43.1	4.8	14
22	2.5	222	P52907	F-actin-capping protein subunit alpha-1	32.9	5.5	13
23	2.5	473	P21964	Catechol O-methyltransferase	30.0	5.2	17
24	2.6	175	Q04760	Lactoylglutathione lyase	20.8	5.1	3
25	2.6	475	Q9Y265	RuvB-like 1	50.2	6.0	24
26	2.6	81	P62195	26S protease regulatory subunit 8 - Homo sapiens (Human)	45.6	7.1	15
27	2.9	267	P09211	Glutathione S-transferase P	23.3	5.4	12
28	2.9	304	Q99497	Protein DJ-1	19.9	6.3	14
29	3.0	207	Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal - Homo sapiens (Human)	15.2	6.6	10
30	3.2	155	P06748	Nucleophosmin	32.6	4.6	3
31	3.2	346	Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	38.4	7.6	11
32	3.2	254	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6 precursor	48.1	5.0	10
33	3.3	375	O60684	Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1 - Homo sapiens (Human)	47.0	5.3	15
34	3.3	293	P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57.9	8.0	23
35	3.5	194	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	51.0	5.4	23
36	3.5	179	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	50.9	5.4	24
37	3.7	218	P00558	Phosphoglycerate kinase 1	44.6	8.3	14
38	4.1	59	P23528	Cofilin-1	18.5	8.2	8
39	4.4	230	P06733	Alpha-enolase	47.1	7.0	16
40	4.5	103	P15311	Ezrin	69.4	5.9	15
41	4.8	64	P23381	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	53.1	5.8	10
42	4.9	341	P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57.9	8.0	18
43	5.4	422	P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57.9	8.0	21
44	5.6	82	P30101	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	56.7	6.0	15
45	6.0	246	P07437	Tubulin beta chain	49.6	4.8	18
46	6.4	167	P16949	Stathmin	17.3	5.8	7
47	7.4	216	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49.2	5.9	21
48	7.9	150	P28066	Proteasome subunit alpha type-5	26.4	4.7	11
49	9.3	302	P84103	Splicing factor, arginine/serine-rich 3 - Homo sapiens (Human)	19.3	11.6	8
50	9.4	349	P14625	Endoplasmic precursor	92.4	4.8	30
51	10.8	120	Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	88.5	5.5	11
52	13.3	290	P08865	40S ribosomal protein SA	32.8	4.8	11
53	13.6	282	Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	38.4	7.6	8
54	15.9	332	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	84.6	4.9	15
55	18.6	243	Q13885	Tubulin beta-2A chain	49.9	4.8	13
56	19.7	619	P08670	Vimentin	53.6	5.1	28
57	23.6	278	P09211	Glutathione S-transferase P	23.3	5.4	13
58	42	86	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	33.7	5.0	6
59	53	348	P09211	Glutathione S-transferase P	23.3	5.4	14
60	61	154	P62834	Ras-related protein Rap-1A precursor	21.0	6.4	5

Um einen umfassenden Überblick zu bekommen, wurden die identifizierten Proteine in definierte biologische Gruppen klassifiziert. Diese Einteilung wurde mit Hilfe einer Datenbankrecherche auf SwissProt und NCBI durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte in Tortendiagrammen (Abbildung 30).

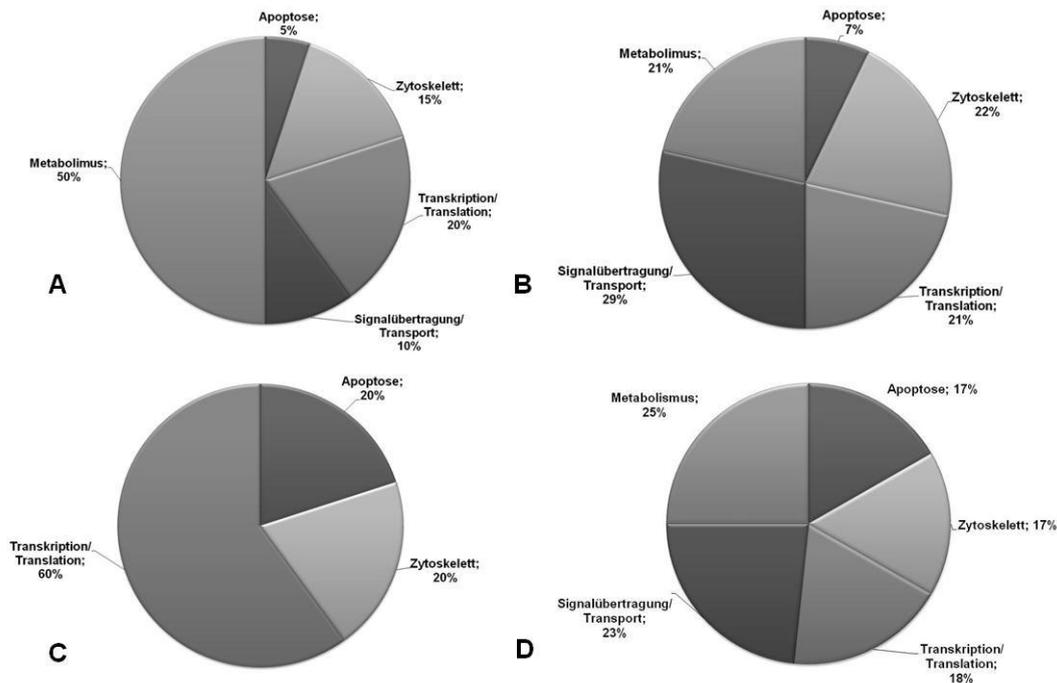


Abbildung 30: Klassifizierung der mindestens zweifach regulierten Proteine in biologische Funktionsgruppen aus den Vergleichen zwischen Kontrollzellen (unbehandelt) und nach 48h Cisplatinbehandlung mit der IC_{50} -Dosis bei (A) NTERA-2-, (B) 2102EP-, (C) NCCIT- und (D) TCam-2-Zellen zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit.

Die Klassifizierung zeigte im Vergleich der vier Zelllinien eine recht inhomogene Verteilung, wobei z.B. die Apoptose mit 5-20% in einem relativ engen Größenbereich vertreten ist. Die Verteilung der Proteine war prozentual bei den Zelllinien 2102EP und TCam-2 am ähnlichsten. Einschränkend muß aber angemerkt werden, dass die Zahl der identifizierten Proteine mit einer Spannweite von 5 (NCCIT) bis 60 (TCam-2) sehr heterogen ist und somit eine sehr eingeschränkte Vergleichbarkeit vorliegt.

3.2.4 Rolle des MAPK-Signalwegs in der Apoptoseinduktion bei Cisplatin-sensitiven Keimzelltumorzellen

Der MAP(mitogen-activated protein)-Kinase-Signalweg ist an diversen Prozessen, wie Zelldifferenzierung, Zellproliferation, aber auch an der Apoptose beteiligt. Zu den MAP-Kinasen gehören u.a. die Kinasen ERK1 und ERK2 (extracellular signal-related kinases), die durch die MAPK Kinasen 1/2 (MEK1/2) phosphoryliert und aktiviert werden. Eine konstitutive Aktivierung dieses Signalwegs konnte in vielen Tumorarten nachgewiesen werden, wie z.B. bei Darm- und Lungenkrebs. Schweyer et al. konnte für Keimzelltumoren am Beispiel von NCCIT-Zellen eine Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 nach einer zweistündigen Behandlung mit 50 μ M Cisplatin zeigen (Schweyer et al. 2004). Das Verhalten dieser Kinasen in den in dieser Arbeit verwendeten Keimzelltumor-Zelllinien nach Behandlung mit den entsprechenden IC_{50} -Dosen von

Cisplatin und einer Inkubationszeit von 48h wurde auf Western-Blot-Ebene analysiert.

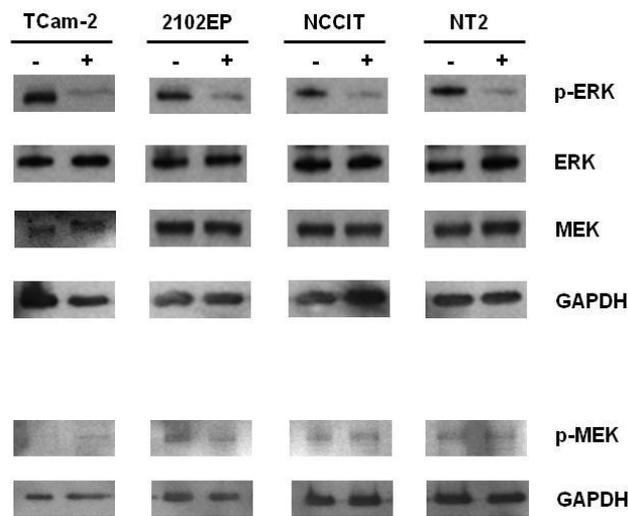


Abbildung 31: Western-Blot-Analyse der Kinasen MEK1/2 und ERK1/2, sowie ihrer aktiven Formen p-MEK1/2 und p-ERK1/2. Es wurde 30 µg Proteinlysate aufgetragen und als Ladungskontrolle wurden GAPDH verwendet.

Entgegen den Ergebnissen der ansteigenden Aktivierung und damit der höheren Expression von p-MEK1/2 und p-ERK1/2 bei einer kurzen Behandlung mit einer hohen Cisplatin-Dosis und anschließender Inkubationszeit von bis zu 24h in den Versuchen von Schweyer, konnte bei der IC_{50} -Behandlung in unseren Versuchen über 48h eine Expressionsabnahme der aktiven Form von p-ERK1/2 nachgewiesen werden. Abgesehen von der Zelllinie 2102EP, bei der eine etwas geringere Expression von p-MEK1/2 bei den behandelten Zellen gezeigt werden konnte, war bei den anderen Zelllinien keine Regulation zu beobachten.

3.3 Proteomvergleich der sensitiven und der resistenten Keimzelltumorzelllinien unter der Behandlung mit Cisplatin

Durch die Generierung der Cisplatin-resistenten Zelllinien war es möglich Proteomvergleiche zwischen den Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinien durchzuführen, um möglicherweise Proteine, die mit der Resistenzentwicklung in Verbindung stehen, identifizieren zu können. Weiterhin konnten nach der Apoptoseinduktion der Cisplatin-sensitiven Zelllinien auch die Cisplatin-resistenten Zellen der IC₅₀-Behandlung mit Cisplatin unterzogen werden. Dabei waren z.B. Proteine von besonderem Interesse, die sowohl bei den Cisplatin-sensitiven, wie auch den Cisplatin-resistenten Zellen unter der Cisplatinbehandlung reguliert wurden. Mit der letzten Vergleichsmöglichkeit wurden die apoptoseinduzierten Cisplatin-sensitiven-Zellen mit den apoptoseinduzierten Cisplatin-resistenten Zelllinien verglichen. Dabei regulierte Proteine haben möglicherweise ebenfalls mit der Resistenzentwicklung, aber auch mit der Wirkung von Cisplatin auf resistente Keimzelltumor-Zelllinien zu tun. Eine Behandlung von NTERA-2-R-Zellen mit der IC₅₀-Dosis der Cisplatin-sensitiven NTERA-2-Zellen (0.4 µM) zeigte keinerlei Unterschiede im Proteom.

Aus Platzgründen werden im Folgenden nur die Proteintabellen und Gelabbildungen für NTERA-2 und NTERA-2-R gezeigt. Die Daten der Vergleiche für 2102EP/2102EP-R und NCCIT/NCCIT-R sind im Anhang einsehbar.

3.3.1 Cisplatin-sensitive Zellen (unbehandelt) und Cisplatin-resistente Zellen (unbehandelt)

Der Vergleich zwischen den unbehandelten NTERA-2- und den unbehandelten NTERA-2-R-Zellen resultierte in insgesamt 60 Proteinen, die differentiell reguliert waren und von denen 53 Proteine (88%) identifiziert werden konnten. In den NTERA-2-R-Zellen waren 23 Proteine stärker und 30 Proteine schwächer exprimiert.

Tabelle 34: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich NTERA-2 unbehandelt und NTERA-2-R unbehandelt. Die * gekennzeichneten Proteine wurden mit einem signifikanten Proteinscore >65 (Mascot-Datenbankrecherche) identifiziert.

Spot auf Gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pi	peptide count
NTERA-2-R höher							
1	2.1	399	Q96019	Actin-like protein 6A - Homo sapiens (Human)	47.4	5.4	21
2	2.1	122	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6	7
3	2.2	*	P06748	Nucleophosmin 1 isoform 3	28.4	4.3	*
4	2.2	151	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6	9
5	2.3	366	P07237	Protein disulfide-isomerase precursor - Homo sapiens (Human)	57.1	4.8	30
6	2.4	423	P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase - Homo sapiens (Human)	24.6	6.2	18
7	2.5	287	P52815	39S ribosomal protein L12, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	21.3	9.0	10
8	2.6	416	Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1 precursor - Homo sapiens (Human)	111.3	5.2	33
9	2.7	226	P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F - Homo sapiens (Human)	45.6	5.4	18
10	2.8	*	AA14958.1	Unknown	18.5	6.3	*
11	2.9	*	CAA66808.1	enoyl-CoA hydratase	31.8	9.0	*
12	3.0	414	P06733	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	20
13	3.0	723	P06733	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	24
14	3.1	534	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	73.6	5.9	22
15	3.1	297	P19338	Nucleolin - Homo sapiens (Human)	76.6	4.6	12
16	3.2	516	P07237	Protein disulfide-isomerase precursor - Homo sapiens (Human)	57.1	4.8	34
17	3.6	318	P12277	Creatine kinase B-type - Homo sapiens (Human)	42.6	5.3	20
18	4.6	174	P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	16.8	6.3	7
19	4.6	291	O75531	Barrier-to-autointegration factor - Homo sapiens (Human)	10.1	5.8	9
20	5.1	487	P06733	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	16
21	5.8	627	Q14195	Dihydropyrimidinase-related protein 3 - Homo sapiens (Human)	61.9	6.0	28
22	1050.1	294	Q04760	Lactoylglutathione lyase - Homo sapiens (Human)	20.8	5.1	13
23	1558.3	313	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 - Homo sapiens (Human)	16.8	5.1	13
NTERA-2-R niedriger							
24	2.1	127	Q15417	Calponin-3 - Homo sapiens (Human)	36.4	5.7	17
25	2.1	270	Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 - Homo sapiens (Human)	52.1	5.4	28
26	2.1	251	Q99961	Endophilin-A2 - Homo sapiens (Human)	41.5	5.3	16
27	2.1	543	Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I - Homo sapiens (Human)	36.5	5.4	21
28	2.1	445	P51858	Hepatoma-derived growth factor - Homo sapiens (Human)	26.8	4.7	10
29	2.3	545	Q03252	Lamin-B2 - Homo sapiens (Human)	67.6	5.3	37
30	2.3	564	Q15019	Septin-2 - Homo sapiens (Human)	41.5	6.2	25
31	2.4	217	Q16576	Histone-binding protein RBBP7 - Homo sapiens (Human)	47.8	4.9	12
32	2.4	*	P29762	CRABP1	15.7	5.3	*
33	2.5	151	Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H - Homo sapiens (Human)	27.4	6.7	13
34	2.5	376	P08670	Vimentin - Homo sapiens (Human)	53.6	5.1	28
35	2.7	206	P47813	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal - Homo sapiens (Human)	16.5	5.1	11
36	2.8	*	P23434	PREDICTED: similar to Glycine cleavage system H protein, mitochondrial precursor isoform 1	18.8	4.6	*
37	2.8	252	P07951	Tropomyosin beta chain - Homo sapiens (Human)	32.8	4.7	15
38	2.9	154	O14562	Ubiquitin domain-containing protein UBF1 - Homo sapiens (Human)	56.9	9.5	16
39	3.3	433	P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 [Includes: Phosphoribosylamine-glycine ligase]	107.7	6.3	26
40	3.3	251	P10599	Thioredoxin - Homo sapiens (Human)	11.7	4.8	8
41	3.5	582	Q13765	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha - Homo sapiens (Human)	23.4	4.5	9
42	4.5	466	Q13162	Peroxisome-assembly protein 4 - Homo sapiens (Human)	30.5	5.9	13
43	4.5	557	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H - Homo sapiens (Human)	49.2	5.9	22
44	4.5	336	P62491	Ras-related protein Rab-11A - Homo sapiens (Human)	24.4	6.1	19
45	4.5	82	P10599	Thioredoxin - Homo sapiens (Human)	11.7	4.8	5
46	5.2	538	Q00299	Chloride intracellular channel protein 1 - Homo sapiens (Human)	26.8	5.1	22
47	5.4	218	P04792	Heat shock protein beta-1 - Homo sapiens (Human)	22.8	6.0	5
48	7.8	*	AAP36086.1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	57.7	6.4	*
49	15.0	138	P61970	Nuclear transport factor 2 - Homo sapiens (Human)	14.5	5.1	6
50	15.9	81	P07951	Tropomyosin beta chain - Homo sapiens (Human)	32.8	4.7	11
51	323.8	307	P23528	Cofilin-1 - Homo sapiens (Human)	18.5	8.2	12
52	641.8	479	P29373	Cellular retinoic acid-binding protein 2 - Homo sapiens (Human)	15.7	5.4	14
53	2922.1	124	Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal - Homo sapiens (Human)	15.2	6.6	6

In der folgenden Tabelle sind die Zahlen der Proteomvergleiche zu den drei EC-Zelllinien dieses Vergleichsmusters aufgelistet.

Tabelle 35: Überblick über die Anzahl der regulierten Proteine zwischen den Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinien.

Vergleich	Differentiell regulierte Spots		Expression bei den R-Linien	
	insgesamt	identifiziert (%)	höher	niedriger
NTERA-2/NTERA-2-R	60	53 (88%)	23	30
2102EP/2102EP-R	25	21 (84%)	1	20
NCCIT/NCCIT-R	34	33 (97%)	20	13

Um einen umfassenden Überblick zu bekommen, wurden die identifizierten Proteine wie auch in den vorangegangenen Vergleichen in definierte biologische Gruppen klassifiziert. Dies erfolgte mit Hilfe der SwissProt-Datenbank und wurde mit Hilfe von Tortendiagrammen visualisiert.

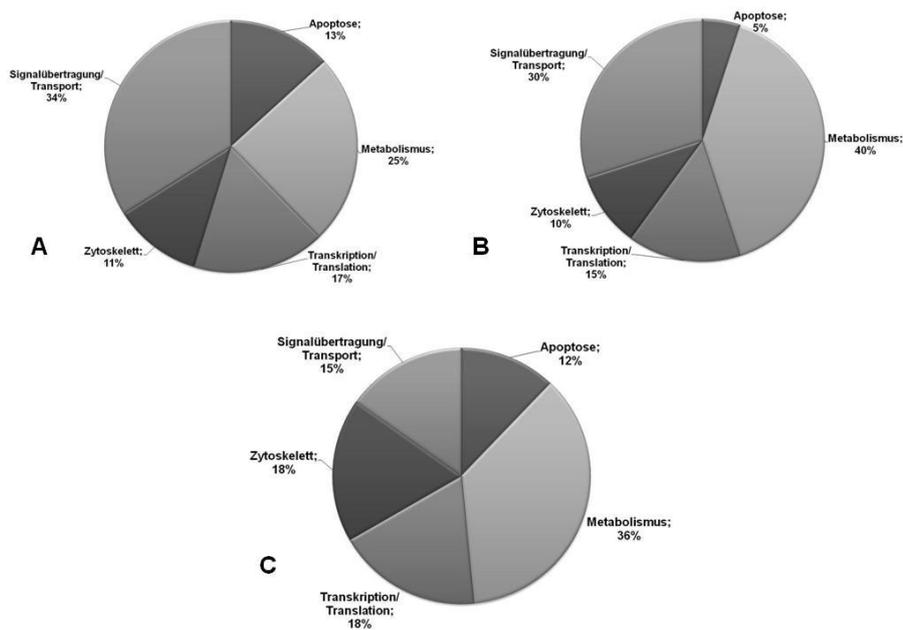


Abbildung 32: Klassifizierung der mindestens 2-fach regulierten Proteine in biologische Funktionsgruppen aus den Vergleichen zwischen den sensitiven Zellen ohne Behandlung und den resistenten Zellen ohne Behandlung bei (A) NTERA-2-, (B) 2102EP- und (C) NCCIT-Zellen zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit.

Die Klassifizierung der differentiell regulierten Proteine zwischen den unbehandelten Cisplatin-sensitiven Zellen und den unbehandelten Cisplatin-resistenten Zellen zeigte ein relativ homogenes Muster zwischen den einzelnen Zelllinien auf. Der größte Anteil der Proteine konnte bei allen Zelllinien in die Gruppen Signalübertragung/Transport und Metabolismus eingeordnet werden. Hingegen war der Anteil der an der Apoptose beteiligten Proteine eher gering.

3.3.2 Cisplatin-resistente Zellen (unbehandelt) und Cisplatin-resistente Zellen (IC₅₀-Dosis von Cisplatin)

Insgesamt 13 Proteine wurden im Vergleich NTERA-2-R unbehandelt/NTERA-2-R IC₅₀-behandelt differentiell reguliert, von denen auch alle (100%) identifiziert werden konnten. Davon waren 9 Proteine in den Cisplatin-behandelten NTERA-2-Zellen stärker exprimiert und 4 Proteine schwächer exprimiert.

Tabelle 36: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich NTERA-2-R unbehandelt und NTERA-2-R Cisplatin IC₅₀. Die * gekennzeichneten Proteine wurden mit einem signifikanten Proteinscore >65 (Mascot-Datenbankrecherche) identifiziert.

Spot auf Gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	peptide count
NTERA-2-R IC₅₀ höher							
1	2.5	366	P50213	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	14.5	5.0	10
2	2.7	163	P36954	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9 - Homo sapiens (Human)	21.4	4.9	6
3	2.7	526	Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1 precursor - Homo sapiens (Human)	111.3	5.2	35
4	2.9	*	Q58J86	Elongation factor 2	40.3	5.8	*
5	3.0	81	O75821	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G - Homo sapiens (Human)	35.6	5.9	8
6	3.4	385	P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8 - Homo sapiens (Human)	53.6	5.5	23
7	3.5	*	P62491	Ras-related protein Rab-11A - Homo sapiens (Human)	24.4	6.1	*
8	3.6	319	P06733	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	21
9	15.5	254	P83916	Chromobox protein homolog 1 - Homo sapiens (Human)	39.6	6.5	18
NTERA-2-R IC₅₀ niedriger							
10	2.3	414	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 - Homo sapiens (Human)	33.6	4.6	15
11	2.3	122	P23588	Eukaryotic translation initiation factor 4B - Homo sapiens (Human)	69.1	5.5	12
12	2.3	*	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta - Homo sapiens (Human)	83.2	5.0	*
13	2.9	205	P08758	Annexin A5 - Homo sapiens (Human)	35.9	4.9	12

In der folgenden Tabelle sind die Zahlen der Proteomvergleiche zu den drei EC-Zelllinien dieses Vergleichsmusters aufgelistet.

Tabelle 37: Überblick über die Anzahl der regulierten Proteine zwischen den Cisplatin-sensitiven (unbehandelt) und Cisplatin-resistenten (IC₅₀-behandelt) Zelllinien.

Vergleich	Differentiell regulierte Spots		Expression bei den R-Linien IC ₅₀ -behandelt	
	insgesamt	identifiziert (%)	höher	niedriger
NTERA-2-R unbeh./ NTERA-2-R IC ₅₀	13	13 (100%)	9	4
2102EP-R unbeh./ 2102EP-R IC ₅₀	50	44 (88%)	31	13
NCCIT-R unbeh./ NCCIT-R IC ₅₀	43	36 (84%)	20	16

Auch hier wurden die identifizierten Proteine nach einer SwissProt-und NCBI-Datenbankrecherche in definierte biologische Gruppen eingeteilt (Abbildung 33).

