

**Keimzelltumore und Cisplatinresistenz:
Bildung von DNA-Addukten, Auswirkungen auf
Zellzyklus und Zelltod und Beteiligung von
DNA-Reparaturmechanismen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften

vorgelegt von

Annabelle Elisabeth Fenske

aus Hamburg

Hamburg 2010

Gutachter: JProf. Dr. Dorothee Dartsch
Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein

Datum der Disputation: 24. September 2010

Il est aussi facile
de rêver un livre
qu'il est difficile
de le faire.

Honoré de Balzac

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2006 bis Juni 2010 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg unter der Leitung von

Frau JProf. Dr. Dorothee Dartsch.

Ich danke ihr ganz herzlich für die Überlassung des Themas, ihre engagierte Betreuung und Unterstützung und das mir damit entgegengebrachte Vertrauen, sowie ihre stets freundliche Motivation.

Das Koreferat wurde freundlicherweise von **Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein** übernommen, dem ich ebenfalls herzlich danke.

Desweiteren möchte ich mich bei **Herrn Dr. Dr. Friedemann Honecker** vom Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) für die freundliche Bereitstellung der verwendeten Zelllinien bedanken.

Herrn PD Dr. Jochen Dahm-Daphi, Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie des UKE sowie **Herrn PD Dr. Jürgen Thomale**, Institut für Zellbiologie (IFZ) des Universitätsklinikums Essen danke ich für die Möglichkeit, in ihren Laboren arbeiten und neue Methoden erlernen zu dürfen. Ihren Arbeitskreisen danke ich ganz herzlich für deren tatkräftige Unterstützung. In diesem Zusammenhang geht zudem ein besonderer Dank an die **Ernst und Elfriede Griebel's Förderungs- und Unterstützungsstiftung**, Hamburg, für die finanzielle Unterstützung.

Mein aufrichtigster Dank gilt allen Kollegen unserer **Arbeitsgruppe** - für neue Einblicke, interessante Betrachtungsweisen und erfrischende Gespräche.

Besonders herzlich möchte ich mich bei **Frau Dr. Miriam Pein**, **Frau Sophie Günther** und **Herrn Dr. Marc Muchow** für das äußerst konstruktive Korrekturlesen bedanken - bei Miriam außerdem für ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die vielen kreativen Anregungen und bei Sophie für ihre fachliche Kompetenz und ihr Verständnis. Marc danke ich weiterhin für sein fortwährend großes Interesse am Fortschritt dieses Projekts und allgegenwärtige und kompetente Hilfe in vielen, vielen themenübergreifenden Fragen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie für ihre Geduld, großartige Unterstützung und Aufmunterungen. Mein größter Dank gilt meinem Großvater. Er wird mir immer leuchten.

Abkürzungsverzeichnis und Glossar

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Antikörper
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Ataxia telangietasia mutation
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATR	ATM and Rad3-related
BRCA1/2	Breast Cancer Susceptibility Gene 1/2
BSA	Bovine serum albumin = Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
CDDP	Cisplatin (cis-Diamminodichloridoplatin (II))
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DNA damage response	zelluläre Antwort auf die DNA-Schädigung
DSB	Doppelstrangbruch
EC	embryonal carcinoma = Embryonalkarzinom
ECL™	enhanced chemiluminescence = verbesserte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> -Bakterien
ERCC1	Excision Repair Cross Complementing protein 1
<i>et al.</i>	et altera = und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	fetal bovine serum = fötales Rinderserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
Gy	Grey, Einheit der Strahlendosis
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HR	Homologe Rekombination
IC	inhibiting concentration = inhibitorische Konzentration
ICA	immunocytological assay = immunzytologischer Test
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
min	Minuten
ml	Milliliter
μM	Mikromol
MMR	Mismatch-Reparatur
mRNA	messenger RNA = Boten-RNS
NER	Nukleotid Exzisions Reparatur
OT	Objekträger
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PEB	Kombinationschemotherapie aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin
PI	Propidiumiodid

PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pol β	DNA-Polymerase β
pol η	DNA-Polymerase η
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radio-Immunopräzipitations-Assay
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure (RNS)
rpm	Umdrehungen per Minute (1/min)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SSC	Side Scatter
TBS	Tris buffered saline = Tris-gepufferte-Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGCT	testicular germ cell cancer = testikulärer Keimzelltumor
TLS	Translesion synthesis, auch replicative bypass oder DNA-bypass-Synthese = DNA-Synthese um eine bestehende DNA-Schädigung herum
tlw.	teilweise
Well	Loch / Vertiefung in Gewebe- / Zellkulturplatte
XP	Xeroderma pigmentosum

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	1
1 Einleitung	2
1.1 Testikuläre Keimzelltumore (TGCTs).....	2
1.1.1 Inzidenz und Therapie	3
1.1.2 TGCTs in der Forschung.....	5
1.2 Darmkrebs.....	7
1.2.1 Inzidenz und Therapie	7
1.2.2 Kolonkarzinomzellen in der Forschung.....	7
1.3 Cisplatin (CDDP)	8
1.3.1 Entdeckung.....	8
1.3.2 Molekulare Effekte.....	8
1.3.3 Bioverfügbarkeit und Metabolisierung.....	10
1.3.4 Allgemeine Resistenzmechanismen gegen CDDP	10
1.4 CDDP in der Therapie von TGCTs	14
1.4.1 CDDP-Sensitivität von TGCTs	14
1.4.2 CDDP-Resistenz in TGCTs	16
1.5 DNA-Reparaturmechanismen und CDDP-Resistenz	18
1.5.1 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER).....	18
1.5.2 Homologe Rekombination (HR)	20
1.5.3 Interstrang-Crosslink-Reparatur	22
1.5.4 Zellzykluskontrollpunkte und Signalweiterleitung.....	23
1.5.5 Translesion Synthesis (TLS)	25
1.6 Charakteristische Merkmale verschiedener Zelltodarten	28
2 Fragestellung.....	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Auswahl geeigneter Inkubationsbedingungen	30
3.1.1 Morphologische Untersuchungen	30
3.2 Charakterisierung der Zytotoxizität und des Zelltods.....	33
3.2.1 Koloniebildung nach Behandlung mit CDDP	33
3.2.2 CellTiter-Glo® Luminescence Cell Viability Assay	39
3.2.3 Analyse der Zellverteilung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen.....	44
3.2.4 Charakterisierung des Zelltods.....	50
3.3 DNA-Schädigung durch Cisplatin	52
3.3.1 DNA-Platinierung nach CDDP-Behandlung	52
3.3.2 Bildung von sekundären DNA-Schäden nach CDDP-Behandlung	54

3.3.3	Charakterisierung der DNA-DSB in NT-2- und NT-2-R-Zellen	58
3.4	Vergleichende Untersuchung ausgewählter Proteine	60
3.4.1	Absoluter Proteingehalt in unbehandelten Kontrollzellen	60
3.4.2	Analyse der Wirkung von CDDP auf die Proteinexpression	62
3.5	Ergebnisüberblick nach CDDP-Behandlung	68
3.6	Untersuchung der TCam-2-Zellen nach Bestrahlung	70
3.6.1	Koloniebildung in TCam-2-Zellen nach Bestrahlung	71
3.6.2	Analyse der Zellverteilung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen	72
3.6.3	Bildung von DNA-Schäden nach Bestrahlung	73
3.7	Ergebnisüberblick nach Bestrahlung	74
4	Diskussion	75
4.1	Zytotoxische Effekte nach CDDP-Behandlung	76
4.1.1	Koloniebildungsvermögen	76
4.1.2	CellTiter-Glo® Luminescence Cell Viability Assay	77
4.1.3	Beeinflussung des Zellzyklus	78
4.1.4	Charakterisierung des Zelltods	80
4.1.5	Ausblick	81
4.2	DNA-Schädigung durch CDDP	82
4.2.1	DNA-Platinierung nach CDDP-Behandlung und deren Verlauf	82
4.2.2	Sekundäre DNA-Schädigungen durch CDDP und deren Verlauf	83
4.2.3	Ausblick	86
4.3	Veränderte Proteinexpression nach CDDP-Behandlung	87
4.3.1	Untersuchung der an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine	87
4.3.2	Untersuchung der an der TLS beteiligten Proteine	89
4.3.3	Ausblick	92
4.4	Untersuchung der TCam-2 Zellen nach Bestrahlung	94
4.4.1	Betrachtung der strahleninduzierten Toxizität	94
4.4.2	DNA-Schädigung nach Bestrahlung	97
4.4.3	Ausblick	99
5	Zusammenfassung	101
6	Summary	103
7	Material und Methoden	105
7.1	Geräte	105
7.2	Zellkultur	107
7.2.1	NT-2	107
7.2.2	NT-2-R	108
7.2.3	TCam-2	108
7.2.4	HT-29	109

7.3	Mikroskopie.....	110
7.3.1	Lichtmikroskopie	110
7.4	Zytotoxizitätstests	110
7.4.1	Colony Formation Assay (CFA)	110
7.4.2	Cell TiterGlo® Luminescence Cell Viability Assay	111
7.4.3	Bestimmung der Zahl abgelöster Zellen	112
7.5	Durchflusszytometrie (FACS)	113
7.5.1	Zellzyklusanalyse	113
7.5.2	Annexin V-Färbung.....	115
7.6	Methoden zur Untersuchung der DNA	116
7.6.1	Immunocytological Assay (ICA)	116
7.6.2	γ H2AX-Assay.....	117
7.6.3	Kombinierte Färbung von γ H2AX und 53BP1	119
7.7	Methoden zur Proteinuntersuchung	120
7.7.1	Proteinisolierung.....	120
7.7.2	Western Blot (WB)	122
7.8	Bestrahlung	125
7.9	Statistische Auswertung.....	125
7.10	Gefahrstoffverzeichnis	126
8	Literaturverzeichnis.....	129
	Curriculum Vitae.....	147
	Veröffentlichungen	148
	Anhang	149

Vorwort

Im Jahr 2006 erkrankten in der Bundesrepublik Deutschland 4.960 Männer an Hodenkrebs [1]. Auch wenn diese Erkrankung bezogen auf die Gesamtzahl aller Krebserkrankungen mit einem Anteil von 2 % eher zu den seltenen Krebsarten gehört, so ist sie doch in der Altersklasse der 25 bis 45 jährigen Männer die häufigste bösartige Tumorart [1, 2].

Wird ein Hodentumor frühzeitig entdeckt und behandelt, kann er so gut wie immer geheilt werden. Die Überlebensrate liegt bei > 95 % [1, 3]. Neben der Möglichkeit einer Operation bzw. der chirurgischen Entfernung der Hoden und /oder einer Strahlentherapie, sprechen Hodentumore außerordentlich gut auf cisplatinhaltige Chemotherapien an. Selbst metastasierte Tumore können noch in > 80 % der Fälle geheilt werden [4].

Trotz der guten Therapiemöglichkeiten entwickeln 10 % der betroffenen Patienten eine Chemoresistenz gegen die Cisplatin-Behandlung [5]. Eine Chemotherapie bedeutet für die Patienten nach wie vor eine große körperliche Belastung durch Wirkungen und Nebenwirkungen der eingesetzten Zytostatika, sowie die Belastung durch den Tumor selbst.

Die Art einer Chemoresistenz sowie deren Entwicklung hat somit besondere klinische Bedeutung. Letztlich sind diese Resistenzen, erworben oder angeboren, für das Scheitern der meisten Behandlungen und damit für den Tod der Patienten verantwortlich. Die Vermeidung dieser Chemoresistenzen gegenüber einem Zytostatikum setzt Wissen über deren Entstehung voraus. Es ist daher ebenso wichtig, neue Therapieoptionen und Zytostatika-Angriffspunkte zu erforschen, wie die bereits etablierter Zytostatika genauer zu betrachten und deren molekulare Mechanismen zu ergründen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss der DNA-Reparatur auf die Sensitivität und die Resistenz maligner Keimzelltumore des Hodens gegenüber einer Cisplatin-Behandlung. Sie leistet damit einen Beitrag zum Verständnis von Resistenzentwicklungen und Therapieansprechen.

1 Einleitung

1.1 Testikuläre Keimzelltumore (TGCTs)

Keimzelltumore wurden 2004 im Klassifikationssystem der World Health Organisation (WHO) in fünf Gruppen unterteilt [6]. Diese Einteilung basiert auf epidemiologischen und klinischen Erkenntnissen, sowie chromosomalen Charakteristika. Drei dieser fünf Gruppen erfassen testikuläre Keimzelltumore (TGCT). TGCTs sind eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren, die von pluripotenten Keimzellen ausgehen.

Als Typ I-Tumore werden Teratome und Dottersacktumore bei Neugeborenen und Kindern bezeichnet. Typ II-Tumore treten bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen auf. Die Typ III-Tumore sind spermatozytische Seminome des älteren Mannes. Typ II-Tumore repräsentieren die größte Gruppe unter den Keimzelltumoren. Die Untersuchungen in dieser Arbeit erfolgen an Zelllinien aus diesen Typ II-Keimzelltumoren. Die Vorläuferzelle der testikulären Typ II-Keimzelltumore wird als Carcinoma in situ (CIS) oder auch intratubuläre Keimzellneoplasie unklassifiziert (ITGCNU) bzw. testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) bezeichnet.

Typ II-Keimzelltumore werden in Seminome und Nicht-Seminome unterteilt [6-8] (siehe Abbildung 1.1). Seminome und Nicht-Seminome kommen ungefähr gleich häufig vor und machen 80-90 % aller Keimzelltumore aus. Etwa 10 % sind gemischte Keimzelltumore, 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. Dem gegenüber stehen die Nicht-Seminome, die aus histologisch verschiedenen Komponenten, wie dem Embryonalkarzinom (EC), dem Teratom, dem Dottersacktumor und dem Chorionkarzinom bestehen (siehe Abbildung 1.1). Die EC-Zellen repräsentieren die Stammzellkomponente. Diese haben das Potential, zu extraembryonalen Geweben (Dottersacktumor und Chorionkarzinom) oder auch zu embryonalen Geweben mit mesenchymalen, epithelialen oder neuronalen Komponenten (unreife und reife Teratome) zu differenzieren.

Als Unterscheidungsmerkmal zwischen Seminomen und Nicht-Seminomen kann die Expression von AFP (α -Foetoprotein) herangezogen werden. Im Gegensatz zu Nicht-Seminomen produzieren Seminome kein AFP und zeigen deshalb auch keine erhöhten Serumwerte [8].

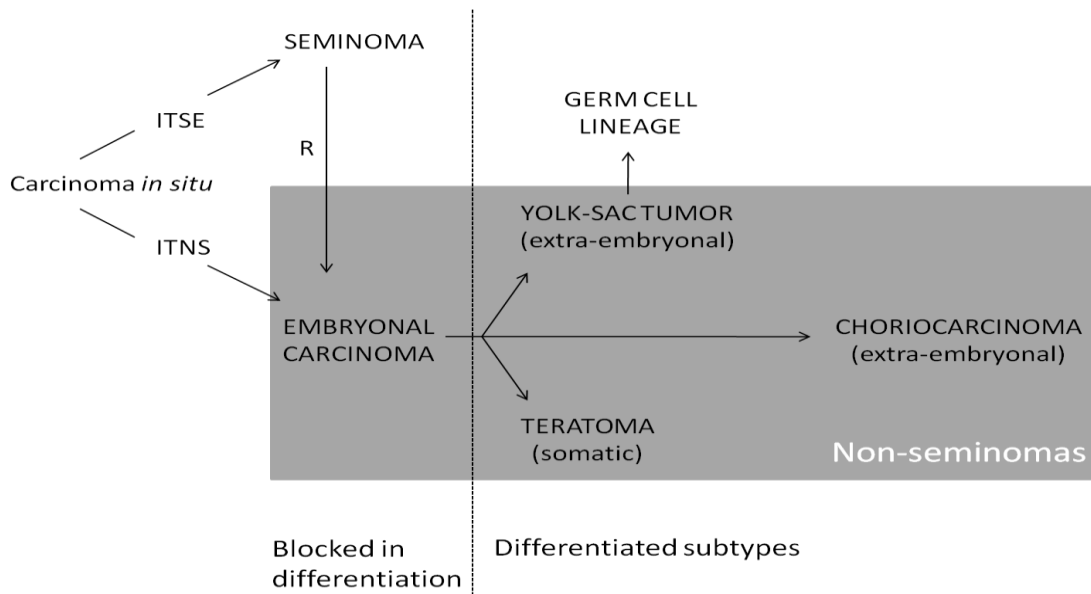


Abbildung 1.1: Überblick über die verschiedenen histologischen Formen der Typ II-TGCTs. Ausgehend von der Vorläuferschädigung Carcinoma in situ können sich über die intermediären Stadien des intratubulären Seminoms (ITSE) oder intratubulären Nicht-Seminoms (ITNS) entweder Seminome oder Nicht-Seminome entwickeln. Die unterschiedlichen Histologien der Nicht-Seminome sind auf grauem Hintergrund dargestellt. Seminome können sich mittels 'Re-Programmierung (R)' auch zu Nicht-Seminomen entwickeln, aus van de Geijn 2009 ¹

Weitere Keimzelltumormarker sind das β -Humane-Choriongonadotropin (β -HCG) und die Laktatdehydrogenase (LDH). Bei 80 % der Patienten mit einem Nicht-Seminom sind AFP und / oder β -HCG erhöht. Eine Erhöhung von β -HCG bei Seminom-Patienten kommt in 20 % der Fälle vor. LDH ist bei 50 % der Seminom- und Nicht-Seminom-Patienten erhöht. Sie hat eher prognostische Bedeutung. Alle TGCTs, unabhängig von deren Histologie, zeigen eine Zunahme des kurzen Arms von Chromosom 12, das sogenannte Isochromosom 12p (i(12p)n). In CIS-Zellen konnte diese chromosomale Veränderung dagegen nicht nachgewiesen werden.

1.1.1 Inzidenz und Therapie

Wie bereits erwähnt erkrankten im Jahr 2006 in der Bundesrepublik Deutschland 4.960 Männer an Hodenkrebs [1]. Wird dieser frühzeitig entdeckt und behandelt, kann er so gut wie immer geheilt werden. Die Überlebensrate liegt bei > 95 % [1, 3]. Unter Anwendung einer Cisplatin-basierten Chemotherapie kann sogar bei metastasierenden Verlaufsformen eine Heilungsrate von > 80 % erreicht werden [4].

¹ aus [Birth Defects Research Part A: Clinical And Molecular Teratology](#); 87(1), Geijn Gert-Jan M. van de, Hersmus Remko, Looijenga Leendert H. J., Recent developments in testicular germ cell tumor research, pages 96-113, 2009, mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons

Die Therapie der Typ II-TGCTs richtet sich nach der Art des Keimzelltumors, dessen Stadium und Prognose-Score. Grundsätzlich wird zunächst versucht, den Primärtumor durch eine Operation zu entfernen.

Die histologische Einteilung ist wegen der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten und des unterschiedlichen Metastasierungsverhaltens der Seminome und Nicht-Seminome von erheblicher Bedeutung für die Prognose und Therapie. Faktoren wie die Festlegung der lokalen Ausdehnung des Primärtumors mit Überschreiten bestimmter Grenzen als auch die Bestimmung der Tumormarker spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Die Einteilung der Tumorstadien erfolgt mittels international einheitlicher TNM-Klassifikation.

Seminome gelten allgemein als radiosensitiv. Die adjuvante Radiotherapie gilt daher als Standard bei der Behandlung von Seminomen der Stadien I bis IIb. Nach neuesten Erkenntnissen wird für die Stadium I-Seminome eine Surveillance-Strategie empfohlen. Im klinischen Stadium IIa erfolgt die Bestrahlung mit 30 Gy und im klinischen Stadium IIb mit 36 Gy. Patienten, die eine Strahlentherapie ablehnen, sollten eine Chemotherapie mit drei Zyklen PEB (siehe Tabelle 1.1) oder vier Zyklen Cisplatin und Etoposid (EP) erhalten. Letztgenannte Therapie ist beispielsweise bei bestehender Lungenschädigung oder im Fall von Kontraindikationen gegen Bleomycin angezeigt. So können zwischen 80 % und 95 % der Patienten im Stadium II durch die postoperative Radio- oder auch Chemotherapie geheilt werden [8-11].

Für die Therapie eines Stadium II-Nicht-Seminoms kommt eine Chemotherapie über 3 Zyklen gemäß PEB-Schema (siehe Tabelle 1.1) in Frage, gefolgt von einer Entfernung residueller retroperitonealer Tumormassen und evtl. ergänzt durch eine retroperitoneale Lymphadenektomie (RPLND). Weitere Möglichkeiten sind eine RPLND gefolgt von einer adjuvanten Chemotherapie gemäß PEB-Schema über 2 Zyklen sowie eine RPLND mit engmaschiger Nachkontrolle und Einsatz einer Chemotherapie bei Nachweis eines Rezidivs [8, 10-12].

Tabelle 1.1: Typisches PEB-Schema zur Behandlung der testikulären Keimzelltumore

	Dosis	Intervall
Cisplatin	20 mg/m ² i.v. in NaCl 0.9 % 500 ml/h	Tag 1-5
Bleomycin	30 mg/m ² i.v. Bolus	Tag 1, 8, 15
Etoposid	100 mg/m ² i.v. in NaCl 0.9 % 500 ml/h	Tag 1-5
Wiederholung des Schemas		Tag 22 oder 29

1.1.2 TGCTs in der Forschung

TGCTs sprechen hervorragend auf eine Chemotherapie an. Lediglich reife Teratome teilen diese allgemein hohe Chemosensitivität nicht, obwohl sie ein identisches Erbgut aufweisen. Die meisten Zelllinien, die von humanen TGCTs abstammen, behalten diese ungewöhnlich hohe Sensitivität [4, 13-15]. Ein Einblick in die molekularen Bestimmungsgrößen dieser Wirksamkeit der Behandlung der TGCTs könnte das Therapieansprechen von Keimzelltumoren mit schlechter Prognose verbessern. Desweiteren könnte es neue Strategien zur Steigerung der Therapiesensitivität in anderen soliden und metastasierten Tumoren liefern.

1.1.2.1 NT-2

Die NT-2-Zelllinie stammt aus einem Xenograft-Tumor der humanen Teratokarzinomzelllinie Tera-2 (auch TERA-2) [16]. Diese wiederum stammt aus dem metastasierten Teratokarzinom eines 22-jährigen, europäischen Mannes.

Bei der NT-2-Zelllinie handelt es sich um eine humane Embryonalkarzinomzelllinie. EC-Zellen repräsentieren die pluripotenten Stammzellen eines Tumors. NT-2-Zellen haben die Fähigkeit zur somatischen Differenzierung behalten. Sie weisen keine p53-Mutation auf. Die Zelllinie wird in der Literatur auch oft als NTERA-2 oder NTera-2 bezeichnet.

1.1.2.2 NT-2-R

Die CDDP-resistente Zelllinie NT-2-R wurde über eine Zeitspanne von 18 Monaten aus der NT-2-Zelllinie generiert [17]. Die Kultivierung erfolgte dabei unter steigenden CDDP-Konzentrationen, beginnend mit der IC_{50} der Elternzelllinie. Wenn eine Viabilität von < 50 % erreicht wurde, wurde die CDDP-Zugabe unterbrochen, und die Zellen konnten sich über drei Passagen erholen.

Die IC_{50} sowie die relative CDDP-Resistenz wurden mittels MTT-Assay nach 48 h Dauerinkubation bestimmt. Die NT-2-R-Subzelllinie zeigte eine 14-fach höhere IC_{50} ($5.5 \mu\text{M} \pm 0.3 \mu\text{M}$) verglichen mit der CDDP-sensitiven NT-2-Zelllinie ($0.4 \mu\text{M} \pm 0.1 \mu\text{M}$) ($p < 0.05$).

Der MTT-Test basiert auf der Reduktion des gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu wasserunlöslichen, violetten Formazankristallen (siehe Abbildung 1.2). Die enzymatische Reduktion des MTT findet nur in metabolisch aktiven Zellen durch membrangebundene, mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen statt.

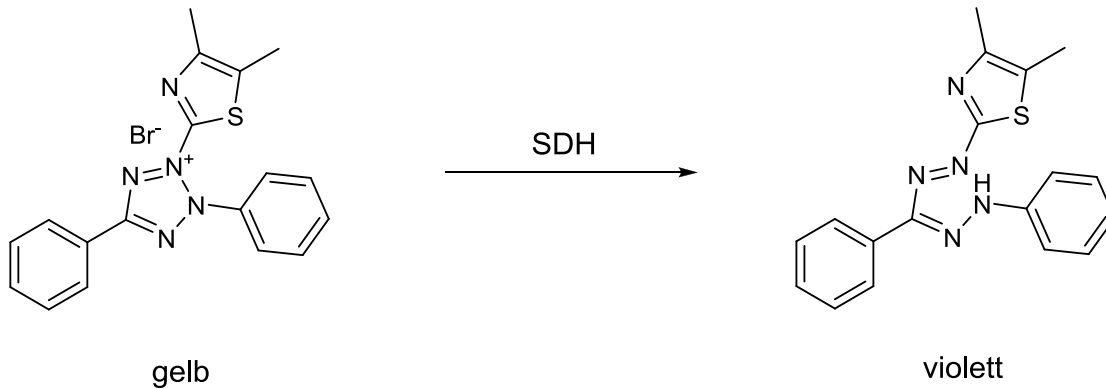


Abbildung 1.2: MTT-Reaktion: Reduktion des gelben MTT (3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) zu wasserunlöslichen, violetten Formazankristallen durch membrangebundene, mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen (SDH)

1.1.2.3 TCam-2

Die TCam-2-Zelllinie ist die erste und bisher einzige Seminomzelllinie. Nachweise spezifischer Marker und Merkmale bestätigen deren Seminomeigenschaften [18, 19]. Sie stammt aus dem primären testikulären Seminom eines 35-jährigen Patienten. Die Generierung erfolgte initial mittels *in vitro* Zellkultur sowie einer Vermehrung mittels Xenograft in SCID-Mäusen.

Die Verfügbarkeit einer Seminomzelllinie ermöglicht Untersuchungen früherer Stadien der Keimzelltumorigenese als es Embryonalkarzinomzelllinien erlauben.

1.2 Darmkrebs

1.2.1 Inzidenz und Therapie

Die häufigste Unterart des Darmkrebses sind kolorektale Karzinome, also maligne Tumore im Bereich des Dick- und Mastdarms. Die Therapie kolorektaler Karzinome besteht primär in einer operativen Entfernung des Tumors und des angrenzenden Gewebes. Bei einer ungünstigen Prognose oder Metastasierung wird eine adjuvante Chemotherapie angeschlossen. Mittel der Wahl ist hierbei die Kombination von 5-Fluorouracil (5-FU) mit Folinsäure. Bei einem Nicht-Ansprechen kann die Kombinationstherapie auch durch Oxaliplatin, Irinotecan oder Capecitabin ergänzt oder ganz durch diese ersetzt werden [20].

1.2.2 Kolonkarzinomzellen in der Forschung

Aufgrund der klinischen Häufigkeit der Erkrankung sind Kolonkarzinomzellen auch in der Forschung von großer Bedeutung. Die Zellen der hier verwendeten Linie HT-29 wurden im Jahr 1964 von Fogh [21] aus dem primären Tumor einer 44-jährigen Patientin mit kolorektalem Adenokarzinom isoliert. Sie besitzen eine G→A-Punktmutation an Position 1032 des p53-Gens, was zu einer Arg→His-Substitution im Codon 273 führt. Die Folge ist eine Überproduktion von nicht-funktionalem p53-Protein [22].

1.3 Cisplatin (CDDP)

1.3.1 Entdeckung

Erstmals 1847 durch M. Peyrone synthetisiert, wurde die hochpotente Wirkung des *cis*-Diammindichloroplatin(II) (Cisplatin) erst 1965 eher zufällig entdeckt. B. Rosenberg arbeitete am *Department of Biophysics der Michigan State University* am Einfluss des elektrischen Feldes auf die Zellteilung [23]. Bei seinen Versuchen mit Platinelektroden, Ammoniumchlorid-Nährlösungen und *E. coli*-Bakterien kam es zur reduktiven Bildung von CDDP. Rosenberg erkannte dessen zellteilungsinhibierende Wirkung.

Heute gehört CDDP zu den effektivsten und am meisten verwendeten Zytostatika zur Behandlung maligner Tumore wie Lungen-, Ovarial-, Blasen- und Hodenkrebs sowie Karzinomen der Kopf- und Halsregion. Die klinische Verwendung wird jedoch durch Nebenwirkungen, überwiegend Nephro- und Ototoxizität, sowie einer hohen Resistenzentwicklung begrenzt.