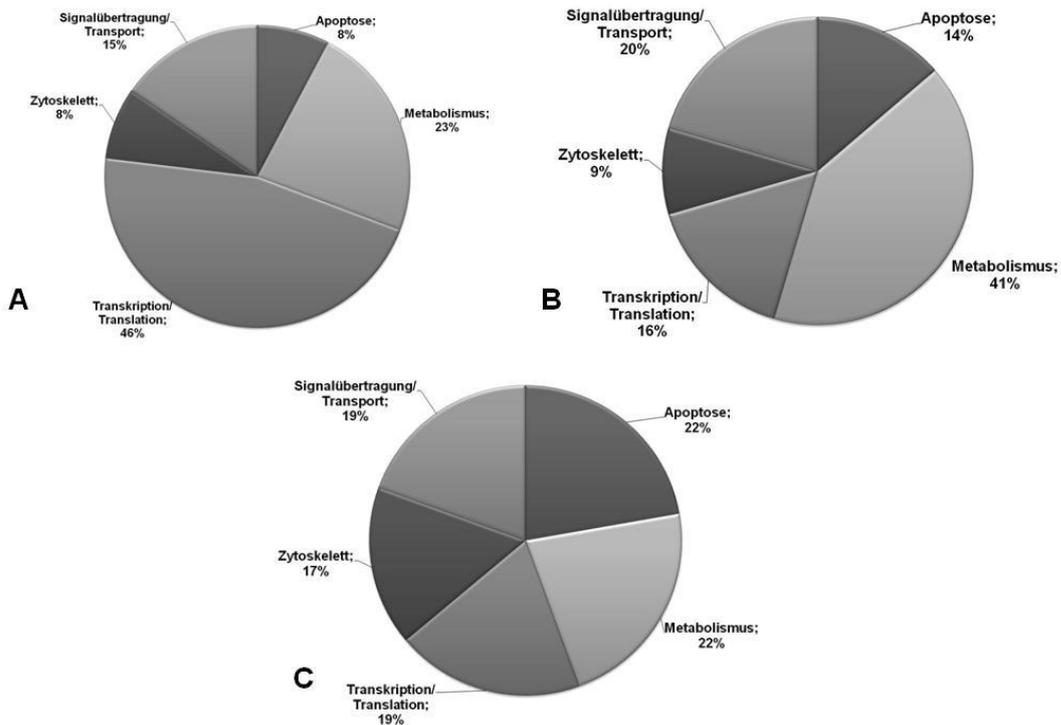


Abbildung 33: Klassifizierung der mindestens zweifach regulierten Proteine in biologische Funktionsgruppen aus den Vergleichen zwischen den resistenten Zellen ohne Behandlung und den resistenten Zellen nach 48h Cisplatinbehandlung mit der IC_{50} -Dosis bei (A) NTERA-2-R, (B) 2102EP-R- und (C) NCCIT-R-Zellen zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit. Die Kontrollexperimente wurden zeitgleich geerntet.

Die Klassifizierung der differentiell regulierten Proteine wies insbesondere in der NCCIT-R-Zelllinie eine sehr gleichmäßige Verteilung auf. Mit 22% war die Apoptose am stärksten vertreten. Ein vergleichbares Muster konnte bei den anderen Cisplatin-resistenten Zelllinien nach erfolgter Apoptoseinduktion nicht festgestellt werden. Während im Vergleich der NTERA-2-R-Zellen die Transkription/Translation-Gruppe dominierte, stand bei den 2102EP-R-Zellen mit 41% fast die Hälfte aller identifizierten Proteine mit dem Metabolismus in Verbindung.

3.3.3 Cisplatin-sensitive (jeweilige IC₅₀-Dosis von Cisplatin) und Cisplatin-resistente Zellen (jeweilige IC₅₀-Dosis von Cisplatin)

Dieser Proteomvergleich zeigte für die Zelllinien NTERA-2/NTERA-2-R insgesamt 71 differentiell regulierte Proteine, von denen 60 Proteine (85%) massenspektrometrisch identifiziert werden konnten. Davon waren bei den Cisplatin-behandelten NTERA-2-R-Zellen 41 Proteine stärker und 19 Proteine schwächer exprimiert (Tabelle 38).

Tabelle 38: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich NTERA-2 Cisplatin IC₅₀ und NTERA-2-R Cisplatin IC₅₀. Die * gekennzeichneten Proteine wurden mit einem signifikanten Proteinscore >65 (Mascot-Datenbankrecherche) identifiziert.

Spot auf Gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	peptide count
NTERA-2-R IC₅₀ höher							
1	2.0	260	P52907	F-actin-capping protein subunit alpha-1 - Homo sapiens (Human)	32.9	5.5	5
2	2.0	564	P20700	Lamin-B1 - Homo sapiens (Human)	66.4	5.1	35
3	2.1	*	P05455	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	*
4	2.1	663	P08670	Vimentin - Homo sapiens (Human)	53.6	5.1	33
5	2.2	202	P34932	Heat shock 70 kDa protein 4 - Homo sapiens (Human)	94.2	5.2	25
6	2.2	*	P30101	ER-60 protein	57.2	5.9	*
7	2.3	849	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein - Homo sapiens (Human)	70.9	5.4	34
8	2.3	670	AAC51518.1	Protein disulfide-isomerase A3 precursor - Homo sapiens (Human)	56.7	6.0	31
9	2.4	583	Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1 precursor - Homo sapiens (Human)	111.3	5.2	30
10	2.5	*	P07237	Protein disulfide-isomerase precursor - Homo sapiens (Human)	57.1	4.8	*
11	2.5	166	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6	10
12	2.5	418	P08238	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	23
13	2.5	364	P33316	Deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial precursor - H	26.7	9.7	13
14	2.6	*	P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase - Homo sapiens (Human)	24.6	6.2	*
15	2.7	471	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	73.6	5.9	21
16	2.7	428	P33316	Endoplasmic precursor - Homo sapiens (Human)	92.4	4.8	27
17	2.8	249	P14625	Endoplasmic precursor - Homo sapiens (Human)	92.4	4.8	21
18	2.9	*	P30101	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	*
19	2.9	795	P20700	Lamin-B1 - Homo sapiens (Human)	66.4	5.1	37
20	3.0	724	CAA66808.1	Protein disulfide-isomerase A3 precursor - Homo sapiens (Human)	56.7	6.0	21
21	3.2	*	P00492	Dihydropyrimidinase-related protein 3 - Homo sapiens (Human)	61.9	6.0	*
22	3.3	222	P34932	Heat shock 70 kDa protein 4 - Homo sapiens (Human)	94.2	5.2	23
23	3.4	*	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6	*
24	3.6	*	P06733	enoyl-CoA hydratase	31.8	8.9	*
25	3.7	*	O96019	Actin-like protein 6A - Homo sapiens (Human)	47.4	5.4	*
26	3.7	525	P07437	Tubulin beta chain - Homo sapiens (Human)	49.6	4.8	21
27	4.0	177	P43243	Matrin-3 - Homo sapiens (Human)	94.6	5.9	9
28	4.1	120	P83916	Chromobox protein homolog 1 - Homo sapiens (Human)	21.4	4.9	8
29	4.1	242	Q9P1F3	Uncharacterized protein C6orf115 - Homo sapiens (Human)	9.1	5.9	5
30	4.5	*	P07237	Protein disulfide-isomerase precursor - Homo sapiens (Human)	57.1	4.8	*
31	4.5	451	P06748	Endoplasmic precursor - Homo sapiens (Human)	92.4	4.8	25
32	5.0	276	Q9H4A5	Golgi phosphoprotein 3-like - Homo sapiens (Human)	32.7	5.6	15
33	5.7	136	P05455	Lupus La protein - Homo sapiens (Human)	46.8	6.7	9
34	6.9	*	P12277	Creatine kinase B-type - Homo sapiens (Human)	42.6	5.3	*
35	7.3	383	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	59.7	9.2	13
36	7.5	*	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta - Homo sapiens (Human)	83.2	5.0	*
37	9.7	301	Q96D15	Reticulocalbin-3 precursor - Homo sapiens (Human)	37.5	4.7	11
38	10.4	81	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	73.6	5.9	12
39	10.4	*	P06748	Nucleophosmin 1 isoform 3	28.4	4.3	*
40	15.3	291	P63261	Actin, cytoplasmic 2 - Homo sapiens (Human)	41.8	5.3	15
41	1738.6	312	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 - Homo sapiens (Human)	16.8	5.1	13
NTERA-2-R IC₅₀ niedriger							
42	2.2	*	P10599	Thioredoxin - Homo sapiens (Human)	11.7	4.8	*
43	2.2	*	O00299	Chloride intracellular channel protein 1 - Homo sapiens (Human)	26.9	5.1	*
44	2.8	357	Q43852	Calumenin precursor - Homo sapiens (Human)	37.1	4.5	16
45	2.8	*	P47813	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal - Homo sapiens (Hu	16.5	5.1	*
46	2.8	*	P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 [Includes: Phosphoribosy	107.7	6.3	*
47	3.2	236	P35080	Profilin-2 - Homo sapiens (Human)	15.0	6.6	7
48	3.6	371	Q13162	Peroxiredoxin-4 - Homo sapiens (Human)	30.5	5.9	13
49	3.8	174	Q15274	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating] - Homo sapiens (Hurr	30.8	5.8	12
50	3.9	*	AAP36086.1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	57.7	6.4	*
51	4.0	692	O00299	Chloride intracellular channel protein 1 - Homo sapiens (Human)	26.9	5.1	24
52	4.8	319	P15311	Ezrin - Homo sapiens (Human)	69.4	5.9	27
53	5.9	280	Q05682	Caldesmon - Homo sapiens (Human)	93.2	5.6	21
54	7.0	*	P07951	Tropomyosin beta chain - Homo sapiens (Human)	32.8	4.7	*
55	7.3	509	Q16352	Alpha-internexin - Homo sapiens (Human)	55.4	5.3	35
56	7.4	102	Q9UK45	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM7 - Homo sapiens (Human)	11.6	5.1	7
57	7.9	*	Q99961	Endophilin-A2 - Homo sapiens (Human)	41.5	5.3	*
58	18.4	127	Q12765	Secernin-1 - Homo sapiens (Human)	46.4	4.7	8
59	290.5	229	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 - Homo sapiens (Human)	16.8	5.1	13
60	807.9	*	P29373	Cellular retinoic acid-binding protein 2 - Homo sapiens (Human)	15.7	5.4	*

In der folgenden Tabelle sind die Zahlen der Proteomvergleiche zu den drei EC-Zelllinien dieses Vergleichsmusters aufgelistet.

Tabelle 39: Überblick über die Anzahl der regulierten Proteine zwischen den Cisplatin-sensitiven (IC_{50} -behandelt) und Cisplatin-resistenten (IC_{50} -behandelt) Zelllinien.

Vergleich	Differenziell regulierte Spots		Expression bei den R-Linien IC_{50} -behandelt	
	insgesamt	identifiziert (%)	höher	niedriger
NTERA-2 IC_{50} / NTERA-2-R IC_{50}	71	60 (85%)	41	19
2102EP IC_{50} / 2102EP-R IC_{50}	31	25 (81%)	17	8
NCCIT-R IC_{50} / NCCIT-R IC_{50}	41	30 (73%)	20	10

Die Verteilung der mindestens zweifach regulierten Proteine ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

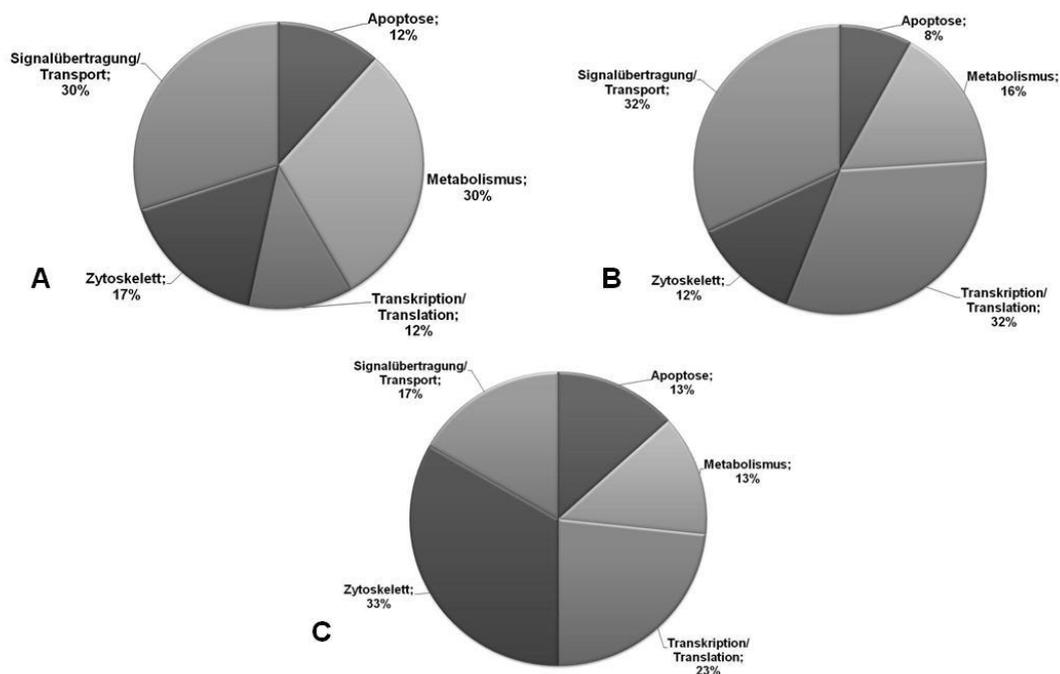


Abbildung 34: Klassifizierung der mindestens zweifach regulierten Proteine in biologische Funktionsgruppen aus den Vergleichen zwischen den sensitiven Zellen nach 48h Cisplatinbehandlung mit der IC_{50} -Dosis und den resistenten Zellen nach 48h Cisplatinbehandlung mit der IC_{50} -Dosis bei (A) NTERA-2-, (B) 2102EP- und (C) NCCIT-Zellen zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit. Die Kontrollexperimente wurden zeitgleich geerntet.

Auch die Expressionsmuster dieser Vergleiche wiesen im Vergleich untereinander keine große Homogenität auf. Lediglich die Apoptose ist wie in den anderen Proteimvergleichen mit einem vergleichbaren prozentualen Anteil von 8-13% vertreten.

3.4 „Small molecule inhibitors“: Sunitinib und Temsirolimus

3.4.1 Bestimmung der IC₅₀-Dosis von Sunitinib und Temsirolimus mit MTT und Zellzählung

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von Sunitinib und Temsirolimus wurde neben dem MTT-Assay als zusätzliche Methode die direkte Zellzählung mit Trypan-Blau verwendet. Für die Analyse mit dem MTT-Assay wurden die Zellen in 96-well-Platten ausgesät und über 48h mit ansteigenden Konzentrationen von Sunitinib bzw. Temsirolimus in einem Dosis-Bereich von 0.2-25.6 µM inkubiert. Nach dem Lösen der Formazankristalle mit DMSO erfolgte die photometrische Messung mit Hilfe des Victor2 Wallac 1420-Photometers.

Die Zellzählung mit Trypanblau wurde in 6-well-Platten durchgeführt, in die pro well 2 x 10⁵ Zellen in Dreifachansätzen ausgesät wurden. Der hier verwendete Konzentrationsbereich entsprach dem des MTT-Assays. Nach der Inkubationszeit von 48h wurden die Zellzahlen mit Hilfe des ViCell™XR Zellzählgerätes bestimmt. In Tabelle 40 sind die ermittelten IC₅₀-Werte für die beiden Substanzen im direkten Vergleich zu Cisplatin zu sehen.

Tabelle 40: IC₅₀-Werte der parentalen Embryonalkarzinom-Zelllinien und ihrer Cisplatin-resistenten Tochterzelllinien für Sunitinib und Temsirolimus bestimmt mit Hilfe des MTT-Assays und Zellzählungen in direkter Gegenüberstellung zu Cisplatin.

IC ₅₀ [µM]	Cisplatin		Sunitinib		Temsirolimus	
	MTT	MTT	Zellzählung	MTT	Zellzählung	
NTERA-2	0.4	3.8	7	9	9.5	
NTERA-2-R	5	3.5	7.5	9.9	7.5	
2102EP	0.8	3.0	5	7.3	8	
2102EP-R	5	3.3	6	6.2	5.5	
NCCIT	1.7	3.7	5	8.9	11	
NCCIT-R	4.5	3.4	10	9.2	9	
TCam-2	30	26	5	8	12	

Die Bestimmung der Zytotoxizität von Sunitinib und Temsirolimus in den verwendeten Keimzelltumorzelllinien erfolgte zum einen mit Hilfe des MTT-Assays und als zusätzliche Methode mit der direkten Zellzählung mit Trypan-Blau.

Sunitinib Die Ergebnisse aus den MTT-Versuchen wiesen IC₅₀-Werte in einem engen Dosisbereich von 3.0 -3.8 µM auf und zeigten auch im Vergleich zwischen den Cisplatin-sensitiven parentalen Zelllinien und den Cisplatin-resistenten Tochter-Zelllinien vergleichbare Ergebnisse, zudem bestand keine Kreuzresistenz zwischen Cisplatin und Sunitinib. Die Analyse der Seminom-Zelllinie TCam-2 wies analog zu

der hohen IC_{50} -Dosis bei Cisplatin auch bei Sunitinib einen hohen IC_{50} -Wert mit 26 μM auf. Die Ergebnisse aus den Zellzählungen mit Trypan-Blau ergaben dagegen im Vergleich zu den MTT-Experimenten einen höheren Dosisbereich von 5-10 μM . Zwischen den parentalen Zellen und den R-Linien bei NTERA-2 und 2102EP konnte keine Kreuzresistenz beobachtet werden. Dagegen zeigte die NCCIT-R-Zelllinie mit 10 μM einen doppelt so hohen IC_{50} -Wert wie die parentale NCCIT-Zelllinie.

Temsirolimus Die Untersuchungen resultierten in vergleichbaren IC_{50} -Werten in einem Bereich von 5.5 – 11 μM . Zudem zeigten die Ergebnisse des MTT-Assays vergleichbare Ergebnisse zwischen den Cisplatin-sensitiven parentalen und Cisplatin-resistenten Tochter-Zelllinien, wogegen die Zellzählung mit Trypanblau leicht niedrigere IC_{50} -Werte für die Cisplatin-resistenten Zelllinien aufwies. Mit beiden Methoden konnte auch gezeigt werden, dass keine Kreuzresistenz zwischen Temsirolimus und Cisplatin besteht. Der IC_{50} -Wert der Seminom-Zelllinie TCam-2 wurde ebenfalls bestimmt und liegt mit 8 μM im gleichen Dosisbereich der Embryonalkarzinom-Zelllinien.

3.4.2 Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit Sunitinib und Temsirolimus

Um den Effekt von Sunitinib bzw. Temsirolimus auf den Zellzyklus der verwendeten Cisplatin-sensitiven und –resistenten Keimzelltumorzelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mit der jeweiligen IC_{50} -Dosis der entsprechenden Substanz behandelt und 48h inkubiert. Die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Analysen PI-gefärbter Zellen sind am Beispiel von NTERA-2 in Abbildung 35 dargestellt.

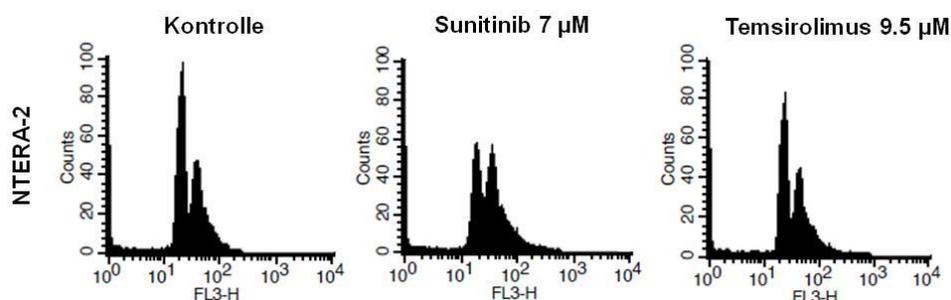


Abbildung 35: Durchflußzytometrische Analyse des Zellzyklus von NTERA-2-Zellen nach Behandlung mit den IC_{50} -Dosen von Sunitinib und Temsirolimus.

Die Zellen wurden nach 48h ohne Behandlung (links) und mit der jeweiligen IC_{50} -Dosis von Sunitinib (Mitte) behandelt (unten) mit 70%igem Ethanol fixiert und für die Messung mit Propidiumjodid gefärbt.

Die Zellzyklusanalyse der Cisplatin-sensitiven und -resistenten Keimzelltumorzelllinien zeigten keine signifikanten Änderungen im Vergleich zwischen den unbehandelten und den mit über 48h mit Sunitinib bzw. Temsirolimus behandelten Zellen. Ein Zellzyklusarrest konnte nicht nachgewiesen werden.

3.4.3 Sunitinib

3.4.3.1 Identifikation von differentiell exprimierten Proteinen bei NTERA-2-Zellen nach Behandlung mit Sunitinib

Um Änderungen im globalen Proteinexpressionsprofil zu analysieren, wurden NTERA-2-Zellen mit der IC₅₀-Dosis von Sunitinib über einen Zeitraum von 48h behandelt. Die behandelten Zellen wurden mit Kontrollzellen verglichen, die mit dem Lösungsvermittler von Sunitinib (DMSO) behandelt wurden.

Mit Hilfe der 2D-PAGE-Analyse und anschließender Delta2D-Auswertung konnten 14 differentiell regulierte Proteinspots identifiziert werden. Diese Proteinspots wurden dann zu 100% massenspektrometrisch identifiziert. Sieben Spots waren unter Sunitinibbehandlung stärker und sieben Spots waren schwächer exprimiert.

Tabelle 41: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich NTERA-2 unbehandelt und NTERA-2 unter Behandlung mit Sunitinib.

Spot auf Gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	peptide matches	Coverage (%)
höher								
1	2.0	258	PA2G4_HUMAN	Proliferation-associated protein 2G4	43.8	6.5	3	63
2	2.2	193	CALU_HUMAN	Calumenin	37.1	4.2	2	38
3	2.4	87	EZRI_HUMAN	Ezrin	69.3	6.2	1	19
4	2.5	514	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial	73.6	6.0	4	47
5	2.5	331	GRSF1_HUMAN	G-rich sequence factor 1	50.1	5.8	4	59
6	3.6	120	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain	50.1	4.7	3	39
7	4.2	260	CDV3_HUMAN	Protein CDV3 homolog	27.3	6.3	2	55
niedriger								
8	2	534	DPYL3_HUMAN	Dihydropyrimidinase-related protein 3	62.0	6.5	5	56
9	2	395	VIME_HUMAN	Vimentin	53.6	4.8	3	69
10	2.5	78	TPM3_HUMAN	Tropomyosin alpha-3 chain	32.8	4.4	1	19
11	2.5	595	CN166_HUMAN	UPF0568 protein C14orf166	28.1	6.6	5	72
12	3.3	153	VIME_HUMAN	Vimentin	53.6	4.8	1	58
13	5	583	COPE_HUMAN	Coatomer subunit epsilon	34.5	4.7	5	76
14	5	358	EZRI_HUMAN	Ezrin	69.4	6.2	3	42

Um einen orientierenden Überblick zu bekommen, welchen definierten biologischen Gruppen die Zellen nach Behandlung mit Cisplatin als klassischem Zytostatikum und Sunitinib als neuer Substanz zuzuordnen sind, wurden die jeweils behandelten Zellen verglichen. Dies erfolgte mit Hilfe der SwissProt-Datenbank (www.expasy.org).

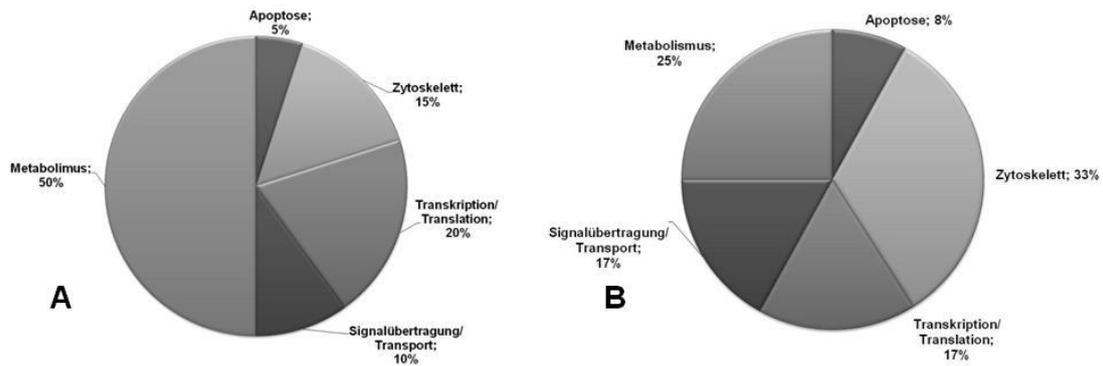


Abbildung 36: Biologische Funktionen aus den Proteomvergleichen zwischen NTERA-2-Zellen (unbehandelt) und nach 48h Behandlung mit der IC_{50} -Dosis von (A) Cisplatin und (B) Sunitinib. Die mindestens zweifach regulierten Proteine wurden auf fünf biologische Funktionsgruppen zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit aufgeteilt. Die Kontrollexperimente wurden zeitgleich geerntet.