1.3.2 Molekulare Effekte

Bei CDDP handelt es sich um einen quadratisch planaren Komplex. Es wird intravenös verabreicht, wobei die hohe Chloridkonzentration im Serum (100 mM) eine Hydrolyse verhindert. Größtenteils durch passive Diffusion gelangt CDDP durch die Zellmembran in das Zytoplasma. Dort ist die Chloridkonzentration mit 4 mM deutlich niedriger und es kommt zur Bildung von reaktiven Aquaplatin(II)-Komplexen - in wässrigen Lösungen dissoziieren die beiden Chloridionen vom zentralen Platin und es kommt zum Austausch gegen zwei Hydroxidionen. Dieser Aquaplatin(II)-Komplex kann dann mit Nukleophilen (z.B. DNA, RNA, Proteinen oder thiolgruppenhaltigen Molekülen wie Glutathion) reagieren und kovalente Bindungen ausbilden [24].

Cisplatin entfaltet seine zytotoxische Wirkung durch Bindung an alle DNA-Basen, wobei die N-7-Position des Guanins und des Adenins bevorzugt ist. Es entstehen sowohl Vernetzungen benachbarter Basenpaare innerhalb eines DNA-Stranges (1,2-Intrastrang-Addukte) als auch Vernetzungen über ein Basenpaar hinweg und innerhalb eines DNA-Stranges (1,3-Intrastrang-Addukte). Der Hauptanteil der DNA-Addukte sind 1,2-d(GpG)-Intrastrang- (60-65 %) und 1,2-d(ApG)-Intrastrang-Addukte (20-25 %), die Guanin mit Guanin oder Adenin mit Guanin vernetzen und zusammen ca. 90 % aller DNA-Addukte ausmachen [25]. Von Bedeutung für die Wirkung von CDDP ist außerdem die Ausbildung von Interstrang-Crosslinks (ICL), den Quervernetzungen zwischen zwei DNA-Strängen, obwohl diese quantitativ nur ca. 5 % aller DNA-Addukte darstellen. CDDP bildet außerdem DNA-Protein-Crosslinks und DNA-Monoaddukte [26, 27] (siehe Abbildung 1.3).

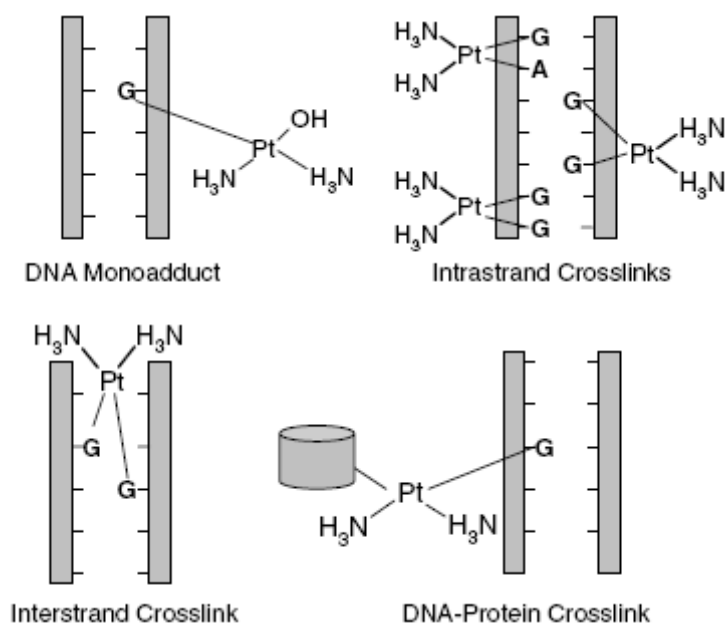


Abbildung 1.3: Strukturen der CDDP-induzierten DNA-Addukte, aus Rabik 2007²

Für die zytotoxische Wirkung werden hauptsächlich die 1,2-d(GpG)-Intrastrang-Addukte verantwortlich gemacht [24, 28]. Die Addukte verändern die DNA-Struktur [29, 30] und blockieren dadurch Replikation und Transkription. Nach der „Erkennung“ dieser Addukte werden diverse Signaltransduktionswege aktiviert, die z.B. in die DNA damage response eingreifen und die DNA-Reparatur aber auch einen Zellzyklusarrest und die Apoptose beeinflussen. Die Proteine, die an der Erkennung der DNA-Addukte beteiligt sind, sind u.a. die hMSH2- oder hMutS α -Komponente des Mismatch-Reparatur- (MMR-)Systems, die HMG1- und HMG2-Proteine (non-histone chromosomal highmobility group 1 and 2) sowie hUBF und TBP (Transkriptionsfaktor „TATA-bindendes Protein“) [31]. Jedes dieser Erkennungsproteine initiiert einen oder mehrere spezifische Reaktionen.

Eine dieser Reaktionen ist die Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten. Eine CDDP-Behandlung induziert einen vorübergehenden S-Phase-Arrest. Es folgt eine Hemmung der Cdc2-Cyclin A- oder B-Kinase, was einen anhaltenden G₂/M-Arrest bedingt. Ein Zellzyklusarrest vermindert die zytotoxische Wirkung. Ein Zellzyklusarrest erlaubt die Reparatur der DNA-Schädigungen [32]. Nur wenn die Reparatur unvollständig oder der Schaden zu groß ist, wird die Apoptose eingeleitet. Diese Prozesse sind mit dem Tumorsuppressor-Protein p53 assoziiert [33].

Die Kinasen ATM und ATR sind an der Kontrollpunkt-Aktivierung beteiligt [34]. CDDP aktiviert bevorzugt die ATR-Kinase. Diese wiederum aktiviert p53 mittels

² Reprinted from Cancer Treatment Reviews; 33(1), Cara A. Rabik, M. Eileen Dolan, Molecular

Phosphorylierung [24]. Außerdem kommt es zur Aktivierung spezifischer Signalwege der MAPK-Kaskade und diese wiederum aktiviert ebenfalls p53 [27].

Die CDDP-induzierte Apoptose kann durch verschiedene Wege eingeleitet werden. Zum einen kommt es zur Translokation von Bax vom Zytosol in die Mitochondrien und dort mittels Aktivierung von Caspase 9-Caspase 3-Signalwegen zur Apoptose. Zum anderen kann eine CDDP-induzierte Apoptose auch mittels Fas / FasL („Todesrezeptor“) und die Aktivierung von Caspase 8-Caspase 3-Signalwegen eingeleitet werden. Desweiteren existiert ein p73-abhängiger Signalweg [24].

1.3.3 Bioverfügbarkeit und Metabolisierung

Ein typisches Dosierungsschema bei testikulären Tumoren besteht aus 20 mg/m² Körperoberfläche CDDP an fünf aufeinanderfolgenden Tagen, alle drei bis vier Wochen (siehe Tabelle 1.1). Dabei werden maximale Plasmaspiegel von 0.6-14 µM mit einem Median von 3.3 µM erhalten [35].

CDDP ist zwei Stunden nach Verabreichung zu über 90 % an Plasmaproteine gebunden. Grundsätzlich wurde nach intravenöser Bolusinjektion einer Dosis von 50-100 mg/m² Körperoberfläche eine dreiphasische Elimination der Substanz beschrieben. Die erste Phase betrifft die Elimination der nicht an Plasmaproteine gebundenen Substanz ($t_{1/2\alpha}$) und dauert ca. 20-30 min. Dieser folgt eine zweite Eliminationsphase von ebenfalls nicht an Plasmaproteine gebundenem Cisplatin ($t_{1/2\beta}$) für im Schnitt 48-67 Minuten. Die dritte Phase der Elimination von Cisplatin ($t_{1/2\gamma}$) betrifft die Entfernung des an Plasmaproteine gebundenen Cisplatin und erstreckt sich über ca. 24 h. In dieser Phase spielen Proteinabbau sowie renale und biliäre Ausscheidungen eine Rolle [36].

1.3.4 Allgemeine Resistenzmechanismen gegen CDDP

Es sind mehrere molekulare Mechanismen einer CDDP-Resistenz bekannt. Dazu zählen eine verminderte CDDP-Aufnahme und eine vermehrte Detoxifizierung, die zu einer veränderten Adduktbildung führen. Außerdem sind unterschiedlich regulierte Signalwege der DNA damage response, die in einen Zellzyklusarrest eingreifen sowie DNA-Reparatur oder eine erhöhte Toleranz gegenüber den CDDP-induzierten Schäden beschrieben [14, 29, 30, 37-40]. Die Folgen sind eine erhöhte Proliferation oder eine Inhibition des Zelltods. Da die meisten Studien keinen einzelnen, relevanten Parameter der CDDP-Resistenz bestimmen konnten, nimmt man an, dass diese multifaktoriell ist [41].

Kenntnisse über diese Mechanismen der Resistenzentwicklungen können jedoch die Therapien verbessern und Therapieversagen bzw. Rückfälle verhindern. Abbildung 1.4

verdeutlicht das mögliche Schicksal von CDDP in der Zelle und die einzelnen Resistenzmechanismen sowie deren Interaktionen [42].

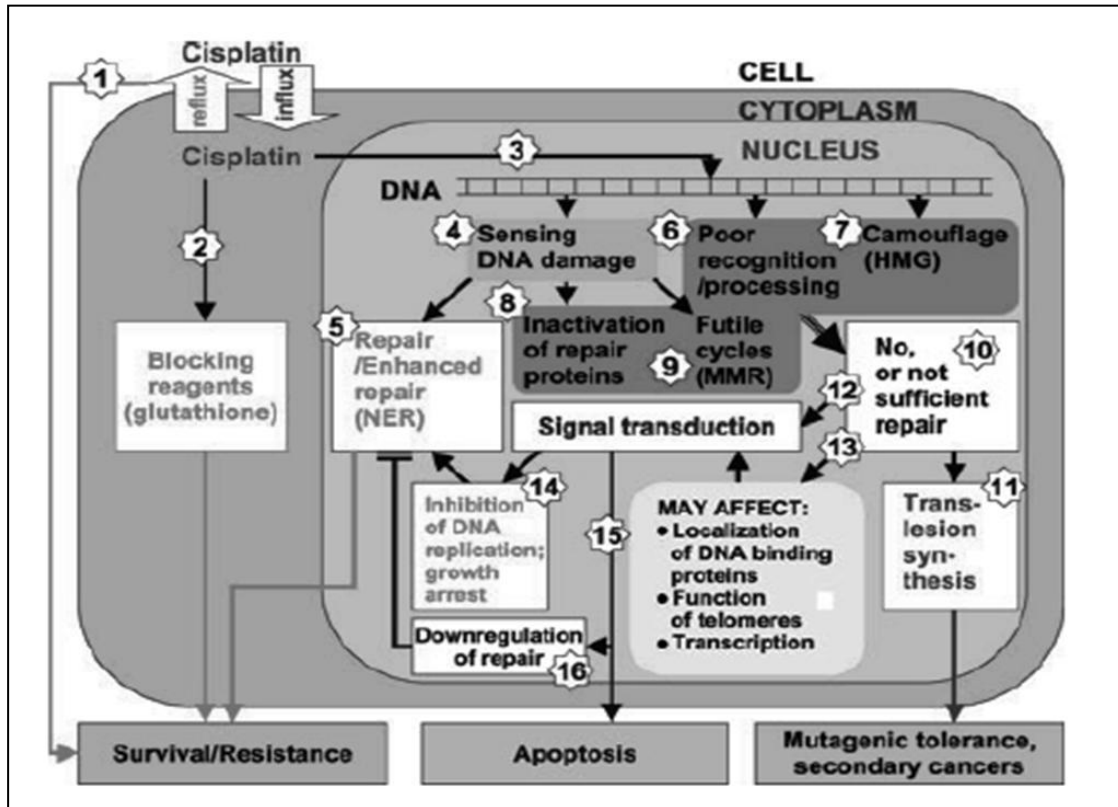


Abbildung 1.4: Schicksal von CDDP in der Zelle (vereinfacht), Einzelheiten im Text, aus Zorbas 2005³

Durch aktiven Efflux kann CDDP aus den Zellen ausgeschleust werden oder es kommt auf Grund veränderter Prozesse zu einer verminderten CDDP-Aufnahme (1). Letzteres scheint der entscheidendere Mechanismus zu sein. In Hefen wird die CDDP-Akkumulation in den Zellen durch den Kupfertransporter CTR1 reguliert. Auch Untersuchungen an humanen Zellen konnten zeigen, dass ein CTR1-Mangel zu einer CDDP-Resistenz führen kann [26, 30].

Aufgrund der CDDP-Reaktivität gegenüber Nukleophilen kann es zu inaktivierenden Reaktionen mit thiolhaltigen Agenzien wie Glutathion oder Metallothionein kommen (2). Eine Detoxifikation durch hohe Glutathionspiegel ist mit einer CDDP-Resistenz assoziiert [24, 30].

Grundsätzlich werden die CDDP-Addukte durch verschiedenste Proteine (siehe Abschnitt 1.3.2) erkannt (4). Dies kann zur Reparatur der Schädigungen führen (5). Eine

³ aus ChemBioChem; 6(7), Zorbas, H. and Keppler, B.K., Cisplatin damage: Are DNA Repair Proteins Saviors or Traitors to the Cell?, pages 1157-1166, 2005, mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons

verstärkte oder veränderte Reparatur kann zur Resistenzentwicklung beitragen [38]. Im Zusammenhang mit CDDP sind vor allem Resistenzen mittels „Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)“ aber auch mittels „Homologer Rekombination (HR)“ und „DNA-Mismatch-Reparatur (MMR)“ beschrieben (siehe Abschnitte 1.5.1 und 1.5.2). Es kann aber auch, bei defekten oder inaktivierten Reparaturmechanismen (8) oder auch erfolglosen Reparaturzyklen (9) zunächst zu einer Hemmung der DNA-Replikation und zu einem Wachstumsarrest kommen (14). Somit kann die Chance auf eine erfolgreiche Reparatur gewahrt werden. Sollte dies nicht gelingen oder wird erst gar kein Arrest eingeleitet, kommt es zur Apoptose (15). CDDP-induzierte Schädigungen können über aktiviertes p53 und nachgeschalteter Bax-Aktivierung zur Apoptose führen [24, 27]. Während der Apoptoseinduktion werden alle energieverbrauchenden Prozesse in der Zelle, wie weitere Reparaturversuche, gestoppt (16).

Eine ineffiziente Erkennung und / oder eine ineffiziente Bearbeitung der nackten (6) oder maskierten (7) DNA-Addukte führt zu einer mangelhaften Reparatur (10) und darüber hinaus über eine „Translesion-Synthesis“ (TLS) (11) zum Bypass der Addukte [31] oder über direkte (12) bzw. indirekte (13) Signalwege zu zwei weiteren möglichen Folgen: zur Apoptose oder zum Überleben der Zelle bzw. einer Resistenzentwicklung.

Das MMR-System und die HMG-Proteine sind für eine Maskierung der DNA-Addukte (7) verantwortlich. Sie erkennen diese Addukte, bevorzugt die 1,2-(GpG)-Intrastrang-Addukte, und binden an diese. Dadurch wird eine Reparatur dieser Schädigungen verhindert. Es kann zu erfolglosen Reparaturzyklen kommen, die letztlich zur Apoptose führen. Es besteht aber auch eine direkte Verbindung zwischen der Addukt-Erkennung und der Signalweiterleitung zur Apoptose [27, 29]. Das MMR-System ist somit für die Apoptoseeinleitung wichtig. Defizite im MMR-System führen zu milden CDDP-Resistenzen und zur Mikrosatelliteninstabilität [43, 44].

Eine TLS (siehe Abschnitt 1.5.5.) kann zu Mutationen und / oder Resistenzen führen. Interessanterweise scheinen Defizite im MMR eine verbesserte TLS zu bedingen [25]. Diese Toleranz der DNA-Schädigungen scheint mit einer verminderten oder fehlenden Expression von apoptotischen Signalwegen verbunden zu sein [30, 45]. Eine veränderte Apoptoseeinleitung bzw. -neigung kann über viele Signalwege zu einer CDDP-Resistenz führen. Beschrieben sind u.a. Veränderungen im AKT-Signalweg, im c-Abl-Signalweg, in den p53-Signalwegen und in den MAPK / JNK / ERK-Signalwegen [27, 40]. Proteine der Bcl-2-Familie sind ebenfalls daran beteiligt.

Veränderungen in der Expression von Onkogenen wie *c-fos*, *c-myc*, *H-ras*, *c-jun* und *c-abl* werden ebenfalls mit CDDP-Resistenzen in Verbindung gebracht [25]. Es kommt

zu veränderten Adduktspiegeln und Veränderungen in deren Bildung sowie zu einer Schadenstoleranz und einer Aktivierung von anti-apoptotischen Signalwegen.

In Abbildung 1.5 sind nochmals alle für CDDP beschriebenen Resistenzmechanismen zusammengefasst. In dieser Arbeit wurden besonders Einfluss und Zusammenhang der Adduktbildung, die Bildung sekundärer DNA-Schädigungen sowie eine DNA-Reparatur und Schadenstoleranz bzw. eine TLS untersucht (grau umrandet).

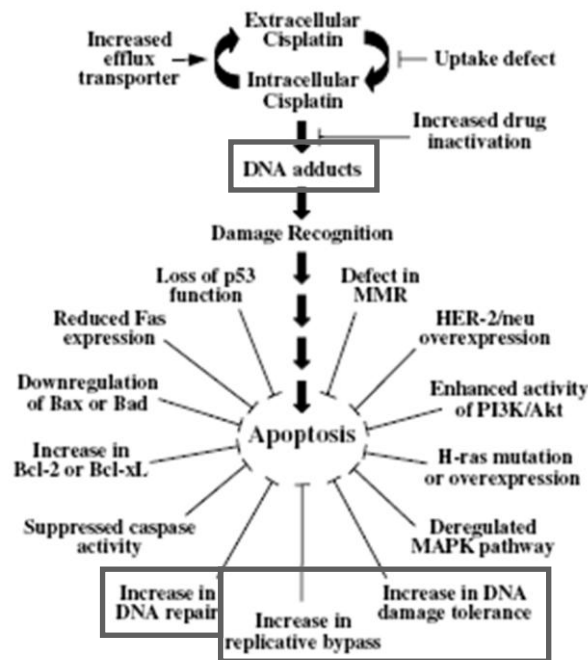


Abbildung 1.5: Mechanismen, die die CDDP-induzierte Apoptose inhibieren und damit zu Resistenzen führen. Gewöhnlich sind mehrere Mechanismen beteiligt, was den multifaktoriellen Charakter einer CDDP-Resistenz verdeutlicht, Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Oncogene*; 22(47), pages 7265-7279 (Siddik, Z. H., Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance.), copyright 2003

1.4 CDDP in der Therapie von TGCTs

Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, werden TGCTs mit Cisplatin nach dem PEB-Schema (Tabelle 1.1) behandelt. Unter Anwendung dieser CDDP-Chemotherapie kann sogar bei metastasierenden Verlaufsformen eine Heilungsrate von > 80 % erreicht werden [4]. Was zu dieser außergewöhnlichen Hypersensitivität von TGCTs gegenüber CDDP beiträgt, wird im folgenden Abschnitt erläutert. Trotz dieses hervorragenden Therapieansprechens tritt in 20 % aller Fälle eine intrinsische oder erworbene Chemosensitivität auf. Mögliche Ursachen in der Resistenzentwicklung gegenüber CDDP sind in allen zellulären Vorgängen zu suchen, die auch für die Sensitivität verantwortlich sind. Sie werden in Abschnitt 1.4.2 näher erklärt.

1.4.1 CDDP-Sensitivität von TGCTs

Man vermutet, dass auch der Ursprung der Typ II-TGCTs deren Hypersensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien, wie Bestrahlung oder Chemotherapie, erklärt [7]. Dies reflektiert die Biologie ihrer Ursprungszellen, den Gonozyten.

Nach i.v.-Applikation von CDDP passiert das Molekül die Zellmembran größtenteils mittels Diffusion. CDDP kann aber auch über eine aktive Aufnahme durch Membranproteine oder über Transmembranpumpen in das Zytosol gelangen. Das Fehlen von Exportpumpen mit einer spezifischen CDDP-Affinität ist ein möglicher Bestandteil der Prozesse, die für die Chemosensitivität verantwortlich sind [41].

In der Zelle werden, wie zuvor beschrieben, DNA-Addukte gebildet, auf die die Zelle auf verschiedensten Wegen reagieren kann. Die Addukt-Bildung ist für die zytotoxische Wirkung wichtig. In Keimzelltumoren wurden nach einer CDDP-Behandlung höhere Adduktspiegel gemessen als in Kolonkarzinomen [46]. Letztere gelten außerdem als eher CDDP-resistent. Masters und Koberle geben an, dass die Behandlung mit CDDP in unterschiedlichen Krebsarten zu einer großen Spanne im Gehalt an platinierter DNA führt, was den Adduktspiegel in TGCTs einschließt [4]. Die Detektion von DNA-Schäden erfolgt über Erkennungsproteine und soll durch weitere Prozessierung, auch mittels Zellzyklusarrest, eine Reparatur der DNA ermöglichen. Diverse Untersuchungen weisen darauf hin, dass TGCTs nach einer CDDP-Behandlung keine adäquate DNA damage response aktivieren können; dies beinhaltet die Schadenserkenkung sowie die Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten [47]. Hoden-spezifische HMG-box-Proteine scheinen an der Maskierung der DNA-Addukte beteiligt zu sein [4]. Die Komponenten des MMR-Systems können außerdem die Schadenserkenkung mit der Apoptoseeinleitung verbinden [41, 48]. Als ein weiterer Aspekt könnte daher eine Überexpression von p53 zu der Hypersensitivität der TGCTs beitragen. Im Umkehrschluss bedeutet dies aber nicht, dass alle TGCTs mehr intaktes p53 exprimieren [4].

Die Reparatur der DNA-Schädigungen erfolgt in erster Linie mit Hilfe des NER-Systems [49], aber auch mit Hilfe von Reparaturwegen wie dem MMR-System. Studien über die NER im gesamten Genom deuten darauf hin, dass einige TGCT-Zelllinien ein Reparaturdefizit aufweisen [30, 50] und dass dieses Defizit zur deren außergewöhnlicher Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Substanzen beiträgt [13, 15, 51]. Die geringe Kapazität des NER-Systems ist oftmals mit niedrigen Spiegeln der Proteine XPA, XPF und ERCC1 assoziiert [4, 13, 52-54]. XPF und ERCC1 sind auch an der HR zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) beteiligt [55]. Daher könnten niedrige Proteinspiegel gleichzeitig die DSB-Reparatur beeinflussen.

In den meisten Zellen wird die „Stressantwort“ durch Zellzykluskontrollmechanismen moduliert. Sie sind einer Apoptose vorgeschaltet. Während eines Zellzyklusarrests versuchen die Zellen, einen Schaden zu reparieren oder den Schaden zu umgehen. Ist eine vollständige Reparatur der DNA-Schäden nicht möglich, wie bei Keimzelltumoren vermutet, wird die Apoptose eingeleitet [56]. Die grundsätzlich hohe Empfindlichkeit der Keimzelltumore für den programmierten Zelltod spielt eine Schlüsselrolle bei ihrer hohen intrinsischen Chemosensitivität [4, 57]. Neben dem intrinsischen spielt auch der extrinsische Apoptosesignalweg eine Rolle, so dass eine anormale Expression der Bcl-2-Homologe (hohes Bax : Bcl-2 Verhältnis) und ein deregulierter „Fas-Signalweg“ an der Hypersensitivität beteiligt sind [58-60]. Die p53-unabhängige Apoptoseinduktion nach CDDP-Behandlung kann in TGCTs tlw. auch mittels Aktivierung des MEK-ERK-Signalweges ablaufen [61]. Fung *et al.* fanden in zehn TGCT-Zelllinien eine erhöhte MAD2-Expression. Diese war mit der CDDP-Sensitivität korreliert, welche wiederum mit der Aktivierung des MEK-Signalweges assoziiert war [62].

Diese regulierenden Aufgaben werden von sehr vielen Proteinen wahrgenommen. Einige von diesen werden in TGCTs im Vergleich zu Zellen anderen Ursprungs abweichend exprimiert. Das könnte zur Chemosensitivität beitragen [25, 63]. Eine anormale Expression von Proteinen der Zellzyklusregulation kann den Verlust einer Kontrollpunkt-Aktivierung bedeuten. Es ist z.B. beschrieben worden, dass der „G₁/S-Kontrollpunkt“ in TGCTs dereguliert sei. Die Folgen einer CDDP-Behandlung sind daraufhin ein verfrühter Eintritt in die S-Phase und die Apoptose [63, 64]. Im Gegensatz dazu ist der „G₂/M-Kontrollpunkt“ in TGCTs, z.B. der NT-2-Zelllinie, intakt [65, 66]. Dem kann allerdings eine zeitlich verzögerte S-Phase vorausgehen [24].

Als ein weiterer Mechanismus zur Erklärung der Chemosensitivität ist die geringe Detoxifikationsfähigkeit von Keimzelltumorzellen zu nennen. Untersuchungen zum Akkumulationsverhalten von Cisplatin zeigten im Vergleich zwischen TGCT-Zelllinien und CDDP-resistenten Kolonkarzinomzelllinien keinen signifikanten Unterschied [41]. Zudem wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Glutathion-Konzentration bei Keimzelltumoren, im Vergleich zu anderen Tumoren, sehr gering ist [14]. Die Expression von Metallothionein wies dagegen vergleichbare Spiegel zu anderen Tumoren auf [41].

Seit langem ist bekannt, dass CDDP-Addukte während der Replikation und der DNA-Reparatur zu DNA-Einzel- (SSB) und Doppelstrangbrüchen (DSB) abgebaut werden können [66, 67]. Dieser Prozess kann zur Zytotoxizität von CDDP beitragen [68-70]. Widersprüchliche Daten über das Vorkommen und die Häufigkeit dieser sekundären DNA-Schädigungen verdeutlichen, dass dieser Prozess vom Zelltyp und der Art der CDDP-Behandlung abhängig ist.

1.4.2 CDDP-Resistenz in TGCTs

Mögliche Ursachen 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 von Cisplatin in die Zelle abgeschwächt oder nicht möglich, so kann eine Resistenz bereits durch das Nicht-Erreichen des Wirkortes bzw. Wirkspiegels entstehen. Unter diesem Aspekt ist ein möglicherweise erhöhter Efflux, z.B. über ABC-Transporter oder „Multi-drug-resistance-Proteine“ (MDR-Proteine) zu berücksichtigen. Allerdings konnten bei fünf Exportproteinen der MDR-Familie (MRP1, MRP2, PGP, BCRP und LRP) keine signifikanten Unterschiede zwischen sensitiven und resistenten TGCTs festgestellt werden [41].

Die Detoxifikationsfähigkeit durch Proteine wie Glutathion und Metallothionein sowie deren Beitrag zu einer CDDP-Resistenz wurde bereits in Abschnitt 1.3.4 beschrieben. Auch wenn einzelne Untersuchungen an EC-Zelllinien Zusammenhänge zwischen dem Glutathion-Spiegel und einer Resistenz beobachten konnten [37], konnten jedoch zwischen sensitiven und refraktären TGCT-Zelllinien und Tumorproben keine Unterschiede in der Expression von Metallothionein und der Glutathion-S-Transferase gefunden werden [4, 41]. Die Detoxifikationsmechanismen scheinen demzufolge in der Resistenzentwicklung von TGCTs nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Auch in den initialen Adduktspiegeln sensitiver und resistenter TGCT-Zelllinien konnte kein Unterschied festgestellt werden [71]. Eine Toleranz oder Reparatur der DNA-Schädigungen scheint wichtiger.

Eine Reparatur und damit eine Reduktion der DNA-Adduktspiegel ist auch in TGCT-Zellen ein wichtiger Mechanismus der erworbenen CDDP-Resistenz. Der Verlust eines funktionsfähigen MMR-Systems ist häufig im Zusammenhang mit einer *in vitro* auftretenden CDDP-Resistenz beschrieben [31, 45, 72]. In Tumorproben von Patienten mit refraktären oder resistenten TGCTs wurde eine hohe Inzidenz für einen MMR-Mangel beobachtet [5, 43, 73]. In 20-40 % der refraktären TGCTs trat eine Mikrosatelliteninstabilität auf [43, 74, 75].

Hingegen ist die NER für die Entfernung der platinieren DNA-Intrastrang-Addukte verantwortlich [27, 30]. Eine sekundäre CDDP-Resistenz kann durch eine verstärkte NER-Effizienz bedingt sein. Ein Anstieg der NER- und HR-Effizienz in TGCTs könnte daher durch eine vermehrte Expression der Schlüsselproteine XPA, XPF und ERCC1 erreicht werden. Insbesondere hinsichtlich der ERCC1-Expression, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, konnte das in einigen Studien an Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom [76] sowie Ovarial- und Magenkrebs gezeigt werden [77-79]. In anderen Studien hingegen fehlte dieser Zusammenhang [80, 81].

Kommt es trotz einer DNA-Reparatur zur Apoptoseinduktion, 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 [82, 83].