Unter der Behandlung mit Sunitinib sind 8% der Proteine in die Apoptose involviert, während eine große Gruppe der Proteine in Verbindung mit zytoskelettalen Strukturen und/oder der Organisation des Zytoskeletts steht. Im Vergleich zu der Behandlung mit Cisplatin sind die identifizierten Proteine im Fall von Sunitinib gleichmäßig auf die fünf Funktionsgruppen verteilt. Der Anteil der unmittelbar an der Apoptose beteiligten Proteine ist in etwa gleich hoch.

Um die Regulation der mittels 2D-PAGE-Analyse identifizierten differentiell exprimierten Proteine mit weiteren Methoden zu bestätigen, wurden mit Vimentin und Ebp1 (auch *proliferation-associated protein 2G4*) zwei zuvor identifizierte Proteine mit der Western-Blot- (Vimentin) bzw. der Mini-2D-PAGE-Methode (Ebp1) unter Anwendung von spezifischen Antikörpern untersucht.

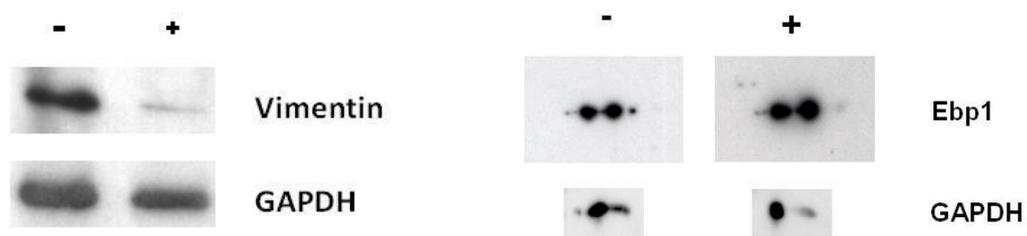


Abbildung 37: Nachweis von zwei differentiell regulierten Proteinen aus dem Proteomvergleich NTERA-2 (unbehandelt) mit NTERA-2 (IC_{50} von Sunitinib). Vimentin wurde mittels Western-Blot-Analyse (links), Ebp1 mittels Mini-2D-Analyse (rechts) untersucht. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet.

Die abnehmende Expression von Vimentin, sowie die Zunahme der Expression von Ebp1 (auch bekannt unter *proliferation-associated protein 2G4*), konnte mit den beiden Methoden in den NTERA-2-Zellen nachgewiesen und bestätigt werden.

3.4.3.2 Expressionsanalyse von bekannten Zielproteinen von Sunitinib in KZT-Zelllinien

Auf Western-Blot-Ebene wurde die Expression von Proteinen des MAPK/ERK-Signalweges unter dem Einfluss von Sunitinib bei den untersuchten Cisplatin-sensitiven und -resistenten Keimzelltumorzelllinien analysiert. Dieser Signaltransduktionsweg ist in Prozesse wie die zelluläre Differenzierung, Zellwachstum und Apoptose involviert. Die Inhibition des MAPK Kinase Signalwegs nach Behandlung mit Sunitinib ist in der Literatur beschrieben, z.B. beim Nierenzellkarzinom (Hudes 2009).

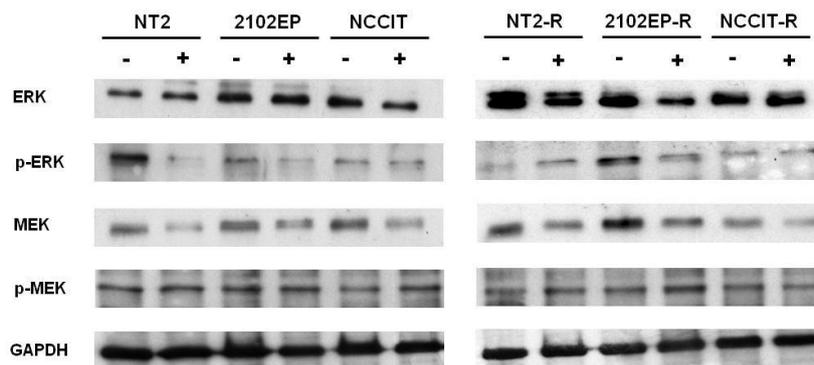


Abbildung 38: Western-Blot Analyse der MAPK Signalweg-Proteine MEK1/2 und ERK1/2 und ihrer aktivierten, phosphorylierten Formen p-MEK1/2 und p-ERK1/2. Der Proteinauftrag betrug 30µg. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet.

Die Behandlung mit der IC_{50} -Dosis von Sunitinib über 48h resultierte in der Inhibition der phosphorylierten und somit aktiven Form von ERK1/2, p-ERK1/2, in den Zelllinien NTERA-2, 2102EP und 2102EP-R. Dagegen konnte bei NCCIT, NTERA-2-R und NCCIT-R keine Veränderung nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte eine Expressionsabnahme des unphosphorylierten MEK1/2 Proteins in allen Zelllinien beobachtet werden, während die Expression der phosphorylierten und demnach aktiven Form von MEK1/2 unverändert in den behandelten Zelllinien blieb.

3.4.3.3 Effekt der Kombinationsbehandlung von Sunitinib und Cisplatin auf das Zellwachstum von KZT-Zelllinien in vitro

Um zu untersuchen, ob Sunitinib und Cisplatin einen synergistischen Effekt aufweisen, wurden die Cisplatin-sensitiven und -resistenten Keimzelltumorzelllinien einer Kombinationsbehandlung mit diesen beiden Substanzen unterzogen. Hierfür wurden die an den Cisplatin-sensitiven Zellen ermittelten IC_{10^-} , IC_{25^-} und IC_{50^-} -Dosen der einzelnen Substanzen alleine und in Kombination verwendet. Die Ergebnisse der behandelten Zellen der Monotherapie wurden mit den Ergebnissen der Substanzkombinationen verglichen. In Abbildung 39 sind die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen von Sunitinib und Cisplatin am Beispiel von NTERA-2 und NTERA-2-R dargestellt.

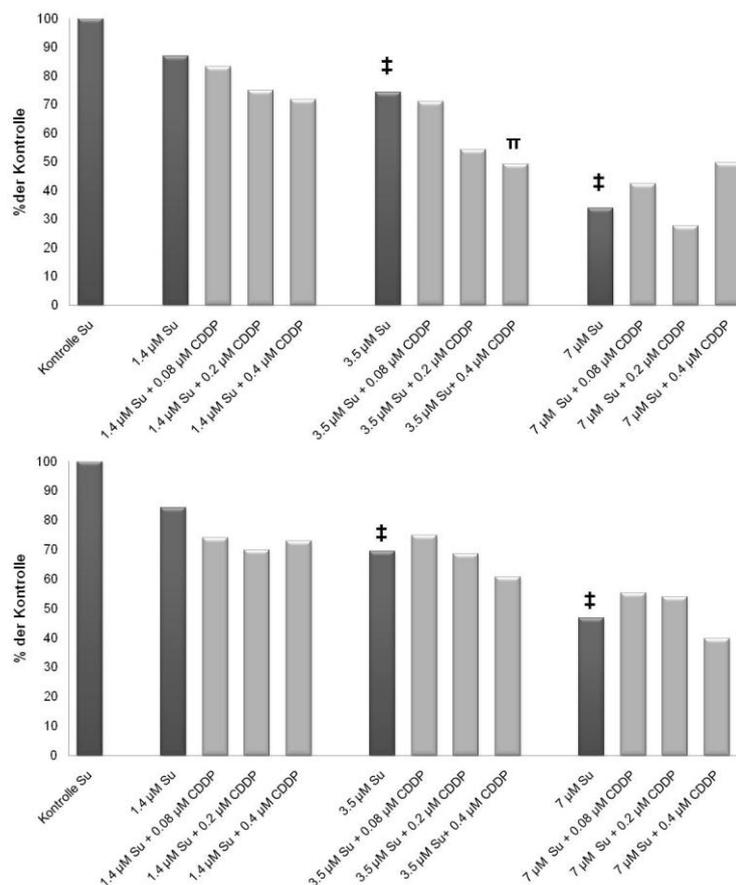


Abbildung 39: Effekte einer Monotherapie und Kombinationstherapie von Sunitinib (Su) und Cisplatin (CDDP) bei NTERA-2-Zellen (oben) und NTERA-2-R-Zellen (unten) mit den jeweiligen IC_{10^-} , IC_{25^-} und IC_{50^-} -Dosen der Cisplatin-sensitiven Zelllinien.

Erklärung der Symbole in Abbildung 39:

- ‡ Unterschiede sind statistisch signifikant in den behandelten Zellen, verglichen mit den un-behandelten Kontrollzellen ($p < 0.05$).
- π Kombinationsbehandlung resultierte in signifikant erhöhter Zytotoxizität, verglichen mit der Monotherapie mit Sunitinib in der jeweiligen Konzentrationsstärke ($p \leq 0.05$).

Der Effekt von Sunitinib in der Monotherapie unterschied sich nicht zwischen den Cisplatin-sensitiven und den -resistenten Zellen. Die Kombinationstherapie mit Sunitinib und Cisplatin zeigte insbesondere in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien 2102EP und NCCIT eine stärkere Inhibition des Zellwachstums und eine etwas schwächere Inhibition in der Cisplatin-resistenten NCCIT-R-Zelllinie.

3.4.4 Temsirolimus

3.4.4.1 Identifikation von differentiell exprimierten Proteinen bei NTERA-2-Zellen nach Behandlung mit Temsirolimus

Analog der Behandlung mit Sunitinib, wurden für die Analyse der globalen Proteinexpression NTERA-2-Zellen über einen Zeitraum von 48h mit der IC₅₀-Dosis von Temsirolimus behandelt. Die Kontrollbehandlung wurde auch hier mit dem Lösungsvermittler für Temsirolimus (DMSO) durchgeführt. Die 2D-PAGE-Analyse und die Auswertung mit der Delta2D-Software ergaben 32 differentiell exprimierte Proteine, die alle massenspektrometrisch identifiziert werden konnten. Davon waren nach Behandlung mit Temsirolimus 22 Proteine stärker und 10 Proteine niedriger exprimiert (Tabelle 42).

Tabelle 42: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich NTERA-2 unbehandelt und NTERA-2 Temsirolimus IC₅₀

Spot auf gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	peptide matches	Coverage (%)
höher								
1	2.1	463	K2C8_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 8	53.7	5.3	4	64
2	2.3	252	TIF1B_HUMAN	Transcription intermediary factor 1-beta	88.5	5.6	3	15
3	2.4	126	TEBP_HUMAN	Prostaglandin E synthase 3	18.7	4.1	1	45
4	2.4	242	CALD1_HUMAN	Caldesmon	93.2	5.4	3	27
5	2.5	181	RD23A_HUMAN	UV excision repair protein RAD23 homolog A	39.6	4.2	3	61
6	2.5	374	PSME1_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 1	28.7	5.8	3	65
7	2.5	663	HNRH1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49.2	6.3	4	57
8	2.6	55	TPM1_HUMAN	Tropomyosin alpha-1 chain	32.7	4.4	1	13
9	2.6	369	EZR1_HUMAN	Ezrin	69.4	6.2	3	5
10	3.0	240	IMDH2_HUMAN	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	55.8	6.9	2	46
11	3.1	440	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	22.8	6.4	4	6
12	3.1	256	PLST_HUMAN	Plastin-3	70.4	5.5	2	41
13	3.3	84	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1	70.0	5.3	1	27
14	3.6	210	RUVB2_HUMAN	RuvB-like 2	51.1	5.3	2	53
15	3.8	335	PIPNB_HUMAN	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	31.5	6.9	4	64
16	3.9	168	GDIB_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor beta	50.6	6.4	2	53
17	4.2	659	GDIB_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor beta	50.6	6.4	5	82
18	4.3	63	HYOU1_HUMAN	Hypoxia up-regulated protein 1	111.3	4.9	2	16
19	4.5	179	LSUL_HUMAN	Lactoylglutathione lyase	20.8	4.9	2	4
20	4.8	345	ODPA_HUMAN	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	43.3	8.1	3	66
21	5.3	776	RUVB2_HUMAN	RuvB-like 2	51.1	5.3	5	66
22	5.7	461	TRXR1_HUMAN	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	70.9	6.4	5	42
niedriger								
23	2.0	146	LMNB1_HUMAN	Lamin-B1	66.4	4.8	1	45
24	2.0	508	LMNB1_HUMAN	Lamin-B1	66.4	4.8	3	59
25	2.0	289	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	22.8	6.4	4	52
26	2.5	338	HNRL2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	85.1	4.6	4	34
27	2.5	363	ENPL_HUMAN	Endoplasm	92.4	4.5	4	32
28	2.5	342	HYOU1_HUMAN	Hypoxia up-regulated protein 1	111.3	4.9	3	3
29	2.5	607	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial	73.6	6.0	5	48
30	3.3	549	STAM1_HUMAN	Signal transducing adapter molecule 1	59.1	4.4	4	28
31	3.3	380	HYOU1_HUMAN	Hypoxia up-regulated protein 1	111.3	4.9	3	3
32	3.3	309	PTER_HUMAN	Phosphotriesterase-related protein	39.0	6.5	3	58

Um einen orientierenden Überblick zu bekommen, welchen definierten biologischen Gruppen die Zellen nach Behandlung mit Cisplatin als klassischem Zytostatikum und Temsirolimus als neuer Substanz zuzuordnen sind, wurden die jeweils behandelten Zellen verglichen. Dies erfolgte mit Hilfe der SwissProt-Datenbank (www.expasy.org).

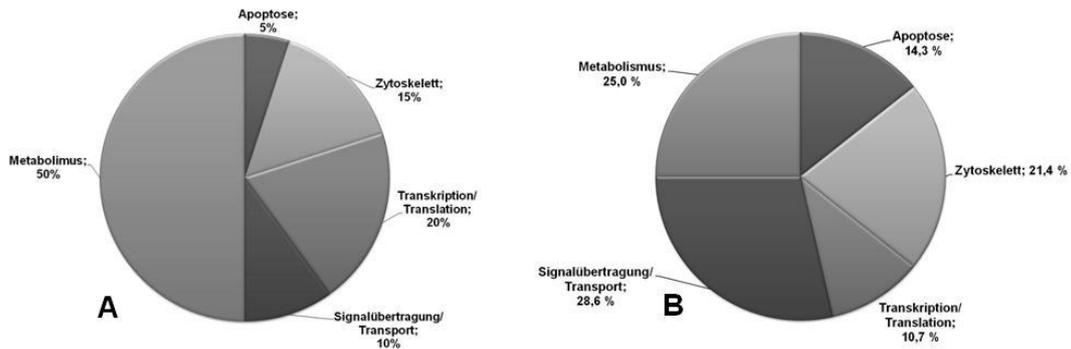


Abbildung 40: Biologische Funktionen aus den Proteomvergleichen zwischen NTERA-2-Zellen (unbehandelt) und nach 48h Behandlung mit der IC_{50} -Dosis von (A) Cisplatin und (B) Temsirolimus. Die mindestens zweifach regulierten Proteine wurden auf fünf biologische Funktionsgruppen zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit aufgeteilt. Die Kontrollexperimente wurden zeitgleich geerntet.

Die Klassifizierung der differentiell regulierten Proteine nach Behandlung mit Temsirolimus zeigt, dass im Vergleich mit der Behandlung mit Cisplatin oder auch Sunitinib (Abbildung 36), mit 14,3% etwas mehr Proteine in den zellulären Vorgang der Apoptose involviert scheinen. Die beiden Gruppen Metabolismus und Signalübertragung/Transport sind zusammen mit über 50% recht stark vertreten.

Mit Hilfe der RT-PCR (Reverse Transkriptase)-Methode wurden drei Proteine aus der 2D-PAGE-Analyse, Inosine-5'-monophosphat Dehydrogenase 2 (IMPDH2), UV excision repair protein RAD23 homolog A (RAD23A) und Signal transducing adapter molecule 1 (STAM1), in NTERA-2 und NTERA-2-R untersucht.

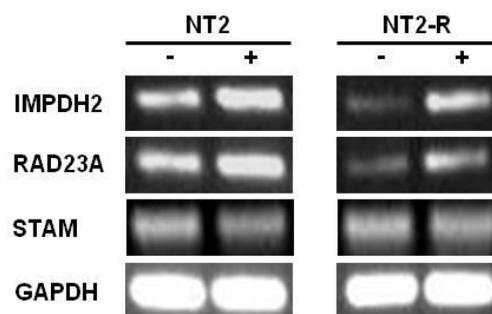


Abbildung 41: RT-PCR Analyse mit Primern für IMPDH, RAD23A und STAM. Diese drei Proteine wurden als differentiell regulierte Proteine in der 2D-PAGE-Analyse und Massenspektrometrie identifiziert. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet.

Die stärkere Expression von IMPDH2 und RAD23A konnte in den NTERA-2-, sowie in den NTERA-2-R-Zellen nach der Behandlung mit Temsirolimus nachgewiesen und bestätigt werden. Eine geringere Expression von STAM war in den NTERA-2-Zellen

zu beobachten, während in den NTERA-2-R-Zellen keine eindeutige Regulation nachgewiesen werden konnte.

3.4.4.2 Expressionsanalyse von bekannten Zielproteinen von Temsirolimus in KZT-Zelllinien

In früheren Untersuchungen, z.B. in Zelllinienmodellen des Nierenzellkarzinoms (Hudes 2009), konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Temsirolimus der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/AKT Signalweg durch die Blockierung des Schlüsselenzyms mTOR inhibiert wird. Der PI3K/AKT Signalweg spielt u.a. eine wichtige Rolle bei der Apoptose und auch der Zellproliferation. Um den Einfluss von Temsirolimus auf Keimzelltumorzelllinien zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen zu ausgewählten Proteinen dieses Signalweges durchgeführt.

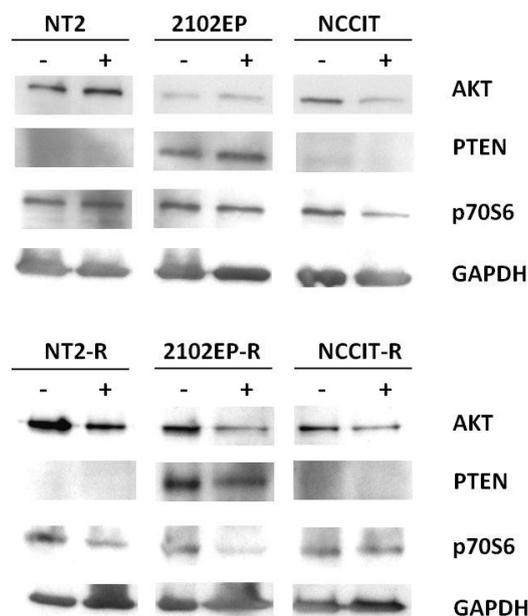


Abbildung 42: Western-Blot Analyse der PI3K/AKT-Signalweg-Proteine AKT, PTEN und p70S6. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet

Die Behandlung der Cisplatin-sensitiven und -resistenten Keimzelltumorzelllinien mit der IC_{50} -Dosis von Temsirolimus über 48h resultierte in einer Expressionsabnahme von AKT in den Cisplatin-sensitiven NCCIT-Zellen, wogegen die Cisplatin-sensitiven NTERA-2- und 2102EP-Zellen keine Regulation aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten alle drei Cisplatin-resistenten Zelllinien eine Runterregulation von AKT. Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass nur 2102EP und 2102EP-R-Zellen PTEN aufwiesen und dass die Cisplatin-resistenten 2102EP-R-Zellen nach Behandlung mit Temsirolimus PTEN schwächer exprimieren. Die Analyse von p70S6 zeigte das

gleiche Muster wie AKT, d.h. eine Expressionsabnahme bei den Cisplatin-sensitiven NCCIT-Zellen, sowie bei allen drei Cisplatin-resistenten Zelllinien.

3.4.4.3 Effekt der Kombinationsbehandlung von Temsirolimus und Cisplatin auf das Zellwachstum von KZT-Zelllinien in vitro

Um zu untersuchen, ob Sunitinib und Cisplatin einen synergistischen Effekt aufweisen, wurden die Cisplatin-sensitiven und -resistenten Keimzelltumorzelllinien einer Kombinationsbehandlung mit diesen beiden Substanzen unterzogen. Hierfür wurden die an den Cisplatin-sensitiven Zellen ermittelten IC_{10} -, IC_{25} - und IC_{50} -Dosen der einzelnen Substanzen alleine und in Kombination verwendet. Die Ergebnisse der Monotherapie mit Temsirolimus wurden mit den Ergebnissen der Kombinationsbehandlungen verglichen. In Abbildung 43 sind die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen von Temsirolimus und Cisplatin am Beispiel von NTERA-2 und NTERA-2-R zu sehen.

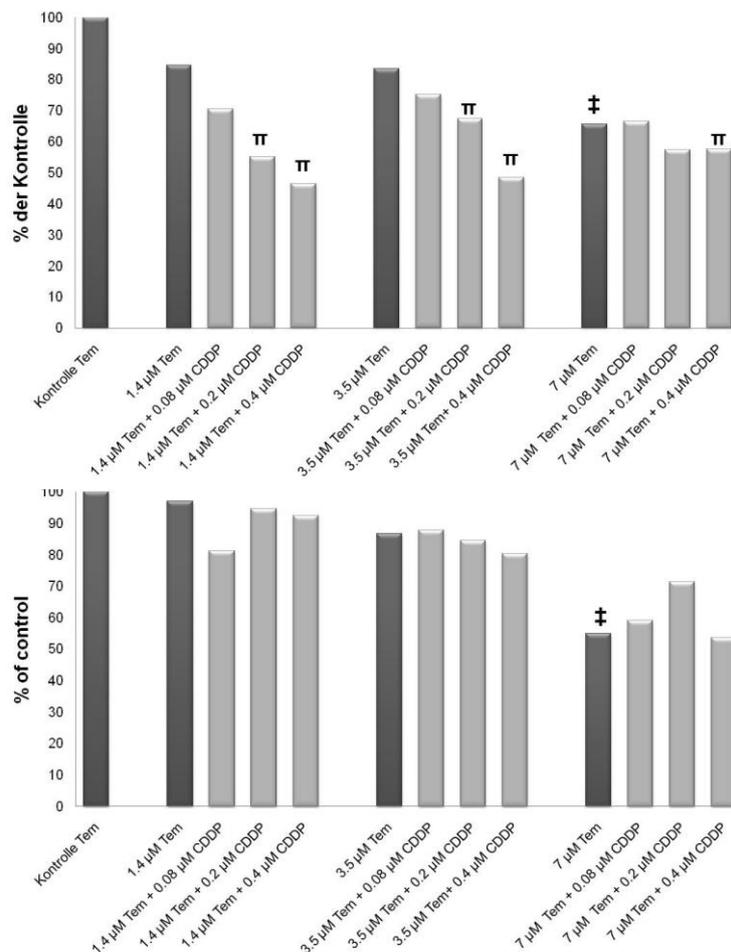


Abbildung 43: Effekte einer Monotherapie und Kombinationstherapie von Temsirolimus (Tem) und Cisplatin (CDDP) bei NTERA-2-Zellen (oben) und NTERA-2-R-Zellen (unten) mit den jeweiligen IC_{10} -, IC_{25} - und IC_{50} -Dosen der Cisplatin-sensitiven Zelllinien.

Erklärung der Symbole in Abbildung 43:

- ‡ Unterschiede sind statistisch signifikant in den behandelten Zellen, verglichen mit den un-behandelten Kontrollzellen ($p < 0.05$).
- π Kombinationsbehandlung resultierte in signifikant erhöhter Zytotoxizität, verglichen mit der Monotherapie mit Temsirolimus in der jeweiligen Konzentrationsstärke ($p \leq 0.05$).

Die Behandlung mit Temsirolimus in der Monotherapie war gleichermaßen effektiv in den Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zellen. Die Kombinationstherapie mit Temsirolimus und Cisplatin zeigte hauptsächlich in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien NTERA-2, 2120EP und NCCIT eine stärkere Inhibition des Zellwachstums. Dagegen konnte kein eindeutig synergistischer Effekt der Kombination in den Cisplatin-resistenten Zelllinien beobachtet werden.