Aber auch der Verlust der CDDP-induzierten Aktivierung des CD95 / Fas-Todesrezeptor-Signalweges kann eine Apoptose unterbinden [84]. Der p53 Status ist scheinbar nicht bestimmend für die Resistenzentwicklung [4]. Im Mausmodell zeigte sich auf Grund von Aktivierungen p53-unabhängiger Signalwege kein Unterschied in der Hemmung der Zellproliferation [85].

1.5 DNA-Reparaturmechanismen und CDDP-Resistenz

Von den vier Hauptwegen zur DNA-Reparatur - Nukleotid-Excisions-Reparatur (NER), Basen-Exzisions-Reparatur (BER), Mismatch-Reparatur (MMR) und DSB-Reparatur via Homologer Rekombination (HR) und / oder „Non-homologous end-joining (NHEJ)“ - ist NER der Hauptweg zur Entfernung der CDDP-Addukte [30].

DNA-Reparaturmechanismen sind wichtig für die genomische Stabilität der Zelle. In Tumorzellen kann eine verstärkte bzw. veränderte Reparatur zum zellulären Überleben und damit zur Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Substanzen führen.

Für eine CDDP-Resistenz kann eine verstärkte DNA-Reparatur entscheidend sein. Die NER und ihre Schlüsselproteine spielen dabei eine wichtige Rolle [76-79]. Ihr Ablauf wird daher näher erläutert. ERCC1, das Schlüsselprotein der NER, spielt auch in der Crosslink-Reparatur der induzierten ICL und der HR zur Reparatur der sekundär gebildeten DSB eine Rolle. Diese beiden Reparaturwege werden daher ebenfalls dargestellt. Außerdem erfolgt ein kurzer Einblick in die Signalwege im Anschluss an eine DSB-Bildung.

Eine erhöhte Toleranz der CDDP-Addukte hat, gerade in letzter Zeit, hinsichtlich einer CDDP-Resistenz immer mehr an Bedeutung gewonnen und steht im Zusammenhang mit den genannten Reparaturwegen. Der Ablauf einer TLS wird ebenfalls vorgestellt.

1.5.1 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Die NER stellt das wichtigste System zur Reparatur UV-induzierter Schäden, sogenannter Photoprodukte dar. Im Allgemeinen werden voluminöse, sperrige DNA-Schäden repariert, wie UV-induzierte Dimere, an die DNA gebundene polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, aber eben auch Platin-DNA-Addukte [49]. Diese DNA-Schädigungen verändern die helikale Struktur der DNA und stören so die DNA-Replikation und die Transkription.

Alle drei Typen der Intrastrang-Addukte werden vom NER-System erkannt. Die 1,2-d(GpG)-Intrastrang-Addukte werden weniger effizient repariert. Darauf basiert auch die Vermutung, dass die 1,2-d(GpG)-Intrastrang-Addukte für die toxische Wirkung von CDDP verantwortlich sind [29].

In der humanen Erbkrankheit Xeroderma Pigmentosum (XP) liegt ein NER-Defekt vor. Die Patienten zeigen eine extreme Photosensitivität und eine um den Faktor 2000 erhöhte Inzidenz für Hautkrebs [86]. Außerdem haben diese Patienten eine höhere Inzidenz für innere Tumore und neurologische Anomalien.

Die NER besteht aus drei wesentlichen Schritten: 1. Schadenserkennung und die Bildung des Inzisionskomplexes, 2. beidseitiger Einschnitt am geschädigten DNA-Strang und das Herauslösen des geschädigten Bereichs und 3. DNA-Synthese und Ligation (siehe Abbildung 1.6).

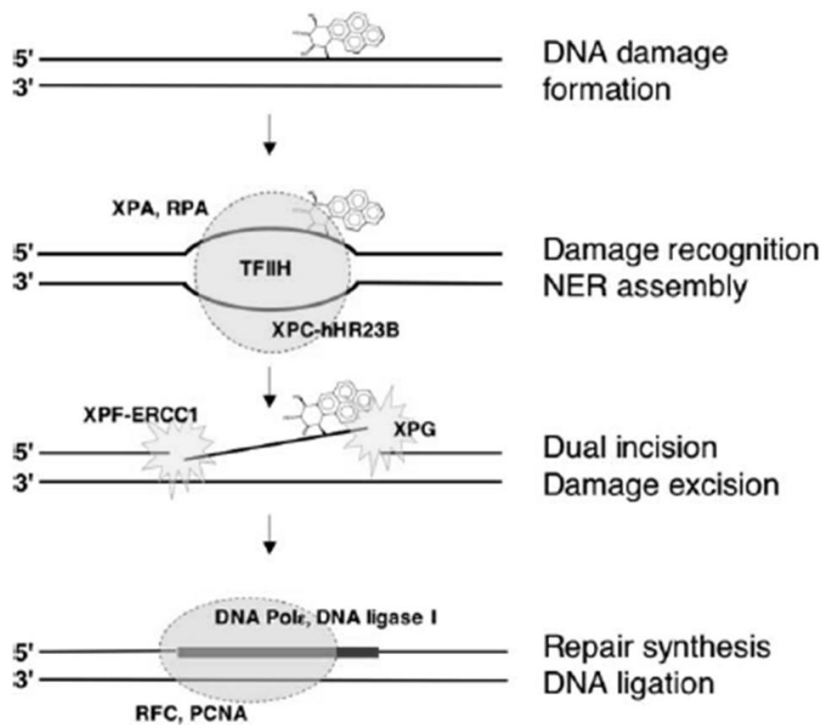


Abbildung 1.6: Ablauf der NER, der geschädigte DNA-Strang trägt ein polyzyklisches aromatisches Kohlenwasserstoff-Addukt, vereinfacht, aus Dip 2004⁴

Am NER sind mehrere Proteine beteiligt. Essentiell sind sechs Reparaturfaktoren, die aus 15 Polypeptiden bestehen [34, 49]. Sie können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Schadenerkennung und Exzision (z.B. ERCC1 und XPA) sowie Helikase-Typen (z.B. XPB und XPD).

Die DNA-Schädigung wird durch die kooperative Bindung von RPA, XPA und XPC-TFIIH erkannt. Die vier Proteine bilden einen Komplex an der DNA-Bindungsstelle. Mittels kinetischer Korrekturlesung (TFIIH) wird kontrolliert, ob überhaupt eine Schädigung vorliegt. Ist dies nicht der Fall, dissoziiert der Komplex nach ATP-Hydrolyse durch die XPB- und XPA-Helikasen von der DNA.

⁴ Reprinted from DNA Repair; 2(11), Ramiro Dip, Ulrike Camenisch, Hanspeter Naegeli, Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair, Pages 1409-1423, 2004, with permission from Elsevier

Enthält die Bindungsstelle einen Schaden, wird durch die ATP-Hydrolyse die DNA-Duplexstruktur um den Schaden herum geöffnet. An einer geschädigten DNA ist die Bindung der Proteine stabiler. So entsteht der Präzisionskomplex 1 (PIC1). Im nächsten Schritt ersetzt XPG dann XPC, um einen stabileren Präzisionskomplex 2 (PIC2) zu bilden. Daraufhin assoziiert der XPF-ERC1-Komplex an der Schädigung und es entsteht der Präzisionskomplex 3 (PIC3). Der geschädigte DNA-Strang wird nun vom 3'-Ende etwa 3-9 Basenpaare vom Schaden entfernt durch XPG und am 5'-Ende etwa 15-25 Basenpaare vom Schaden entfernt von XPF-ERCC1 eingeschnitten. Das entstandene 24-32 Basenpaar-Oligomer wird freigesetzt und die Lücke mittels Polymerase δ bzw. ϵ und der Hilfe von PCNA („proliferating cell nuclear antigen“) und RFC („replication factor c“) aufgefüllt. Der ungeschädigte Strang bleibt während der Reparatur unverändert und dient als Template zur DNA-Synthese [86].

In Eukaryonten existieren zwei Wege der NER. Die „transcription coupled repair (TCR)“ und die „global genome repair (GGR)“. In der GGR erfolgt die Schadenserkenkung durch den XPC/hHR23B-Komplex und einer anschließenden Verifizierung mittels XPA/RPA. Die Schadenserkenkung in der TCR erfolgt durch eine geblockte RNA-Polymerase II während der Transkription [87]. Sie benötigt außerdem die Proteine CSA und CSB [86] und ein funktionsfähiges MMR-System [51]. Die TCR entfernt DNA-Schäden vom transkribierten Strang aktiver Gene und ist daher effizienter [86].

Drei der NER-Proteine erfüllen noch andere Funktionen. So ist RPA auch für die Replikation, TFIIH auch für die Transkription und ERCC1 auch für die Rekombination wichtig [34]. ERCC1 („excision repair cross complementing 1“) scheint das Schlüsselprotein in der NER zu sein [49]. Es ist wichtig für die Schadenserkenkung, die Exzision und die HR [88]. Eine Überexpression ist mit einer CDDP-Resistenz assoziiert [13, 15, 38, 76, 78], wohingegen eine geringere Endonukleasekapazität und ein vermindertes Erkennen der DNA-Schäden zu empfindlicheren Zellen führt [53, 54, 79].

1.5.2 Homologe Rekombination (HR)

Das Genom einer Zelle ist diversen schädigenden Einflüssen ausgesetzt, die zur Entstehung von DSB in der DNA führen können. Hierzu zählen sowohl exogene Faktoren wie ionisierende Strahlen und Chemikalien als auch endogene Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies und durch blockierte und kollabierte Replikationsgabeln. Hinzu kommen DSB, die im Rahmen der Meiose gebildet werden. Außerdem kann es auch im Verlauf der DNA-Adduktbearbeitung zu DSB kommen (siehe Abschnitt 1.5.3). Bereits ein einziger Doppelstrangbruch kann, wenn er nicht repariert wird, letal sein. Eukaryonten verfügen über drei Systeme zur schnellen und effektiven Reparatur: das NHEJ und die HR, sowie eine Variante des HR, das „Single strand annealing (SSA)“ [89]. Da im Zusammenhang mit einer CDDP-Behandlung und der Schadensbearbeitung die HR von Bedeutung ist, wird auf deren Ablauf näher eingegangen.

Zunächst werden bei der HR die freien DNA-Enden des DSB durch den auch beim NHEJ beteiligten Mre11 / Rad50 / Nbs1-Komplex in 5'→3'-Richtung zugeschnitten und durch Bindung von Rad52 vor einen weiteren Abbau durch Exonukleasen geschützt. Die entstandenen 3'-Einzelstrang-Enden dringen nachfolgend mit Hilfe von Rad51 in die DNA-Doppelhelix eines homologen, ungeschädigten Partnermoleküls ein. Dort werden sie durch DNA-Polymerase verlängert, wobei der komplementäre DNA-Strang des homologen Partners als Vorlage dient. Die dabei erzeugten Überkreuzungen der DNA-Stränge („Holliday junctions“) werden abschließend gelöst, so dass zwei intakte DNA-Doppelstranghelices entstehen [34, 90-92] (siehe Abbildung 1.7).

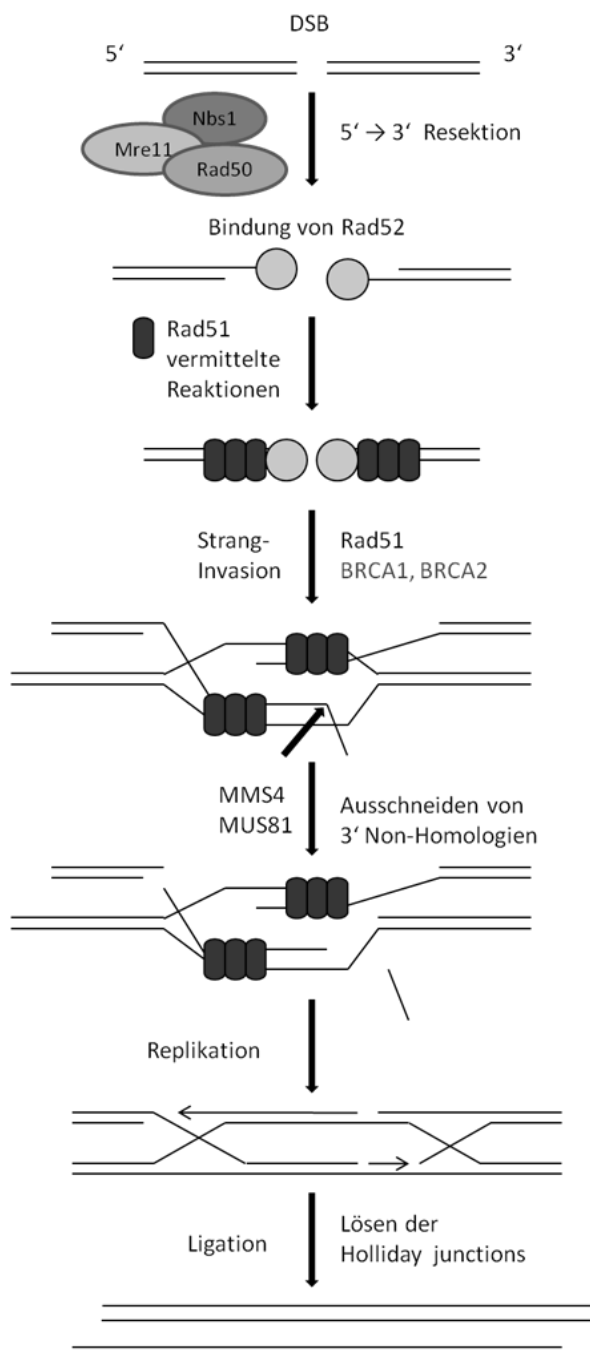


Abbildung 1.7: Ablauf der HR. Die HR ist Rad51-abhängig. Ein wichtiger Zwischenschritt der HR ist die Bildung sogenannter Holliday junctions: Überkreuzungen der DNA-Stränge. Sie werden mittels MUS81•MMS4 aufgelöst und es entstehen zwei intakte DNA-Doppelstranghelices, nach Sançar 2004 [34]

Für die HR wird ein ungeschädigter, homologer DNA-Abschnitt benötigt, also eine Sequenzwiederholung oder ein Schwesterchromatid [93]. Letzteres tritt erst in der späten S- sowie in der G₂-Phase des Zellzyklus auf, weshalb die HR nur in diesem Zeitraum den bevorzugten Weg zur Reparatur von DNA-DSB darstellt [89]. Allerdings ist die HR dank dieses Schritts durch eine hohe Präzision gekennzeichnet, da die zu komplettierende Sequenz von einer intakten Matrize abgelesen wird. Die Reparatur erfolgt jedoch, im Vergleich zum NHEJ, langsamer [94].

Das zentrale Protein der HR ist Rad51. Es gehört wie die meisten HR-Proteine zur Rad52-Familie und ist essentiell für die Katalyse der Stranginvasion in das homologe Molekül. Rad51 wird vor allem in der S- und G₂-Phase des Zellzyklus gebildet und wandert nach Schädigung der DNA vom Zytosol in den Nukleus, wo es mit Rad52 sowie BRCA1 und BRCA2 in Form von Foci co-lokalisiert wird [89].

Darüber hinaus sind bei der HR eine Reihe weiterer Proteine beteiligt, die die Reparatur regulieren, darunter BRCA1 und BRCA2, sowie c-Abl und ATM. BRCA1 und c-Abl sind für die Regulation von RAD51 zuständig. BRCA1 bewirkt dies durch dessen subzelluläre Relokalisation von RAD51 vom Zytoplasma in den Nukleus mittels BRCA2 [93], welches als Mediator die RAD51 Foci-Bildung kontrolliert. BRCA1 co-lokalisiert zudem mit dem Nbs1 / RAD50 / Mre11-Komplex [95]. BRCA1 ist somit für die DNA damage response nach DSB-Bildung mitverantwortlich [90] und wird im Zuge der DSB-Erkennung und einer HR an Doppelstrangbrüchen angereichert. Außerdem wird BRCA1 eine Rolle in der MMR zugeschrieben [96]. Es wird vermutet, dass BRCA1 und BRCA2 für die vermittelnde Antwort auf eine Chemotherapie wichtig sind. BRCA1 ist an der Bildung des BASC-Komplexes („BRCA1-associated genome surveillance complex“) beteiligt. Dieser besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, u.a. aus dem MMR-System [38]. *In vitro* wurde gezeigt, dass eine Hemmung des FA / BRCA-Signalweges die Chemosensitivität erhöht und dass eine Reparatur dieser Defekte die Resistenz gegen CDDP erhöht. BRCA-Defizite stehen mit erhöhten Chemosensitivitäten in Zusammenhang [70, 97, 98]. Eine Wiederherstellung der BRCA-Funktionalitäten erhöht die Chemosensitivität der Zellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen [99-101], vermutlich über eine verminderte Apoptoseinduktion [102].

1.5.3 Interstrang-Crosslink-Reparatur

Sancar *et al.* beschreiben eine spezielle Interstrang-Crosslink-Reparatur. Dabei arbeiten NER und HR aufeinander abgestimmt oder nacheinander, um diese ICL von der DNA zu entfernen [34]. Andere Arbeitsgruppen bestätigen das Modell einer eigenen Crosslink-Reparatur [55, 103].

ICL induzieren Doppelstrangbrüche (DSB) während der Replikation. Dies geschieht vermutlich durch geblockte und kollabierte Replikationsgabeln und einen Nuklease-Abbau. Ausgehend von diesen DSB kommt es durch die XPF-ERCC1-Nuklease zu einem Abbau eines der DNA-Stränge und damit zu einer Konvertierung des ICL in ein Intrastrang-Dinukleotid-Addukt, welches benachbart zu einem DSB vorliegt. Die Rekombinationsproteine (Rad51, Rad52, XRCC2, XRCC3, RPA) generieren daraufhin die Holliday-junctions, die durch den MUS81•MMS4-Komplex aufgelöst werden. Dieser Weg scheint der Hauptweg zu sein [34].

Ferner existiert ein Nebenweg, der das gesamte NER-System und fehleranfällige Polymerasen (wie Polymerase η) beinhaltet. Neueste Untersuchungen zeigen, dass der FA-Komplex aus den FANC-A, -C, -E, -F-Proteinen, zusammen mit dem Mre11 / Rad50 / Nbs1-Komplex und BRCA1 / BRCA2 sowohl an der Crosslink-Reparatur als auch der HR beteiligt ist [34].

Untersuchungen im Zellkulturmodell konnten zeigen, dass ein ERCC1-Defizit eher die ICL-Reparatur als die Intrastrang-Addukt-Reparatur hemmt [54, 104]. Die Anzahl und Frequenz ICL-induzierter DSB sind in Zellen mit einem ERCC1-Mangel höher als in Zellen ohne diesen Mangel. Desweiteren persistieren diese DSB. Die Zellen sind äußerst empfindlich gegenüber einer CDDP-Behandlung [105]. In resistenten Ovarialkarzinomzelllinien konnte außerdem gezeigt werden, dass eine veränderte ICL-Bildung sowie deren Reparatur zur Resistenz beitragen [106].

1.5.4 Zellzykluskontrollpunkte und Signalweiterleitung

Eine DNA-Schädigung aktiviert ein komplexes Signalnetzwerk in der Zelle. Sie triggert eine Protein-Phosphorylierungskaskade [92]. Dadurch kommt es zur Koordination von Prozessen wie Reparatur, Zellzyklusarrest und Apoptose.

Die Kontrollpunkte während des Zellzyklus können abhängig von Ausmaß und Art einer DNA-Schädigung zu einem verzögerten, arretierten oder unveränderten Zellzyklusverlauf führen. Es gibt vier Zellzyklusphasen (G_1 , S, G_2 und M). Die Kontrollpunkte gelten nicht nur für akute DNA-Schädigungen, sondern werden regulär im Zellzyklusverlauf durchlaufen. Sie sichern damit also auch die genomische Stabilität.

Die Signalweiterleitung nach Erkennung eines DNA-Schadens besteht aus drei Komponenten: den Sensoren, den Überträgern und den Effektoren. Hinzu kommen sogenannte Mediatoren. Sie stehen zwischen den Sensoren und Überträgern und unterstützen erstere [34]. Das Schlüsselprotein in der Signalkaskade ist ATM. Es wird nach der Entstehung von DSB aktiviert. Ein verwandtes Protein ist ATR. Es wird durch UV-induzierte Schäden und geblockte Replikationsgabeln aktiviert. Nach Aktivierung dieser Proteine kommt es durch deren Kinase-Aktivitäten zu Phosphorylierungen weiterer Proteine wie p53, BRCA1, Nbs1, Chk1 und Chk2. ATM ist dabei für die Chk2- und ATR für die Chk1-Phosphorylierung verantwortlich [34, 92].

BRCA1 scheint für die Signalweiterleitung nach Schädigungen durch ionisierende Strahlen wichtig zu sein (Abbildung 1.9). BRCA1 ist außerdem an der TCR zur Entfernung oxidierter DNA-Basen beteiligt. Es ist allerdings unklar, ob direkt an der Reparatur oder indirekt mittels Signalweiterleitung. Hingegen scheint BRCA2 wichtig für die Signalweiterleitung nach UV-induzierten Schädigungen [89] zu sein.

DNA-DSB induzieren die Phosphorylierung von Histon A2X (γ H2AX) an Ser139 [107] mittels ATM, ATR oder DNA-PK. Es kommt an den Strangbrüchen zur Akkumulation klarer Foci [108]. Eine Induktion von DSB mittels genotoxischer Substanzen führt zu einer H2AX-Phosphorylierung mittels ATM. Diverse Kontroll- und DNA-Reparaturproteine wie Rad50, Rad51 und BRCA1 co-lokalisieren mit γ H2AX (Abbildung 1.8). γ H2AX ist demzufolge ein Mediator der DNA damage response. Es vermittelt außerdem die Translokation von 53BP1 („p53 binding protein“) an strahleninduzierte Foci [109]. Ein Verlust von H2AX führt zu genomischer Instabilität und einer erhöhten Strahlensensitivität [110].

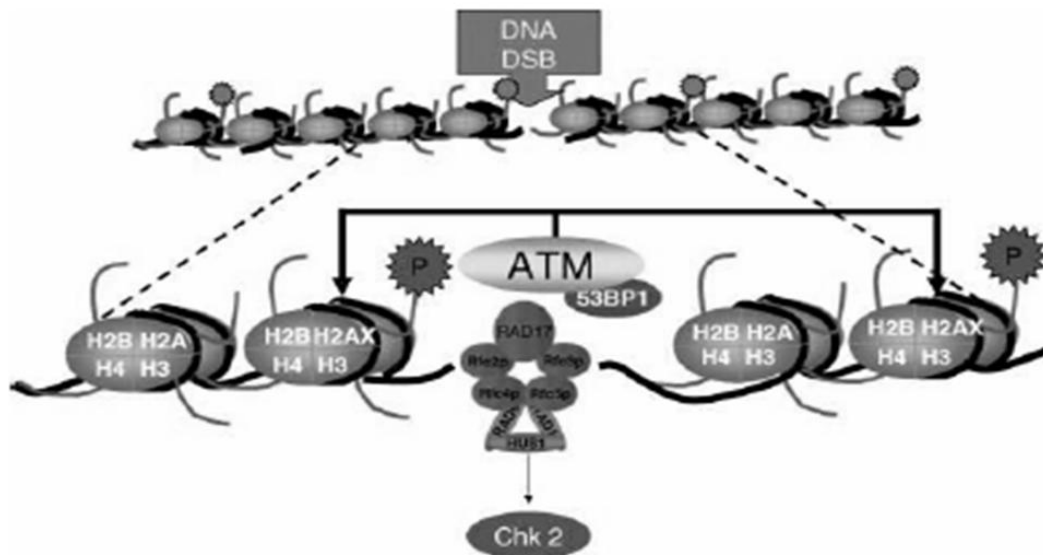


Abbildung 1.8: Histon 2AX wird nach einer DSB-Induktion mittels ATM phosphoryliert und akkumuliert als klare γ H2AX-Foci am Strangbruch. Eine Vielzahl weiterer Proteine akkumulieren daraufhin ebenfalls an der Schadensstelle, aus Huang 2005⁵

Die γ H2AX-Bildung kann aber auch im Zusammenhang mit DSB, die während der Meiose oder der V(D)J-Rekombination gebildet werden, auftreten (intrinsische H2AX-Phosphorylierung). Diese Foci sind kleiner und weniger deutlich ausgeprägt als die Foci, die auf Grund exogen-induzierter DSB gebildet werden.

⁵ aus Cell Proliferation; 38(4), Huang Xuan, Halicka H. Dorota, Traganos Frank, et al., Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis, pages 223-243, 2005, mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons

Auch die DSB, die während der Apoptose entstehen, induzieren eine γ H2AX-Foci-Bildung [69]. Die γ H2AX-Bildung erfolgt überwiegend in der S-Phase [90].

Der Signalweg, der zu einer Bildung von Signal- und Reparatur-Foci nach DSB-Bildung durch ionisierende Strahlen führt, ist verzweigt und zeigt eine regulatorische Hierarchie (Abbildung 1.9). 53BP1 ist sowohl ein Überträger der schadensinduzierten Signalwege als auch ein wichtiger Faktor der Intra-S- und G₂/M- Kontrollpunkte [111, 112]. 53BP1 und H2AX sowie Nbs1 und Mre11 werden für eine ATM-abhängige NHEJ-Reparatur von DSB benötigt [112].

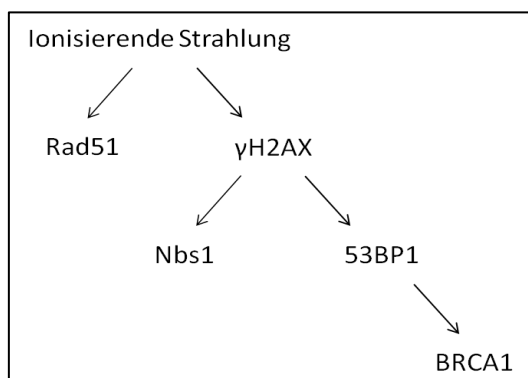


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der hierarchischen Bildung von nukleären Foci unterschiedlicher Proteine nach DSB-Bildung durch ionisierende Strahlen, nach Wang 2002 [111]

1.5.5 Translesion Synthesis (TLS)

Während der Replikation können durch die DNA-Schädigungen geblockte Replikationsgabeln entstehen. Abhängig von der Art der Schädigung kann der Organismus auf diese reagieren. In manchen Fällen sind die Schädigungen nicht reparabel oder die DNA-Helix durch eine fortgeschrittene Replikationsgabel bereits entspannt und somit eine Verwendung des ungeschädigten Stranges als Template zur DNA-Synthese nicht mehr möglich. Ein zelluläres Überleben trotz persistierender DNA-Addukte kann durch eine TLS (auch „replicative bypass“) vermittelt werden. Es kommt zu einer Toleranz gegenüber der DNA-Schädigung. Eine TLS ist somit streng genommen kein DNA-Reparatur-Mechanismus, da die Schädigung - zumindest vorübergehend - an der DNA verbleibt. Dennoch ist sie eine wichtige Komponente der Zellantwort auf eine DNA-Schädigung und trägt zum zellulären Überleben bei.

Einige DNA-Polymerasen können DNA-Basen gegenüber einer DNA-Schädigung einbauen. Dies geschieht wenig genau und ermöglicht mutagene Replikationen [113]. Diese Polymerasen zeigen außerdem eine geringe Prozessivität und bauen nur einige wenige Basen ein, bevor sie wieder vom DNA-Templatestrang dissoziieren. Andere Polymerasen können dann die weitere Replikation übernehmen (Abbildung 1.10).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass Kombinationen von spezialisierten DNA-Polymerasen, abhängig von deren Art, an einer Schadensumgehung zusammenarbeiten [113].

An der Umgehung der meisten Schädigungen ist REV3L (pol ζ) in Kombination mit einer weiteren Polymerase beteiligt [113]. Die TLS eines CDDP-induzierten 1,2-Intrastrang-Addukts erfolgt mit pol η und pol ζ . Vermutlich besteht eine TLS immer aus einem Insertionsschritt mittels einer Polymerase der Y-Familie (z.B. pol η) und einem Verlängerungsschritt durch pol ζ . Eine Monoubiquitination von PCNA scheint an dem Polymerase-Wechsel beteiligt zu sein [114, 115]. Eine Beteiligung von mehr als zwei Polymerasen ist möglich. Eine große Anzahl Arbeitsgruppen konnte zeigen, dass eine erhöhte Toleranz von CDDP-Addukten eine wichtige Rolle in der CDDP-Resistenz spielt.