Kapitel 4 Diskussion

4.1 Allgemein

Trotz der Errungenschaften und Erfolge in der Krebsforschung und der Therapie bösartiger Erkrankungen ist das Auftreten von Chemotherapieresistenz in der klinischen Krebstherapie ein großes und nicht zu unterschätzendes Problem. Zwar konnten durch den Einsatz gezielter Therapieansätze, wie z.B. mit monoklonalen Antikörpern, spezifischen Substanzen zur Inhibition von Kinasen oder Immunotoxinen, die bestimmte Oberflächenrezeptoren zum Ziel haben, entweder alleine oder als Wirkverstärker zytotoxischer Substanzen, zum Teil beachtliche Verbesserungen erzielt werden (Pastan et al. 1998; Druker et al. 2001; Nabholz et al. 2001). Ein Teil der Patienten, insbesondere mit metastasierten Tumoren, kann trotz dieser vielfältigen Behandlungsansätze jedoch noch immer nicht geheilt werden. Keimzelltumoren des Hodens sind die am häufigsten vorkommenden soliden Tumoren junger Männer im Alter zwischen 20 und 45 Jahren und sind heutzutage sehr gut therapierbar. Deshalb gelten sie als Paradebeispiel für eine heilbare Tumorerkrankung. Dies ist insbesondere auf die Einführung von Cisplatin in den frühen 70er Jahren des letzten Jahrhunderts zurückzuführen. In eingeschränktem Maße gilt dies auch für Tumorarten wie das Ovarialkarzinom oder den Brustkrebs, wo Cisplatin ebenfalls zu verbesserten Heilungschancen geführt hat (Kelland 2007). Mit einer Cisplatin-basierten Kombinationschemotherapie können heutzutage mehr als 70% der metastasierten Keimzelltumorpatienten geheilt werden. Trotz dieser allgemein guten Prognose versagt jedoch in ca. 30% der Fälle mit einem metastasierten nicht-seminomatösen Keimzelltumor die Therapie. Diese Patienten sprechen entweder nur teilweise auf eine Therapie an (primäre Chemotherapieresistenz) oder erleiden nach einer vollständigen Remission einen bzw. multiple Rückfälle (sekundäre oder erworbene Chemotherapieresistenz).

In dieser Arbeit ging es in erster Linie um die globale Proteomanalyse von Keimzelltumoren *in vitro*, um Signalwege bzw. einzelne Proteine zu identifizieren, die eine Rolle in der inherent hohen Chemosensitivität der Tumoren spielen. Neben der Suche nach Faktoren, die die besondere Chemosensitivität dieser Tumoren erklären können, war zum zweiten die Identifizierung von Faktoren, die für die Entwicklung einer Resistenz gegen die Behandlung mit Cisplatin verantwortlich sind, von besonderem Interesse. Trotz zahlreicher Forschungsansätze, die in erster Linie auf

Genexpressionsebene ansetzen, konnten die mit einer Chemoresistenz assoziierten Faktoren und Mechanismen bis heute kaum ansatzweise geklärt werden. Ein übereinstimmendes Fazit aller bisherigen Untersuchungen ist allerdings, dass die Wirkung von Cisplatin ein multifaktorielles Ereignis ist und evtl. auch die Chemoresistenz nicht nur durch einen einzelnen Prozess vermittelt wird (Mayer et al. 2003b). Neben den klassischen Analysen, wie der Charakterisierung von definierten, an der Chemoresistenz beteiligten Signalwegen, sind globale Ansätze, wie z.B. eine Analyse des Proteoms, ein Weg, um neue Marker zu entdecken oder Mechanismen der Chemoresistenz zu erklären. Besonders für die deskriptive und funktionelle Proteomanalyse gilt die 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese, kombiniert mit der Massenspektrometrie, als eine der effizientesten Methoden, um durch die Identifizierung von differentiell regulierten Proteinen potentielle Kandidaten für Marker der Chemoresistenz und/oder der anderer Mechanismen, wie Proliferation, Apoptose oder auch Metastasierung, aufzudecken.

4.2 Die Analyse des Proteoms

Allgemein

Die Analyse des Proteoms, also der Gesamtheit aller Proteine, ist neben der Genomanalyse ein Schritt zum besseren Verständnis der Prozesse, die sich in einer Zelle bzw. in einem Organismus unter den unterschiedlichsten Bedingungen abspielen. Während das Genom allenfalls geringen Schwankungen unterliegt, wird das Proteom aus den ungefähr 30000 Genen des humanen Genoms in geschätzte 300.000 bis 1 Million Proteinvarianten translatiert (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001). Diese Unterschiede zwischen der Gen- und der Proteinexpression entstehen zum einen durch translationale Regulation auf der Ebene der Aminoacyl-tRNS, zum anderen durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, Glykosylierung, Methylierung, Acetylierung, Sulfatierung und Ubiquitinierung (Han et al. 1992; Rodnina et al. 2005).

2D-Polyacrylamidgelelektrophorese und Massenspektrometrie

Proteinchemische Analysen, wie die 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese und die anschließende Identifizierung mittels Massenspektrometrie, sind ideale Methoden für die quantitative Analyse von Veränderungen des Proteoms unter verschiedensten Voraussetzungen, wie z.B. nach Behandlung mit zytotoxischen Substanzen. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese können die spezifischen Proteinmuster von Zelllinien, aber

auch von Gewebeproben bzw. Tumorproben, visualisiert und analysiert werden. Die rapide Entwicklung im Bereich der Proteomanalyse hat in den letzten Jahren immer bessere Resultate in der Auftrennung von Proteinen bzw. Proteingemischen ermöglicht. Zum einen ist hier die Entwicklung der IPG-Streifen, die die Analyse verschiedener pH-Bereiche mit einer hohen Auflösung ermöglichen, zu nennen, aber auch die Optimierung der Protokolle bezüglich der Probenaufbereitung verschiedener Zellfraktionen und der Durchführung der Gelelektrophorese. Hier sind besonders die denaturierenden Bedingungen mit Hilfe hoher Konzentrationen von Harnstoff wichtig, um auch wasserunlösliche Proteine in Lösung zu bringen, sowie um Sekundär- auch Tertiärstrukturen von Proteinen aufzubrechen und Protein-Protein-Interaktionen zu vermeiden. Bereits während der Probenaufbereitung, als auch nach der Fokussierung bzw. kurz vor Auftrennung der Proteine in der 2D-PAGE, unterstützen bestimmte Chemikalien die spätere massenspektrometrische Analyse der Proteine. Dazu gehören unter anderem das im Harnstoff-Lysepuffer enthaltene zwitterionische Detergenz CHAPS, welches für die Lösung von hydrophoben Bindungen verwendet wird und im Gegensatz zu anderen Detergenzien, wie z.B. Nonidet NP-40, aufgrund seines hohen Reinheitsgrades die Massenspektrometrie nicht beeinflusst. Weiterhin sind die Reduktion und die Alkylierung von Cysteinen in den aufzutrennenden Proteinen für die Massenspektrometrie unerlässlich. Obwohl Cysteine relativ selten in Proteinen vorkommen und nur für einen kleinen Teil von Proteinen relevant sind, ist die irreversible Trennung von Disulfidbrückenbindungen für einige wenige Proteine für eine bessere Peptidausbeute in der Massenspektrometrie notwendig. Die Reduktion von Cysteinen zum Thiol, sowie die Unterbindung von weiteren Oxidationsreaktionen der Proteine erfolgt mit Hilfe von DTT. Die alkylierende Reaktion und damit eine irreversible Änderung vom Cystein in das stabile CAM (S-Carboxyamidomethylcystein) werden mit Iodacetamid durchgeführt. Ein weiterer Vorteil der 2D-Gelelektrophorese ist die geringe Menge an Protein, die benötigt wird und die nur einige Mikrogramm bis wenige Milligramm beträgt. Neben der Auswertung der Coomassie-gefärbten 2D-Gele mit Hilfe von speziellen Softwareprogrammen, können diese sogleich auch für die präparative Analyse weiterverwendet werden. Aufgrund der Unterstützung durch visuelle Auswertungsprogramme (in unserem Fall PDQuest, Delta2D) können auch noch schwach exprimierte Proteine ausgewertet und die relativ schwache Sensitivität der

Coomassie-Färbung kann im Vergleich zu der 100-fach sensitiveren Silberfärbung der Gele zum Teil kompensiert werden. Die Auftrennung von Proteinen mit Hilfe von Polyacrylamidgelen hat neben der hohen Auflösung der Proteine noch weitere Vorteile. Da ist zum einen die hervorragende Lagermöglichkeit der aufgetrennten und analysierten Proteingemische, da die Gele unter kühlen und relativ sterilen Bedingungen mehrere Jahre haltbar sind, und zum anderen die einfache Verfügbarkeit für die massenspektrometrische Analyse. Die differentiell regulierten Proteinspots lassen sich ohne technische Hilfsmittel ausstechen und stehen unmittelbar für weiterführende Schritte zur Verfügung.

Die Einordnung der massenspektrometrisch ermittelten Peptidmassen basiert unabhängig von der Messmethode immer auf dem gleichen Prinzip. Dazu werden die Peptidmassen mit den theoretisch berechneten Werten, die in Datenbanken für das einzelne Proteine zur Verfügung stehen, abgeglichen und dem am „besten passenden“ Proteintreffer zugeordnet. Die potentiellen Proteinkandidaten werden dann mit einem gewissen „Score“-Wert oder aber auch mit sogenannten „peptide matches“, die die Signifikanz bewerten, belegt. Je höher diese Werte sind, umso eindeutiger sind die gemessenen Peptidmassen einem bestimmten Protein zuzuordnen. Dabei kann die Identifikation von Proteinen von verschiedenen Faktoren beeinflusst oder auch verhindert werden. Der in dieser Arbeit verwendete In-Gel-Verdau Coomassie-gefärbter Polyacrylamidgele mit Trypsin zum Beispiel hat verschiedene Limitationen. Zum einen ist die Expressionsstärke des Proteins im Gel ein Faktor, der die Messung beeinflussen kann. Ein quantitativer Einfluss spielt z.B. bei zu geringer Protein- und damit nach dem Trypsinverdau zu geringer Peptidmenge eine wichtige Rolle. Aber auch „zuviel“ Protein kann die massenspektrometrische Messung beeinflussen und damit eine eindeutige Identifizierung verhindern. Bei besonders deutlichen Proteinspots besteht auch die Möglichkeit, dass mehrere Proteine an einer Stelle im 2D-PAGE-Gel lokalisiert sind und dadurch eine eindeutige Bestimmung erschwert werden kann. Im qualitativen Bereich sind Einschränkungen durch den enzymatischen Verdau des Proteins möglich. Trypsin schneidet im Normalfall am Carboxyende der Aminosäuren Arginin und Lysin, außer es folgt der Schnittstelle ein Prolin, und transformiert das zu analysierende Protein in festgelegte Peptidstücke. Liegt jedoch ein zu niedriges Enzym-Substrat-Verhältnis vor oder ist die Inkubationszeit des Enzyms zu kurz, ist der Verdau nur unvollständig und erschwert die nachfolgende Messung. Zudem kann durch die Verwendung eines

einzelnen Enzyms nicht die gesamte Sequenz eines Proteins analysiert werden. Für diesen Fall ist die Verwendung weiterer Enzyme, wie z.B. Lys-C oder Glu-C notwendig, die die vorangegangene Analyse komplettieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nicht alle Proteine im ersten Anlauf mit Hilfe der MALDI-TOF-Analyse identifiziert werden. Erst mit Hilfe eines sensitiveren MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometers war teilweise die endgültige Identifizierung möglich.

Kritischerweise sollte beachtet werden, dass in dieser Arbeit nur Proteine im eher engen pH-Bereich von 4-7 analysiert wurden. Proteine im sehr sauren bzw. basischen Bereich wurden nicht untersucht, was bedeutet, dass hier noch weiterer Forschungsbedarf zur Identifizierung weiterer interessanter Kandidaten besteht, die in diesen Untersuchungen nicht identifiziert werden konnten. Ein weiterer Ansatz ist die Analyse von speziellen Zellfraktionen, wie z.B. nukleären Proteinen, da diese Proteine in unserem Ansatz der Analyse ganzer Zellen kaum gefunden wurden. Dies wäre insbesondere unter dem Gesichtspunkt, dass die DNS und somit auch beteiligte Kernproteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, die Hauptangriffspunkte von Cisplatin sind, besonders interessant. Möglicherweise werden diese in der Regel nur in geringen Mengen exprimierte Proteine von anderen prävalenteren Proteinen „überdeckt“ und bedürfen anderer Extraktions- und Fraktionierungsmethoden. Auffallend häufig treten in den Proteomvergleichen dieselben Proteine auf, wie z.B. Nucleophosmin, Dihydropyrimidinase-like 3, Triosephosphat Isomerase, die nicht nur in dieser Arbeit als differentiell reguliert identifiziert wurden. Auch andere Publikationen, bei denen Proteomanalysen im Fokus standen, zeigten immer wieder die gleichen Proteine. Scheinbar sind diese Proteine in allen Zelltypen sehr stark repräsentiert und/oder unterliegen deutlichen Schwankungen in der Regulation, die auf verschiedenste zelluläre Prozesse zurückzuführen sind und sie für die Proteomanalyse prädestinieren (Chuthapisith et al. 2007; Cicchillitti et al. 2009).

4.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der verwendeten KZT-Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Embryonalkarzinomzelllinien NTERA-2, 2102EP und NCCIT sind bekannte und gut charakterisierte Zelllinien, die bereits für diverse Untersuchungen zur Chemosensitivität und -resistenz herangezogen wurden. Um die Daten aus den Proteomanalysen mit weiteren zellulären Prozessen in Verbindung zu bringen, wurde neben der Zellproliferation und der Populationsverdopplungszeit auch das Oberflächenmarkerprofil der untersuchten Keimzelltumorzelllinien analysiert. Die Ermittlung der IC₅₀-Dosis von Cisplatin zeigte

im Vergleich der Zelllinien untereinander, dass die NTERA-2-Zellen (0.4 μM) am sensitivsten auf die Behandlung mit Cisplatin reagierten, gefolgt von den 2102EP-Zellen (0.8 μM) und den NCCIT-Zellen (1.7 μM). Frühere Ergebnisse der IC_{50} -Bestimmung dieser drei EC-Zelllinien konnten somit reproduziert und bestätigt werden (Koch et al. 2003). Die erstmals in diesem Zusammenhang untersuchte Seminomzelllinie TCam-2 wies hingegen mit einer IC_{50} -Dosis von 30 μM im Vergleich zu den NTERA-2-Zellen ein 75fach höheres Resistenzniveau unter Cisplatinbehandlung auf. Dies widerspricht den klinischen Daten zu Seminomen insofern, als diese als höchst sensitiv gegenüber einer Chemotherapie gelten. Möglicherweise kann dies mit der Kultivierung der Zellen *in vitro* zusammenhängen, da die Bedingungen der Zellkultur nicht zwangsläufig mit denen im Tumor, d.h. *in vivo*, übereinstimmen. Weiterhin ist zu beachten, dass die Zelllinie TCam-2 eine Ausnahmezelllinie darstellen muß, da bisherige Versuche, eine Seminomzelllinie zu etablieren, durch eine sehr hohe Apoptoseneigung von Seminomen gescheitert sind (Olie et al. 1996). Es muß somit eine besondere Apoptoseresistenz in diesen Zellen vorliegen (de Jong et al. 2008). Weitere Untersuchungen, wie z.B. das Zellzyklusverhalten der EC-Zelllinien, bestätigten frühere Ergebnisse einer Zellzyklusarretierung in der G2/M-Phase unter Cisplatin (Mueller et al. 2006). Obwohl die Bedingungen der Experimente bezüglich Behandlungsdosis und -dauer differierten, arretierten die untersuchten Zellen in unseren Untersuchungen nach Cisplatinbehandlung ebenfalls in dieser Zellzyklusphase. Auch die Seminomzelllinie zeigte dieses Resultat. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Keimzelltumorzellen unabhängig vom Zelltyp (Nicht-Seminom oder Seminom), der Dosis und der Behandlungsdauer mit einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase auf Cisplatin reagieren. Weiterhin entsprach das jeweilige Oberflächenmarkerprofil der untersuchten Zelllinien weitgehend den bisherigen Erkenntnissen aus immunohistochemischen Analysen, die in der Klinik Verwendung in der Unterscheidung des Tumortyps liefern. Besonders interessant ist hier jedoch die Beschreibung einer Expression des Oberflächenmarkers CD133 in Keimzelltumorzellen. Dieses Protein wurde u.a. in Seminomen nachgewiesen (Gashaw et al. 2007), weiterhin ist es bislang in Keimzelltumoren jedoch wenig beschrieben. Neben der Expression in der Seminomzelllinie TCam-2 konnten wir die Expression von CD133 auch in den Embryonalkarzinom-Zelllinien nachweisen. Das Protein gilt in einigen Tumoren als Stammzellmarker (Wu et al. 2009). Ob in

Keimzelltumoren ebenfalls eine sogenannte „side population“ von Tumorstammzellen existiert, bleibt zu ergründen; unsere Untersuchungen legen auf jeden Fall den Schluß nahe, dass dieser Marker in Keimzelltumoren kaum zur Charakterisierung von Tumorstammzellen herangezogen werden kann.

Der Vergleich der Proteomanalysen der Wildtyp-Zellen der Nichtseminom-Zelllinien untereinander zeigte ein ähnliches Proteinmuster, was die Validität der Untersuchungen belegt und hinsichtlich einer Vergleichbarkeit der weiteren Proteomanalysen eine wichtige Voraussetzung darstellte. Unter den differentiell exprimierten Proteinen waren verhältnismäßig wenig stressinduzierte Proteine zu finden. Der Großteil der Proteine konnte hingegen metabolischen und Signalübertragungs-/Transport-Funktionen zugeordnet werden. Allerdings wurde mit dem Cellular Retinoic Acid Binding Protein (CRABP1) ein interessantes Protein identifiziert, welches in die Differenzierung von Zellen unter ATRA involviert ist. Dieses Protein wird auf Proteinebene in 2102EP-Zellen nicht exprimiert. Da diese Zellen nicht unter der Behandlung von ATRA differenzieren, ist CRABP1 möglicherweise ein Kandidat für weitere Untersuchungen unter Differenzierungsbedingungen.

Die Proteomanalysen der Zelllinien nach der Resistenzentwicklung unter Cisplatin-Langzeitexposition, wie auch nach der Behandlung mit der IC_{50} -Dosis mit Cisplatin, zeigten, dass alle Zelllinien ein zelllinienspezifisches, deutlich unterschiedliches Profil exprimieren. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die Resistenzentwicklung als auch die Reaktion auf Cisplatinexposition in allen Zelllinien unterschiedliche Prozesse in Gang bringen, die für jede Linie typisch sind. Das bedeutet aber auch, dass eine vereinfachende Beschränkung auf einen Signalweg oder gar ein einziges Schlüsselprotein als Modell der Cisplatin-Resistenz nicht denkbar ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen vielmehr die These der multifaktoriellen Entstehung von Resistenz gegenüber Cisplatin. Der Proteomvergleich der primär Cisplatin-resistenten Seminomzelllinie TCam-2 mit den im Vergleich deutlich sensitiveren EC-Zelllinien zeigte interessanterweise, dass mehrere Proteine, die im Zusammenhang mit Detoxifikationsmechanismen stehen, höhere Expression in den TCam-2-Zellen zeigen. Dazu gehören z.B. Glutathion-S-Transferase P1 (GSTP1) und Peroxiredoxin, die später noch näher diskutiert werden. Möglicherweise steht so den TCam-2-Zellen ein Weg zur Verfügung, die Behandlung mit Cisplatin besser zu tolerieren, wodurch sich auch das hohe Resistenzniveau erklären ließe.

4.4 Mechanismen und Proteine der Chemotherapieresistenz

Globale Chromosomenanalysen, die das Ziel hatten, Mechanismen der Chemotherapieresistenz zu identifizieren, zeigten u.a. amplifizierte chromosomale Regionen, die mit einer Therapieresistenz assoziiert sind (Rao et al. 1998). Eine Arbeit, in der analog zu dieser Arbeit chemosensitive Zelllinien mit ihren chemoresistenten Tochterzelllinien verglichen wurden, identifizierte eine Überrepräsentation von Abschnitten von Chromosom 16. Bei näherer Betrachtung konnte allerdings kein übereinstimmendes Änderungsmuster bei den verwendeten Zelllinien beobachtet werden (Wilson et al. 2005). Mit Hilfe von *microarray*-Analysen konnten in Keimzelltumoren nach der Behandlung mit Cisplatin Expressionsänderungen auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Dabei wurden sowohl bekannte (z.B. *P53*, *CASP8*), als auch bislang unbekannte Gene identifiziert, die im Zusammenhang mit der Behandlung mit Cisplatin reguliert werden (Duale et al. 2007). Weitere *microarray*-Analysen, diesmal im Hinblick auf die Identifizierung von Genen, die im Zusammenhang mit der Resistenz auf Cisplatin stehen, wurden an Tumormaterial von Cisplatin-behandelten Patienten durchgeführt (Korkola et al. 2009). Untersuchungen auf sämtlichen Ebenen, d.h. chromosomales Muster, RNS-Analysen, als auch Proteinanalysen, sind notwendig und ergänzen sich, da sich Veränderungen auf chromosomaler Ebene z.B. nicht zwangsläufig auf den späteren Proteinstatus übertragen. Dies wird auch durch eigene Ergebnisse gestützt, die teilweise deutliche Differenzen zwischen dem chromosomalen Status, ermittelt über CGH-array-Analysen, sowie der mRNA-Expression und schließlich der Proteinexpression zeigten (Glaesener et al. 2008). Die globale Proteomanalyse ist somit der nächste Schritt, um Änderungen zu identifizieren, die für die Chemotherapiesensitivität bzw. -resistenz verantwortlich sind. Die Resistenz gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung kann wie bereits zuvor erwähnt als primäre Resistenz (intrinsisch) und als sekundäre Resistenz (erworben) auftreten. Über die Mechanismen der sekundären Resistenz ist bis dato mehr bekannt, da die Erforschung dieses Phänomens *in vitro* unter experimentellen Bedingungen einfacher möglich ist. Kritisch betrachtet entsprechen aber die Bedingungen *in vitro* nicht denen Verhältnissen im Tumor selbst. Demnach können die Resultate der Experimente aus dem Labor auch nur unter Vorbehalt auf einen lebenden Organismus übertragen werden und benötigen zumindest eine Validierung in Tumormodellen mit Tumorentwicklung, z.B. mittels Xenografts in Nacktmäusen. Um

zelllinienspezifische Schwankungen auszugleichen und um ein möglicherweise einheitliches Änderungsmuster durch die Behandlung mit den verschiedenen Substanzen zu identifizieren, wurden mehrere Zelllinien bezüglich ihrer Reaktion auf die Behandlung mit chemotherapeutischen Substanzen und die Entwicklung von Chemotherapieresistenz untersucht.

Denkbare Mechanismen der Chemoresistenz sind Vorgänge wie die veränderte Aufnahme der Substanz, die Umgehung der Apoptose, eine erhöhte DNS-Reparatur, eine veränderte Genexpression oder auch eine Änderung des Drug-Targets (Kartalou et al. 2001). Untersuchungen zu der Wirkung von Cisplatin zeigten bei *E.coli* und eukaryotischen Zellen, die eine geschädigte bzw. eine verminderte DNS-Reparatur haben, ein sensibles Verhalten gegenüber einem Zytostatikum. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass die Bildung von DNS-Addukten ohne Möglichkeit zur vollständigen Reparatur das entscheidende Ereignis für die Einleitung einer Apoptose darstellt (Alazard et al. 1982; Dijt et al. 1988). Zudem konnte gezeigt werden, dass mit dem Anstieg der Häufigkeit von DNS-Cisplatin-Addukten die Überlebensfähigkeit der Zelle abnimmt (Reed et al. 1988). Weitere Effekte einer Behandlung mit Cisplatin sind die Inhibition der DNS-Replikation, der RNS-Transkription, ein Zellzyklusarrest in der G2-Phase, sowie die Induktion von Apoptose (Uchida et al. 1986; Sorenson et al. 1988a; b; Sorenson et al. 1990; Mello et al. 1995). Bislang gibt es nur vergleichsweise wenige Untersuchungen zum Proteinstatus im Zusammenhang mit Resistenzmechanismen in Tumoren. Diese wurden u.a. am Melanom, Gebärmutterhalskarzinom und beim Ovarialkarzinom durchgeführt (Sinha et al. 2000; Castagna et al. 2004; Le Moguen et al. 2006). Unter den Proteinen bzw. Proteingruppen, denen eine Rolle in der Chemotherapieresistenz zugesprochen wird und die in dieser Arbeit als differentiell reguliert identifiziert wurden, sind neben den Hitzeschockproteinen/Chaperonen vor allem auch Proteine, die an der Kalzium-Homöostase, der Detoxifikation und dem Zytoskelett beteiligt sind. Ein Protein, dem eine wichtige Rolle in der Chemotherapiesensitivität von Keimzelltumoren zugeordnet wurde, ist p53 (Chresta et al. 1996). Allerdings konnten Untersuchungen zeigen, dass die Chemotherapiesensitivität in Keimzelltumoren in p53-unabhängigen Signalwegen begründet sein kann (Burger et al. 1997; Burger et al. 1999). Diese Ergebnisse wurden durch Analysen zum Verhalten des MAPK-Signalwegs nach Behandlung mit Cisplatin unterstützt. Diese zeigten, dass die Induktion der Apoptose in Keimzelltumoren auch über diese Signalkaskade initiiert

werden kann. Dabei wurde eine Aktivierung von MEK und ERK in NCCIT und NTERA-2-Zellen nach einer zweistündigen Behandlung mit einer hohen Dosis (50µM) Cisplatin nachgewiesen (Schweyer et al. 2004). Die Analysen von MEK und ERK, sowie ihrer aktiven und phosphorylierten Formen, nach der Behandlung mit Cisplatin und den in dieser Arbeit angewandten Parametern (jeweilige IC₅₀-Dosis über 48h) zeigten gegensätzliche Ergebnisse im Fall der phosphorylierten Proteine. Während in den unbehandelten Zellen auch die aktiven Formen der Proteine vorlagen, zeigten die mit Cisplatin behandelten Zellen eine deutliche schwächere Expression der phosphorylierten Kinasen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der früheren Untersuchung ist es somit denkbar, dass die Apoptose über den MAPK-Weg bereits nach kurzer Behandlung mit Cisplatin induziert wird und somit eine Aktivierung der Signalkaskade allein in der frühen Phase der Apoptose erfolgt. Nach 48h Behandlungsdauer wäre dann diese Aktivierung nicht mehr nachweisbar.

4.4.1 Molekulare Chaperone

Chaperone sind sogenannte Hilfsproteine bzw. Stressproteine, die zahlreich in der Zelle vertreten und auch unter der Bezeichnung „Hitzeschockproteine“ (heat shock proteins, HSPs) bekannt sind (Ritossa 1996). Unter Stressbedingungen, wie Hitze, Kälte, Trockenheit, UV-Bestrahlung, oxidativem Stress, aber auch durch die Behandlung mit chemischen Substanzen und Zytostatika wird die Synthese unterschiedlichster Chaperone induziert. Zu den bekannten Funktionen von Hitzeschockproteinen gehören u.a. die Faltung neugebildeter Proteine, die Vermeidung der Denaturierung und Bildung von Proteinaggregaten und die Stabilisierung und Wiederherstellung von geschädigten Proteinen (Rokutan et al. 1998), aber auch regulatorische Effekte auf die Apoptose. Daher ist diese Gruppe von Proteinen auch besonders im Hinblick auf die Chemoresistenz interessant. Die Proteomanalysen in dieser Arbeit zeigten einige differentiell regulierte HSPs, die nachfolgend diskutiert werden.

Hsp70 Hsp70 ist ein anti-apoptotisches Chaperon, welches häufig in humanen Tumoren und Tumorzelllinien exprimiert wird (Kregel 2002; Hwang et al. 2003). Eine hohe Expression dieses Proteins wird in Tumoren des Darms und des Ovars in Zusammenhang mit einer Therapieresistenz und somit einer schlechten Prognose gebracht (Elpek et al. 2003; Rupnarain et al. 2004). Weiterhin konnte für Hsp70 eine Beteiligung am MDR (*multi-drug resistance*)-Prozess und an der Regulation am

mitochondrialen Apoptosesignalweg nachgewiesen werden (Jolly et al. 2000; Zylitz et al. 2001), sowie die Fähigkeit Apoptose zu inhibieren, die durch Chemotherapie induziert wird (Creagh et al. 2000).

Hsp90 Mit dem Chaperon Hsp90 wurde ein weiteres interessantes Protein differentiell reguliert. Hsp90 ist das am häufigsten vorkommende Protein in der Zelle und in Eukaryonten überlebenswichtig. Es ist in diverse immunologische Prozesse involviert (Srivastava et al. 1994; Buchner 1999; Pearl et al. 2000) und nimmt unter normalen Bedingungen am intrazellulären Transport, der Proteinfaltung und der Degradation von Proteinen teil. In Tumorzellen wurde gezeigt, dass Hsp90 eine Rolle in der Modulation des PI3K/AKT-Signalwegs, sowie von TNFR und NF κ B spielt und dass eine niedrigere Expression des Proteins in resistenten Zellen zu einer indirekten Inhibition von apoptotischen Vorgängen führt (Ciocca et al. 1992; Mohsin et al. 2005). Hitzeschockproteine stellen somit möglicherweise gute molekulare Zielstrukturen in Zellen dar, um den molekularen Effekt einer Cisplatintherapie zu verstärken. So hat das Antibiotikum Geldanamycin, ein benzochinoides Ansamycin aus *Streptomyces hygroscopicus* (DeBoer et al. 1970), das das Hitzeschockprotein Hsp90 spezifisch bindet und seine Funktion als molekulares Chaperon unterbindet, antikanzerogenes Potential bewiesen (Whitesell et al. 1992).

4.4.2 Proteine des Zytoskeletts

Einige differentiell regulierte Proteine, die in allen Proteomvergleichen dieser Arbeit gefunden wurden, gehören der Gruppe der zytoskeletalen Proteine an, darunter Tubulin beta 2 & 3, Vimentin, Lamin B1 & B2, Actin, Myosin, Tropomyosin und Zytokeratin 8. Eine veränderte Expression in chemoresistenten Zellen konnte insbesondere für Zytokeratine und das Protein Vimentin, nachgewiesen werden. Die Art der Regulation ist allerdings zelllinien- bzw. tumorspezifisch und konnte bislang keinem spezifischen Mechanismus zugeordnet werden. Zytokeratine, Lamine, sowie Vimentin gehören den Intermediärfilamenten an, die in der Zelle für die mechanische Stabilität verantwortlich sind. Zytokeratine werden in neutral-basische (Zytokeratin 1-8) und saure (Zytokeratine 9-20) Keratine unterschieden, die jeweils Heterodimere miteinander bilden, was wiederum aufgrund der Spezifität der Dimere eine Klassifizierung von Tumoren ermöglicht. Ein spezifischer Nachweis über Antikörper unterstützt die Identifizierung von bestimmten Tumorarten, z.B. gilt Zytokeratin 19 als ein Marker undifferenzierter Zellen und wird bei der Detektion diverser Tumoren

verwendet (Ecke 2008; Alvaro 2009). In der Brustkrebszelllinie MCF-7 konnte gezeigt werden, dass eine geringere Expression von Zytokeratin 8 und Keratin 19 mit der Chemoresistenz gegenüber Adriamycin und Paclitaxel in Zusammenhang steht (Chuthapisith et al. 2007). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit *in vivo*-Daten von aggressiven Brustkrebstumoren (Willipinski-Stapelfeldt et al. 2005). Da in der Regulation der in dieser Arbeit gezeigten zytoskeletalen Proteine kein einheitliches Muster zu erkennen ist, ist ein möglicher Zusammenhang mit der Entwicklung der Chemoresistenz oder der -sensitivität jedoch schwer zu interpretieren. Eine Regulation der Expression von Proteinen des Zytoskeletts nach Behandlung mit zytotoxischen Substanzen ist aber möglicherweise mit dem apoptosebedingten Abbau von zellulären Strukturen, zu denen neben dem Zytoskelett auch der Zellkern gehört, in Verbindung zu bringen (Hengartner 2000).

4.4.3 Annexine

Annexine gehören einer strukturell konservierten Proteinfamilie an, die in verschiedenen Ca^{2+} -abhängigen membranverbundenden Prozessen, wie Reparatur und Fusionierung der Membran, Ionenkanalbildung, Vesikeltransport, aber auch in der Zellproliferation und -differenzierung und der Kalzium-Homöostase eine Rolle spielen (McNeil et al. 2006). Unter der Behandlung mit Cisplatin konnte eine Hochregulation von Annexin A1 gezeigt werden. Frühere Untersuchungen zeigten eine Induktion des Proteins als Reaktion auf Stress, was mit unseren Ergebnissen in Einklang steht.

4.4.4 Proteine des Redox-Metabolismus

Für den Schutz vor schädigenden Substanzen, wie z.B. in unserem Fall das Zytostatikum Cisplatin, stehen der Zelle mit dem Thioredoxin-, und dem Glutathionmetabolismus zwei entgiftende Stoffwechselwege zur Verfügung. Beide Systeme wurden schon früher mit Resistenzmechanismen, wie z.B. der „*Multi-Drug-Resistance*“ (MDR) gegenüber Zytostatika in Verbindung gebracht. Sowohl Thioredoxin, als auch Peroxiredoxin, welches eine Rolle im Thioredoxinstoffwechsel spielt, wurden in unseren Experimenten wiederholt als differentiell exprimiert identifiziert. Als Mitglied des Glutathionmetabolismus wird im Folgenden die Glutathion-S-Transferase detaillierter diskutiert.

Thioredoxine Thioredoxine spielen eine regulatorische Rolle in Prozessen wie dem Überleben und der Proliferation der Zelle. Sie interagieren mit

Transkriptionsfaktoren, wie dem Tumorsuppressor p53, oder dem HIF-1 α -Protein und haben so einen regulatorischen Einfluss auf die Apoptose. Eine erhöhte Expression von Thioredoxinen, sowie eine damit einhergehende erhöhte Chemoresistenz, konnte in mehreren Tumorarten, darunter Lunkenkrebs und Brustkrebs beobachtet werden (Berggren et al. 1996; Grogan et al. 2000).

Peroxiredoxine Peroxiredoxine gehören einer Thiol-haltigen Peroxidase-Familie an, deren Hauptfunktion der Abbau von Wasserstoffperoxiden in der Zelle ist (Seaver et al. 2001) und die an zellulären Prozessen wie der Proliferation und Differenzierung beteiligt sind. Die vermehrte Expression von Peroxiredoxin 1 konnte in verschiedenen Tumoren gezeigt werden, so dass für dieses Protein eine Rolle in der Regulation der Chemoresistenz vermutet wird (Kim et al. 2003).

Glutathion-S-Transferase (GSTP1) In der Seminomzelllinie TCam-2 wurde im Vergleich zu den EC-Zelllinien das Protein Glutathion-S-Transferase P1 als höher exprimiert identifiziert. Neben Enzymen wie den Glutathionperoxidasen und den Glutaredoxinen gehört auch GSTP1 dem Glutathionstoffwechsel an. Dieses System spielt eine große Rolle in der Detoxifikation der Zelle und dient der Zelle als Schutzmechanismus, was zumindest einen Erklärungsansatz für die wesentliche höhere Toleranz gegenüber Cisplatin der TCam-2-Zellen liefern würde.

4.4.5 Kalzium-bindende Proteine

Kalzium ist an diversen Vorgängen in der Zelle beteiligt, zu denen Prozesse wie die Zellkontraktion, die Sekretion und die Induktion der Mitose (Mitogenese) gehören. Verschiedene Kalzium-bindende Proteine, die schon früher mit der Reaktion der Zelle auf das Zytostatikum Cisplatin in Zusammenhang gebracht wurden (Tachikawa et al. 1998), wurden in den Proteomvergleichen dieser Arbeit als differentiell reguliert identifiziert. Die Ausschüttung von Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) unter Stressbedingungen ist in die Vorgänge, die für die Induktion der Apoptose verantwortlich sind, involviert. Daher ist die Regulation von Proteinen, die mit dem Kalzium-Haushalt der Zelle in Verbindung stehen, vermutlich ein Indiz für die Stressreaktion auf die Behandlung mit Cisplatin. Neben dem ER greifen auch die Mitochondrien über die Kalzium-Homöostase in die Apoptose ein, indem sie Kalziumionen speichern und auch wieder abgeben können. Kalziumionen übernehmen in den Mitochondrien im Normalfall die Regulation der mitochondrialen

Dehydrogenase-Aktivität und haben damit Einfluss auf die ATP-Produktion. Eine massive Kalzium-Akkumulation in den Mitochondrien, ausgelöst durch zellulären Stress, resultiert in der Induktion der Apoptose (Camello-Almaraz et al. 2006). Eine übermäßige Interaktion von Ca^{2+} mit Cyclophilin D resultiert in der Öffnung eines Transmembrankanals, der von der inneren Membran (IMM) bis zur äußeren Membran des Mitochondriums (OMM) reicht. Dies hat ein Anschwellen der Matrix und letztendlich das Zerreißen der äußeren Membran und eine Freisetzung von Cytochrom C zur Folge. Cytochrom C initiiert den intrinsischen Apoptoseweg über die Bindung an Apaf-1 („apoptotic protease activating factor-1“) und die Bildung von Apoptosomenkomplexen, die wiederum für die Aktivierung von Caspasen verantwortlich sind (Jeong et al. 2008). Die im Folgenden beschriebenen Proteine sind alle primär im ER lokalisiert.

Calmodulin Calmodulin ist ein Protein, das viele Kinasen und Phosphataseenzyme (u.a. die MAPK-Proteine) reguliert, die mit der Modulation von Signalwegen, wie die Apoptose oder das Überleben der Zelle, insbesondere auch nach der Behandlung mit Cisplatin, in Verbindung stehen (Singh et al. 1999).

Calumenin Dieses Protein ist wie auch die anderen an der Kalzium-Homöostase beteiligten Proteine im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, die genaue Funktion ist aber bislang noch unbekannt. Es wurde allerdings in einer früheren Arbeit basierend auf der Proteomanalyse von Cisplatin-sensitiven und -resistenten Plattenepithelkarzinom-Zelllinien ebenfalls als differentiell reguliert beschrieben (Castagna et al. 2004).

Calreticulin Die bekannteste Funktion von Calreticulin ist die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration, sowie die hohe Bindungsaffinität für Kalzium. Ein Bindungspartner von Calreticulin ist GRP78. Eine hohe Expression von GRP78 in malignen Gliomen wurde mit einer höheren Proliferationsrate und mit aggressiveren Tumoren in Verbindung gebracht (Pyrko et al. 2007). Beide Proteine wurden im Vergleich zu den EC-Zelllinien in der Seminomzelllinie TCam-2 stärker exprimiert.

Reticulocalbin Reticulocalbin agiert unter anderem als Chaperon im ER, konnte aber auch mit der Chemosensitivität in H69-Zellen, einer Lungentumorzelllinie, in Verbindung gebracht werden. Dabei konnte durch die Transfektion mit Reticulocalbin

bei den Cisplatin-resistenten Zellen eine vorübergehende Sensitivität gegenüber Cisplatin gemessen werden (Hirano et al. 2005). Unsere Untersuchungen zeigten hingegen bei der Seminomzelllinie TCam-2, die ein hohes Resistenzniveau gegenüber Cisplatin aufweist, eine höhere Expression von Reticulocalbin als bei den Cisplatin-sensitiven EC-Zelllinien.

Caldesmon Caldesmon ist ein Actin-, Calmodulin- und Tropomyosin-bindendes Protein und kann als Substrat für das ERK1/2-Protein, welches Caldesmon phosphoryliert, agieren. Diese Phosphorylierung ermöglicht u.a. eine stärkere Interaktion zwischen Actin und Myosin (Lee et al. 1999).

Endoplasmin & Proteindisulfidisomerase Die Proteine Endoplasmin (GRP94) und Proteindisulfidisomerase binden beide Kalzium, wobei die extreme Bindungskapazität von Endoplasmin im Millimolar-Bereich liegt. Zudem wird das Protein auch zu den Hitzeschockproteinen gezählt und ist auch unter dem Namen *heat shock protein GP96* bekannt (Koch et al. 1986).

4.5 „Small molecule inhibitors“: Sunitinib und Tamsirolimus

Die Entwicklung einer gezielt ansetzenden Therapie („targeted therapy“), die verschiedene zelluläre Signalwege blockiert, sollte idealerweise individuelle Resistenzmechanismen umgehen bzw. ausschalten, um in der Zukunft mehr Patienten heilen zu können. Der Bedarf an neuen therapeutischen Optionen, insbesondere bei Patienten mit chemoresistenten Keimzelltumoren, hat uns dazu veranlasst, vorklinische Untersuchungen zu der Wirkung von neuen Substanzen in Keimzelltumoren durchzuführen und deren Wirkung an den Cisplatin-resistenten Zelllinien auszutesten. Da Keimzelltumoren zu den Tumorentitäten mit der höchsten Expression von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehören, sind sie geeignete Kandidaten, um *in vitro* Effekte von gezielten Ansätzen der Inhibition von solchen Kinasen zu untersuchen. Zur Bestimmung der Wirksamkeit der Substanzen Sunitinib und Tamsirolimus auf die Cisplatin-sensitiven und -resistenten Keimzelltumorzelllinien wurden die IC₅₀-Werte für die einzelnen Zelllinien mit Hilfe der Zellzählung und des MTT-Assays ermittelt. Beide Substanzen wiesen demnach keine Kreuzresistenz mit Cisplatin auf und könnten damit potentielle Kandidaten einer Therapie im Fall einer Chemotherapieresistenz gegenüber Cisplatin darstellen. Die Zellzyklusanalysen zeigten im Gegensatz zum G2/M-Arrest bei Cisplatin keinen eindeutigen Effekt durch die Behandlung mit Sunitinib oder Tamsirolimus, allerdings spiegelt dies nur den

Zellzyklusstatus an einem Zeitpunkt nach 48h wider. Daher können Effekte zu einem früheren Zeitpunkt auf den Zellzyklus nicht ausgeschlossen werden. Die Einteilung der Proteine auf biologische Funktionsgruppen lassen im Fall von Sunitinib auf einen bisher unbekanntem Effekt der Substanz auf das Zytoskelett *in vitro* schließen. Zudem könnte Ebp1 ein potentiell Ziel zur Wirkverstärkung von Sunitinib sein, was weiter untersucht werden sollte.

Die Proteomanalysen nach der Behandlung mit den „neuen“ Substanzen zeigten, dass diese ein von Cisplatin unterschiedliches Proteinmuster haben. Bislang bekannte Ziele konnten mit der 2D-Methode nicht identifiziert werden, dafür wurden mögliche neue Proteinkandidaten gefunden. Die Reaktion der Zellen zeigte z.B. nach der Behandlung mit Temsirolimus eine relativ homogene Verteilung der Proteine auf die biologischen Funktionsgruppen. Interessanterweise wurden unter den differentiell regulierten Proteinen viele Hitzeschockproteine gefunden. Die Kombinationsbehandlungen von Sunitinib/Cisplatin und Temsirolimus/Cisplatin zeigten teilweise eine Wirkverstärkung der Kombination im Vergleich zur Einzelsubstanz. Daher sollte die mittels einer Kombinationsbehandlung erzielbare Inhibition weiter untersucht werden, z.B. in Nacktmausmodellen mit Xenografts.

Kapitel 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Keimzelltumorzelllinien mittels globaler Proteomanalyse. Ein besonderes Augenmerk galt der Identifizierung neuer Tumormarkerproteine sowie der Charakterisierung von Faktoren, die an der Chemotherapieresistenz gegen Cisplatin beteiligt sind. Hierzu wurde ein Ansatz einer Proteomanalyse, bestehend aus der 2D-PAGE, der Massenspektrometrie und der ergänzenden Datenbankrecherche, gewählt. Die Ergebnisse zeigten in erster Linie, dass die Expression von Proteinen sehr zelllinienspezifisch und nicht zwingend in allen Zelllinien gleichermaßen reguliert ist. Es gelang die Identifikation einer Reihe von Proteinen, welche mit der Chemoresistenz in Verbindung gebracht werden könnten. So deutet z.B. die differentielle Regulation von Kalzium-bindenden Proteinen als auch von Hitzeschockproteinen in der Reaktion auf die Cisplatinbehandlung auf Mechanismen hin, die insbesondere bei Keimzelltumoren näher untersucht werden sollten, da sie möglicherweise Ansätze zur Wirkverstärkung bieten könnten. An die Screeninguntersuchungen mit Zelllinien sollten in weiteren Arbeiten Untersuchungen mit humanem Tumormaterial unter Zuhilfenahme weiterer Proteomanalysen anschließen. Diese Analysen könnten ergänzende Daten zu den *in vitro*-Untersuchungen, die in erster Linie auf der sekundären, erworbenen Cisplatinresistenz basieren, liefern. Zudem ist in humanem Tumormaterial mit Daten zu primärer Chemoresistenz zu rechnen. Somit könnten Faktoren, die aufgrund zellkulturspezifischer Effekte auftreten, wie wir sie z.B. im Falle der Expression von Galectin 1 vermuten, das in Zelllinien gefunden, in Tumorproben jedoch nicht nachweisbar war, ausgeschlossen werden. Als Fazit lässt sich zusammenfassen, dass unsere Untersuchungen an Zelllinien als initiales Screening eine ganze Reihe von Faktoren identifizieren konnten, deren Expression beim Einsatz unterschiedlicher Substanzen und Zytostatika reguliert wurde. Diesem Screening sollten nun funktionelle Untersuchungen an Zelllinien, sowie weiterführende Untersuchungen an humanem Tumormaterial folgen. Die Methode der Proteomanalyse ist somit ein geeignetes Mittel, um die Regulation von Proteinen unter definierten unterschiedlichen Bedingungen untersuchen und analysieren zu können.

Die Untersuchungen zu neuen Therapieansätzen mit Sunitinib und Temsirolimus, die in der Zelle völlig andere Targets haben als Cisplatin, zeigten vielversprechende Effekte ohne Kreuzresistenz zwischen den Substanzen. Zudem konnten mögliche neue Therapiemöglichkeiten für Cisplatin-resistente Keimzelltumoren, sowohl alleine,

als auch in der Kombination mit Cisplatin, aufgezeigt werden. Nicht zuletzt gelang zudem die Identifikation möglicher Ansatzpunkte für eine Wirkverstärkung aufgrund des Nachweises von unter Behandlung differentiell regulierter Proteine (z.B. Ebp1 unter Behandlung mit Sunitinib).

Wie auch schon von früheren Arbeiten und Untersuchungen gezeigt bzw. postuliert wurde, zeigten auch die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Chemoresistenz auf Cisplatin in Keimzelltumoren nicht auf wenige bestimmte und klar definierte Prozesse beschränkt ist, sondern ein multifaktorielles Ereignis darstellt.

Literaturverzeichnis

- Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R.D., Boland, C.R., Koi, M., Fishel, R., et al. 1996. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* **56**: 3087-3090.
- Alazard, R.J., and Germanier, M. 1982. Post replication repair in an excision defective strain of *Escherichia coli* following treatment with cis dichlorodiammineplatinum(II). *Biochem Biophys Res Commun* **104**: 693-700.
- Alvaro, D. 2009. Serum and bile biomarkers for cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* **25**: 279-284.
- Andrews, P.W. 1982. Human embryonal carcinoma cells in culture do not synthesize fibronectin until they differentiate. *Int J Cancer* **30**: 567-571.
- Andrews, P.W. 1984. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol* **103**: 285-293.
- Berggren, M., Gallegos, A., Gasdaska, J.R., Gasdaska, P.Y., Warneke, J., and Powis, G. 1996. Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res* **16**: 3459-3466.
- Besmer, P., Manova, K., Duttlinger, R., Huang, E.J., Packer, A., Gyssler, C., and Bachvarova, R.F. 1993. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl*: 125-137.
- Blume-Jensen, P., Jiang, G., Hyman, R., Lee, K.F., O'Gorman, S., and Hunter, T. 2000. Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat Genet* **24**: 157-162.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., and Wijnholds, J. 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**: 1295-1302.
- Boylan, J.F., and Gudas, L.J. 1992. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* **267**: 21486-21491.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Buchner, J. 1999. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* **24**: 136-141.
- Burger, H., Nooter, K., Boersma, A.W., Kortland, C.J., and Stoter, G. 1997. Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer* **73**: 592-599.
- Burger, H., Nooter, K., Boersma, A.W., van Wingerden, K.E., Looijenga, L.H., Jochemsen, A.G., and Stoter, G. 1999. Distinct p53-independent apoptotic cell death signalling pathways in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer* **81**: 620-628.
- Camello-Almaraz, C., Gomez-Pinilla, P.J., Pozo, M.J., and Camello, P.J. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**: C1082-1088.
- Castagna, A., Antonioli, P., Astner, H., Hamdan, M., Righetti, S.C., Perego, P., Zunino, F., and Righetti, P.G. 2004. A proteomic approach to cisplatin resistance in the cervix squamous cell carcinoma cell line A431. *Proteomics* **4**: 3246-3267.