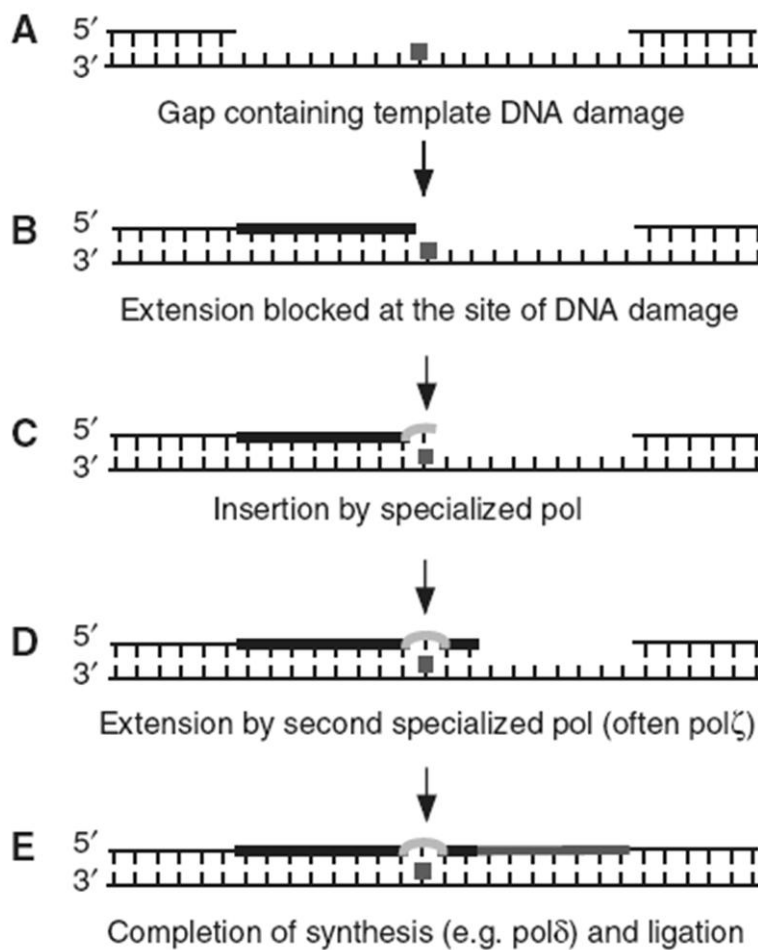


Abbildung 1.10: Arbeitsmodell einer TLS. Replikationspolymerasen stoppen an DNA-Schädigungen (B). Spezialisierte (TLS)-Polymerasen, abhängig von der Art der Schädigung, bauen eine bis einige wenige Basen gegenüber dieser Schädigung ein (C). Die weitere Verlängerung des synthetisierten DNA-Stranges erfolgt mit einer anderen Polymerase (D). Wenn eine TLS in der S-Phase erfolgt oder die Auffüllung großer Lücken in der DNA behoben wird, erfolgt ein Wechsel zurück zu einer Replikationspolymerase (E), Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *The EMBO Journal*; 28(4), pages 313-314 (Takata, K. and R. D. Wood, Bypass specialists operate together.), copyright 2009

Die wenig genauen Polymerasen, die an der Umgehung der CDDP-DNA-Addukte beteiligt sind, sind außer Polymerase (pol) η und pol ζ auch pol β und REV1 [114-119]. Hohe Spiegel dieser Polymerasen scheinen mit einer CDDP-Resistenz verknüpft zu sein und außerdem mit einer erhöhten Mutagenität zusammen zu hängen [117, 118, 120].

Drei Schritte sind für die TLS eines CDDP-GpG-Addukts essentiell: Insertion einer Base gegenüber dem 3'-G, Insertion einer Base gegenüber dem 5'-G und Verlängerung ausgehend vom 5'-G [120]. Die spezialisierten Polymerasen erfüllen diese Schritte unterschiedlich erfolgreich bzw. unterschiedlich fehleranfällig [119, 121].

Die spezialisierten Polymerasen erledigen weitere Aufgaben. Pol η kann auch UV-induzierte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere umgehen. Mutationen im pol η -Gen sind außerdem für die XP-Variante XPV verantwortlich [116]. Pol β ist zusätzlich an der BER beteiligt [34]. REV1 und pol ζ scheinen ebenfalls in der Interstrang-Crosslink-Reparatur (siehe Abschnitt 1.5.3) eine wichtige Rolle zu spielen [115]. Die beobachtete (genetische) Epistase zwischen den REV1-, pol ζ - und FANCC- („Fanconi anemia complementation group C“) Genen bezieht eine TLS in die Interstrang-Reparatur mit ein. Pol ζ scheint die DNA-Synthese gegenüber dem geschädigten DNA-Strang durchzuführen. Dies ist eine notwendige Vorbereitung des Tochterstranges zur nachfolgenden HR. Der Prozess der Intrastrang-Reparatur scheint unabhängig von einer PCNA-Monoubiquitination.

Defekte im MMR-System, wie z.B. veränderte oder fehlende hMSH6 und /oder hMLH1, führen zu einer gesteigerten TLS der CDDP-Addukte [31, 72]. Auch HMG1 verhindert die TLS der CDDP-Addukte.

Zwischen den einzelnen Reparatur- und /oder DNA damage response-Wegen bestehen also Kooperationen und Überschneidungen. Abbildung 1.11 stellt diese Zusammenhänge noch mal schematisch dar.

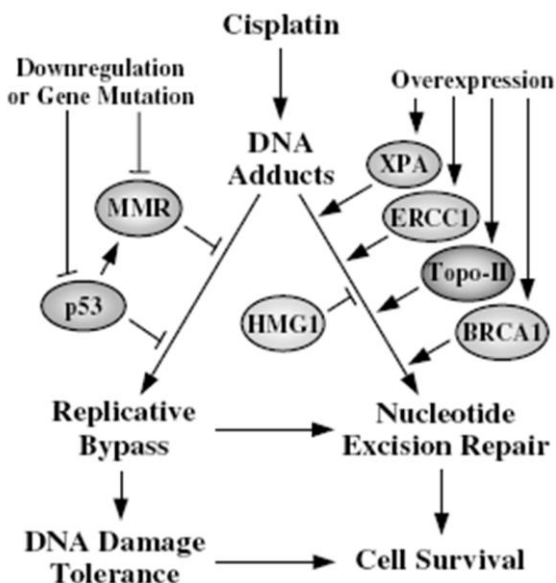


Abbildung 1.11: Faktoren, die eine DNA-Reparatur CDDP-induzierter Addukte modulieren und die eine TLS regulieren, Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Oncogene*; 22(47), pages 7265-7279 (Siddik, Z. H., Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance.), copyright 2003

1.6 Charakteristische Merkmale verschiedener Zelltodarten

Ziel einer Behandlung ist letztendlich der Zelltod der Krebszellen. Dieser lässt sich anhand des morphologischen und biochemischen Ablaufs in zwei Arten unterteilen: Apoptose und Nekrose. Die Apoptose ist ein von der Zelle aktiv regulierter Vorgang und wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet [122]. Hingegen kann die Nekrose von der Zelle nicht beeinflusst werden.

Die Apoptose gliedert sich morphologisch in zwei Phasen. In der ersten Phase kommt es zu einer Loslösung der apoptotischen Zelle von ihren Nachbarzellen sowie zur Kondensation von Chromatin und Zytoplasma. Es kommt außerdem zu einer Fragmentierung des Nukleus und der Ausbildung kleiner Vesikel an der Zellmembran. Diese sogenannten apoptotischen Körperchen werden nach und nach von der Zelle abgeschnürt [109]. Bereits im frühen Stadium der Apoptose kommt es zur Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite [123]. Die Zellmembran bleibt ansonsten intakt. In der zweiten Phase kommt es zur Phagozytose der abgeschnürten Vesikel und deren Wiederverwertung. Die Apoptose erhält somit die zelluläre Homöostase.

Die Nekrose ist dagegen durch einen Verlust der Membranintegrität gekennzeichnet. Es kommt zu einem Anschwellen der gesamten Zelle inklusive Nukleus, Endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien und letztlich zur Ruptur der Zellmembran. Durch den Austritt des Zellinhalts in den Extrazellulärraum entsteht eine lokale Entzündung [122, 124].

Auch CDDP induziert, abhängig von der Konzentration, diese zwei Arten des Zelltods [27, 125].

2 Fragestellung

Die Ursachen eines Therapieversagens in TGCTs, das fast ausschließlich in Nicht-Seminomen beobachtet wird, sind vielfältig und nicht vollständig aufgeklärt. Die Aufdeckung relevanter Faktoren und Mechanismen, die bei einer Resistenzentwicklung auftreten, ist für eine Verbesserung des Therapiemanagements äußerst wichtig.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Sensitivität und Resistenz maligner Keimzelltumore des Hodens gegenüber einer CDDP-Behandlung. Sie soll damit anhand von *in vitro*-Untersuchungen einen Beitrag zum Verständnis von Resistenzentwicklungen und Therapieansprechen leisten.

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, sind die Ursachen und Mechanismen einer CDDP-Resistenz vielfältiger Natur. Welche Mechanismen an der Resistenzentwicklung von Keimzelltumoren beteiligt sind, soll anhand folgender Überlegungen untersucht werden:

1. Welche zytotoxischen Effekte sind nach einer CDDP-Behandlung mit klinisch relevanten Konzentrationen zu beobachten und wann kommt es zum Tod der Zelle?
2. Welche Bedeutung hat die Addukt-Bildung bzw. DNA-Platinierung sowie deren Reparatur auf die Sensitivität bzw. Resistenzentwicklung in Keimzelltumoren?
3. Welcher Zusammenhang besteht zwischen der Addukt-Bildung und der Bildung sekundärer DNA-Schädigungen? Welche Bedeutung haben diese sekundären DNA-Schädigungen auf das Therapieansprechen und die unterschiedlichen Resistenzniveaus der Zelllinien?
4. Ist eine erhöhte Schadenstoleranz bzw. eine TLS an der Resistenzentwicklung in Keimzelltumoren beteiligt? Welcher Zusammenhang besteht mit der Bildung der DNA-Addukte und den sekundären DNA-Schädigungen?
5. Welche Unterschiede bestehen in Seminomen zwischen den toxischen Effekten einer Bestrahlung und denen einer CDDP-Behandlung?

Die Untersuchungen erfolgten an der Embryonalkarzinomzelllinie NT-2 und deren generierter, CDDP-resistenter Sublinie NT-2-R. Vergleichende Analysen erfolgten an der einzig etablierten Seminomzelllinie TCam-2.

3 Ergebnisse

Zunächst erfolgte die Bestimmung geeigneter Inkubationsbedingungen. In den anschließenden Abschnitten der Arbeit wurde daraufhin die Reaktion von Keimzelltumoren auf die Behandlung mit CDDP an der Embryonalkarzinomzelllinie NT-2 und ihrem resistenten Subklon NT-2-R untersucht. Diese beiden Zelllinien wurden als repräsentative Gruppe von Nicht-Seminomen mit vornehmlich Embryonalzellkarzinom-Charakter mit der Seminomzelllinie TCam-2 verglichen. Da TCam-2 die derzeitige einzig etablierte Seminomzelllinie darstellt, war hier ein zusätzlicher Gruppenvergleich nicht möglich. Bei den Untersuchungen wurde besonderes Augenmerk auf den Zusammenhang zwischen DNA-Schädigung und Zytotoxizität gelegt. Im letzten Teil der Arbeit erfolgte für die TCam-2-Zelllinie eine ergänzende Analyse der toxischen Wirkung einer Strahlentherapie.

3.1 Auswahl geeigneter Inkubationsbedingungen

Da in dieser Arbeit die Bedeutung der DNA-Reparatur für die Sensitivität bzw. Resistenz von Keimzelltumorzellen gegenüber CDDP untersucht werden soll, wurden zunächst Inkubationskonzentrationen und -zeiten für die Behandlung der Zellen ermittelt, bei denen zwar ein Zellschaden zu beobachten war, die aber nicht zu einem kompletten Zelluntergang führten. Dafür wurden zunächst mikroskopische Beobachtungen der Zelllinien unter CDDP-Behandlung durchgeführt.

3.1.1 Morphologische Untersuchungen

Betrachtet man die in Abschnitt 1.1.2 vorgestellten Zellen unter dem Lichtmikroskop, so weisen die behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen Änderungen in der Morphologie auf. Zunächst wurden 3×10^4 NT-2- und NT-2-R-Zellen ausplattiert und nach frühestens 24 h gemäß Tabelle 3.1 behandelt.

Tabelle 3.1: Verwendete CDDP-Konzentrationen und Inkubationszeiten

CDDP - Konzentrationen	Inkubationszeiten
Kontrolle 0.4 μM / 1 μM / 2.5 μM / 5 μM / 10 μM / 20 μM / 50 μM	1 h / 3 h / 6 h / 12 h / 24 h / 48 h

Die Betrachtung im Lichtmikroskop erfolgte mit 20-facher Vergrößerung zu den angegebenen Zeitpunkten. Abbildung 3.1 zeigt repräsentative Ausschnitte dieser Präparate.

Bei den NT-2-Zellen handelt es sich um adhärente Epithelzellen mit deutlichen Einlagerungen (Granula). Sie wachsen dicht gedrängt mit direktem Zell-Zell-Kontakt und weisen eine polygonale Form auf.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die NT-2-Zellen nach einer Inkubation für 48 h mit 2.5 μM CDDP im Vergleich zu den Kontrollzellen angeschwollen sind. Zudem lösen sich die Zellen voneinander und es kommt zu einem Ablösen der Zellen von der Kulturplatte. Dennoch sind noch immer intakte Zellverbände vorhanden.

Hingegen zeigten die NT-2-R-Zellen sogar nach einer Inkubation mit 5 μM CDDP für 48 h nur minimale Veränderungen und sehr wenig abgelöste Zellen.

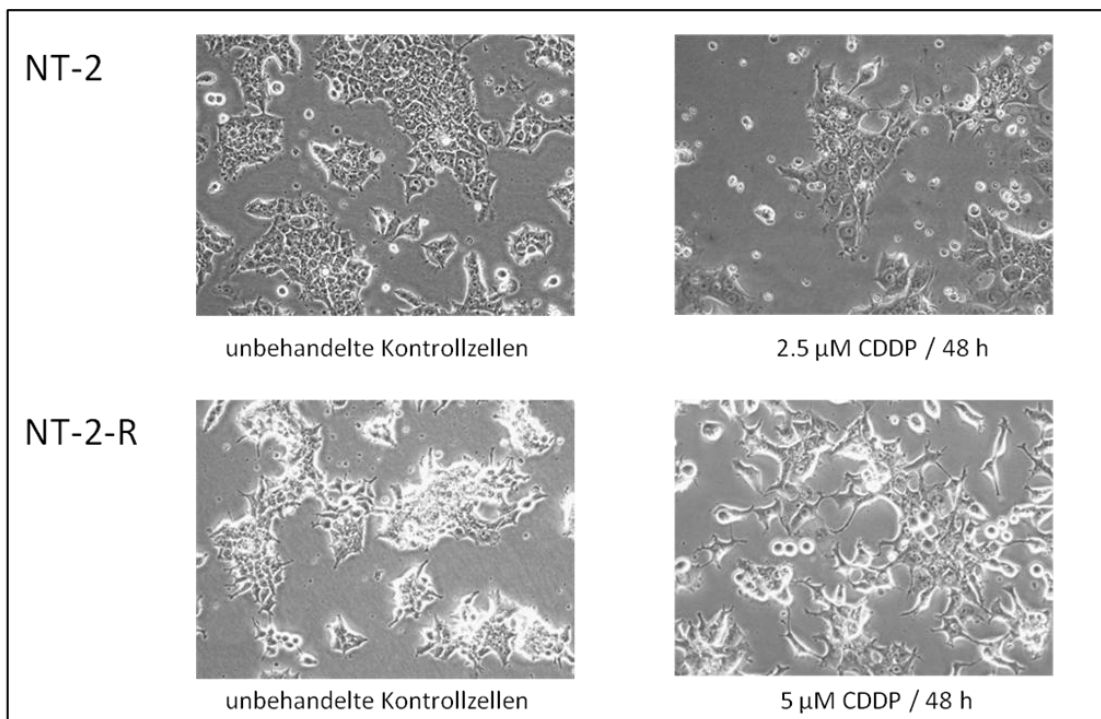


Abbildung 3.1: Morphologische Veränderungen von NT-2- und NT-2-R Zellen nach 48 h CDDP-Behandlung. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte. Die Aufnahmen erfolgten bei 20-facher Vergrößerung (Hellfeld-Aufnahme).

Für die nachfolgenden Untersuchungen bot sich somit eine CDDP-Konzentration von 2.5 μM an. Eine CDDP-Chemotherapie erfolgt in der Regel als Kurzinfusion [8, 10, 11, 126], seltener auch als Langzeitinfusion über 24 h [127, 128]. Es wurden daher unterschiedliche Inkubationszeiten ausgewählt (Tabelle 3.2). Eine Inkubationszeit von 48 h wurde zusätzlich gewählt, um zu untersuchen, welchen Einfluss eine längere CDDP-Exposition hat. Diese Bedingungen wurden zur vergleichenden Analyse auch bei den TCam-2-Zellen verwendet.

Bei vielen der folgenden Untersuchungen wurde nach Ablauf der in Tabelle 3.2 erwähnten Inkubationszeiten ein Mediumwechsel durchgeführt, dafür wurde das cisplatinhaltige Medium abgesaugt und gegen cisplatinfreies Medium ersetzt („Reparaturanalyse“). Anschließend wurden die Zellen weiter inkubiert. Auf diese Weise wurde *in vitro* ein Absinken des Plasmaspiegels *in vivo* imitiert. Die Analyse der Zellen erfolgte versuchsabhängig zu unterschiedlichen Zeiten nach Mediumwechsel. Die Versuche werden im Folgenden durch Hinzufügen der Inkubationszeit mit Zytostatikum und der Zeit nach Mediumwechsel (ZnM) benannt. Eine Angabe von 24 h / 6 h steht zum Beispiel für eine Behandlung über 24 h und anschließender cisplatinfreier Inkubation für 6 h.

Tabelle 3.2: Verwendete CDDP – Inkubationsbedingungen zur Reparaturanalyse

	Zeiten	Bedingungen
Reparaturanalyse	3 h / 24 h / 48 h	Kontrolle, 2.5 μM

3.2 Charakterisierung der Zytotoxizität und des Zelltods

Zunächst wurde untersucht, welche Auswirkungen CDDP auf die Viabilität der Zellen und die Bildung von Zellkolonien hat. Außerdem wurde untersucht, welche Auswirkungen CDDP auf den Zellzyklus hat. Da deutliche Zeichen des Zelltods zu beobachten waren, wurden diese näher charakterisiert. Dabei wurde unter anderem die Art des Zelltods näher bestimmt sowie deren zeitlicher Ablauf analysiert.

3.2.1 Koloniebildung nach Behandlung mit CDDP

Eine Möglichkeit, die Proliferationsfähigkeit zytostatikabehandelter Zellen zu untersuchen, bietet der Colony Formation Assay (CFA). Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst ausplattiert und nach dem Anwachsen gemäß Tabelle 3.2 behandelt. Je 100 der behandelten Zellen wurden wiederum ausplattiert und 14 Tage (NT-2 und NT-2-R) bzw. 21 Tage (TCam-2) inkubiert. Es folgten eine Zellfärbung nach Giemsa und die Auszählung der Koloniezahl pro Ansatz. Überall dort, wo sich nach der Aussaat noch eine proliferationsfähige Tumorzelle befand, war nun eine Zellkolonie. Je mehr Zellen also in ihrer Proliferation gehemmt waren bzw. je toxischer die Behandlung war, desto weniger Kolonien wuchsen.

Das Koloniewachstum der behandelten Zellen wird in Prozent [%] bezogen auf die unbehandelten Kontrollen angegeben. 100 unbehandelte NT-2-Zellen bildeten 84.0 ± 13.3 Kolonien, 100 unbehandelte NT-2-R-Zellen 116.3 ± 27.8 . Die 100 unbehandelten TCam-2-Kontrollzellen bildeten 28.9 ± 0.7 Kolonien.

Wie in den Abbildung 3.2, Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4 gezeigt, führte eine CDDP-Behandlung zu einer statistisch signifikanten, konzentrationsabhängigen Reduktion der Koloniebildung. TCam-2-Zellen zeigten zu allen Zeitpunkten und für alle untersuchten Konzentrationen eine höhere Koloniebildung als die NT-2- und NT-2-R-Zelllinien. Die Daten zeigten außerdem eine relative Resistenz der NT-2-R Zellen im Vergleich zu den ursprünglichen NT-2-Zellen.

Eine 3 h-Behandlung mit 2.5 μM CDDP verringerte die Koloniebildung in NT-2-Zellen auf 22.4 % \pm 11.5 % und in NT-2-R-Zellen auf 62.4 % \pm 8.1 %. In beiden Zelllinien führte eine Behandlung mit 10 μM CDDP zu einem fast vollständigen Verlust der Proliferationsfähigkeit (Abbildung 3.2). Im Vergleich dazu führte eine Behandlung mit 2.5 μM CDDP für 3 h in den TCam-2-Zellen nur zu einem geringen Verlust der Koloniebildung auf 85.4 % \pm 11.4 %. Selbst eine Inkubation mit 100 μM CDDP reduzierte das Koloniewachstum nur auf 15.3 % \pm 3.4 % (Abbildung 3.2).

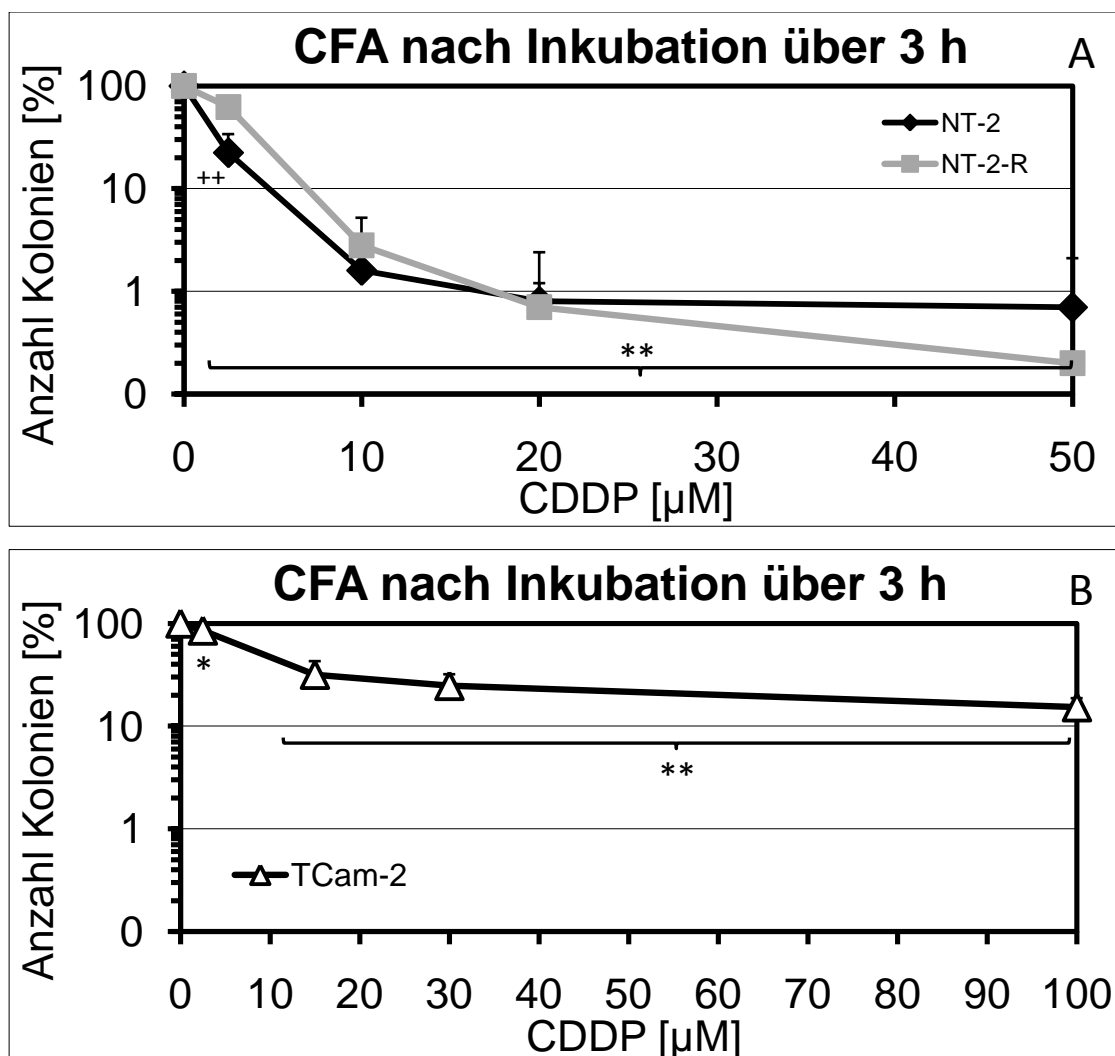


Abbildung 3.2: Koloniebildung nach Behandlung mit CDDP. Die Grafiken zeigen die Anzahl der Kolonien [%] im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen (0) für eine 3 h Inkubation. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mind. drei Versuchen mit Standardabweichung (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ gegen K sowie ++ = $p < 0.01$ gegen NT-2-R). Diese ist auf Grund der logarithmischen Skalierung nur in eine Richtung aufgetragen. Sie ist symmetrisch um den Mittelwert verteilt. (A) NT-2: \blacklozenge , NT-2-R: \blacksquare und (B) TCam-2: \blacktriangle . Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen zwischen NT-2/NT-2-R und TCam-2.

Eine Inkubation mit 0.4 μM CDDP für 24 h verminderte die Koloniebildung in NT-2-Zellen auf $49\% \pm 6.7\%$ und in NT-2-R-Zellen auf $80.1\% \pm 3.9\%$ (Abbildung 3.3). Eine Konzentration von 1 μM bedeutete für die NT-2-Zellen einen Verlust der Proliferationsfähigkeit ($3.3\% \pm 0.4\%$), wohingegen die NT-2-R-Zellen noch ein relatives Koloniewachstum von $46.2\% \pm 11.7\%$ aufwiesen. Für letztere war eine Behandlung mit 2.5 μM CDDP notwendig, um die Koloniebildung fast vollständig zu inhibieren ($3.8\% \pm 1.4\%$). Die Koloniebildung in den TCam-2 Zellen war nach 24 h-Behandlung mit 2.5 μM CDDP auf $43.9\% \pm 16.4\%$ reduziert. Es konnten keine Unterschiede in der Proliferationshemmung zwischen 15 μM , 30 μM und 100 μM CDDP festgestellt werden; Alle Bedingungen führten zwar zu einem verminderten Koloniewachstum, aber nicht zum Verlust der Proliferationsfähigkeit (Abbildung 3.3).

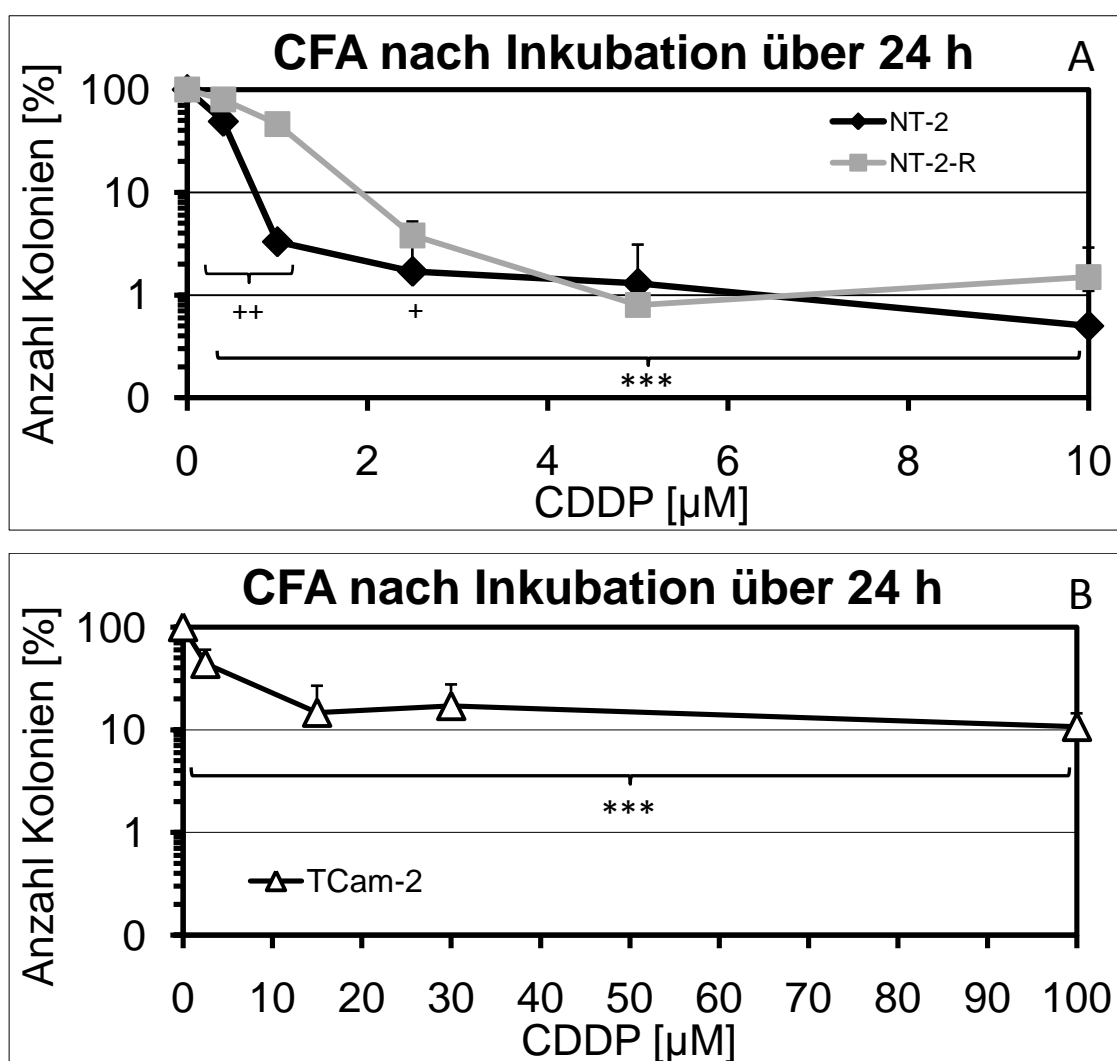


Abbildung 3.3: Koloniebildung nach Behandlung mit CDDP. Die Grafiken zeigen die Anzahl der Kolonien [%] im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen (0) für eine 24 h Inkubation. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mind. drei Versuchen mit Standardabweichung (***) = $p < 0.001$ gegen K sowie ++ = $p < 0.01$ und + = $p < 0.05$ gegen NT-2-R). Diese ist auf Grund der logarithmischen Skalierung nur in eine Richtung aufgetragen. Sie ist symmetrisch um den Mittelwert verteilt. (A) NT-2: \blacklozenge , NT-2-R: \blacksquare und (B) TCam-2: \triangle . Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen zwischen NT-2/NT-2-R und TCam-2.

Nach 48 h CDDP-Behandlung zeigten die NT-2-R-Zellen eine vergleichbare Reduktion in der Koloniebildung wie nach einer 24 h-Inkubation (Abbildung 3.4).

Interessanterweise war die Koloniebildung der NT-2-Zellen nach einer 24 h-Inkubation mit 0.4 μ M und 1 μ M CDDP stärker inhibiert als nach einer 48 h-Inkubation (Abbildung 3.4) mit denselben Konzentrationen (67.6 % \pm 24.8 % bzw. 18.5 % \pm 3.7 %). Ein Vergleich mit der sub-G₁-Fraktion der Zellzyklusdaten (siehe 3.2.2) verdeutlicht, dass die NT-2-Zellen eher zur Apoptose neigen als die NT-2-R-Zellen. Daher ist es möglich, dass während der 48 h-Inkubation mit CDDP Zellen mit einem größeren DNA-Schaden abgebaut werden und somit für weitere Untersuchungen verloren gehen. Das kann zu einer Selektion weniger geschädigter Zellen mit größerer Viabilität und Proliferationsfähigkeit führen. Die scheinbar höhere Koloniebildung nach längerer Inkubationszeit wäre dann nur ein Artefakt.

Nach einer 48 h-Behandlung mit 2.5 μ M CDDP war die Koloniebildung in den TCam-2-Zellen lediglich auf 22.5 % \pm 10.1 % vermindert (Abbildung 3.4). Wie nach einer 24 h-Inkubation führten alle Bedingungen zwar zu einem verminderten Koloniewachstum, aber nicht zum Verlust der Proliferationsfähigkeit.

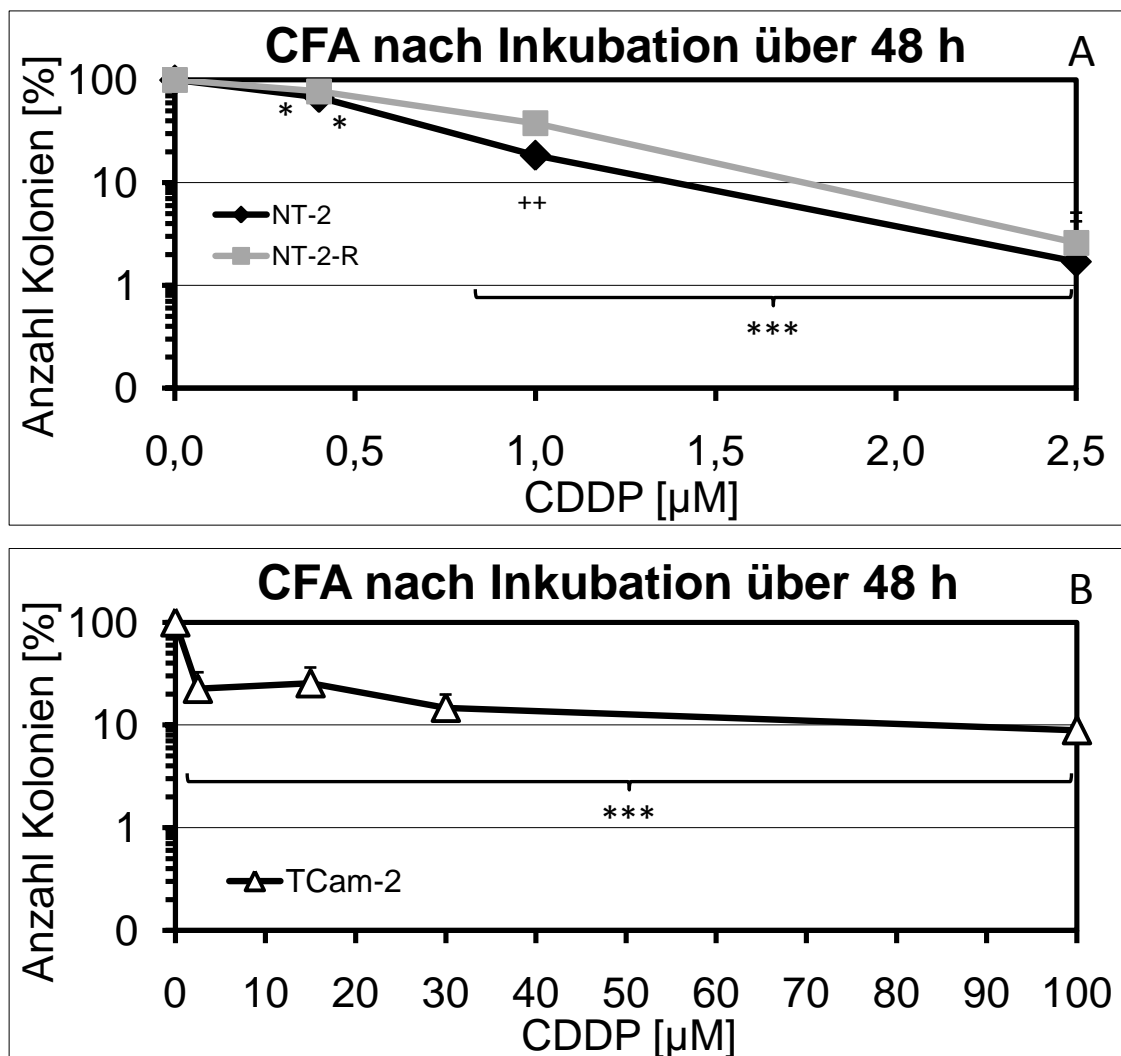


Abbildung 3.4: Koloniebildung nach Behandlung mit CDDP. Die Grafiken zeigen die Anzahl der Kolonien [%] im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen (K) für eine 48 h Inkubation. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mind. drei Versuchen mit Standardabweichung (* = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$ gegen K sowie ++ = $p < 0.01$ gegen NT-2-R). Diese ist auf Grund der logarithmischen Skalierung nur in eine Richtung aufgetragen. Sie ist symmetrisch um den Mittelwert verteilt. (A) NT-2: \blacklozenge , NT-2-R: \blacksquare und (B) TCam-2: \triangle . Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen zwischen NT-2/NT-2-R und TCam-2.

Die Behandlung mit Cisplatin führte außerdem zu einer zeitabhängigen Reduktion der Koloniebildung. Abbildung 3.5 zeigt dies nochmals zusammenfassend und beispielhaft für eine Inkubation mit 2.5 µM CDDP über 3 h, 24 h und 48 h.

Eine 3 h-Behandlung verminderte die Koloniebildung in NT-2-Zellen auf 22.4 % ± 11.5 %, in NT-2-R-Zellen auf 62.4 % ± 8.1 % und in TCam-2-Zellen auf 85.4 % ± 11.4 %. In den NT-2- und den NT-2-R-Zellen führte eine 24 h- bzw. 48 h-Inkubation zu einem fast vollständigen Verlust der Proliferationsfähigkeit (NT-2: 1.7 % ± 1.5 % und 1.7 % ± 2.5 % bzw. NT-2-R: 3.8 % ± 1.4 % und 2.6 % ± 2.5 %). Die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien waren für die 3 h- ($p < 0.01$) und die 24 h- ($p < 0.05$) Inkubation statistisch signifikant. Die TCam-2-Zellen zeigten zu allen Zeitpunkten eine statistisch signifikant höhere Koloniebildung als die NT-2- und NT-2-R-Zellen. Nach 24 h war die Koloniebildung lediglich auf 43.9 % ± 16.4 % reduziert und nach 48 h auf 22.5 % ± 10.1 %.

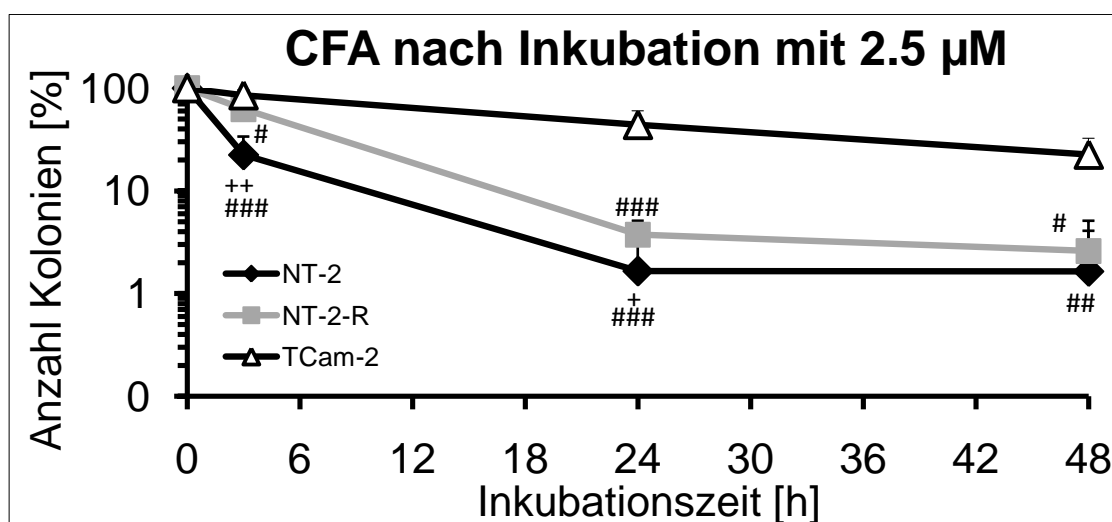


Abbildung 3.5: Koloniebildung nach Behandlung mit CDDP. Die Grafik zeigt die Anzahl der Kolonien [%] im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen (K) für eine Inkubation mit 2.5 µM CDDP für 3 h, 24 h und 48 h. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mind. drei Versuchen mit Standardabweichung (# = $p < 0.05$, ## = $p < 0.01$ und ### = $p < 0.001$ gegen TCam-2 sowie + = $p < 0.05$ und ++ = $p < 0.01$ gegen NT-2-R). Diese ist auf Grund der logarithmischen Skalierung nur in eine Richtung aufgetragen. Sie ist symmetrisch um den Mittelwert verteilt. NT-2: ◆, NT-2-R: ■ und TCam-2: △

Mit Hilfe der Konzentrationsreihen lässt sich zudem für alle Zeitpunkte und alle Zelllinien mittels graphischer Auswertung eine IC_{50} bestimmen (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: IC_{50} -Werte: bestimmt mittels Colony Formation Assay

Inkubationszeit	NT-2	NT-2-R	TCam-2
3 h	1.6 µM ± 0.3 µM	5.0 µM ± 0.3 µM	15.2 µM ± 4.6 µM
24 h	0.48 µM ± 0.02 µM	1.20 µM ± 0.19 µM	2.6 µM ± 1.0 µM
48 h	0.57 µM ± 0.19 µM	0.83 µM ± 0.14 µM	1.4 µM ± 0.24 µM

3.2.2 CellTiter-Glo® Luminescence Cell Viability Assay

Um den Einfluss von CDDP auf die Viabilität der NT-2-, NT-2-R- und TCam-2-Zellen zu untersuchen, wurde der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay durchgeführt. Als Maß für die Anzahl lebender Zellen wird der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen bestimmt. Das von den Zellen produzierte ATP wird in Gegenwart von Luciferin durch das Enzym Luciferase unter Lichtemission zu AMP umgesetzt. Die Intensität des emittierten Lichts wird gemessen (Abschnitt 7.4.2) und ist proportional der Zellviabilität.

Die Abbildung 3.6, Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8 geben die relative Änderung des emittierten Lichts in Bezug auf die Kontrollen wieder.

Nach einer 3 h-Inkubation mit CDDP mit Konzentrationen bis zu 1000 μM konnte erst 24 h nach einem Mediumwechsel eine Abnahme der Zellviabilität gemessen werden. Dieser Effekt trat in allen drei Zelllinien auf (Abbildung 3.6). Die Abnahme der Lumineszenz, und somit die Abnahme der Viabilität, verlief in den NT-2- und NT-2-R-Zellen gleich. Im Gegensatz dazu konnte bei den TCam-2-Zellen eine Abnahme der Lumineszenz erst bei höheren Konzentrationen beobachtet werden. Die Abnahme schien hier zunächst ein Plateau zu durchlaufen (Abbildung 3.6).

Die Konzentration, bei der die Lumineszenz 24 h nach dem Mediumwechsel auf die Hälfte des Kontrollwertes reduziert war (IC_{50}), lag im Falle der NT-2- und NT-2-R Zellen bei $85.8 \mu\text{M} \pm 18.4 \mu\text{M}$ bzw. $85.1 \mu\text{M} \pm 15.1 \mu\text{M}$ und in den TCam-2-Zellen bei $334 \mu\text{M} \pm 166.8 \mu\text{M}$. Es war also kein Unterschied zwischen den Nicht-Seminom-Zelllinien NT-2 und NT-2-R festzustellen.

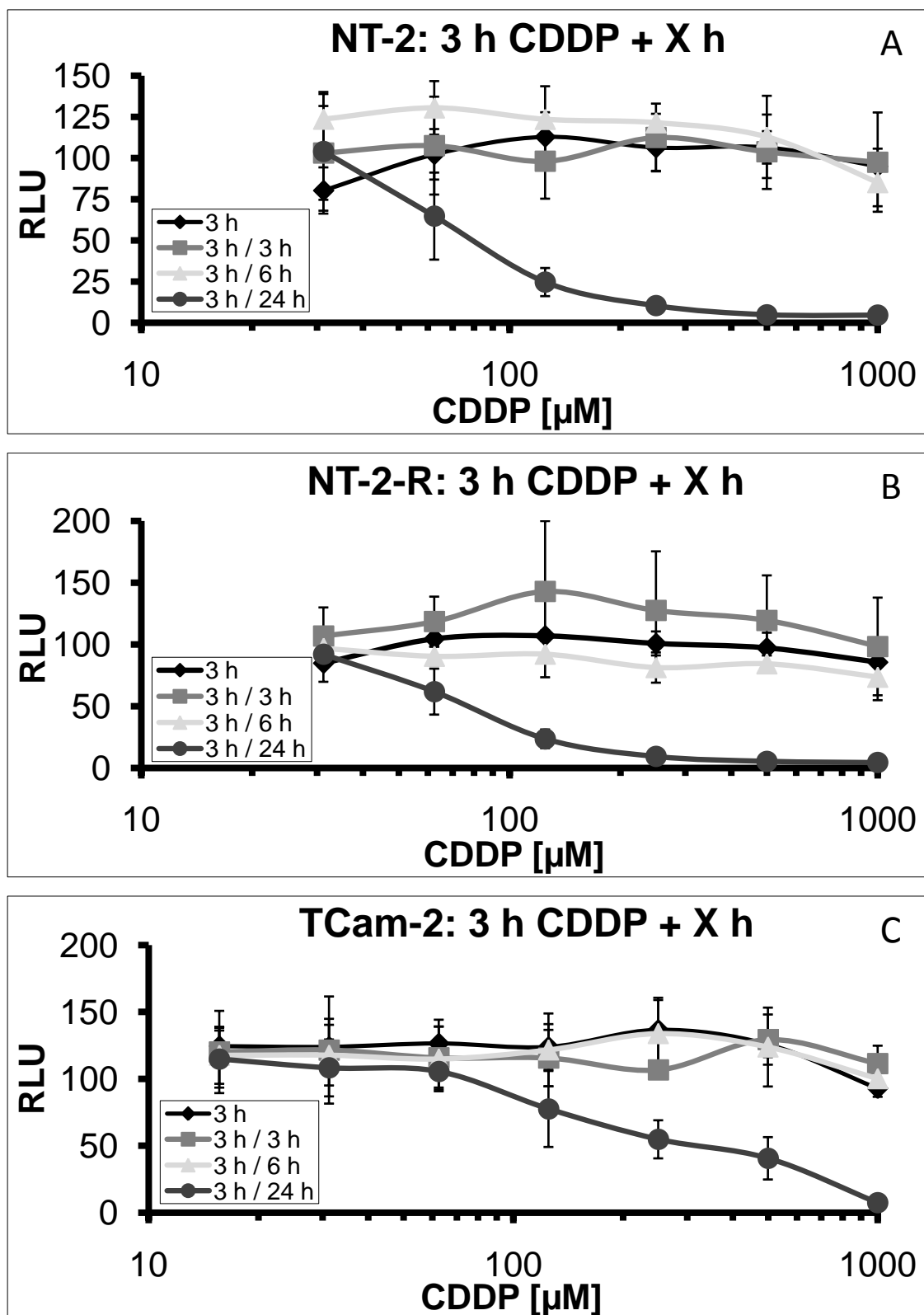


Abbildung 3.6: Änderungen der Lumineszenz nach Behandlung mit $2.5 \mu\text{M}$ CDDP für 3 h und anschließender cisplatinfreier Inkubation. A: NT-2, B: NT-2-R und C: TCam-2. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die ihrerseits jeweils mind. eine Dreifachbestimmung beinhalten. RLU = relative light units. Zu beachten ist die halblogarithmische Darstellung.

Ergebnisse

Nach einer 24 h- sowie einer 48 h-Inkubation zeigte sich die CDDP-induzierte Toxizität deutlich dosisabhängig (Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8). Die resultierenden IC₅₀-Werte sind für jede Bedingung in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.4: IC₅₀-Werte; bestimmt mittels CellTiter-Glo® Luminescence Cell Viability Assay

Inkubationszeit/ ZnM	NT-2	NT-2-R	TCam-2
3 h / 24 h	85.8 µM ± 18.4 µM	85.1 µM ± 15.1 µM	334 µM ± 166.8 µM
24 h / 0 h	22.1 µM ± 1.2 µM	28.5 µM ± 9.1 µM	140 µM ± 81.5 µM
24 h / 3 h	20.4 µM ± 2.4 µM	22.4 µM ± 1.8 µM	69.5 µM ± 39.1 µM
24 h / 6 h	18.4 µM ± 1.8 µM	20.6 µM ± 1.1 µM	50.5 µM ± 22.3 µM
24 h / 24 h	12.8 µM ± 2.5 µM	17.6 µM ± 2.1 µM	27.6 µM ± 8.2 µM
48 h / 0 h	9.5 µM ± 1.9 µM	13.3 µM ± 3.0 µM	19.1 µM ± 0.6 µM
48 h / 3 h	12.0 µM ± 4.9 µM	13.6 µM ± 5.5 µM	18.3 µM ± 1.2 µM
48 h / 6 h	9.4 µM ± 2.8 µM	12.7 µM ± 4.8 µM	17.8 µM ± 1.1 µM
48 h / 24 h	8.6 µM ± 2.0 µM	11.5 µM ± 3.8 µM	15.3 µM ± 0.2 µM

Auch hier zeigte sich, dass der Verlauf der abnehmenden Lumineszenz in den NT-2- und NT-2-R-Zellen gleich war und sich von dem der TCam-2-Zellen unterschied (Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8). Letztere zeigten deutlich flachere Kurvenverläufe. Außerdem war in den TCam-2-Zellen nach einer 24 h-Inkubation zusätzlich ein ausgeprägter zeitabhängiger Effekt der CDDP-Toxizität zu beobachten (Abbildung 3.7).

NT-2-Zellen waren nur wenig sensitiver gegenüber einer CDDP-Inkubation als NT-2-R-Zellen, und die ermittelten IC₅₀-Werte unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant. Im Hinblick auf kürzere Behandlungszeiten waren die TCam-2-Zellen deutlich resistenter als die NT-2- bzw. NT-2-R-Zellen ($p < 0.05$ für 3 h / 24 h). Diese Resistenzunterschiede waren nach längeren Behandlungszeiten weniger ausgeprägt.

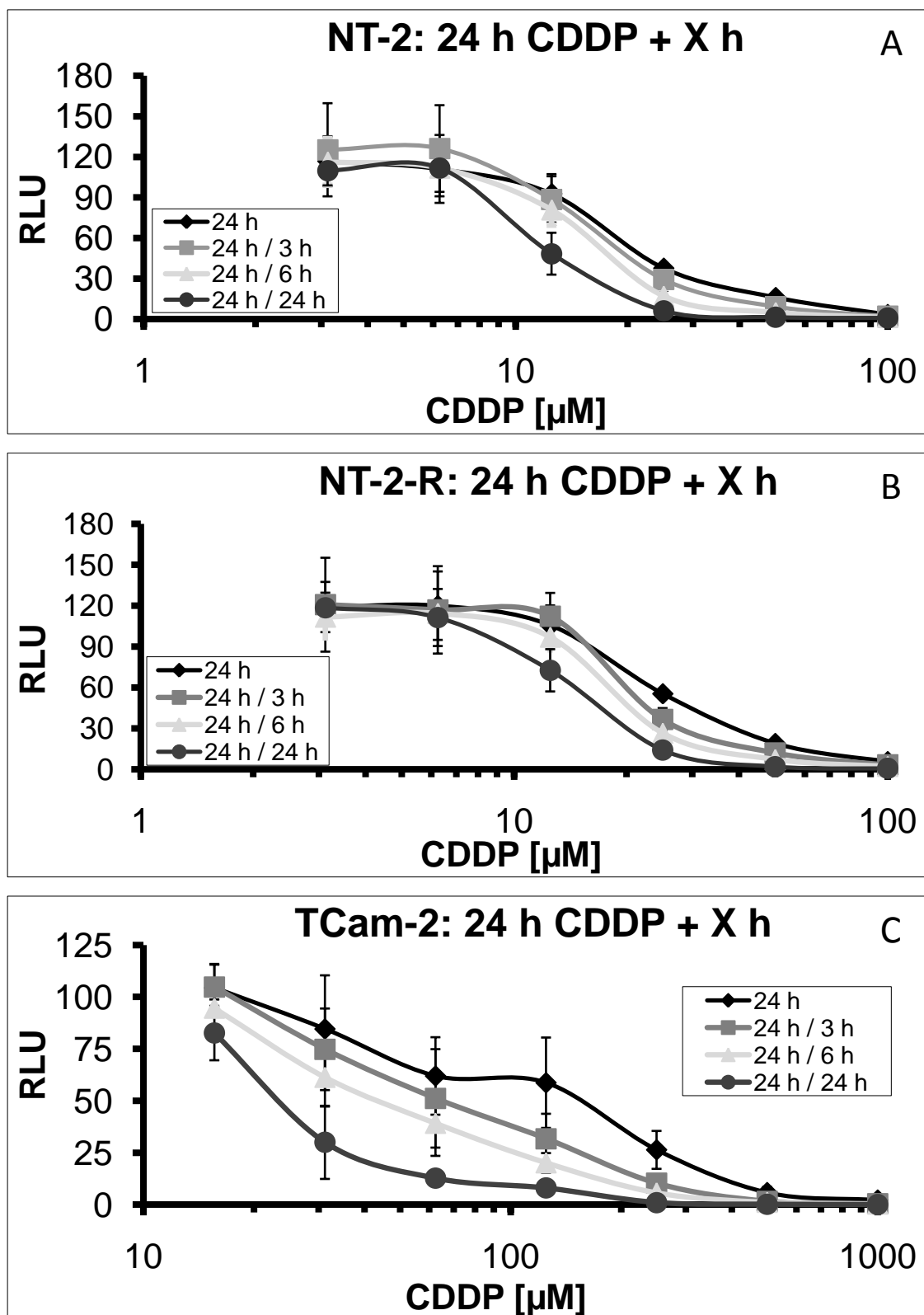


Abbildung 3.7: Änderungen der Lumineszenz nach Behandlung mit 2.5 μM CDDP für 24 h und anschließender cisplatinfreier Inkubation. A: NT-2, B: NT-2-R und C: TCam-2. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die ihrerseits jeweils mind. eine Dreifachbestimmung beinhalten. RLU = relative light units. Zu beachten ist die halblogarithmische Darstellung sowie die unterschiedlichen Skalierungen zwischen NT-2/NT-2-R und TCam-2.

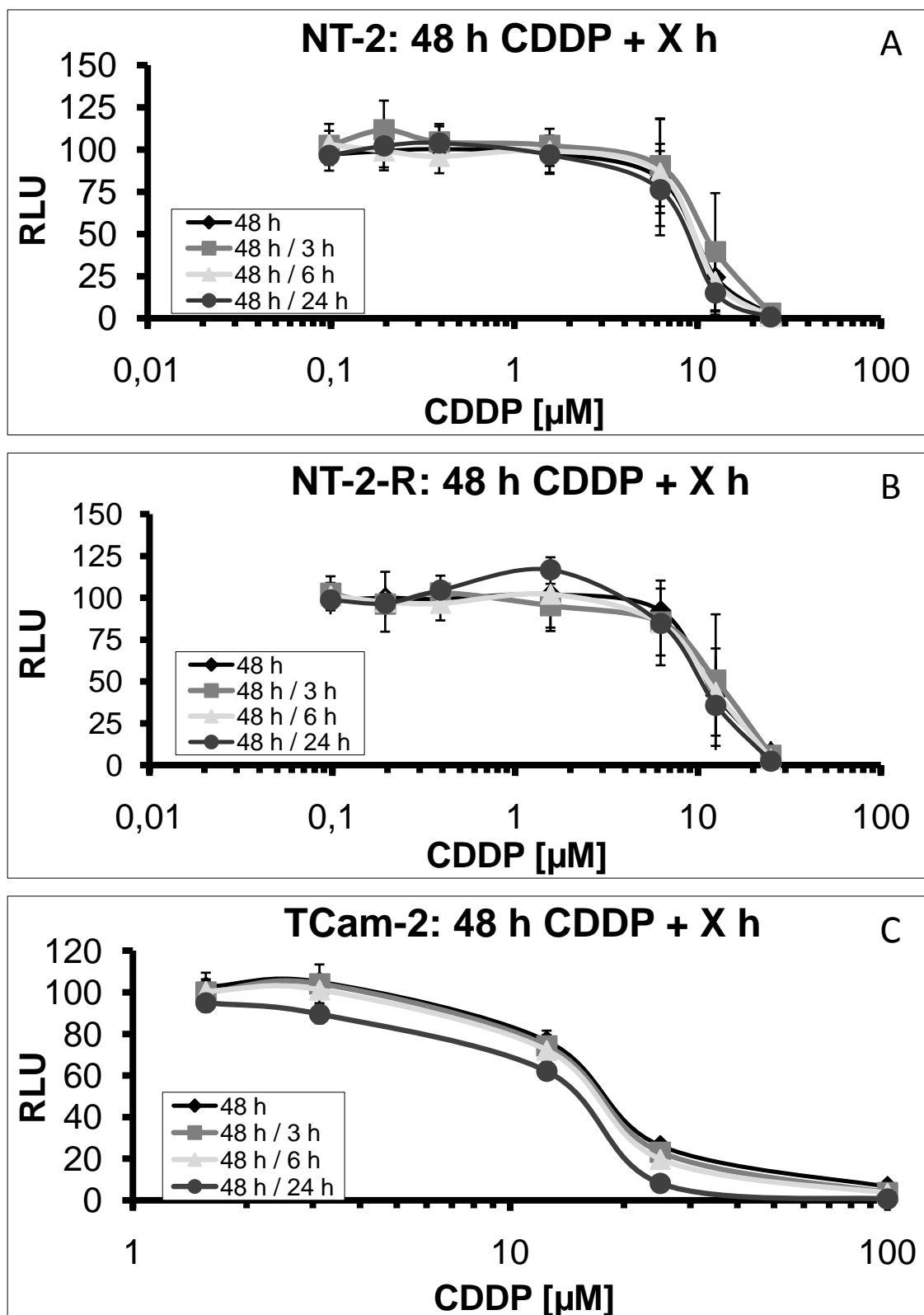


Abbildung 3.8: Änderungen der Lumineszenz nach Behandlung mit $2.5 \mu\text{M}$ CDDP für 48 h und anschließender cisplatinfreier Inkubation. A: NT-2, B: NT-2-R und C: TCam-2. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die ihrerseits jeweils mind. eine Dreifachbestimmung beinhalten. RLU = relative light units. Zu beachten ist die halblogarithmische Darstellung sowie die unterschiedlichen Skalierungen zwischen NT-2/NT-2-R und TCam-2.