- Chaganti, R.S., and Houldsworth, J. 2000. Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res* **60**: 1475-1482.
- Chaganti, R.S., Rodriguez, E., and Mathew, S. 1994. Origin of adult male mediastinal germ-cell tumours. *Lancet* **343**: 1130-1132.
- Chaney, S.G., Campbell, S.L., Bassett, E., and Wu, Y. 2005. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol* **53**: 3-11.
- Chaney, S.G., Campbell, S.L., Temple, B., Bassett, E., Wu, Y., and Faldu, M. 2004. Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function. *J Inorg Biochem* **98**: 1551-1559.
- Chow, L.Q., and Eckhardt, S.G. 2007. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* **25**: 884-896.
- Chresta, C.M., Masters, J.R., and Hickman, J.A. 1996. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. *Cancer Res* **56**: 1834-1841.
- Chuthapisith, S., Layfield, R., Kerr, I.D., Hughes, C., and Eremin, O. 2007. Proteomic profiling of MCF-7 breast cancer cells with chemoresistance to different types of anti-cancer drugs. *Int J Oncol* **30**: 1545-1551.
- Cicchillitti, L., Di Michele, M., Urbani, A., Ferlini, C., Donat, M.B., Scambia, G., and Rotilio, D. 2009. Comparative proteomic analysis of paclitaxel sensitive A2780 epithelial ovarian cancer cell line and its resistant counterpart A2780TC1 by 2D-DIGE: the role of ERp57. *J Proteome Res* **8**: 1902-1912.
- Ciocca, D.R., Fuqua, S.A., Lock-Lim, S., Toft, D.O., Welch, W.J., and McGuire, W.L. 1992. Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* **52**: 3648-3654.
- Cohen, S.L., and Chait, B.T. 1996. Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins. *Anal Chem* **68**: 31-37.
- Creagh, E.M., Sheehan, D., and Cotter, T.G. 2000. Heat shock proteins--modulators of apoptosis in tumour cells. *Leukemia* **14**: 1161-1173.
- de Jong, J., Stoop, H., Dohle, G.R., Bangma, C.H., Kliffen, M., van Esser, J.W., van den Bent, M., Kros, J.M., Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H. 2005. Diagnostic value of OCT3/4 for pre-invasive and invasive testicular germ cell tumours. *J Pathol* **206**: 242-249.
- de Jong, J., Stoop, H., Gillis, A.J., Hersmus, R., van Gurp, R.J., van de Geijn, G.J., van Drunen, E., Beverloo, H.B., Schneider, D.T., Sherlock, J.K., et al. 2008. Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. *Genes Chromosomes Cancer* **47**: 185-196.
- de Laat, W.L., Jaspers, N.G., and Hoeijmakers, J.H. 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **13**: 768-785.
- DeBoer, C., Meulman, P.A., Wnuk, R.J., and Peterson, D.H. 1970. Geldanamycin, a new antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* **23**: 442-447.
- Demydenko, D., and Berest, I. 2009. Expression of galectin-1 in malignant tumors. *Exp Oncol* **31**: 74-79.
- Dijt, F.J., Fichtinger-Schepman, A.M., Berends, F., and Reedijk, J. 1988. Formation and repair of cisplatin-induced adducts to DNA in cultured normal and repair-deficient human fibroblasts. *Cancer Res* **48**: 6058-6062.
- Douros, J., and Suffness, M. 1981. New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat Rev* **8**: 63-87.
- Druker, B.J., Sawyers, C.L., Kantarjian, H., Resta, D.J., Reese, S.F., Ford, J.M., Capdeville, R., and Talpaz, M. 2001. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute

- lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* **344**: 1038-1042.
- Duale, N., Lindeman, B., Komada, M., Olsen, A.K., Andreassen, A., Soderlund, E.J., and Brunborg, G. 2007. Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles. *Mol Cancer* **6**: 53.
- Eastman, A. 1983. Characterization of the adducts produced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II). *Biochemistry* **22**: 3927-3933.
- Eastman, A. 1986. Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. *Biochemistry* **25**: 3912-3915.
- Eastman, A. 1990. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* **2**: 275-280.
- Ebbing, J., Christoph, F., Kempkensteffen, C., Weikert, S., Schostak, M., Hinz, S., Lein, M., Miller, K., and Schrader, M. 2008. [Testicular cancer - explanatory models for high cisplatin chemosensitivity and new therapeutic options]. *Aktuelle Urol* **39**: 429-435.
- Ecke, T.H. 2008. Focus on urinary bladder cancer markers: a review. *Minerva Urol Nefrol* **60**: 237-246.
- Elpek, G.O., Karaveli, S., Simsek, T., Keles, N., and Aksoy, N.H. 2003. Expression of heat-shock proteins hsp27, hsp70 and hsp90 in malignant epithelial tumour of the ovaries. *APMIS* **111**: 523-530.
- Eymann, C., Dreisbach, A., Albrecht, D., Bernhardt, J., Becher, D., Gentner, S., Tamle, T., Buttner, K., Buurman, G., Scharf, C., et al. 2004. A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells. *Proteomics* **4**: 2849-2876.
- Feldman, D.R., Turkula, S., Ginsberg, M.S., Ishill, N., Patil, S., Carousso, M., Bosl, G.J., and Motzer, R.J. 2009. Phase II trial of sunitinib in patients with relapsed or refractory germ cell tumors. *Invest New Drugs*.
- Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R.D., and Howell, S.B. 1996. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* **56**: 4881-4886.
- Fiorella, P.D., and Napoli, J.L. 1994. Microsomal retinoic acid metabolism. Effects of cellular retinoic acid-binding protein (type I) and C18-hydroxylation as an initial step. *J Biol Chem* **269**: 10538-10544.
- Fisher, M.P., and Dingman, C.W. 1971. Role of molecular conformation in determining the electrophoretic properties of polynucleotides in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry* **10**: 1895-1899.
- Gashaw, I., Dushaj, O., Behr, R., Biermann, K., Brehm, R., Rubben, H., Grobholz, R., Schmid, K.W., Bergmann, M., and Winterhager, E. 2007. Novel germ cell markers characterize testicular seminoma and fetal testis. *Mol Hum Reprod* **13**: 721-727.
- Glaesener, S., Honecker, F., Veltman, I.M., Gillis, A.J., Rohlfing, T., Streichert, T., Otto, B., Brummendorf, T.H., Looijenga, L.H., Bokemeyer, C., et al. 2008. Comparative proteome, transcriptome, and genome analysis of a gonadal and an extragonadal germ cell tumor cell line. *J Proteome Res* **7**: 3890-3899.
- Grogan, T.M., Fenoglio-Prieser, C., Zeheb, R., Bellamy, W., Frutiger, Y., Vela, E., Stemmerman, G., Macdonald, J., Richter, L., Gallegos, A., et al. 2000. Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. *Hum Pathol* **31**: 475-481.

- Gundy, S., Babosa, M., Baki, M., and Bodrogi, I. 2004. Increased predisposition to cancer in brothers and offspring of testicular tumor patients. *Pathol Oncol Res* **10**: 197-203.
- Han, K.K., and Martinage, A. 1992. Post-translational chemical modification(s) of proteins. *Int J Biochem* **24**: 19-28.
- Hay, N., and Sonenberg, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* **18**: 1926-1945.
- Heimdal, K., Lothe, R.A., Lystad, S., Holm, R., Fossa, S.D., and Borresen, A.L. 1993. No germline TP53 mutations detected in familial and bilateral testicular cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **6**: 92-97.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.
- Hirano, T., Kato, H., Maeda, M., Gong, Y., Shou, Y., Nakamura, M., Maeda, J., Yashima, K., Kato, Y., Akimoto, S., et al. 2005. Identification of postoperative adjuvant chemotherapy responders in non-small cell lung cancer by novel biomarker. *Int J Cancer* **117**: 460-468.
- Hittmair, A., Rogatsch, H., Hobisch, A., Mikuz, G., and Feichtinger, H. 1996. CD30 expression in seminoma. *Hum Pathol* **27**: 1166-1171.
- Honecker, F., Oosterhuis, J.W., Mayer, F., Hartmann, J.T., Bokemeyer, C., and Looijenga, L.H. 2004a. New insights into the pathology and molecular biology of human germ cell tumors. *World J Urol* **22**: 15-24.
- Honecker, F., Stoop, H., de Krijger, R.R., Chris Lau, Y.F., Bokemeyer, C., and Looijenga, L.H. 2004b. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol* **203**: 849-857.
- Honecker, F., Wermann, H., Mayer, F., Gillis, A.J., Stoop, H., van Gorp, R.J., Oechsle, K., Steyerberg, E., Hartmann, J.T., Dinjens, W.N., et al. 2009. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol* **27**: 2129-2136.
- Hong, Y., and Stambrook, P.J. 2004. Restoration of an absent G1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14443-14448.
- Horwich, A., Shipley, J., and Huddart, R. 2006. Testicular germ-cell cancer. *Lancet* **367**: 754-765.
- Hudes, G.R. 2009. Targeting mTOR in renal cell carcinoma. *Cancer* **115**: 2313-2320.
- Hwang, T.S., Han, H.S., Choi, H.K., Lee, Y.J., Kim, Y.J., Han, M.Y., and Park, Y.M. 2003. Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* **18**: 690-700.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D.J., and Herskowitz, I. 2002. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14298-14302.
- Izquierdo, M.A., Van der Valk, P., Van Ark-Otte, J., Rubio, G., Germa-Lluch, J.R., Ueda, R., Scheper, R.J., Takahashi, T., and Giaccone, G. 1995. Differential expression of the c-kit proto-oncogene in germ cell tumours. *J Pathol* **177**: 253-258.
- Jeong, S.Y., and Seol, D.W. 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* **41**: 11-22.
- Jolly, C., and Morimoto, R.I. 2000. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* **92**: 1564-1572.
- Jones, R.H., and Vasey, P.A. 2003. Part II: testicular cancer--management of advanced disease. *Lancet Oncol* **4**: 738-747.

- Jorgensen, N., Rajpert-De Meyts, E., Graem, N., Muller, J., Giwercman, A., and Skakkebaek, N.E. 1995. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest* **72**: 223-231.
- Kartalou, M., and Essigmann, J.M. 2001. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* **478**: 23-43.
- Kelland, L. 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **7**: 573-584.
- Kerley-Hamilton, J.S., Pike, A.M., Li, N., DiRenzo, J., and Spinella, M.J. 2005. A p53-dominant transcriptional response to cisplatin in testicular germ cell tumor-derived human embryonal carcinoma. *Oncogene* **24**: 6090-6100.
- Kim, H.J., Chae, H.Z., Kim, Y.J., Kim, Y.H., Hwangs, T.S., Park, E.M., and Park, Y.M. 2003. Preferential elevation of Prx I and Trx expression in lung cancer cells following hypoxia and in human lung cancer tissues. *Cell Biol Toxicol* **19**: 285-298.
- Koberle, B., Grimaldi, K.A., Sunter, A., Hartley, J.A., Kelland, L.R., and Masters, J.R. 1997. DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer* **70**: 551-555.
- Koch, G., Smith, M., Macer, D., Webster, P., and Mortara, R. 1986. Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasmin. *J Cell Sci* **86**: 217-232.
- Koch, S., Mayer, F., Honecker, F., Schittenhelm, M., and Bokemeyer, C. 2003. Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro. *Br J Cancer* **89**: 2133-2139.
- Korkola, J.E., Houldsworth, J., Feldman, D.R., Olshen, A.B., Qin, L.X., Patil, S., Reuter, V.E., Bosl, G.J., and Chaganti, R.S. 2009. Identification and validation of a gene expression signature that predicts outcome in adult men with germ cell tumors. *J Clin Oncol* **27**: 5240-5247.
- Kregel, K.C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* **92**: 2177-2186.
- Laemmli, U.K., Beguin, F., and Gujer-Kellenberger, G. 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* **47**: 69-85.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
- Le Moguen, K., Lincet, H., Deslandes, E., Hubert-Roux, M., Lange, C., Poulain, L., Gauduchon, P., and Baudin, B. 2006. Comparative proteomic analysis of cisplatin sensitive IGROV1 ovarian carcinoma cell line and its resistant counterpart IGROV1-R10. *Proteomics* **6**: 5183-5192.
- Lee, B.S., Gluck, S.L., and Holliday, L.S. 1999. Interaction between vacuolar H(+)-ATPase and microfilaments during osteoclast activation. *J Biol Chem* **274**: 29164-29171.
- Looijenga, L.H., Stoop, H., de Leeuw, H.P., de Gouveia Brazao, C.A., Gillis, A.J., van Roozendaal, K.E., van Zoelen, E.J., Weber, R.F., Wolffenbuttel, K.P., van Dekken, H., et al. 2003a. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* **63**: 2244-2250.
- Looijenga, L.H., Zafarana, G., Grygalewicz, B., Summersgill, B., Debiec-Rychter, M., Veltman, J., Schoenmakers, E.F., Rodriguez, S., Jafer, O., Clark, J., et al.

- 2003b. Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *APMIS* **111**: 161-171; discussion 172-163.
- Masters, J.R., and Koberle, B. 2003. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* **3**: 517-525.
- Masters, J.R., Thomas, R., Hall, A.G., Hogarth, L., Matheson, E.C., Cattan, A.R., and Lohrer, H. 1996. Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. *Eur J Cancer* **32A**: 1248-1253.
- Matthaei, K.I., Andrews, P.W., and Bronson, D.L. 1983. Retinoic acid fails to induce differentiation in human teratocarcinoma cell lines that express high levels of a cellular receptor protein. *Exp Cell Res* **143**: 471-474.
- Mayer, C., Popanda, O., Zelezny, O., von Brevern, M.C., Bach, A., Bartsch, H., and Schmezer, P. 2002. DNA repair capacity after gamma-irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes. *DNA Repair (Amst)* **1**: 237-250.
- Mayer, F., Honecker, F., Looijenga, L.H., and Bokemeyer, C. 2003a. Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors. *Ann Oncol* **14**: 825-832.
- Mayer, F., Stoop, H., Scheffer, G.L., Scheper, R., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H., and Bokemeyer, C. 2003b. Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors. *Clin Cancer Res* **9**: 767-773.
- McKenney, J.K., Heerema-McKenney, A., and Rouse, R.V. 2007. Extragonadal germ cell tumors: a review with emphasis on pathologic features, clinical prognostic variables, and differential diagnostic considerations. *Adv Anat Pathol* **14**: 69-92.
- McNeil, A.K., Rescher, U., Gerke, V., and McNeil, P.L. 2006. Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *J Biol Chem* **281**: 35202-35207.
- Mello, J.A., Lippard, S.J., and Essigmann, J.M. 1995. DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum(II) and its trans isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo. *Biochemistry* **34**: 14783-14791.
- Mendel, D.B., Laird, A.D., Xin, X., Louie, S.G., Christensen, J.G., Li, G., Schreck, R.E., Abrams, T.J., Ngai, T.J., Lee, L.B., et al. 2003. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* **9**: 327-337.
- Mohsin, S.K., Weiss, H.L., Gutierrez, M.C., Chamness, G.C., Schiff, R., Digiovanna, M.P., Wang, C.X., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K., Allred, D.C., et al. 2005. Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol* **23**: 2460-2468.
- Mueller, S., Schittenhelm, M., Honecker, F., Malenke, E., Lauber, K., Wesselborg, S., Hartmann, J.T., Bokemeyer, C., and Mayer, F. 2006. Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro. *Int J Oncol* **29**: 471-479.
- Mueller, T., Voigt, W., Simon, H., Fruehauf, A., Bulankin, A., Grothey, A., and Schmoll, H.J. 2003. Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. *Cancer Res* **63**: 513-521.
- Nabholtz, J.M., and Slamon, D. 2001. New adjuvant strategies for breast cancer: meeting the challenge of integrating chemotherapy and trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* **28**: 1-12.
- O'Connor, A.E., and De Kretser, D.M. 2004. Inhibins in normal male physiology. *Semin Reprod Med* **22**: 177-185.

- Olie, R.A., Boersma, A.W., Dekker, M.C., Nooter, K., Looijenga, L.H., and Oosterhuis, J.W. 1996. Apoptosis of human seminoma cells upon disruption of their microenvironment. *Br J Cancer* **73**: 1031-1036.
- Ong, D.E. 1994. Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr Rev* **52**: S24-31.
- Oosterhuis, J.W., Andrews, P.W., Knowles, B.B., and Damjanov, I. 1984. Effects of cis-platinum on embryonal carcinoma cell lines in vitro. *Int J Cancer* **34**: 133-139.
- Oosterhuis, J.W., Kersemaekers, A.M., Jacobsen, G.K., Timmer, A., Steyerberg, E.W., Molier, M., Van Weeren, P.C., Stoop, H., and Looijenga, L.H. 2003. Morphology of testicular parenchyma adjacent to germ cell tumours. An interim report. *APMIS* **111**: 32-40; discussion 41-32.
- Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H. 2005. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* **5**: 210-222.
- Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H., Geurts van Kessel, A., and de Jong, B. 1993. A cytogenetic classification of germ cell tumors, and its biological relevance. *Eur Urol* **23 Suppl 2**: 6-8.
- Pallesen, G., and Hamilton-Dutoit, S.J. 1988. Ki-1 (CD30) antigen is regularly expressed by tumor cells of embryonal carcinoma. *Am J Pathol* **133**: 446-450.
- Parris, C.N., Arlett, C.F., Lehmann, A.R., Green, M.H., and Masters, J.R. 1988. Differential sensitivities to gamma radiation of human bladder and testicular tumour cell lines. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **53**: 599-608.
- Pascoe, J.M., and Roberts, J.J. 1974. Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds. *Biochem Pharmacol* **23**: 1359-1365.
- Pastan, I.I., and Kreitman, R.J. 1998. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **31**: 53-88.
- Pearl, L.H., and Prodromou, C. 2000. Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 46-51.
- Peng, H.Q., Hogg, D., Malkin, D., Bailey, D., Gallie, B.L., Bulbul, M., Jewett, M., Buchanan, J., and Goss, P.E. 1993. Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* **53**: 3574-3578.
- Pinto, A.L., and Lippard, S.J. 1985. Sequence-dependent termination of in vitro DNA synthesis by cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II). *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4616-4619.
- Porter, A.G., and Janicke, R.U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**: 99-104.
- Pyrko, P., Schonthal, A.H., Hofman, F.M., Chen, T.C., and Lee, A.S. 2007. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res* **67**: 9809-9816.
- Rajpert-De Meyts, E. 2006. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update* **12**: 303-323.
- Rajpert-De Meyts, E., and Skakkebaek, N.E. 1994. Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int J Androl* **17**: 85-92.
- Rao, P.H., Houldsworth, J., Palanisamy, N., Murty, V.V., Reuter, V.E., Motzer, R.J., Bosl, G.J., and Chaganti, R.S. 1998. Chromosomal amplification is associated with cisplatin resistance of human male germ cell tumors. *Cancer Res* **58**: 4260-4263.

- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S.A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J.M., Garrido, C., et al. 2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* **3**: 839-843.
- Reed, E. 1998. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* **24**: 331-344.
- Reed, E., Ozols, R.F., Tarone, R., Yuspa, S.H., and Poirier, M.C. 1988. The measurement of cisplatin-DNA adduct levels in testicular cancer patients. *Carcinogenesis* **9**: 1909-1911.
- Riese, M.J., and Vaughn, D.J. 2009. Chemotherapy for patients with poor prognosis germ cell tumors. *World J Urol* **27**: 471-476.
- Ritossa, F. 1996. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* **1**: 97-98.
- Rodnina, M.V., Gromadski, K.B., Kothe, U., and Wieden, H.J. 2005. Recognition and selection of tRNA in translation. *FEBS Lett* **579**: 938-942.
- Rokutan, K., Hirakawa, T., Teshima, S., Nakano, Y., Miyoshi, M., Kawai, T., Konda, E., Morinaga, H., Nikawa, T., and Kishi, K. 1998. Implications of heat shock/stress proteins for medicine and disease. *J Med Invest* **44**: 137-147.
- Rosenberg, B. 1973. Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. *Naturwissenschaften* **60**: 399-406.
- Rupnarain, C., Dlamini, Z., Naicker, S., and Bhoola, K. 2004. Colon cancer: genomics and apoptotic events. *Biol Chem* **385**: 449-464.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., and Alnemri, E.S. 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* **2**: 476-483.
- Sark, M.W., Timmer-Bosscha, H., Meijer, C., Uges, D.R., Sluiter, W.J., Peters, W.H., Mulder, N.H., and de Vries, E.G. 1995. Cellular basis for differential sensitivity to cisplatin in human germ cell tumour and colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer* **71**: 684-690.
- Schenk, P.W., Stoop, H., Bokemeyer, C., Mayer, F., Stoter, G., Oosterhuis, J.W., Wiemer, E., Looijenga, L.H., and Nooter, K. 2004. Resistance to platinum-containing chemotherapy in testicular germ cell tumors is associated with downregulation of the protein kinase SRPK1. *Neoplasia* **6**: 297-301.
- Schmoll, H.J., Souchon, R., Krege, S., Albers, P., Beyer, J., Kollmannsberger, C., Fossa, S.D., Skakkebaek, N.E., de Wit, R., Fizazi, K., et al. 2004. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG). *Ann Oncol* **15**: 1377-1399.
- Schrader, M., Kempkensteffen, C., Christoph, F., Hinz, S., Weikert, S., Lein, M., Krause, H., Stephan, C., Jung, K., Hoepfner, M., et al. 2009. Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in drug resistance and current therapy options. *Oncology* **76**: 77-84.
- Schweyer, S., Soruri, A., Meschter, O., Heintze, A., Zschunke, F., Miosge, N., Thelen, P., Schlott, T., Radzun, H.J., and Fayyazi, A. 2004. Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. *Br J Cancer* **91**: 589-598.

- Seaver, L.C., and Imlay, J.A. 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 7173-7181.
- Shalet, S.M. 2009. Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatr Blood Cancer* **53**: 285-288.
- Sherman-Baust, C.A., Weeraratna, A.T., Rangel, L.B., Pizer, E.S., Cho, K.R., Schwartz, D.R., Shock, T., and Morin, P.J. 2003. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* **3**: 377-386.
- Simoni, M., Weinbauer, G.F., Gromoll, J., and Nieschlag, E. 1999. Role of FSH in male gonadal function. *Ann Endocrinol (Paris)* **60**: 102-106.
- Singh, R.A., and Sodhi, A. 1999. Expression and activation of RAS and mitogen-activated protein kinases in macrophages treated in vitro with cisplatin: regulation by kinases, phosphatases and Ca²⁺/calmodulin. *Immunol Cell Biol* **77**: 356-363.
- Sinha, P., Kohl, S., Fischer, J., Hutter, G., Kern, M., Kottgen, E., Dietel, M., Lage, H., Schnolzer, M., and Schadendorf, D. 2000. Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **21**: 3048-3057.
- Sorenson, C.M., Barry, M.A., and Eastman, A. 1990. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst* **82**: 749-755.
- Sorenson, C.M., and Eastman, A. 1988a. Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* **48**: 6703-6707.
- Sorenson, C.M., and Eastman, A. 1988b. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* **48**: 4484-4488.
- Srivastava, P.K., Udono, H., Blachere, N.E., and Li, Z. 1994. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* **39**: 93-98.
- Summersgill, B., Osin, P., Lu, Y.J., Huddart, R., and Shipley, J. 2001. Chromosomal imbalances associated with carcinoma in situ and associated testicular germ cell tumours of adolescents and adults. *Br J Cancer* **85**: 213-220.
- Surani, M.A. 2001. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* **414**: 122-128.
- Tachikawa, T., Kumazawa, H., Hori, Y., Harada, N., Sai, S., Yamashita, T., Yodosawa, S., and Kawamoto, K. 1998. Intracellular calcium changes and chemosensitivities of human epidermoid carcinoma cell lines after exposure to cisplatin. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **107**: 611-618.
- Trimmer, E.E., Zamble, D.B., Lippard, S.J., and Essigmann, J.M. 1998. Human testis-determining factor SRY binds to the major DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. *Biochemistry* **37**: 352-362.
- Uchida, K., Tanaka, Y., Nishimura, T., Hashimoto, Y., Watanabe, T., and Harada, I. 1986. Effect of serum on inhibition of DNA synthesis in leukemia cells by cis- and trans-(Pt (NH₃)₂C₁(2)). *Biochem Biophys Res Commun* **138**: 631-637.
- Ummanni, R., Junker, H., Zimmermann, U., Venz, S., Teller, S., Giebel, J., Scharf, C., Woenckhaus, C., Dombrowski, F., and Walther, R. 2008. Prohibitin identified by proteomic analysis of prostate biopsies distinguishes hyperplasia and cancer. *Cancer Lett* **266**: 171-185.

- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351.
- Welsh, C., Day, R., McGurk, C., Masters, J.R., Wood, R.D., and Koberle, B. 2004. Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer* **110**: 352-361.
- Whitesell, L., Shifrin, S.D., Schwab, G., and Neckers, L.M. 1992. Benzoquinonoid ansamycins possess selective tumoricidal activity unrelated to src kinase inhibition. *Cancer Res* **52**: 1721-1728.
- Williams, S.D., Birch, R., Einhorn, L.H., Irwin, L., Greco, F.A., and Loehrer, P.J. 1987. Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N Engl J Med* **316**: 1435-1440.
- Willipinski-Stapelfeldt, B., Riethdorf, S., Assmann, V., Woelfle, U., Rau, T., Sauter, G., Heukeshoven, J., and Pantel, K. 2005. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **11**: 8006-8014.
- Wilson, C., Yang, J., Strefford, J.C., Summersgill, B., Young, B.D., Shipley, J., Oliver, T., and Lu, Y.J. 2005. Overexpression of genes on 16q associated with cisplatin resistance of testicular germ cell tumor cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* **43**: 211-216.
- Wu, Y., and Wu, P.Y. 2009. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev* **18**: 1127-1134.
- Wylie, C. 1999. Germ cells. *Cell* **96**: 165-174.
- Xin, H., Zhang, C., Herrmann, A., Du, Y., Figlin, R., and Yu, H. 2009. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* **69**: 2506-2513.
- Yang, F., Jove, V., Xin, H., Hedvat, M., Van Meter, T.E., and Yu, H. Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumor cells by inhibiting STAT3 and AKT signaling pathways. *Mol Cancer Res* **8**: 35-45.
- Zamble, D.B., Mikata, Y., Eng, C.H., Sandman, K.E., and Lippard, S.J. 2002. Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. *J Inorg Biochem* **91**: 451-462.
- Zylicz, M., King, F.W., and Wawrzynow, A. 2001. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J* **20**: 4634-4638.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in dem Labor für Experimentelle Onkologie unter der Leitung von Prof. Dr. Carsten Bokemeyer in der II. Medizinischen Klinik des Onkologischen Zentrums des Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dr. Friedemann Honecker für die Bereitstellung des interessanten Themas und die unermüdliche Unterstützung während der gesamten Arbeit, sowie für die vielen hilfsreichen Diskussionen und Korrekturen.

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden dankenswerterweise von der Werner-Otto-Stiftung und im Rahmen eines NWF-Projektes von dem Forschungsförderungsfonds Medizin gefördert.

Meinen Kolleginnen Tina Rohlfing, Beate Roth, Juliane Pohl, Katharina Hoch, Christina Mundt und Rosemarie Hanna, möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die erfrischenden Gespräche und viel Unterstützung danken. Ohne Euch hätte es nur halb so viel Spaß gemacht.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Balabanov für die tolle Zusammenarbeit, insbesondere aber bei Christine Barette und Dr. Arthur Gontarewicz für so manch amüsante Minute bedanken.

Bei Dr. Simone Venz möchte ich mich für die MALDI-TOF-Analysen und bei Christiane Horn für die Oberflächenmarkeranalysen bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter, deren bedingungsloser und uneingeschränkter Liebe und Unterstützung ich mir mein ganzes Leben lang sicher sein konnte. Ohne Dich wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Anhang

Zu 3.1.3.5 Vergleich der Seminomzelllinie TCam-2 mit den Embryonalkarzinom-Zelllinien NTERA-2, 2102EP und NCCIT

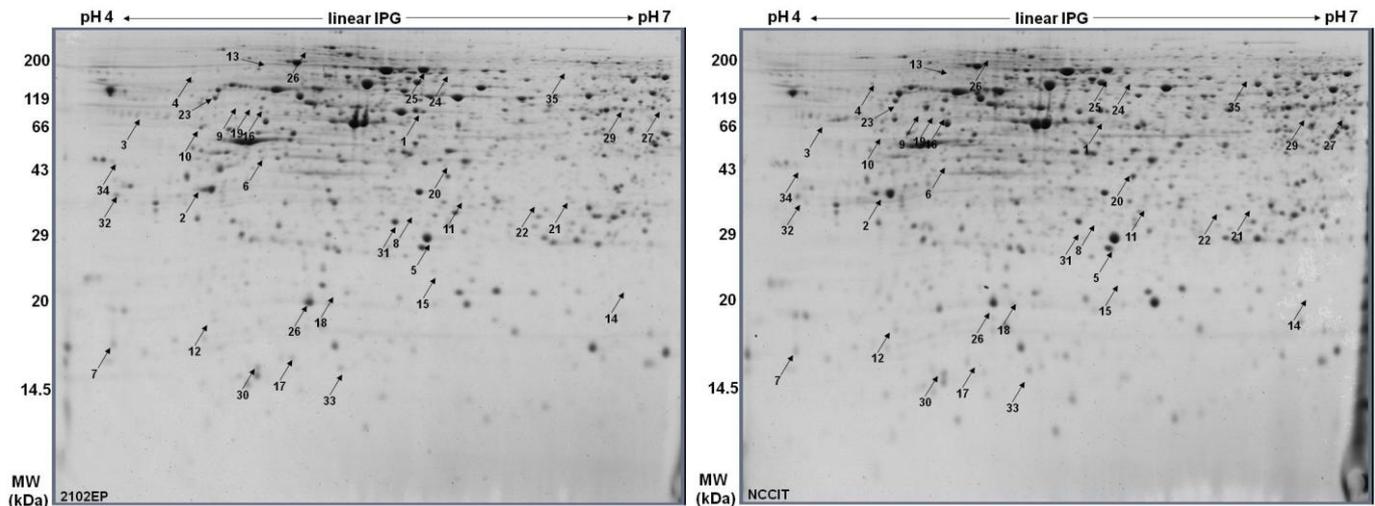


Abbildung 44: 2-D-PAGE-Gele von 2102EP und NCCIT aus dem Proteomvergleich TCam-2 und Embryonalkarzinom-Zelllinien.

Die im Vergleich zwischen beiden Zelllinien als differentiell exprimierte und mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten stehen in Tabelle 28.

Zu 3.2.3 Effekt einer Cisplatinbehandlung auf das Proteommuster von NTERA-2-, 2102EP-, NCCIT- und TCam-2-Zellen

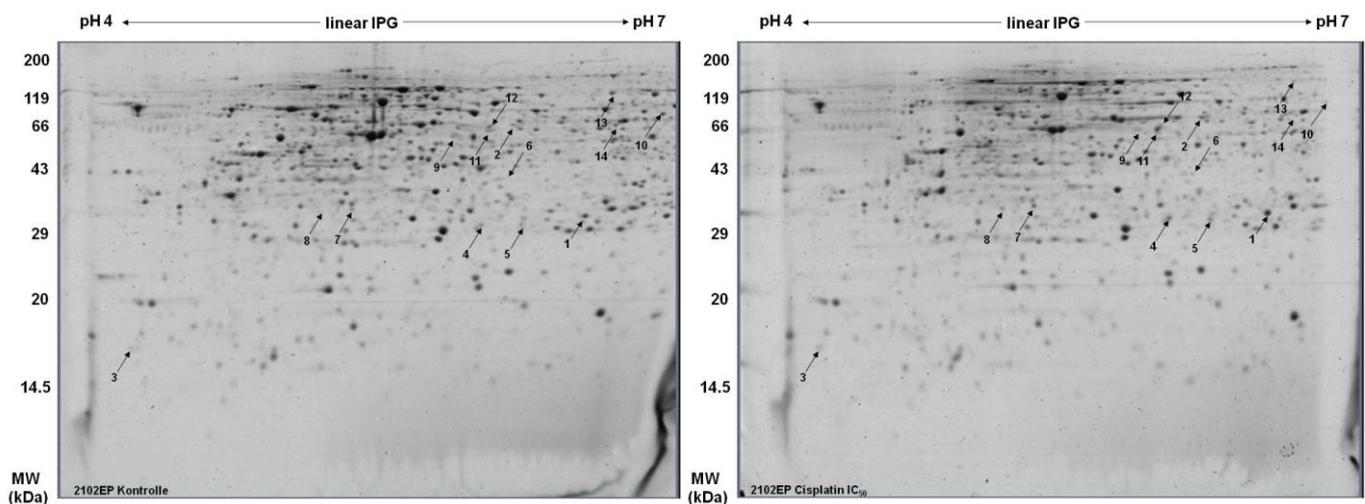


Abbildung 45: 2D-PAGE-Gele von unbehandelten und Cisplatin-behandelten 2102EP-Zellen

Die im Vergleich zwischen den Kontroll- und den mit der IC_{50} -Dosis von Cisplatin (48h) behandelten Zellen als differentiell exprimierte und mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten sind in Tabelle 31 zu sehen.

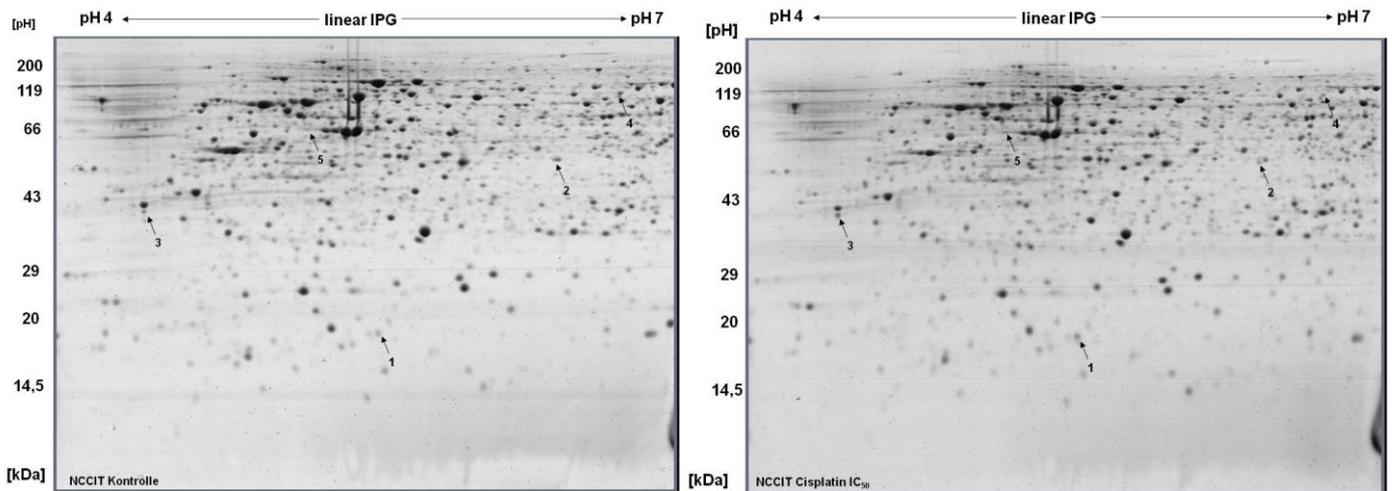


Abbildung 46: 2D-PAGE-Gele von unbehandelten und Cisplatin-behandelten NCCIT-Zellen. Die im Vergleich zwischen den Kontroll- und den mit der IC₅₀-Dosis von Cisplatin (48h) behandelten Zellen als differenziell exprimierten und mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten sind in Tabelle 32 zu sehen.

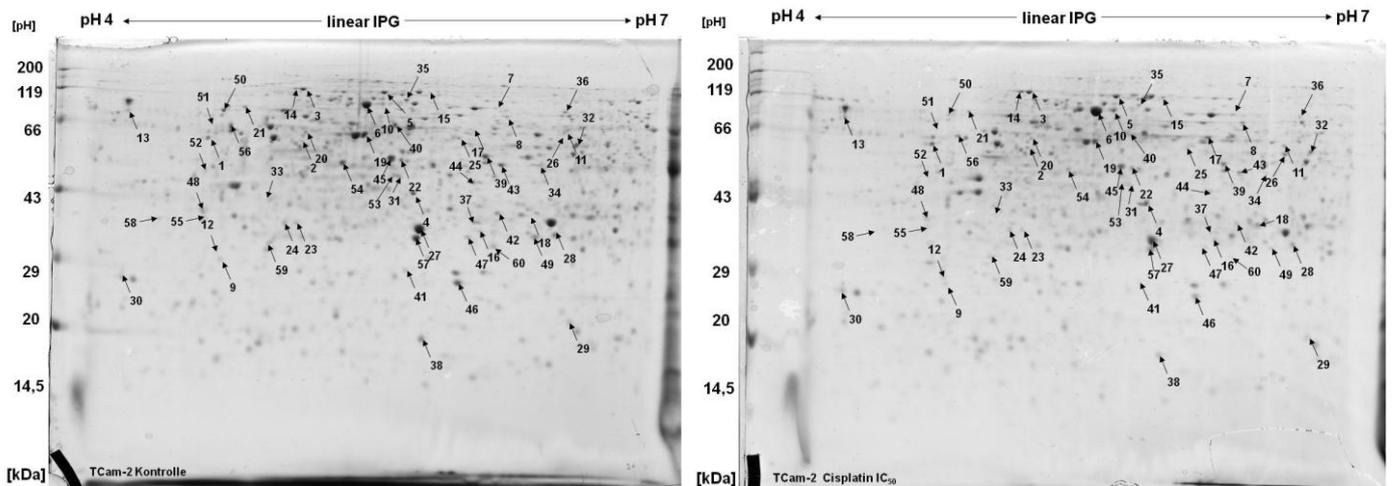


Abbildung 47: 2D-PAGE-Gele von unbehandelten und Cisplatin-behandelten TCam-2-Zellen. Die im Vergleich zwischen den Kontroll- und den mit der IC₅₀-Dosis von Cisplatin (48h) behandelten Zellen als differenziell exprimierten und mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten sind in Tabelle 33 zu sehen.

Zu 3.3 Proteomvergleich der sensitiven und der resistenten Keimzelltumorzelllinien unter der Behandlung mit Cisplatin

Zu 3.3.1 Cisplatin-sensitive Zellen (unbehandelt) und Cisplatin-resistente Zellen (unbehandelt): NTERA-2 und NTERA-2-R

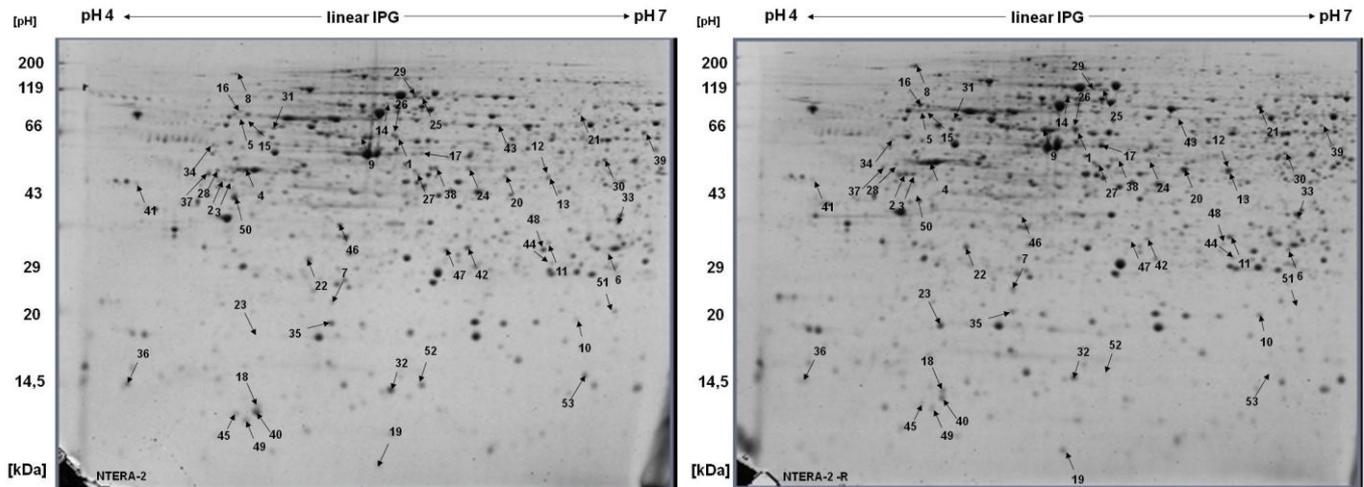


Abbildung 48: 2D-PAGE-Gele von unbehandelten NTERA-2- und unbehandelten NTERA-2-R-Zellen. Die im Vergleich als differentiell exprimierte und mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten sind in Tabelle 34 zu sehen.

Zu 3.3.1 Cisplatin-sensitive Zellen (unbehandelt) und Cisplatin-resistente Zellen (unbehandelt): 2102EP und 2102EP-R

Tabelle 43: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich 2102EP unbehandelt und 2102EP-R unbehandelt. Die * gekennzeichneten Proteine wurden mit einem signifikanten Proteinscore >65 (Mascot-Datenbankrecherche) identifiziert.

Spot auf Gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	peptide count
2102EP-R höher							
1	4.6	301	P09382	Galectin-1 - Homo sapiens (Human)	14.7	5.3	12
2102EP-R niedriger							
2	2.0	147	Q9UKY7	Protein CDV3 homolog - Homo sapiens (Human)	27.3	6.1	8
3	2.1	*	AAH01691.1	HCCS protein	31.0	6.3	*
4	2.1	194	Q9NWS0	PIH1 domain-containing protein 1 - Homo sapiens (Human)	32.3	5.1	11
5	2.1	364	O43765	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein A - Homo sapiens (Human)	34.0	4.8	17
6	2.2	*	AAA61282.1	Vimentin	35.1	4.7	*
7	2.3	*	CAA79613.1	Vimentin	53.7	5.1	*
8	2.4	140	P06733	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	16
9	2.4	413	P30626	Sorcin - Homo sapiens (Human)	21.7	5.3	12
10	2.4	389	Q16891	Mitochondrial inner membrane protein - Homo sapiens (Human)	83.6	6.1	28
11	2.5	97	P62826	GTP-binding nuclear protein Ran - Homo sapiens (Human)	24.4	7.0	6
12	2.8	*	P23434	PREDICTED: similar to Glycine cleavage system H protein, mitochondrial precursor isoform 1	18.8	4.6	*
13	3.0	*	AAA73055.1	Human pre-mRNA splicing factor SF2p32, complete sequence.]	31.3	4.7	*
14	3.1	*	AAD00643.1	erb3 binding protein EBP1	38.3	7.2	*
15	3.2	*	P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	14.2	10.3	*
16	4.0	223	O43617	Trafficking protein particle complex subunit 3 - Homo sapiens (Human)	20.3	4.9	8
17	4.2	122	P61956	Small ubiquitin-related modifier 2 precursor - Homo sapiens (Human)	10.9	5.3	5
18	4.2	242	Q15369	Transcription elongation factor B polypeptide 1 - Homo sapiens (Human)	12.5	4.7	8
19	5.2	171	Q13185	Chromobox protein homolog 3 - Homo sapiens (Human)	20.8	5.2	8
20	11.6	195	Q96K17	Transcription factor BTF3 homolog 4 - Homo sapiens (Human)	17.3	6.0	6

Zu 3.3.1 Cisplatin-sensitive Zellen (unbehandelt) und Cisplatin-resistente Zellen (unbehandelt): NCCIT und NCCIT-R

Tabelle 44: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich NCCIT unbehandelt und NCCIT-R unbehandelt. Die * gekennzeichneten Proteine wurden mit einem signifikanten Proteinscore >65 (Mascot-Datenbankrecherche) identifiziert.

Spot auf Gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	peptide count
NCCIT-R höher							
1	2.0	713	P23381	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic - Homo sapiens (Human)	53.1	5.8	28
2	2.0	497	P40227	T-complex protein 1 subunit zeta - Homo sapiens (Human)	58.0	6.2	28
3	2.0	325	O95630	STAM-binding protein - Homo sapiens (Human)	48.0	5.9	21
4	2.1	350	P15311	Ezrin - Homo sapiens (Human)	69.4	5.9	26
5	2.2	316	O76003	Glutaredoxin-3 - Homo sapiens (Human)	37.4	5.3	22
6	2.3	243	P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	48.5	6.6	14
7	2.4	123	P55735	Protein SEC13 homolog - Homo sapiens (Human)	35.5	5.2	9
8	2.4	318	P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 - Homo sapiens (Human)	37.4	5.6	9
9	2.5	415	P30520	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2 - Homo sapiens (Human)	50.1	6.1	23
10	2.5	317	P17987	T-complex protein 1 subunit alpha - Homo sapiens (Human)	60.3	5.8	27
11	2.6	552	P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit - Homo sapiens (Hum)	37.0	6.1	23
12	2.6	206	P42025	Beta-centractin - Homo sapiens (Human)	42.3	6.0	16
13	2.6	277	P07195	L-lactate dehydrogenase B chain - Homo sapiens (Human)	36.7	5.7	25
14	2.7	217	Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19 - Homo sapiens (Human)	55.1	6.1	10
15	2.7	168	P67936	Tropomyosin alpha-4 chain - Homo sapiens (Human)	28.5	4.7	14
16	3.1	250	P62136	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit - Homo sapiens (Human)	37.5	5.9	22
17	3.2	181	O00330	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial precursor - Homo sapiens (H	54.1	8.8	16
18	4.3	577	Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	80.1	8.3	38
19	5.1	321	Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB precursor - Homo sapiens (Human)	106.8	5.7	30
20	179.2	629	P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8 - Homo sapiens (Human)	53.7	5.5	36
NCCIT-R niedriger							
21	2.1	237	Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1 precursor - Homo sapiens (Human)	111.3	5.2	24
22	2.1	302	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6	13
23	2.2	332	P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F - Homo sapiens (Human)	45.6	5.4	21
24	2.3	266	P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F - Homo sapiens (Human)	45.6	5.4	9
25	2.5	270	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6	12
26	2.6	293	P35080	Profilin-2 - Homo sapiens (Human)	15.0	6.6	9
27	3.0	164	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6	6
28	3.1	495	P60174	Triosephosphate isomerase - Homo sapiens (Human)	26.7	6.5	22
29	3.2	117	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6	7
30	3.3	83	P43487	Ran-specific GTPase-activating protein - Homo sapiens (Human)	23.3	5.2	3
31	3.7	346	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	59.7	9.2	13
32	5.1	235	P15311	Ezrin - Homo sapiens (Human)	69.4	5.9	17
33	8.9	337	Q86SX6	Glutaredoxin-related protein 5 - Homo sapiens (Human)	16.6	6.3	9

Zu 3.3.2 Cisplatin-resistente Zellen (unbehandelt) und Cisplatin-resistente Zellen (IC₅₀-Dosis von Cisplatin): NTERA-2-R

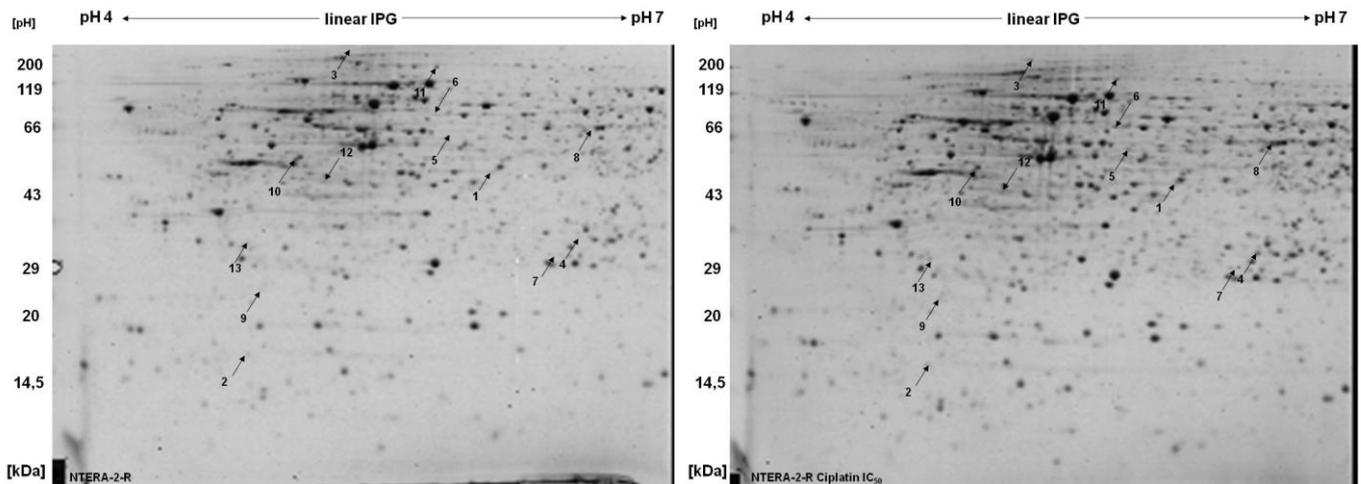


Abbildung 49: 2D-PAGE-Gele von unbehandelten NTERA-2-R und mit Cisplatin-behandelten NTERA-2-R-Zellen

Die im Vergleich als differentiell exprimierten und mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten sind in Tabelle 36 zu sehen.

Zu 3.3.2 Cisplatin-resistente Zellen (unbehandelt) und Cisplatin-resistente Zellen (IC₅₀-Dosis von Cisplatin): 2102EP-R

Tabelle 45: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich 2102EP-R unbehandelt und 2102EP-R Cisplatin IC₅₀. Die * gekennzeichneten Proteine wurden mit einem signifikanten Proteinscore >65 (Mascot-Datenbankrecherche) identifiziert.

Spot auf Gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	peptide count
2102EP-R IC₅₀ höher							
1	2.0	283	O00429	Dynamin-1-like protein - Homo sapiens (Human)	81.8	6.4	26
2	2.0	602	P06733	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	23
3	2.1	437	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6 precursor - Homo sapiens (Human)	48.1	5.0	17
4	2.1	*	CAG38553.1	IDH1	46.8	6.3	*
5	2.1	*	BAD96912.1	Enolase 1 variant	47.5	7.0	*
6	2.1	285	P19404	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial precursor - Ho	27.4	8.2	14
7	2.2	*	AAB00499.1	Elongation factor Tu	49.9	7.9	*
8	2.2	200	P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit - Homo sapiens (Human)	53.5	9.2	15
9	2.2	102	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6	6
10	2.3	*	AAH17917.1	Triosephosphat Isomerase 1	26.9	6.4	*
11	2.3	669	P11021	78 kDa glucose-regulated protein precursor - Homo sapiens (Human)	72.3	5.1	27
12	2.3	410	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	59.7	9.2	12
13	2.3	208	Q9BVG4	UPF0368 protein Cxorf26 - Homo sapiens (Human)	26.0	4.7	9
14	2.4	344	P20042	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 - Homo sapiens (Human)	38.4	5.6	17
15	2.4	*	AAH01348.1	HNRPH1 protein	49.5	5.9	*
16	2.5	442	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	56.5	5.3	17
17	2.6	233	P23528	Cofilin-1 - Homo sapiens (Human)	18.5	8.2	9
18	2.7	277	P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 - Homo sapiens (Human)	57.9	8.0	15
19	2.8	113	Q9NP73	UDP-N-acetylglucosamine transferase subunit ALG13 homolog - Homo sapiens	18.2	6.1	8
20	2.8	545	P31937	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor - Homo sapiens (35.3	8.4	17
21	2.8	*	P31947	14-3-3 protein sigma - Homo sapiens (Human)	27.8	4.7	*
22	2.8	*	P62826	GTP-binding nuclear protein Ran - Homo sapiens (Human)	24.4	7.0	*
23	2.9	381	P06733	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	25
24	2.9	485	P30101	Protein disulfide-isomerase A3 precursor - Homo sapiens (Human)	56.7	6.0	28
25	2.9	*	AAP35556.1	CathepsinD	45.1	6.1	*
26	3.6	207	P30101	Protein disulfide-isomerase A3 precursor - Homo sapiens (Human)	56.7	6.0	17
27	4.8	99	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6	7
28	5.8	277	Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3 - Homo sapiens (Human)	95.3	8.9	17
29	11.2	222	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	59.7	9.2	12
30	506.6	207	P06733	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	21
31	104.9	333	P20700	Lamin-B1 - Homo sapiens (Human)	66.4	5.1	23
2102EP-R IC₅₀ niedriger							
32	2.0	155	Q8WZA9	Immunity-related GTPase family Q protein - Homo sapiens (Human)	62.8	4.8	15
33	2.1	*	AAK32750.1	FK506 binding protein 4	52.1	5.3	*
34	2.1	*	CAI39673.1	Vinculin	117.3	5.8	*
35	2.2	*	AAH70263.1	Ribosomal protein SA	32.9	4.8	*
36	2.5	*	AAH 07562.2	VCP protein	71.6	4.9	*
37	2.6	123	P25788	Proteasome subunit alpha type-3 - Homo sapiens (Human)	28.4	5.2	10
38	2.7	478	P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isof	65.3	5.0	29
39	2.8	*	P61956	Sumo2 protein	9.1	5.2	*
40	2.9	197	P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 - Homo sapier	37.4	5.6	10
41	3.3	*	AAH03670.2	NPM1 protein	25.1	4.7	*
42	3.6	*	AAP35523.1	Enhancer of rudimentary homolog	12.4	5.6	*
43	4.7	160	Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta - Homo sapiens (Human)	88.5	5.5	14
44	4.9	*	AAH68458.1	Villin2	69.3	5.9	*

Zu 3.3.2 Cisplatin-resistente Zellen (unbehandelt) und Cisplatin-resistente Zellen (IC₅₀-Dosis von Cisplatin): NCCIT-R

Tabelle 46: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich NCCIT-R unbehandelt und NCCIT-R Cisplatin IC₅₀. Die * gekennzeichneten Proteine wurden mit einem signifikanten Proteinscore >65 (Mascot-Datenbankrecherche) identifiziert.

Spot auf Gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI
NCCIT-R IC₅₀ höher						
1	2.0	349	P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn] - Homo sapiens (Human)	15.9	5.7
2	2.1	379	P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8 - Homo sapiens (Human)	53.7	5.5
3	2.1	409	P68363	Tubulin alpha-1B chain - Homo sapiens (Human)	50.1	4.9
4	2.3	125	P07951	Tropomyosin beta chain - Homo sapiens (Human)	32.8	4.7
5	2.5	195	P16949	Stathmin - Homo sapiens (Human)	17.3	5.8
6	2.5	158	P12277	Creatine kinase B-type - Homo sapiens (Human)	42.6	5.3
7	2.7	151	Q75832	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10 - Homo sapiens (Human)	24.4	5.7
8	3.2	190	P09336	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 - Homo sapiens (Human)	24.8	5.3
9	3.2	*	P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	48.5	6.6
10	3.7	86	P08670	Vimentin - Homo sapiens (Human)	53.6	5.1
11	4.4	78	P02768	Lactoferrin precursor - Homo sapiens (Human)	78.1	8.5
12	4.6	281	Q13907	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1 - Homo sapiens (Human)	26.3	5.9
13	4.6	78	P02788	Lactoferrin precursor - Homo sapiens (Human)	78.1	8.5
14	4.8	*	P63261	Actin, cytoplasmic 2 - Homo sapiens (Human)	41.8	5.3
15	5.9	96	P19338	Nucleolin - Homo sapiens (Human)	76.6	4.6
16	7.7	*	P56537	Eukaryotic translation initiation factor 6 - Homo sapiens (Human)	26.6	4.6
17	8.6	348	P63261	Actin, cytoplasmic 2 - Homo sapiens (Human)	41.8	5.3
18	9.8	132	Q13765	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha - Homo sapiens (Human)	23.4	4.5
19	87.5	145	Q15185	Prostaglandin E synthase 3 - Homo sapiens (Human)	18.7	4.4
20	216.7	275	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 - Homo sapiens (Human)	16.8	5.1
NCCIT-R IC₅₀ niedriger						
21	2.2	143	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6
22	2.2	148	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6
23	2.4	503	Q14195	Dihydropyrimidinase-related protein 3 - Homo sapiens (Human)	61.9	6.0
24	2.6	163	Q9UMX0	Ubiquitin-1 - Homo sapiens (Human)	62.5	5.0
25	2.7	336	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K - Homo sapiens (Human)	50.9	5.4
26	2.8	296	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 - Homo sapiens (Human)	33.7	5.0
27	2.8	135	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6
28	2.9	449	Q07955	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 - Homo sapiens (Human)	27.7	10.4
29	3.2	75	P11021	78 kDa glucose-regulated protein precursor - Homo sapiens (Human)	72.3	5.1
30	3.4	329	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 - Homo sapiens (Human)	33.7	5.0
31	3.7	447	P00491	Purine nucleoside phosphorylase - Homo sapiens (Human)	32.1	6.5
32	3.8	123	Q963W5	Phosphodiesterase-related protein - Homo sapiens (Human)	39.0	6.1
33	4.1	132	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.5	4.6
34	4.7	*	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6
35	4.9	323	P14625	Endoplasmic precursor - Homo sapiens (Human)	92.4	4.8
36	5.3	60	Q8NB25	Uncharacterized protein C6orf60 - Homo sapiens (Human)	119.3	5.5

Zu 3.3.3 Cisplatin-sensitive (IC₅₀-Dosis von Cisplatin) und Cisplatin-resistente Zellen (IC₅₀-Dosis von Cisplatin): NTERA-2 und NTERA-2-R

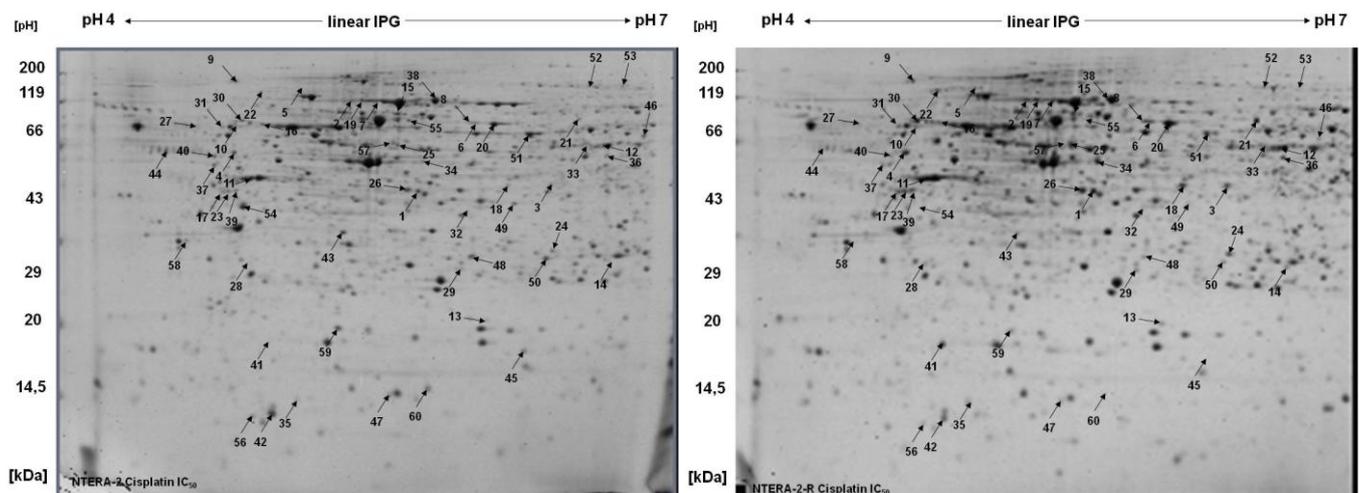


Abbildung 50: 2D-PAGE-Gele von Cisplatin-behandelten NTERA-2- und Cisplatin-behandelten NTERA-2-R-Zellen

Die im Vergleich als differentiell exprimierte und mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten sind in Tabelle 38 zu sehen.

Zu 3.3.3 Cisplatin-sensitive Zellen (IC₅₀-Dosis von Cisplatin) und Cisplatin-resistente Zellen (IC₅₀-Dosis von Cisplatin): 2102EP und 2102EP-R

Tabelle 47: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich 2102EP Cisplatin IC₅₀ und 2102EP-R Cisplatin IC₅₀. Die * gekennzeichneten Proteine wurden mit einem signifikanten Proteinscore >65 (Mascot-Datenbankrecherche) identifiziert.

Spot auf Gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	peptide count
2101EP-R IC₅₀ höher							
1	2.0	527	Q9Y2B0	Protein canopy homolog 2 precursor - Homo sapiens (Human)	20.6	4.8	17
2	2.1	82	P13639	Elongation factor 2 - Homo sapiens (Human)	95.3	6.4	14
3	2.1	280	P31947	14-3-3 protein sigma - Homo sapiens (Human)	27.8	4.7	20
4	2.2	156	P62995	Splicing factor, arginine/serine-rich 10 - Homo sapiens (Human)	33.6	11.3	7
5	2.2	113	P07919	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial precursor - Homo sapiens (H	10.7	4.4	4
6	2.3	109	P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 - Homo sapien	37.4	5.6	10
7	2.4	379	P06733	Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	47.1	7.0	22
8	2.4	498	P40227	T-complex protein 1 subunit zeta - Homo sapiens (Human)	58.0	6.2	33
9	2.4	371	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 - Homo sapiens (Human)	33.6	5.0	11
10	2.6	607	P05388	60S acidic ribosomal protein P0 - Homo sapiens (Human)	34.3	5.7	23
11	2.6	434	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H - Homo sapiens (Human)	49.2	5.9	23
12	2.7	589	P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit - Homo sapi	37.0	6.1	24
13	2.8	371	Q9HAV7	GrpE protein homolog 1, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human)	24.3	8.2	17
14	3.1	182	P43487	Ran-specific GTPase-activating protein - Homo sapiens (Human)	23.3	5.2	9
15	4.0	368	Q15417	Calponin-3 - Homo sapiens (Human)	36.4	5.7	21
16	4.1	349	P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18 - Homo sapiens (Human)	48.0	5.3	16
17	8.7	143	Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta - Homo sapiens (Human)	88.5	5.5	10
2102EP-R IC₅₀ niedriger							
18	2.1	169	O14579	Coatamer subunit epsilon - Homo sapiens (Human)	34.5	5.0	15
19	2.2	261	P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isofc	65.3	5.0	19
20	2.2	92	P55735	Protein SEC13 homolog - Homo sapiens (Human)	35.5	5.2	9
21	2.3	136	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - Homo sapiens (Human)	36.0	8.6	7
22	2.8	113	Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B - Homo sapiens (Human)	36.2	8.2	10
23	3.0	343	Q07955	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 - Homo sapiens (Human)	27.7	10.4	20
24	775.4	154	Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta - Homo sapiens (Human)	88.5	5.5	14
25	1647.2	175	P67936	Tropomyosin alpha-4 chain - Homo sapiens (Human)	28.5	4.7	17

Zu 3.3.3 Cisplatin-sensitive Zellen (IC₅₀-Dosis von Cisplatin) und Cisplatin-resistente Zellen (IC₅₀-Dosis von Cisplatin): NCCIT und NCCIT-R

Tabelle 48: Differentiell regulierte Proteine aus dem Vergleich NCCIT Cisplatin IC₅₀ und NCCIT-R Cisplatin IC₅₀. Die * gekennzeichneten Proteine wurden mit einem signifikanten Proteinscore >65 (Mascot-Datenbankrecherche) identifiziert.

Spot auf Gel	fold change	hit score	Accession Nr.	Protein	MW (kDa)	pI	peptide count
NCCIT-R IC₅₀ höher							
1	2.0	201	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K - Homo sapiens (Human)	50.9	5.4	18
2	2.0	318	P78417	Glutathione transferase omega-1 - Homo sapiens (Human)	27.5	6.2	16
3	2.0	266	P19338	Nucleolin - Homo sapiens (Human)	76.6	4.6	13
4	2.1	314	Q5T7N2	LINE-1 type transposase domain-containing protein 1 - Homo sapiens (H	98.8	4.9	29
5	2.1	273	P09382	Galectin-1 - Homo sapiens (Human)	14.7	5.3	12
6	2.2	468	P63261	Actin, cytoplasmic 2 - Homo sapiens (Human)	41.8	5.3	22
7	2.4	1100	P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH [Includes: Phosphoribos	64.6	6.3	42
8	2.4	307	P58546	Myotrophin - Homo sapiens (Human)	12.9	5.3	8
9	2.6	131	P08670	Vimentin - Homo sapiens (Human)	53.6	5.1	20
10	2.9	455	Q9Y265	RuvB-like 1 - Homo sapiens (Human)	50.2	6.0	26
11	3.6	599	Q8WZA0	Protein LZIC - Homo sapiens (Human)	21.5	4.9	17
12	3.7	277	P63261	Actin, cytoplasmic 2 - Homo sapiens (Human)	41.8	5.3	15
13	4.0	199	P24534	Elongation factor 1-beta - Homo sapiens (Human)	24.7	4.5	8
14	4.3	322	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 - Homo sapiens (Human)	16.8	5.1	12
15	4.3	220	Q9BPX5	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein - Homo sapiens	16.9	6.2	7
16	4.3	284	P56537	Eukaryotic translation initiation factor 6 - Homo sapiens (Human)	26.6	4.6	9
17	5.0	509	P08670	Vimentin - Homo sapiens (Human)	53.6	5.1	27
18	8.8	132	P63261	Actin, cytoplasmic 2 - Homo sapiens (Human)	41.8	5.3	7
19	14.4	372	P19105	Myosin regulatory light chain 2, nonsarcomeric - Homo sapiens (Huma	19.8	4.7	12
20	87.6	119	P19338	Nucleolin - Homo sapiens (Human)	76.6	4.6	14
NCCIT-R IC₅₀ niedriger							
21	2.2	424	P07339	Cathepsin D precursor - Homo sapiens (Human)	44.5	6.1	20
22	2.2	135	P20700	Lamin-B1 - Homo sapiens (Human)	66.4	5.1	12
23	2.2	188	P14625	Endoplasmic precursor - Homo sapiens (Human)	92.4	4.8	25
24	2.6	314	Q15417	Calponin-3 - Homo sapiens (Human)	36.4	5.7	18
25	2.7	284	P62195	26S protease regulatory subunit 8 - Homo sapiens (Human)	45.6	7.1	21
26	2.9	*	P06748	Nucleophosmin - Homo sapiens (Human)	32.6	4.6	*
27	3.6	69	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain - Homo sapiens (Human)	32.7	4.7	8
28	5.4	92	Q9Y2B0	Protein canopy homolog 2 precursor - Homo sapiens (Human)	20.6	4.8	4
29	5.6	137	P23528	Cofilin-1 - Homo sapiens (Human)	18.5	8.2	13
30	22.0	62	Q13885	Tubulin beta-2A chain - Homo sapiens (Human)	49.9	4.8	13

Zu 3.4.3.1 Identifikation von differentiell exprimierten Proteinen bei NTERA-2-Zellen nach Behandlung mit Sunitinib

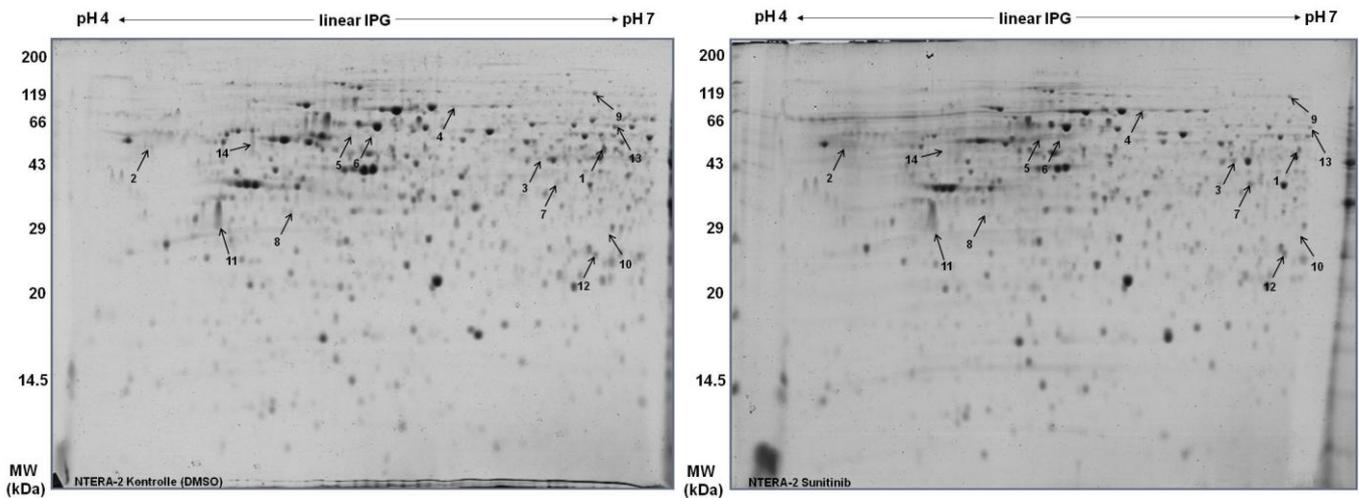


Abbildung 51: 2D-PAGE-Gele von unbehandelten und Sunitinib-behandelten NTERA-2-Zellen. Die im Vergleich zwischen den Kontroll- und den mit der IC_{50} -Dosis von Sunitinib (48h) behandelten Zellen als differentiell exprimierten und mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten sind in Tabelle 41 zu sehen.

Zu 3.4.4.1 Identifikation von differentiell exprimierten Proteinen bei NTERA-2-Zellen nach Behandlung mit Temsirolimus

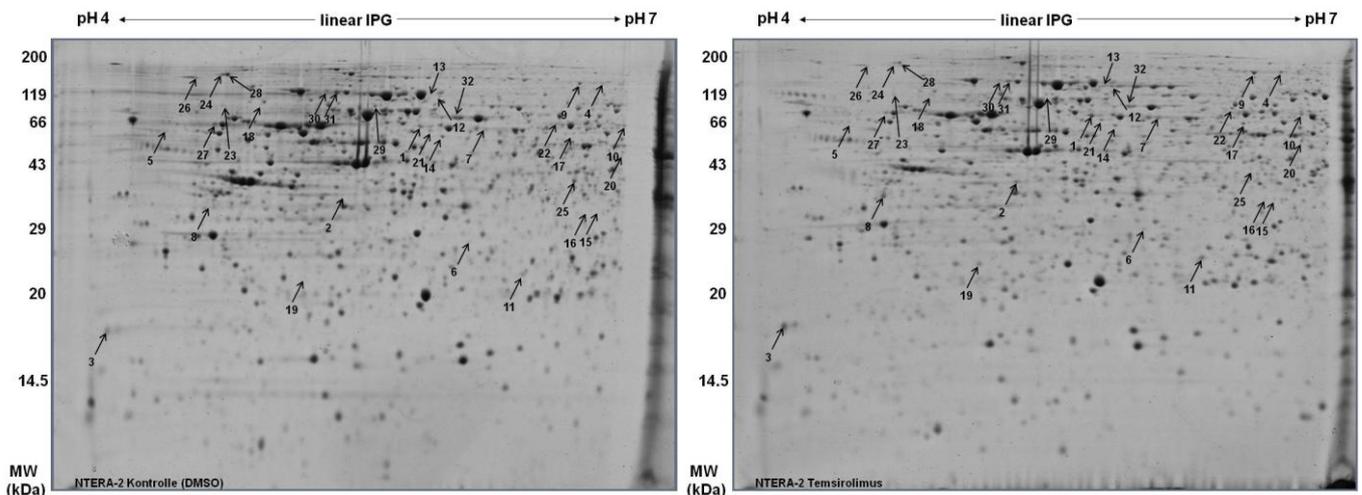


Abbildung 52: 2D-PAGE-Gele von unbehandelten und Temsirolimus-behandelten NTERA-2-Zellen. Die im Vergleich zwischen den Kontroll- und den mit der IC_{50} -Dosis von Temsirolimus (48h) behandelten Zellen als differentiell exprimierten und mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteindaten sind in Tabelle 42 zu sehen.