3.2.3 Analyse der Zellverteilung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen

Um den Einfluss von CDDP auf die Zellzyklusverteilung zu untersuchen, wurde der DNA-Gehalt behandelter Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Durch Messung des DNA-Gehalts von Zellen lässt sich deren momentane Zellzyklusphase bestimmen. Dieser kann durch das Einbringen eines Fluoreszenzfarbstoffs, der quantitativ in die DNA interkaliert, für jede Zelle ermittelt werden. In dieser Versuchsreihe wurde Propidiumiodid (PI) eingesetzt. PI kann nach Fixierung der Membran mit Ethanol in die Zellen eindringen und in die DNA interkalieren. Es wurden im Mittel 10.000 markierte Zellen durchflusszytometrisch vermessen. Anhand des PI-Signals, welches proportional zum DNA-Gehalt einer Zelle ist, wurden diese dann in Zellen der G₁-Phase (einfache DNA-Menge), S-Phase (zwischen ein- und zweifacher DNA-Menge) und G₂/M-Phase (zweifache DNA-Menge) eingeteilt. Zellen, die weniger als die einfache DNA-Menge aufweisen, sind apoptotische Körperchen und werden als sub-G₁ Zellen bezeichnet.

Unbehandelte NT-2-Zellen (Kontrolle) zeigten 33.5 % ± 5.5 % Zellen in der G₁-Phase, 27.3 % ± 2.0 % Zellen in der S- und 38.0 % ± 3.6 % in der G₂/M-Phase. Lediglich 1.3 % ± 0.5 % waren Zellen der sub-G₁-Fraktion. Der Anteil an Zellen in der G₁-Fraktion stieg in den folgenden 48 h leicht an. Dies geschah hauptsächlich auf Kosten der Zellen in der S-Phase und vermutlich auf Grund ansteigender Konfluenz. Unbehandelte NT-2-R-Zellen (Kontrolle) zeigten die gleiche Zellzyklusverteilung (Abbildung 3.10).

Nach einer 3 h-Inkubation mit CDDP waren erst 24 h nach einem Mediumwechsel Veränderungen in der Zellzyklusverteilung sichtbar. Es kam zu einem Anstieg an Zellen in der G₂/M-Phase auf 57.4 % ± 5.0 % in NT-2-Zellen bzw. auf 49.2 % ± 7.4 % in NT-2-R-Zellen und damit verbunden zu einer Abnahme an Zellen in der G₁-Phase auf 11.2 % ± 1.2 % in NT-2-Zellen und auf 15.2 % ± 7.6 % in NT-2-R-Zellen ($p < 0.05$). Dieser Effekt war reversibel: 48 h nach dem Mediumwechsel waren im Vergleich zu den Kontrollzellen keine Unterschiede mehr erkennbar. Die Verschiebung in die G₂/M-Phase verschwand in NT-2- und NT-2-R-Zellen. Zu keinem Zeitpunkt kam es zu einer Zunahme an Zellen in der sub-G₁-Fraktion (Abbildung 3.10).

Im Gegensatz dazu kam es nach einer 24 h-Inkubation zu einer vorübergehenden Anhäufung der Zellen in der S-Phase (Abbildung 3.10). Diese S-Verschiebung ging 24 h nach dem Mediumwechsel in einen G₂/M-Arrest über (mit 73.7 % ± 1.8 % in den NT-2- und 45.5 % ± 7.9 % in den NT-2-R-Zellen, $p < 0.05$). Die Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollzellen waren statistisch signifikant ($p < 0.01$). 48 h nach einem Mediumwechsel kam es zu einer Zunahme an Zellen in der sub-G₁-Fraktion auf 49.2 % ± 2.0 % (NT-2, $p < 0.001$) und auf 24.8 % ± 9.2 % (NT-2-R, $p < 0.05$). Abbildung 3.9 zeigt beispielhaft die Histogramm Plots des Verlaufs dieser Zellzyklusänderungen.

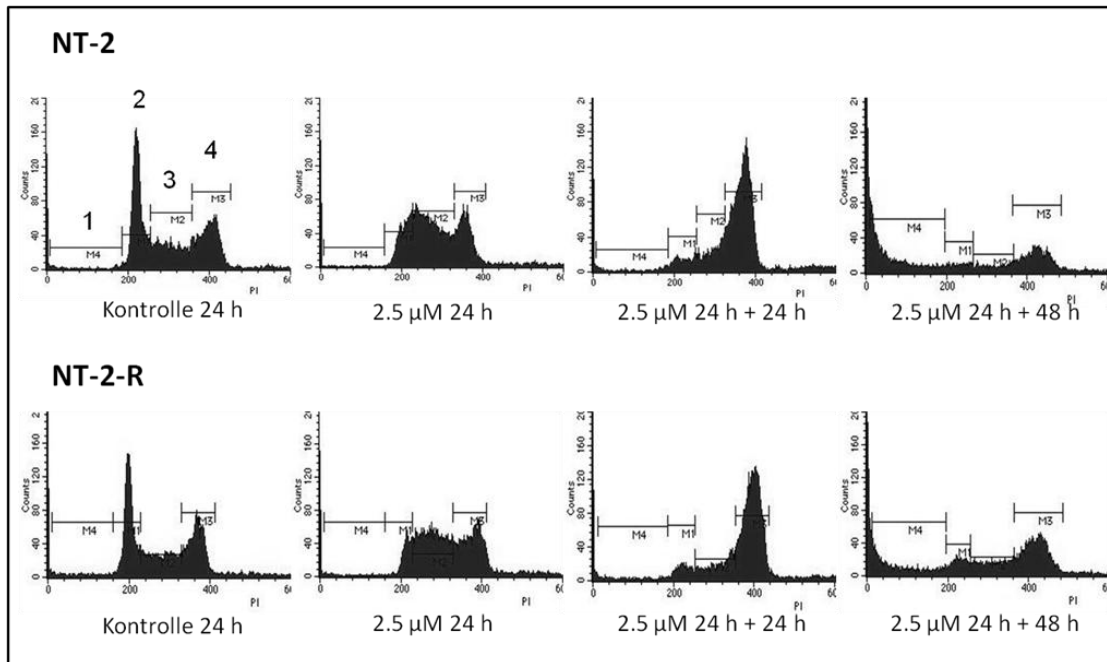


Abbildung 3.9: Histogramm Plots der durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus von NT-2- und NT-2-R Zellen nach 24 h Inkubation mit 2.5 µM CDDP und anschließender cisplatinfreier Inkubation für 24 h und 48 h. Die Zellen wurden mit Ethanol fixiert und für die Messung mit Propidiumiodid gefärbt. Dargestellt ist die Zellzahl gegen den DNA-Gehalt, gemessen als PI-Signal. 1 = sub-G₁-Phase, 2 = G₁-Phase, 3 = S-Phase und 4 = G₂/M-Phase

Grundsätzlich zeigten NT-2- und NT-2-R-Zellen ähnliche Veränderungen der Zellzyklusverteilung. Allerdings waren sowohl der G₂/M-Arrest als auch die Zunahme an Zellen der sub-G₁-Fraktion in den NT-2-Zellen stärker ausgeprägt als in den NT-2-R-Zellen ($p < 0.05$).

Eine 48 h-Inkubation führte zu einem vergleichbaren G₂/M-Arrest in NT-2- (73.3 % ± 3.7 %) und NT-2-R- (71.5 % ± 4.9 %) Zellen. Auf diesen folgte 24 h nach dem Mediumwechsel einer Zunahme an Zellen in der sub-G₁-Fraktion auf 40.7 % ± 6.8 % in NT-2 und auf 28.2 % ± 9.9 % in NT-2-R Zellen.

Die TCam-2-Zellen zeigten eine andere Zellzyklusverteilung. Unbehandelte Kontrollen waren zu 50.9 % ± 4.7 % in der G₁-Phase, zu 20.6 % ± 1.0 % in der S- und zu 25.5 % ± 1.6 % in der G₂/M-Phase. 3.0 % ± 2.2 % der Zellen befanden sich in der sub-G₁-Fraktion. Über die Zeit von 48 h kam es zu einem Anstieg an Zellen in der G₂/M-Phase auf 28.6 % ± 2.3 % und der sub-G₁-Fraktion auf 4.3 % ± 2.0 %. Gleichzeitig zeigte sich ein Abnahme an Zellen in der S-Phase auf 14.5 % ± 0.5 % (Abbildung 3.10).

Im Gegensatz zu den NT-2- und NT-2-R-Zellen führte eine 3 h-Inkubation mit 2.5 µM CDDP erst 48 h nach dem Mediumwechsel zu minimalen Veränderungen in der Zellzyklusverteilung (Abbildung 3.10). Der Anteil an Zellen in der S-Phase verminderte sich auf 13.5 % ± 3.3 % und es kam zu einer entsprechenden Zunahme an Zellen in der G₂/M-Phase auf 28.3 % ± 0.7 % ($p < 0.05$).

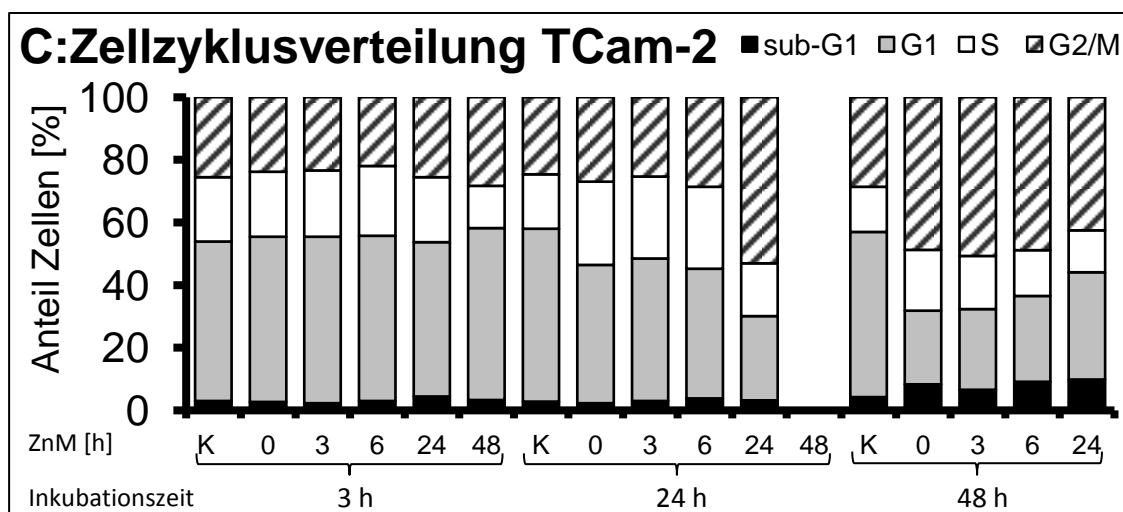
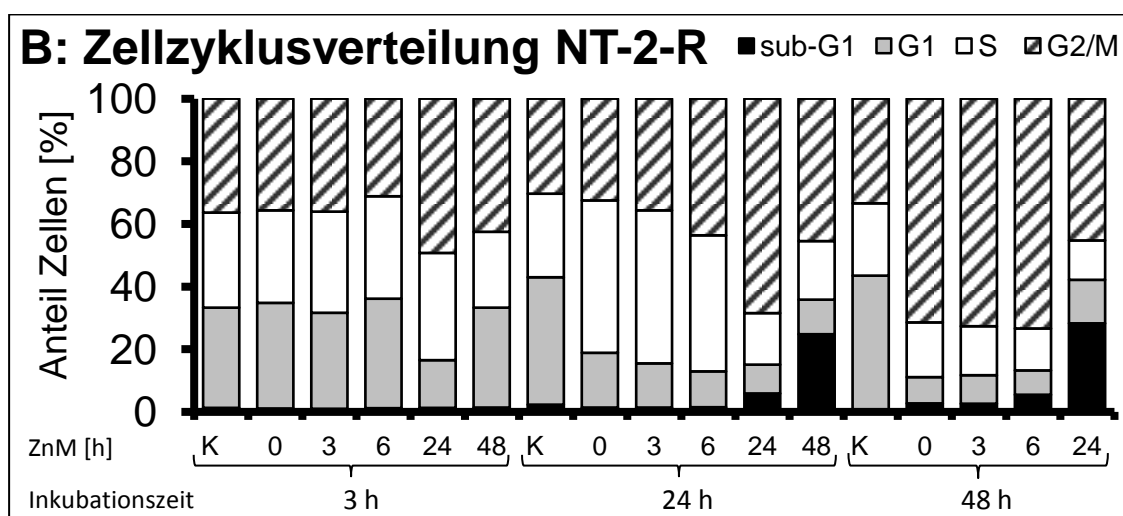
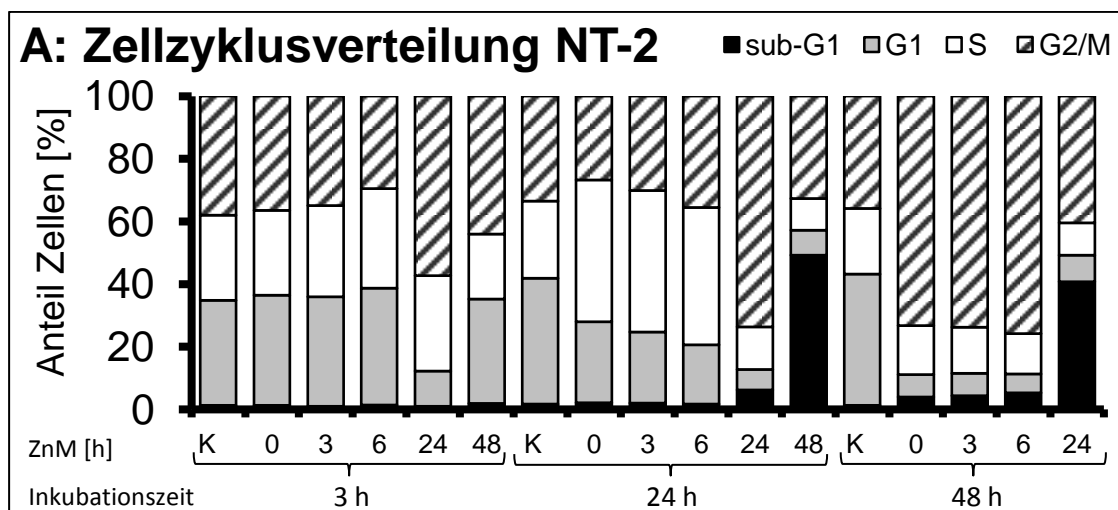


Abbildung 3.10: Veränderung der Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit CDDP für 3 h, 24 h und 48 h mit anschließender cisplatinfreier Inkubation bis zu 48 h. Der Anteil an Zellen je Zellzyklusphase [sub-G₁ (■), G₁ (▒), S (□) und G₂/M (▨)] wurde in Prozent gegen die Dauer der CDDP-Inkubation aufgetragen, ZnM = Zeit nach Mediumwechsel. K zeigt die Verteilung unbehandelter Kontrollzellen. Alle Werte wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt. Die absoluten Standardabweichungen waren $\leq 9.9\%$ für sub-G₁, $\leq 7.6\%$ für G₁, $\leq 7.2\%$ für S und $\leq 11.8\%$ für G₂/M.

Nach einer Inkubation über 24 h verminderte sich der Anteil an Zellen in der G₁-Phase auf 44.2 % ± 0.9 % (p < 0.01) und erhöhte sich in der S-Phase auf 26.6 % ± 0.9 % (p < 0.001). 24 h nach einem Mediumwechsel nahm der Anteil an Zellen in der G₁-Phase noch weiter ab (26.9 % ± 1.0 %, p < 0.001), wohingegen sich der Anteil an Zellen in der S-Phase wieder normalisiert hatte. Der Anteil an Zellen in der G₂/M-Phase stieg dafür deutlich auf 53.0 % ± 1.8 % (p < 0.001) an. Die Zellen in der sub-G₁-Phase zeigten keine Veränderungen (Abbildung 3.10).

Im Gegensatz dazu führte eine CDDP-Inkubation über 48 h zu einer leichten Zunahme an Zellen der sub-G₁-Fraktion mit einem Maximum 24 h nach dem Mediumwechsel (9.9 % ± 1.5 %, p < 0.05). Es kam ebenfalls zu einem Anstieg an Zellen in der G₂/M-Fraktion auf 48.8 % ± 5.9 % (p < 0.01). Diese Verschiebung blieb auch nach dem Mediumwechsel bestehen. Gleichzeitig reduzierte sich der Anteil an Zellen in der G₁-Phase (23.5 % ± 4.0 %, p < 0.01). 24 h nach dem Mediumwechsel stieg dieser Anteil wieder leicht an (34.2 % ± 5.5 %) (Abbildung 3.10).

Um einen möglichen konzentrationsabhängigen Einfluss von CDDP auf die Zellzyklusverteilung der TCam-2-Zellen zu untersuchen, wurde für 3 h, 24 h bzw. 48 h mit jeweils 2.5 μ M, 30 μ M und 100 μ M behandelt. So sollte analysiert werden, ob die TCam-2-Zellen nach einer CDDP-Behandlung überhaupt einen Zellzyklusarrest zeigen und / oder einen Zelltod eingehen.

Nach einer 3 h-Inkubation mit den gewählten Konzentrationen kam es zu keiner Veränderung der Zellzyklusverteilung (Abbildung 3.11).

Eine Inkubation mit 2.5 μ M CDDP für 24 h reduzierte den Anteil an Zellen in der G₁-Phase auf 46.6 % \pm 1.2 % ($p < 0.001$) und führte zu einer Zunahme an Zellen in der S-Phase auf 22.6 % \pm 1.6 % ($p < 0.001$). Eine Inkubation mit 30 μ M CDDP führte hingegen zu einer Zunahme an Zellen der sub-G₁-Fraktion (16.4 % \pm 1.5 %, $p < 0.01$) bei gleichzeitiger Abnahme an Zellen in der G₂/M-Phase (15.5 % \pm 1.6 %, $p < 0.001$). Genauso veränderte sich die Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit 100 μ M CDDP.

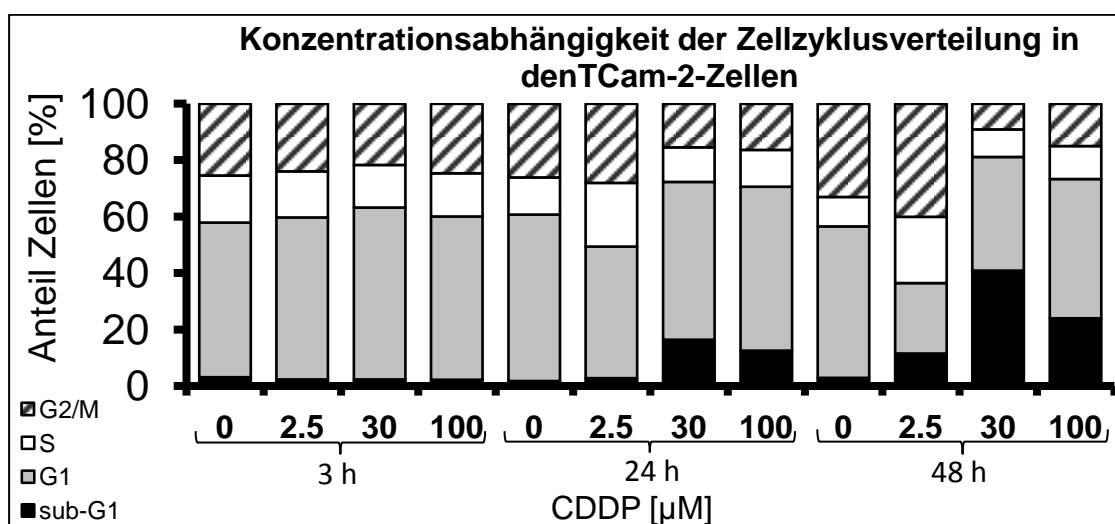


Abbildung 3.11: Konzentrationsabhängigkeit der Veränderung der Zellzyklusverteilung in den TCam-2-Zellen nach Behandlung mit CDDP. Der Anteil an Zellen je Zellzyklusphase [sub-G₁ (■), G₁ (▒), S (□) und G₂/M (▩)] wurde in Prozent gegen die Dauer der CDDP-Inkubation aufgetragen. '0' zeigt die Verteilung unbehandelter Kontrollzellen. Alle Werte wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt. Die absoluten Standardabweichungen waren ≤ 10.6 % für sub-G₁, ≤ 6.4 % für G₁, ≤ 4.0 % für S und ≤ 11.7 % für G₂/M.

Zu einer noch deutlicheren Zunahme an Zellen der sub-G₁-Fraktion kam es nach einer 48 h-Inkubation. Ein Maximum zeigte sich hier für 30 µM CDDP mit 40.9 % ± 10.6 % (p < 0.01). Dieser Anstieg war verbunden mit einer starken Abnahme an Zellen in der G₂/M-Phase (9.2 % ± 2.8 %, p < 0.001) und einer leichten Abnahme an Zellen in der G₁-Phase (40.3 % ± 3.8 %, p < 0.01). Eine Inkubation mit 100 µM CDDP zeigte eine ähnliche, wenn auch nicht so ausgeprägte Veränderung in der Zellzyklusverteilung. Diese geringere Zunahme an Zellen in der sub-G₁-Fraktion nach einer Inkubation mit 100 µM CDDP für 24 h bzw. 48 h, im Vergleich mit 30 µM, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Anteil an abgebauten, nicht mehr durchflusszytometrisch erfassbaren Zellen größer war. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation mit 2.5 µM CDDP zu einer Zunahme an Zellen in der S-Phase (23.4 % ± 2.1 %, p < 0.01) in Zusammenhang mit einer Abnahme an Zellen in der G₁-Phase (25.0 % ± 5.2 %, p < 0.01).

3.2.4 Charakterisierung des Zelltods

Um die Art des Zelltods zu bestimmen, wurde außerdem untersucht, ob es zu einer Präsentation von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche kommt [123]. Dies ist ein früher Prozess während der Apoptose und kann durch eine Annexin-V-Bindung detektiert werden [129]. Untersucht wurden die NT-2- und NT-2-R-Zellen zu den Zeitpunkten, an denen eine deutliche sub-G₁-Fraktion zu beobachten war.

Selbst bei Bedingungen, die zu einer sub-G₁-Fraktion von 30 % oder 40 % führten, konnte kein Anstieg einer Annexin-V-Bindung nachgewiesen werden (Abbildung 3.12).

Die massive PI-Aufnahme der NT-2-Zellen, aber nicht die der NT-2-R-Zellen, zeigt, dass erstere einen Zelltod eingehen, der durch eine DNA-Fragmentierung und einen Verlust der Membranintegrität charakterisiert ist. Es fehlt aber eine Präsentation von Phosphatidylserin, einem Kennzeichen der Apoptose.

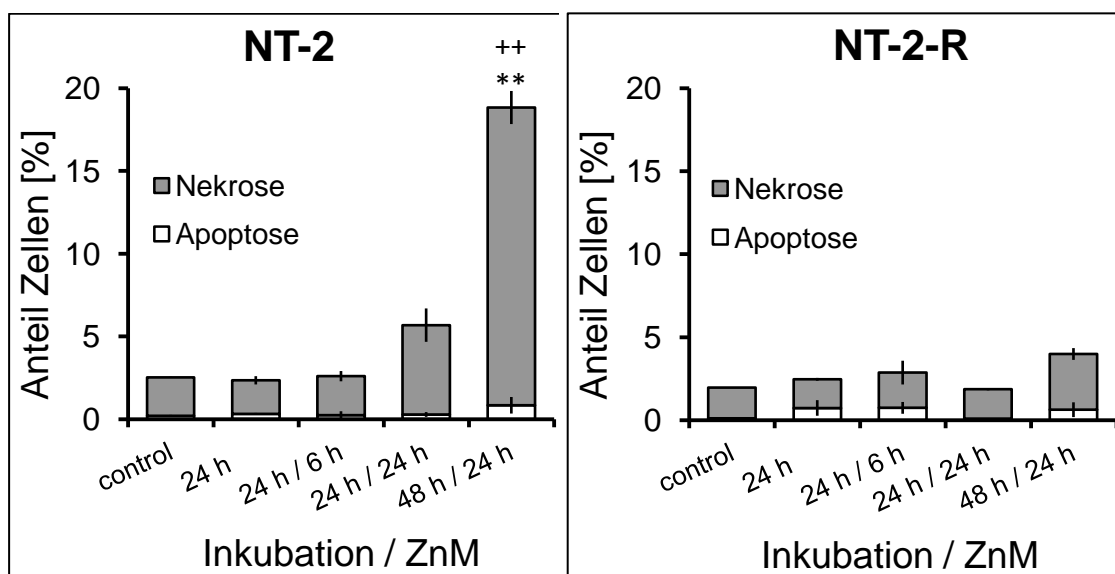


Abbildung 3.12: Anteil apoptotischer (□) und nekrotischer (■) Zellen nach Behandlung mit CDDP, gemessen anhand der Annexin-V- / Propidiumiodid-Färbung. ZnM = Zeit nach Mediumwechsel. 'control' zeigt die Verteilung unbehandelter Kontrollzellen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei Versuchen mit Variationsbreite (** = $p < 0.01$ gegen K und ++ = $p < 0.01$ gegen NT-2-R)

Es lässt sich schlussfolgern, dass erst 48 h nach Beginn einer CDDP-Behandlung eine für den Zelltod charakteristische DNA-Fragmentierung auftritt. Diese ist unabhängig von der tatsächlichen CDDP-Inkubationsdauer.

3.2.4.1 Zahl abgelöster Zellen

Um zu bestimmen, ob nach einer CDDP-Inkubation Zellen durch Ablösen von der Zellkulturschale verloren gehen, erfolgten Zellzählungsversuche. Diese lassen erkennen, dass sich nach 3 h, 24 h und auch 48 h Inkubation mit 2.5 μ M CDDP in allen drei Zelllinien weniger als 2 % der Zellen von den Zellkulturschalen gelöst haben (Tabelle 3.5). Somit kann ausgeschlossen werden, dass durch einen massiven Zellverlust die Ergebnisse der Assays verfälscht werden.

Tabelle 3.5: Anteil von der Zellkulturschale abgelöster Zellen [%] ausgehend von der Gesamtzellzahl

	3 h	24 h	48 h
NT-2	0.85 \pm 1.21	0.66 \pm 0.08	0.89 \pm 0.31
NT-2-R	2.02 \pm 1.44	0.56 \pm 0.27	0.27 \pm 0.13
TCam-2	1.48 \pm 0.72	0.76 \pm 0.05	0.52 \pm 0.12

3.3 DNA-Schädigung durch Cisplatin

3.3.1 DNA-Platinierung nach CDDP-Behandlung

Durch die Entwicklung eines Immunoassays, der einen monoklonalen Antikörper gegen CDDP-Addukte mit einer quantitativen Bildauswertung verbindet [130], konnten strukturdefinierte 1,2-Pt-GpG-DNA Platinierungsprodukte je Zellkern individuell gemessen werden. Mit dieser Methode konnte in neuronalen Zellen und Lymphozyten eine dosisabhängige CDDP-induzierte Adduktbildung bzw. Platinierung nachgewiesen werden [46, 131].

Es wurde die zeitliche Veränderung der Adduktbildung nach einer 24 h Inkubation mit 2.5 μ M CDDP und anschließender zytostatikafreien Inkubation von weiteren 24 h untersucht (Abbildung 3.13).

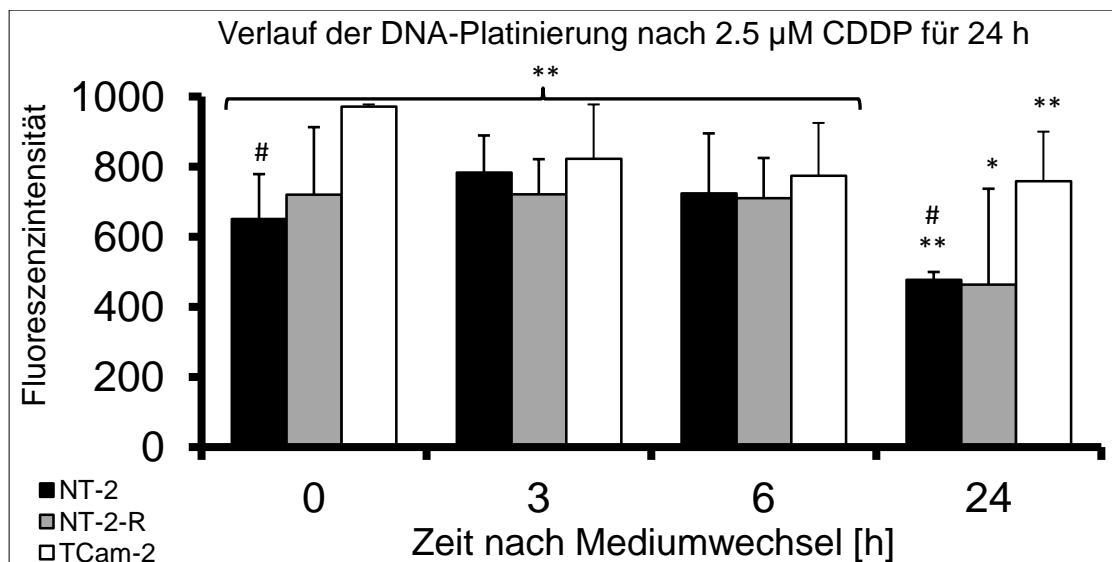


Abbildung 3.13: Bestimmung von 1,2-Pt-GpG-DNA-Addukten mittels Immunhistochemie in NT-2- (■), NT-2-R- (▒) und TCam-2- (□) Zellen nach Behandlung mit 2.5 μ M CDDP für 24 h mit anschließender cisplatinfreier Inkubation für bis zu 24 h. Die Werte entsprechen der Addukt-Fluoreszenzintensität und zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (* = $p < 0.05$ und ** = $p < 0.01$ gegen die Kontrolle und # = $p < 0.05$ gegen TCam-2). Je Probe wurden 70 Zellkerne untersucht und die Fluoreszenzintensität mittels digitaler Bildanalyse bestimmt. Die Mittelwerte wurden errechnet und der Wert der Kontrollen subtrahiert. Das Signal der Kontrollen entspricht somit „0“.

Sowohl NT-2- als auch NT-2-R- und TCam-2-Zellen zeigten direkt nach der Inkubation eine deutliche DNA-Platinierung. Bei den NT-2- bzw. NT-2-R-Zellen blieb diese auch die ersten 6 h nach einem Mediumwechsel erhalten. Nach 24 h cisplatinfreier Inkubation war eine leichte Abnahme an DNA-Addukten messbar. Die TCam-2-Zellen zeigten hingegen nur in den ersten 3 h nach dem Mediumwechsel eine leichte Abnahme an DNA-Addukten.

Sie wiesen zu allen Zeitpunkten eine stärkere Platinierung als die NT-2- bzw. NT-2-R-Zellen auf. Diese Addukt-Kinetiken zeigen, dass in den Zelllinien nur wenige der 1,2-GpG-Addukte entfernt werden konnten. Die TCam-2-Zellen entfernten die wenigsten Addukte.

Die Adduktbildung war in allen behandelten Proben signifikant erhöht (mind. $p < 0.05$). Allerdings zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den NT-2- und NT-2-R-Zellen sowie den NT-2-R- und den TCam-2-Zellen.

Es wurden zudem Vorversuche an den NT-2- und NT-2-R-Zellen mit 2.5 μM CDDP über 3 h- und 48 h-Inkubationen und anschließender Inkubation in cisplatinfreiem Medium für bis zu 24 h durchgeführt.

In der Zeit nach einer 3 h-Inkubation kam es in beiden Zelllinien zu einer Abnahme an DNA-Addukten. In den NT-2-R-Zellen sank dieser Anteil über die Zeit wieder auf Kontrollniveau. Die NT-2-Zellen wiesen tendenziell eine höhere DNA-Platinierung als die NT-2-R-Zellen auf (Abbildung 3.14, A).

Die NT-2-R-Zellen zeigten direkt nach einer 48 h-Inkubation einen ähnlichen Verlauf der DNA-Platinierung wie nach einer 24 h-Inkubation. In den ersten 6 h nach dem Mediumwechsel blieb diese konstant. Nach 24 h cisplatinfreier Inkubation nahm sie um den Faktor 3.2 ab, verglichen mit dem Wert direkt nach der 48 h-Inkubation. In den NT-2-Zellen blieb das Ausmaß der DNA-Platinierung in der Zeit nach einer Langzeitbehandlung von 48 h konstant (Abbildung 3.14, B).

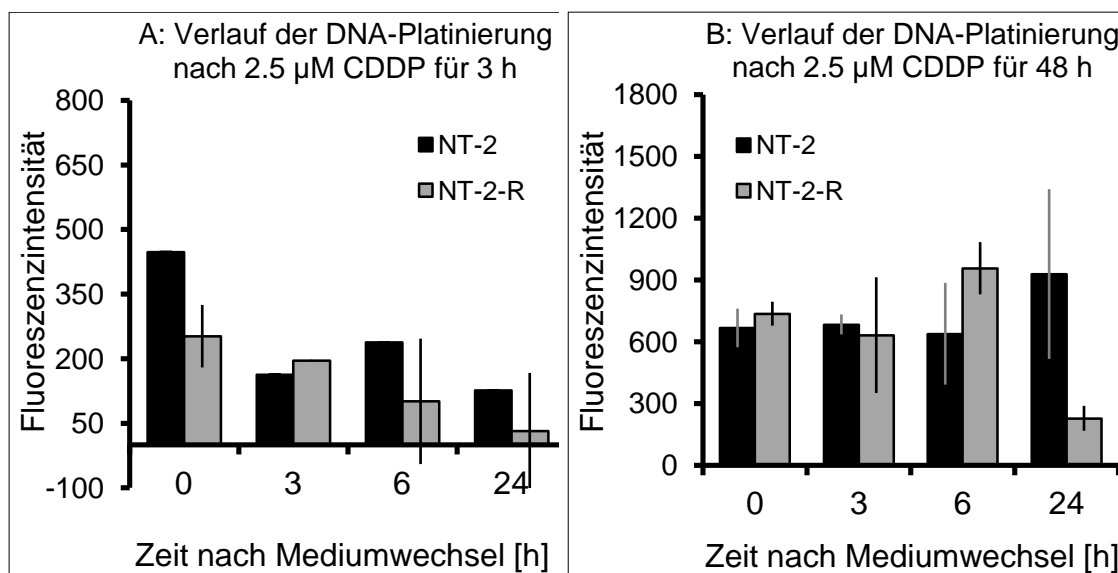


Abbildung 3.14: Bestimmung von Pt-GpG-DNA Addukten mittels Immunhistochemie in NT-2- (■) und NT-2-R- (▒) Zellen nach Behandlung mit 2.5 μM CDDP für 3 h (A) und 48 h (B) mit anschließender cisplatinfreier Inkubation für bis zu 24 h. Die Werte entsprechen der Pt-Addukt-Fluoreszenzintensität und zeigen die Werte aus zwei unabhängigen Versuchen mit Variationsbreite (Ausnahme: NT-2 für die 3 h-Inkubation und die Zeiten nach Mediumwechsel nur $n = 1$).

3.3.2 Bildung von sekundären DNA-Schäden nach CDDP-Behandlung

Um das Ausmaß sekundärer DNA-Schädigungen nach CDDP-Behandlung zu untersuchen, wie z.B. durch fehlerhafte DNA-Reparatur oder geblockte Replikationsgabeln verursacht, erfolgte die Bestimmung von phosphorylierten Histon H2AX-Foci (γ H2AX-Foci), siehe Abbildung 3.15. Diese stellen einen Marker für DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) dar. Außerdem zeigen sie längere Abschnitte einzelsträngiger DNA an, die durch Replikationsstress erzeugt werden können [69, 107, 108, 132-134].

Unbehandelte NT-2-Zellen zeigten weniger als $2.1 \% \pm 3.0 \%$ und unbehandelte NT-2-R-Zellen weniger als $1.5 \% \pm 1.5 \%$ γ H2AX-positive Zellen. Hingegen zeigten unbehandelte TCam-2-Zellen weniger als $7.9 \% \pm 8.5 \%$ γ H2AX-positive Zellen, was, im Vergleich mit den Embryonalkarzinomzelllinien, einer höheren Grundschädigung entspricht.

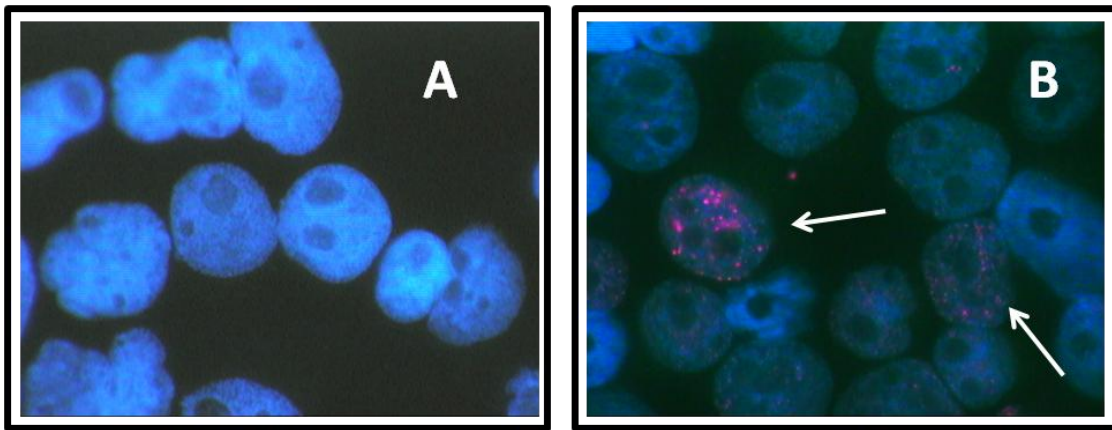


Abbildung 3.15: In der mikroskopischen Analyse wurden die Zellen mittels DAPI Fluoreszenz lokalisiert und der Gehalt an γ H2AX-positiven Zellen bestimmt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen der NT-2-R Zellen. (A) unbehandelte Kontrollzellen und (B) nach Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ CDDP für 24 h. NT-2 Zellen zeigten dieselbe Morphologie. Da die Zellen entweder keine oder eine große Anzahl an γ H2AX-Foci aufwiesen, wurden erstere als ‚negativ‘ und letztere als ‚positiv‘ gezählt (in (B) mit Pfeilen markiert).

Direkt nach einer 3 h Inkubation mit 2.5 μ M CDDP zeigten alle Zelllinien einen leichten, für die NT-2- und NT-2-R-Zellen signifikanten Anstieg an γ H2AX-positiven Zellen (14.3 % \pm 10.0 % für NT-2, 9.4 % \pm 5.1 % für NT-2-R Zellen, $p < 0.05$ und 12.2 % \pm 18.1 % für TCam-2). Dieser Anteil stieg in den nächsten 24 h nach einem Mediumwechsel auf 22.4 % \pm 16.5 % in NT-2- und 14.2 % \pm 18.5 % in NT-2-R-Zellen weiter an (siehe Abbildung 3.16). In den TCam-2 Zellen stieg dieser Anteil auf 33.3 % \pm 23.0 % an. Sie zeigten zu allen Zeitpunkten mehr γ H2AX-positiv Zellen als die NT-2- und NT-2-R-Zellen. Auch 48 h nach einem Mediumwechsel zeigten noch 21.4 % \pm 5.1 % der Zellen γ H2AX-Foci.

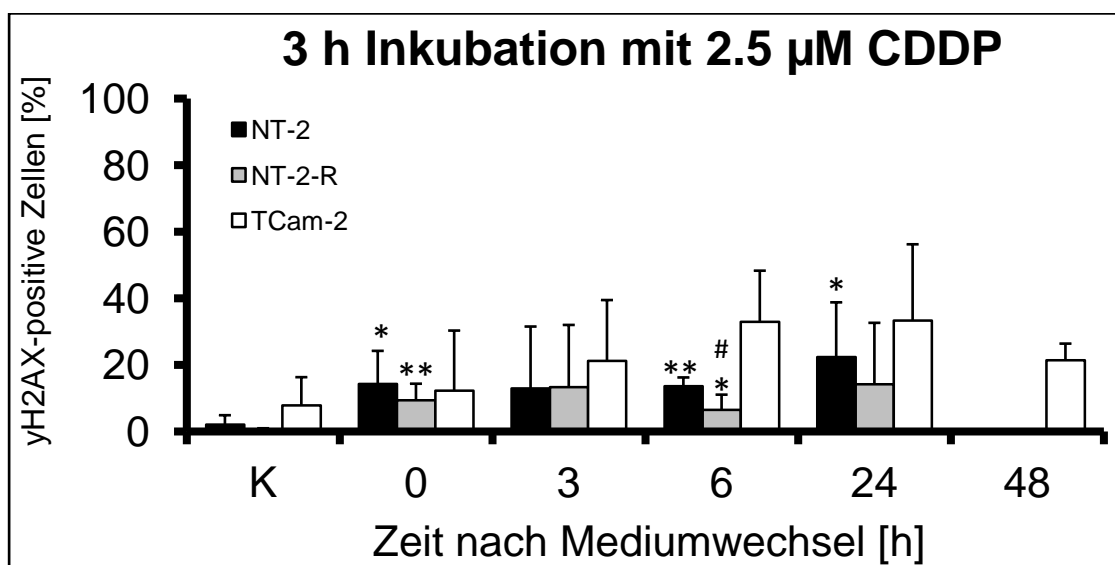


Abbildung 3.16: Bestimmung von γ H2AX-positiven Zellen mittels immunhistochemischer Färbung. NT-2 (■), NT-2-R (■) und TCam-2 (□) Zellen nach Behandlung mit 2.5 μ M CDDP für 3 h mit anschließender cisplatinfreier Inkubation für bis zu 48 h. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mind. drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (* = $p < 0.05$ und ** = $p < 0.01$ gegen die Kontrolle).

Dieser Anteil an γ H2AX-positiven Zellen wurde ebenfalls nach einer 24 h-Inkubation mit 2.5 μ M CDDP erhalten (24.8 % \pm 14.6 % für NT-2 und 19.9 % \pm 11.7 % für NT-2-R, $p < 0.01$ und 29.7 % \pm 14.4 % für TCam-2, $p < 0.05$).

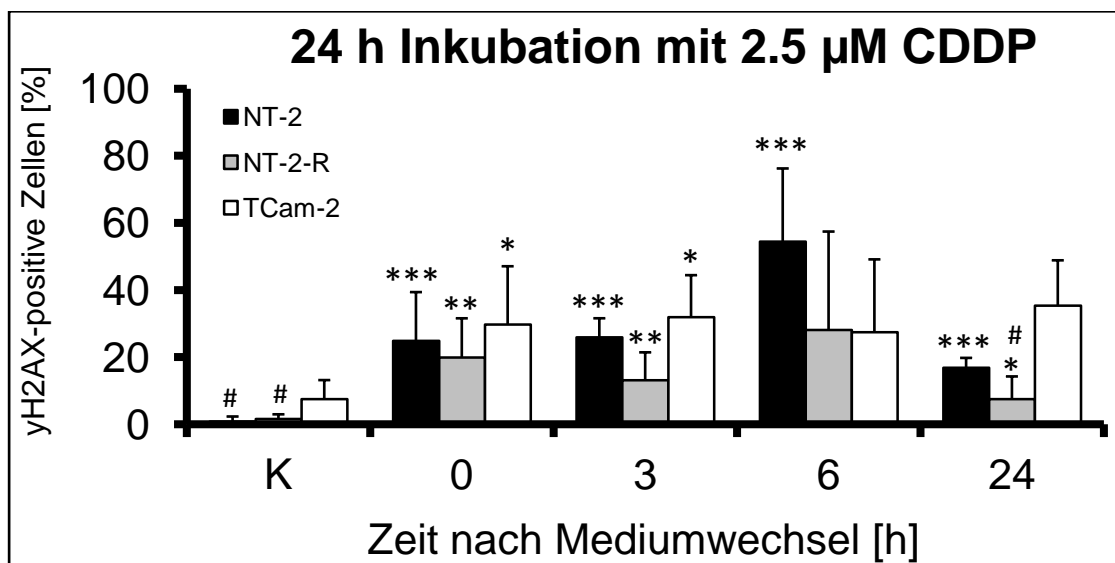


Abbildung 3.17: Bestimmung von γ H2AX-positiven Zellen mittels immunhistochemischer Färbung. NT-2 (■), NT-2-R (■) und TCam-2 (□) Zellen nach Behandlung mit 2.5 μ M CDDP für 24 h mit anschließender cisplatinfreier Inkubation für bis zu 24 h. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mind. drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ und *** = $p < 0.001$ gegen die Kontrolle sowie # = $p < 0.05$ gegen TCam-2 Zellen).

Tendenziell zeigten NT-2- und NT-2-R Zellen 6 h nach dem Mediumwechsel ein Maximum an geschädigten Zellen (54.5 % \pm 21.8 % bzw. 28.1 % \pm 29.4 %) und nach 24 h CDDP-freier Inkubation eine Abnahme auf 16.8 % \pm 3.0 % in NT-2- und 7.5 % \pm 6.8 % in NT-2-R-Zellen (siehe Abbildung 3.17). Für die NT-2-Zellen war diese Abnahme signifikant ($p < 0.05$). Der Anteil an γ H2AX-positiven Zellen in den TCam-2-Zellen blieb dagegen über die gesamte Zeit unverändert.

Eine mögliche Erklärung für die Abnahme an γ H2AX-positiven Zellen in den NT-2- und NT-2-R-Zelllinien ist eine DNA-Reparatur. Allerdings stieg in der gleichen Zeit der Anteil an Zellen in der sub-G₁-Fraktion auf annähernd 5 % in beiden Zelllinien. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass eine DNA-Fragmentierung den Anteil an γ H2AX-positiven Zellen reduziert, da diese Zellen in diesem Assay nicht mehr erfasst werden können.

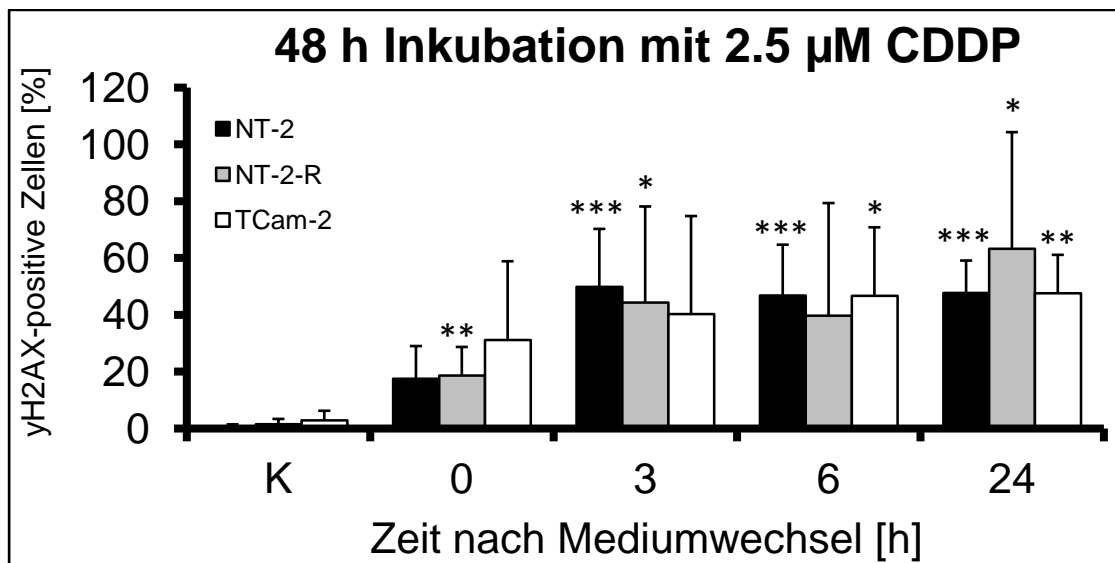


Abbildung 3.18: Bestimmung von γ H2AX-positiven Zellen mittels immunhistochemischer Färbung. NT-2 (■), NT-2-R (■) und TCam-2 (□) Zellen nach Behandlung mit 2.5 μ M CDDP für 48 h mit anschließender cisplatinfreier Inkubation für bis zu 24 h. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mind. drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ und *** = $p < 0.001$ gegen die Kontrolle).

Eine Inkubation von 48 h führte dazu, dass in NT-2- und NT-2-R-Zellen annähernd die gleiche Menge an γ H2AX-positiven Zellen auftrat. Diese war zu allen Zeitpunkten signifikant höher als in den unbehandelten Kontrollen. Direkt nach der Inkubation waren 17.5 % \pm 11.5 % der NT-2-Zellen und 18.7 % \pm 10.0 % der NT-2-R-Zellen γ H2AX-positiv. Während der nächsten 3 h nach dem Mediumwechsel stieg der Anteil an positiven Zellen signifikant an (49.8 % \pm 20.4 % in NT-2 und 44.3 % \pm 33.8 % in NT-2-R, $p < 0.05$) und blieb über den restlichen Beobachtungszeitraum konstant (siehe Abbildung 3.18). Ähnlich verhielten sich auch die TCam-2-Zellen. Direkt nach der Inkubation zeigten 31.1 % \pm 27.7 % der Zellen γ H2AX-Foci. Dieser Anteil stieg in den nächsten Stunden nach dem Mediumwechsel auf 47.6 % \pm 13.5 % an.

Zwischen den NT-2- und NT-2-R-Zellen gab es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Tendenziell zeigten die NT-2-R-Zellen weniger γ H2AX-Bildung als die NT-2-Zellen. Die Ergebnisse lassen nicht erkennen, dass die drei Zelllinien einen wesentlichen Teil γ H2AX dephosphorylieren.

3.3.3 Charakterisierung der DNA-DSB in NT-2- und NT-2-R-Zellen

Ein Modell besagt, dass Platin-Addukte in der S-Phase blockierte Replikationsgabeln verursachen und somit zu einer stabilen H2AX-Phosphorylierung führen [68], ähnlich wie UV-induzierte Pyrimidindimere oder Psoralen-induzierte Interstrang-Crosslinks. Diese zeigen ebenfalls eine γ H2AX-Phosphorylierung, allerdings keine Co-Lokalisation mit 53BP1 [135, 136].

Um zu unterscheiden, ob die untersuchten DSB nun durch Apoptose, durch blockierte Replikationsgabeln in Folge einer Schadensbearbeitung der CDDP-induzierten Addukte oder direkt durch die CDDP-Behandlung entstanden sind, erfolgt eine kombinierte Untersuchung von γ H2AX- und 53BP1-Foci. Treten γ H2AX-Foci co-lokalisiert mit 53BP1-Foci auf, so liegen offene DSB aufgrund einer exogen-induzierten DNA-Schädigung vor [111]. Sie lassen sich von reinen γ H2AX-Foci unterscheiden, welche eine Apoptose oder DNA-Schädigungen auf Grund der blockierten Replikationsgabeln signalisieren.

Die Untersuchung erfolgte beispielhaft an NT-2- und NT-2-R-Zellen zu ausgewählten Zeitpunkten nach einer CDDP-Inkubation mit 2.5 μ M (Abbildung 3.19).

Nur eine Minderheit der γ H2AX-Foci (5-10 % in beiden Zelllinien) zeigte eine Co-Lokalisation mit 53BP1. Die Co-Lokalisation in einzelnen Foci konnte am ehesten in den unbehandelten Kontrollen beobachtet werden.

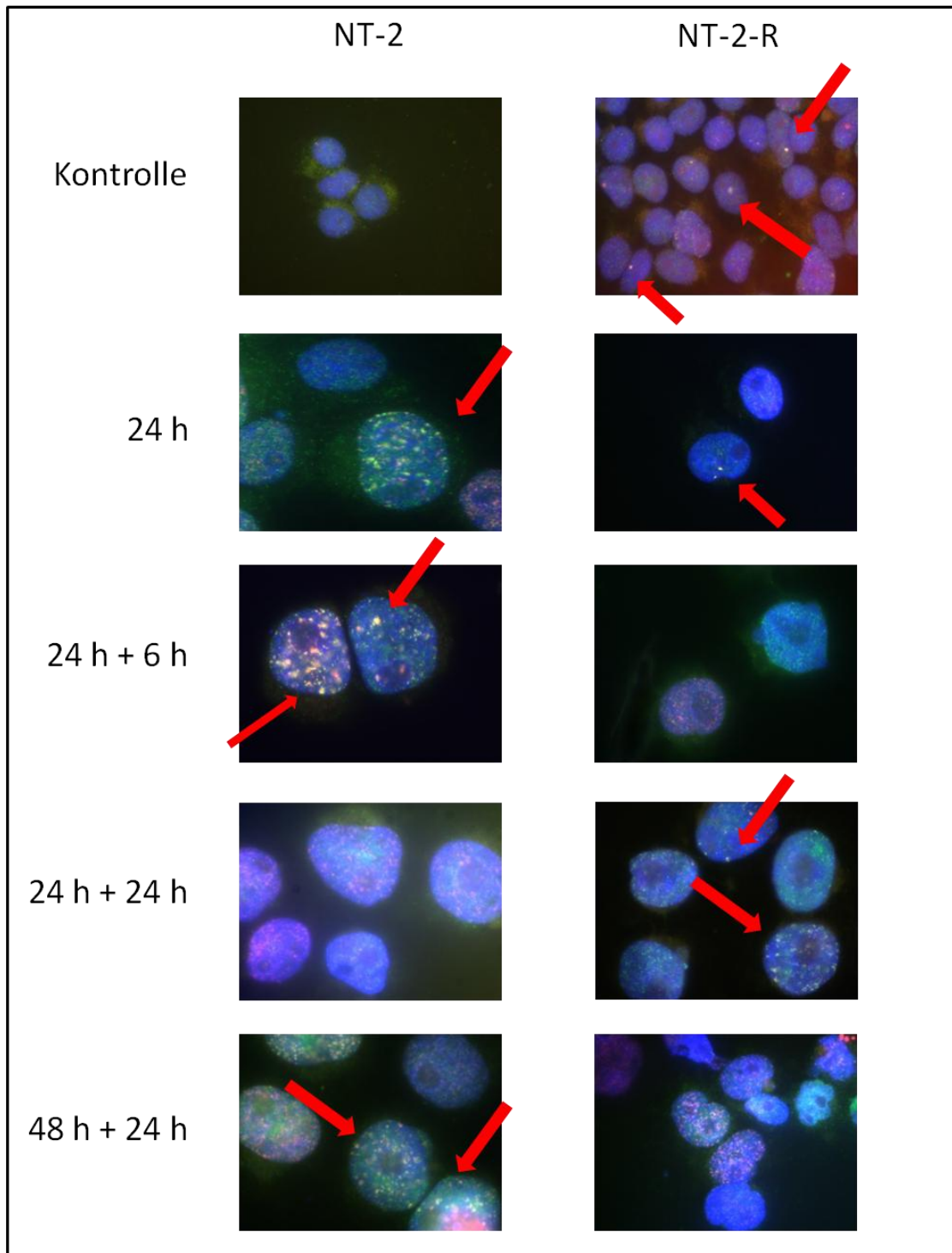


Abbildung 3.19: Simultane immunhistochemische Färbung von γ H2AX und 53BP1 in NT-2- und NT-2-R-Zellen. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 2.5 μ M CDDP behandelt und anschließend für bis zu 24 h in cisplatinfreiem Medium weiter inkubiert. Beide Zelllinien, behandelt oder unbehandelt, zeigten ein ähnliches Verhalten bzgl. der γ H2AX und 53BP1 Co-Lokalisation. Durch das Übereinanderlegen der DAPI-Fluoreszenz (blau) mit den γ H2AX- (rot) und 53BP1- (grün) Foci-Fluoreszenzen ergibt sich eine gelbe Fluoreszenz für co-lokalisierten Foci. Sie sind mit Pfeilen markiert. Großflächige rote oder grüne Fluoreszenzen entsprechen unspezifischen Hintergrundfärbungen.

3.4 Vergleichende Untersuchung ausgewählter Proteine

Der Einfluss von CDDP auf den intrazellulären Gehalt ausgewählter Proteine wurde anhand von Western Blots bestimmt. Untersucht wurden DNA-Reparaturproteine wie ERCC1, BRCA1, BRCA2 sowie die DNA-Polymerasen η (pol η) und β (pol β), die an der DNA-Translesion-Synthese beteiligt sind. Die Untersuchungen erfolgten zu ausgewählten Zeitpunkten (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Verwendete CDDP-Inkubationsbedingungen zur Proteinanalyse

	Zeiten	Bedingungen
Proteinanalyse	3 h / 3 h + 24 h 24 h / 24 h + 24 h	Kontrolle, 2.5 μ M

Die Proteine wurden wie in der Standardmethode beschrieben (siehe Abschnitt 7.7.1) isoliert. Die DNA mitsamt den daran gebundenen Proteinen wurde dabei verworfen. Das Isolat wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Dort folgten anschließend der immunologische Nachweis und die Quantifizierung der Proteine (Abschnitt 7.7.2).

Als Ladungskontrolle diente die Bestimmung der Bandenstärke des Coomassie-gefärbten Proteingels.

3.4.1 Absoluter Proteingehalt in unbehandelten Kontrollzellen

Zunächst erfolgte die Bestimmung der ausgewählten Proteine in den unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist die absolute Proteinmenge der einzelnen Proteine bezogen auf die eingesetzte Menge an Gesamtprotein. Die Unterschiede im Verhalten nach der CDDP-Inkubation könnten auf einem unterschiedlichen Gehalt der beteiligten Proteine beruhen. Um außerdem mögliche Klassenmerkmale der Tumorarten aufzudecken, erfolgte eine vergleichende Untersuchung an der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 (siehe Abschnitt 1.2.2). In den Kontrollen erfolgte außerdem die Bestimmung von β -Tubulin. Es diente hier als zusätzliche interne Ladungskontrolle.

Die TCam-2-Zellen wiesen tendenziell mehr ERCC1 als NT-2-, NT-2-R- und HT-29-Zellen auf (Abbildung 3.20). Sie zeigten dafür im Vergleich mit den anderen drei Zelllinien einen signifikant niedrigeren Gehalt an pol β (mind. $p < 0.05$). In den HT-29-Zellen war dieser zudem niedriger als in den NT-2- ($p < 0.05$) und NT-2-R-Zellen. Der Gehalt an β -Tubulin war in allen Zelllinien ähnlich, lediglich die HT-29-Zellen zeigten einen tendenziell höheren Gehalt (Abbildung 3.20).

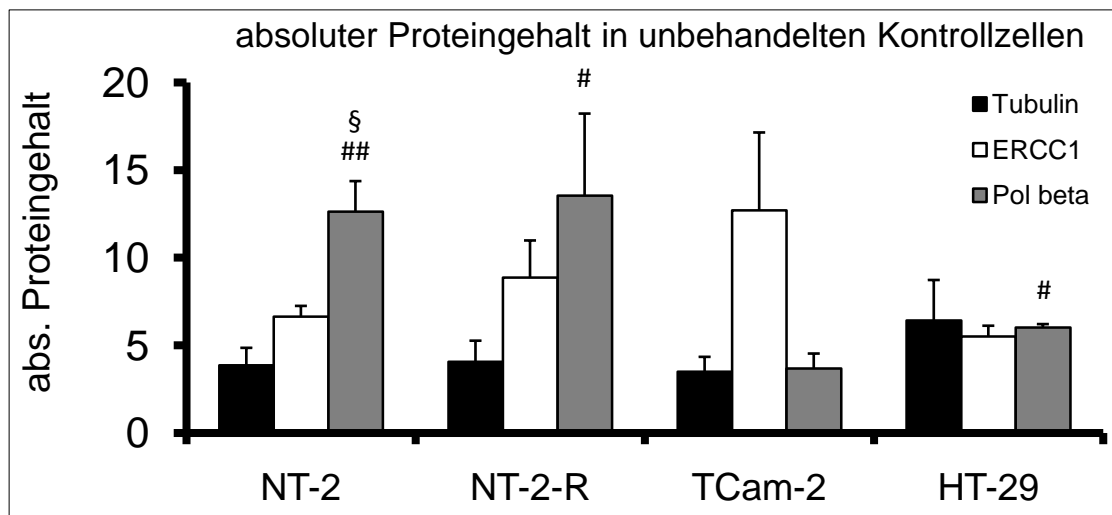


Abbildung 3.20: Vergleich unbehandelter NT-2-, NT-2-R-, TCam-2- und HT-29-Zellen. Untersuchung von Tubulin (■), ERCC1 (□) und pol β (■). Die Proteintrennung erfolgte auf 10 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gelen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (# = $p < 0.05$, ## = $p < 0.01$ gegen TCam-2 sowie § = $p < 0.05$ gegen HT-29).

Darüber hinaus wiesen einzig die TCam-2-Zellen eine detektierbare Menge BRCA1 auf. Weder in den Keimzelltumorzelllinien NT-2 und NT-2-R noch in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wurde BRCA1 gefunden (Abbildung 3.21). Ferner wiesen die TCam-2-Zellen den niedrigsten Gehalt an pol η ($p < 0.05$) auf. Die HT-29-Zellen zeigten hier den höchsten Gehalt. Die NT-2- und NT-2-R-Zellen exprimierten im Vergleich zu den TCam-2- und HT-29-Zellen mehr BRCA2 ($p < 0.05$ gegen TCam-2, Abbildung 3.21).

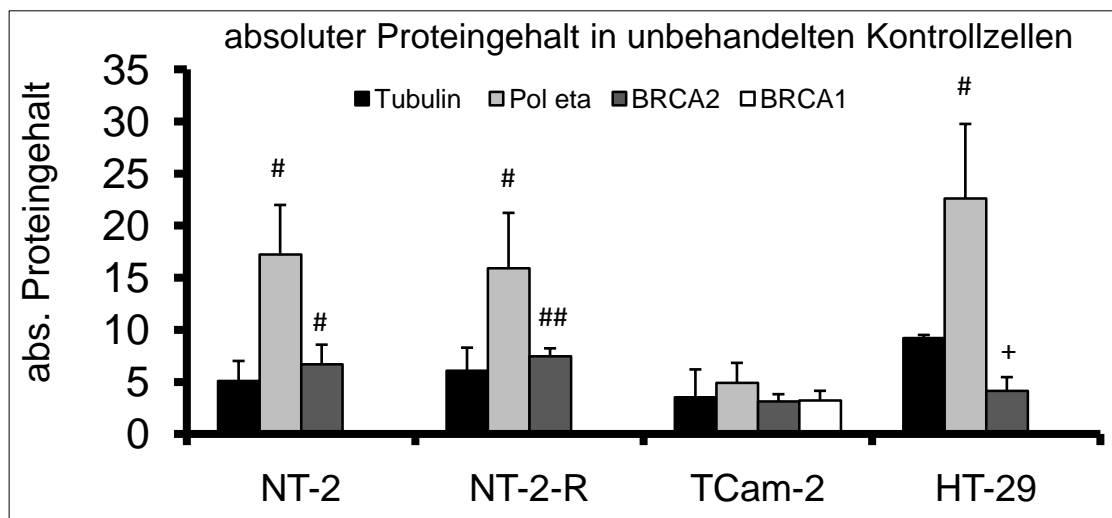


Abbildung 3.21: Vergleich unbehandelter NT-2-, NT-2-R-, TCam-2- und HT-29-Zellen. Untersuchung von Tubulin (■), pol η (■), BRCA2 (■) und BRCA1 (□). Die Proteintrennung erfolgte auf 8 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gelen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (# = $p < 0.05$, ## = $p < 0.01$ gegen TCam-2 sowie + = $p < 0.05$ gegen NT-2-R).

3.4.2 Analyse der Wirkung von CDDP auf die Proteinexpression

Anschließend erfolgte die Analyse der mit CDDP behandelten Zellen. In den vorangegangenen Untersuchungen wurde deutlich, dass frühestens 24 h nach einem Mediumwechsel Veränderungen messbar waren. Desweiteren dauert es eine gewisse Zeit, bis Veränderungen (Hoch- und / oder Herunterregulation) auf Proteinebene sichtbar werden. Es erfolgten daher nur die Bestimmungen nach 3 h bzw. 24 h Inkubation mit 2.5 μ M CDDP und anschließender cisplatinfreier Inkubation für weitere 24 h.

Die Quantifizierung der Proteine (Abschnitt 7.7.2.4) erfolgte densitometrisch im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen; diese zeigen daher den Wert „1“.

In den NT-2-Zellen hatte eine Inkubation mit 2.5 μ M CDDP über 3 h keinen Einfluss auf den Gehalt an ERCC1 (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23). Auch 24 h nach einem Mediumwechsel kam es nur zu einem minimalen Anstieg an Protein. Der Gehalt an pol β war hingegen direkt nach der Inkubation signifikant erniedrigt ($p < 0.05$), stieg aber über die Zeit wieder auf Kontrollniveau an. Auch der Gehalt an BRCA2 war direkt nach der Inkubation vermindert. Dieser veränderte sich über die Zeit allerdings nicht mehr. Der Gehalt an pol η war zu keinem Zeitpunkt verändert (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23).

In den NT-2-R-Zellen kam es direkt nach der Inkubation zu einem Anstieg an ERCC1 (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23). Der Gehalt stieg in den 24 h nach einem Mediumwechsel weiter an ($p < 0.01$). Tendenziell stieg auch der Gehalt an pol β . Analog den NT-2-Zellen war der BRCA2-Gehalt direkt nach der Inkubation erniedrigt ($p < 0.05$) und veränderte sich über die Zeit nicht mehr. Die Menge an pol η war nach einer 3 h Inkubation zunächst vermindert ($p < 0.05$) und stieg dann nach dem Mediumwechsel wieder auf Kontrollniveau an (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23).

In den TCam-2-Zellen zeigten sich die deutlichsten Veränderungen: Jedes untersuchte Protein zeigte eine verminderte Expression (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23). So sank der Gehalt an ERCC1 nach 3 h auf 75 % des Kontrollgehalts ($p < 0.01$) und nahm nach dem Mediumwechsel noch weiter ab (auf 55 % des Kontrollgehalts, $p < 0.001$). Ebenso verhielt es sich mit den Proteinen pol β ($p < 0.05$ bzw. $p < 0.01$) und BRCA2 (auf 56 % bzw. 33 % des Kontrollgehalts, $p < 0.05$). Tendenziell reduzierte sich auch der Gehalt an BRCA1. Der pol η -Gehalt sank direkt nach der Inkubation und blieb dann über die Zeit unverändert (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23).

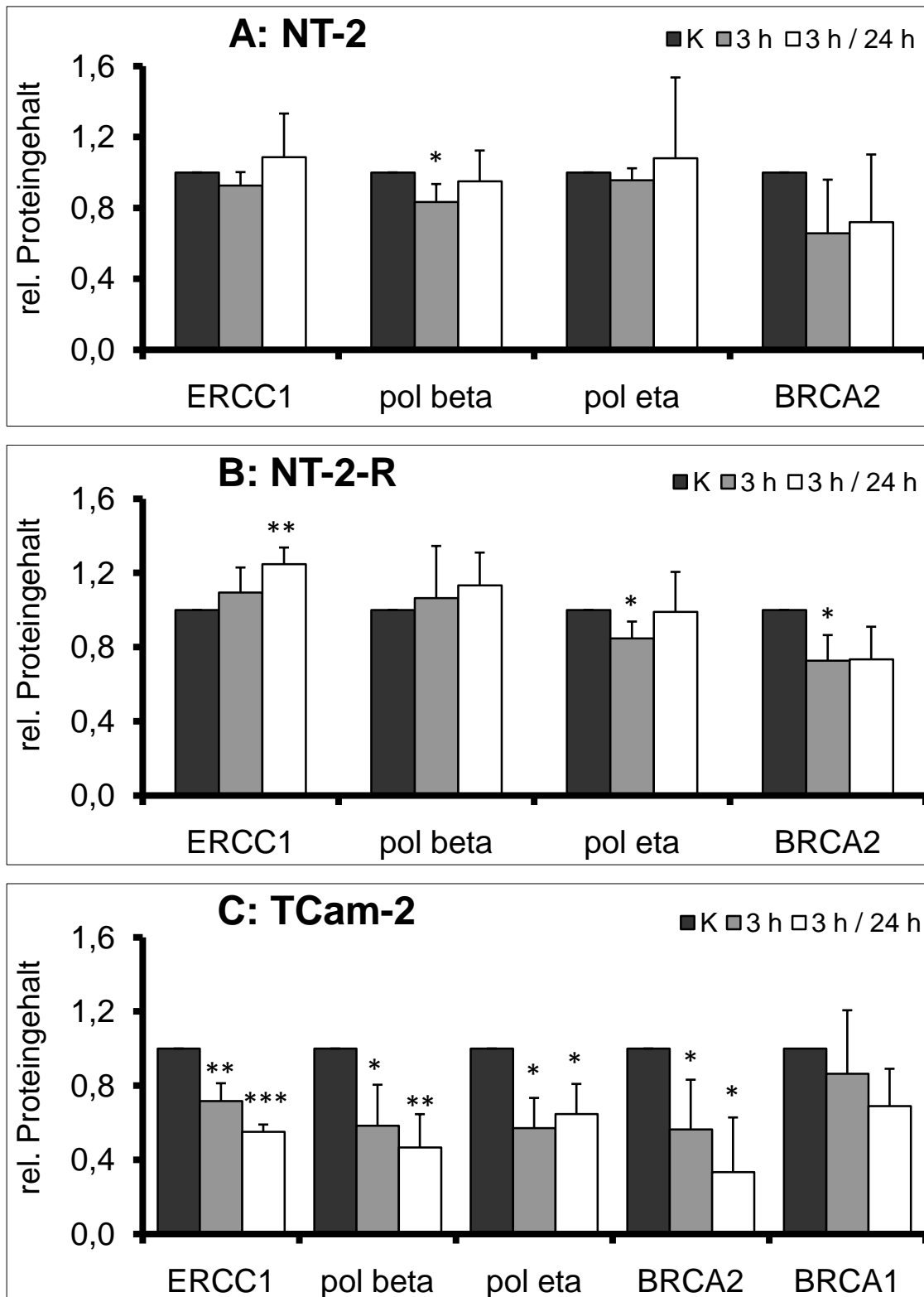


Abbildung 3.22: Wirkung von 2.5 μ M CDDP über 3 h auf die Proteinexpression in A: NT-2-, B: NT-2-R- und C: TCam-2-Zellen. Kontrolle (■), 3 h (▒) und 3 h + 24 h (□). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ und *** = $p < 0.001$ gegen die Kontrolle). Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen; diese zeigen daher den Wert „1“.

Ergebnisse

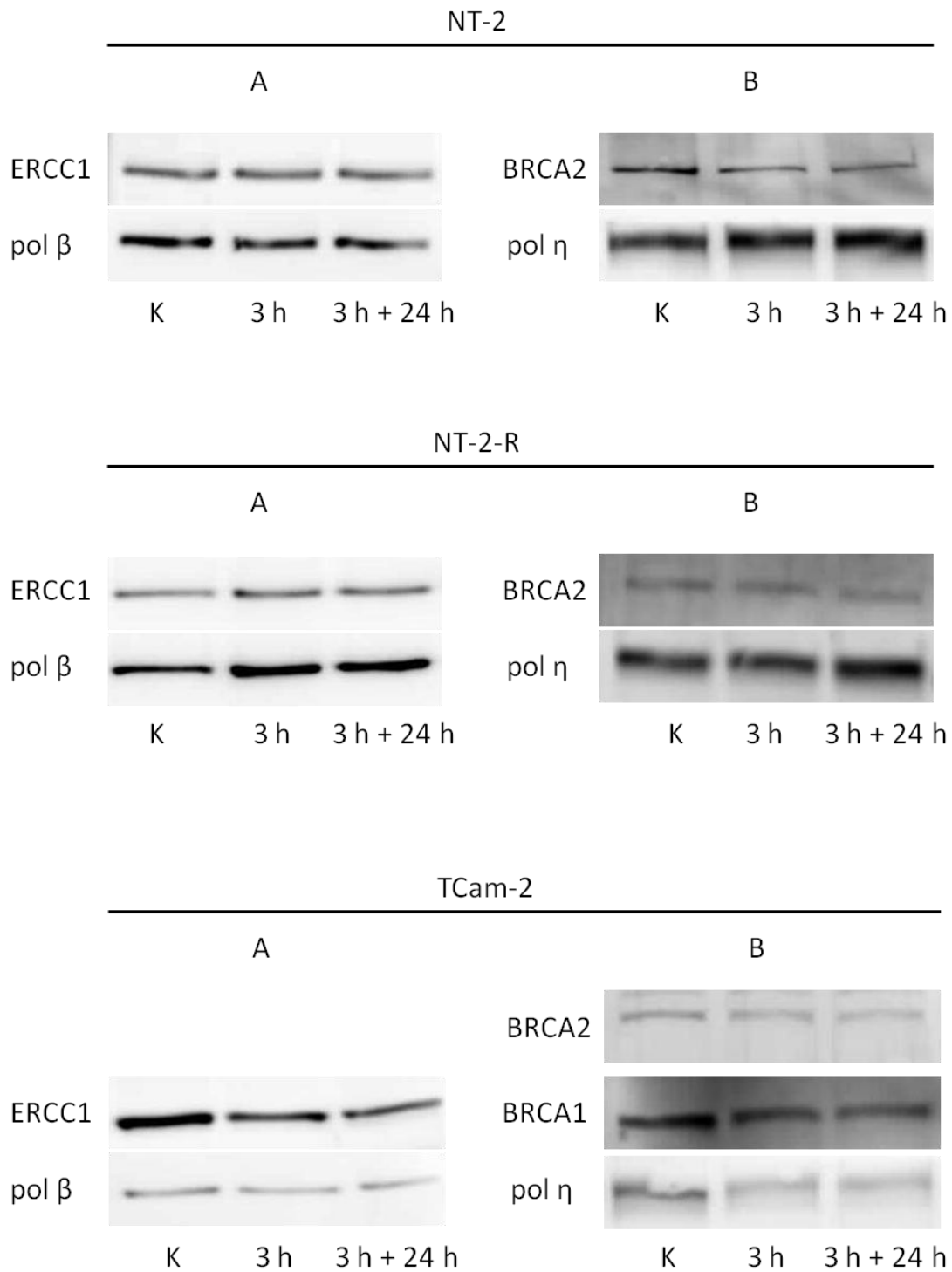


Abbildung 3.23: Western Blot Analyse der CDDP-Wirkung in den NT-2-, NT-2-R- und TCam-2-Zellen nach 3 h-Inkubation. Die Proteingrößen betragen 38 kDa für ERCC1 und pol β (A) sowie 79 kDa für pol η , 220 kDa für BRCA1 und 390 kDa für BRCA2 (B).

Nach einer 24 h-Inkubation mit 2.5 μ M CDDP zeigte sich ein anderes Bild.

In den NT-2-Zellen kam es zu einer Abnahme an ERCC1 ($p < 0.001$). In der Zeit nach dem Mediumwechsel veränderte sich dieser Gehalt dann nicht mehr (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25). Tendenziell stieg der Gehalt an BRCA2 direkt nach der Inkubation und sank dann während der cisplatinfreien Inkubationszeit wieder auf Kontrollniveau. Der Gehalt an pol β war direkt nach der Inkubation vermindert ($p < 0.01$). 24 h nach dem Mediumwechsel zeigten die NT-2-Zellen die 1.26-fache Konzentration der Kontrolle. Bei pol η kam es zu einer minimalen Abnahme; der Gehalt blieb dann über die Zeit nach dem Mediumwechsel unverändert (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25).

Tendenziell nahm auch in den NT-2-R-Zellen der Gehalt an ERCC1 zu (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25). Ebenso verhielt es sich mit pol β . Hier war direkt nach der Inkubation der Gehalt auf das 2.12-fache und 24 h nach dem Mediumwechsel auf das 2.87-fache der Kontrolle angestiegen. Der Gehalt an pol η blieb zunächst unverändert und stieg nach 24 h cisplatinfreier Inkubation minimal an ($p < 0.01$ gegen die Kontrolle und $p < 0.05$ gegen 24 h). Es kam zu keiner signifikanten Veränderung des Proteins BRCA2 (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25).

Im Gegensatz zu einer 3 h-Inkubation führte eine 24 h-Inkubation mit 2.5 μ M CDDP in den TCam-2-Zellen kaum zu Veränderungen im Gehalt der untersuchten Proteine (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25). Pol β , pol η und BRCA2 blieben unverändert. Es zeigten sich weder direkt nach der Inkubation noch 24 h nach einem Mediumwechsel von der Kontrolle abweichende Werte. Dafür sank der ERCC1-Gehalt tendenziell in der Zeit nach dem Mediumwechsel. Die Konzentration an BRCA1 hingegen nahm direkt nach der Inkubation tendenziell zu und blieb auf einem höheren Level als die Kontrolle (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25).

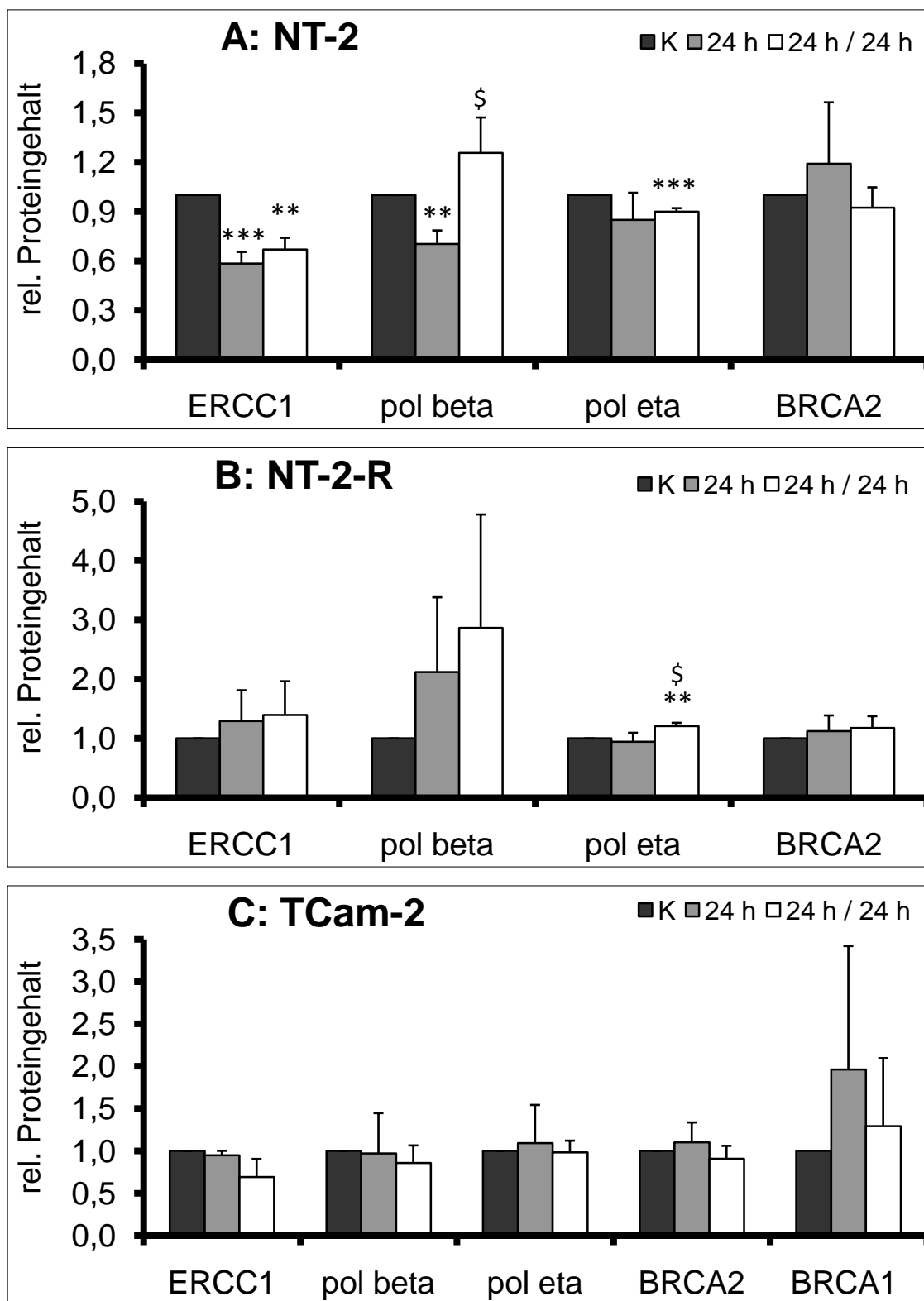


Abbildung 3.24: Wirkung von 2.5 μ M CDDP über 24 h auf die Proteinexpression in A: NT-2-, B: NT-2-R- und C: TCam-2-Zellen. Kontrolle (■), 3 h (▒) und 3 h + 24 h (□). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (** = $p < 0.01$ und *** = $p < 0.001$ gegen die Kontrolle sowie \$ = $p < 0.05$ gegen 24 h). Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen; diese zeigen daher den Wert '1'. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen.

Ergebnisse

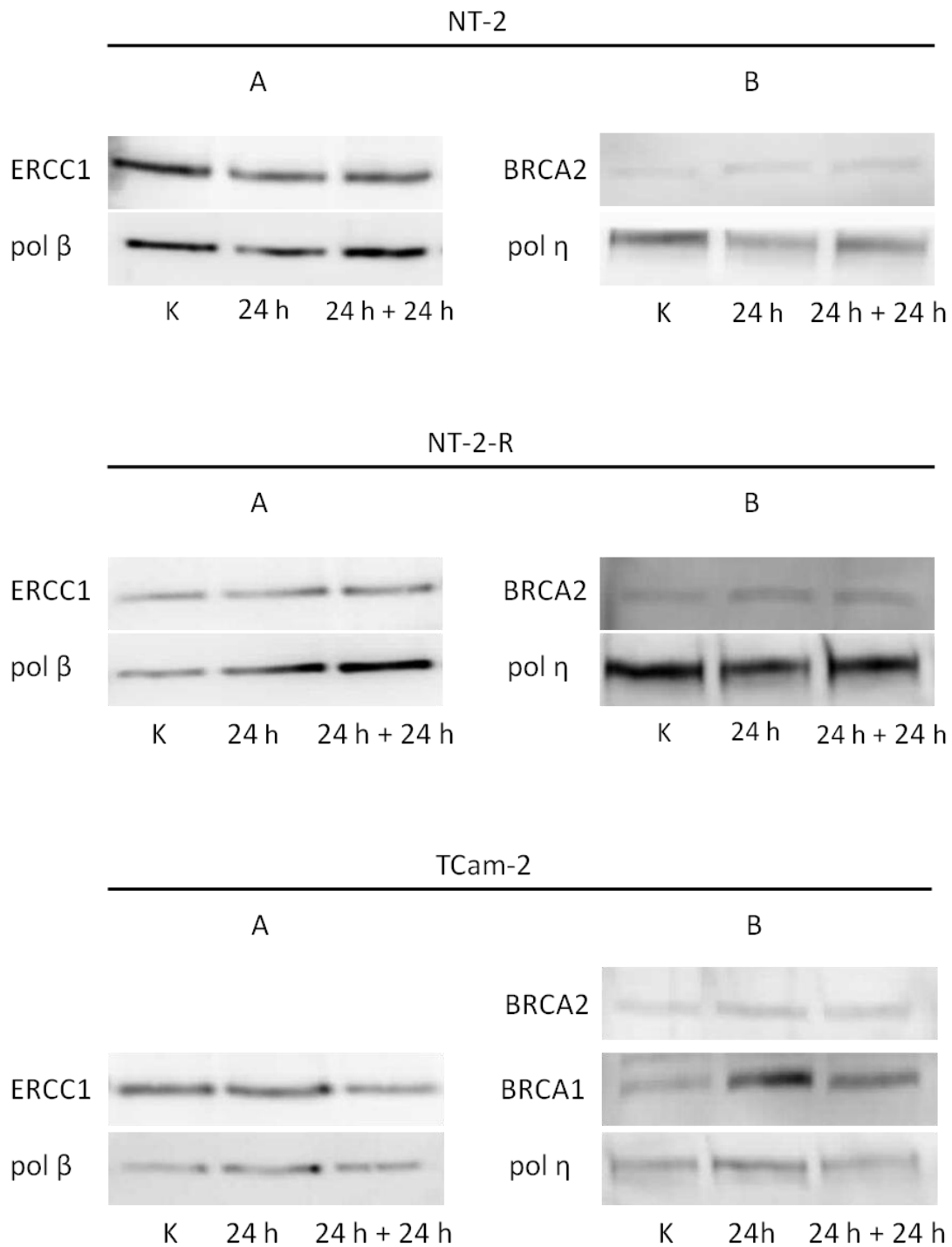


Abbildung 3.25: Western Blot Analyse der CDDP-Wirkung in den NT-2-, NT-2-R- und TCam-2-Zellen nach 24 h-Inkubation. Die Proteingrößen betragen 38 kDa für ERCC1 und pol β (A) sowie 79 kDa für pol η , 220 kDa für BRCA1 und 390 kDa für BRCA2 (B).

3.5 Ergebnisüberblick nach CDDP-Behandlung

Nach der Untersuchung der NT-2-, NT-2-R- und TCam-2-Zellen nach einer CDDP-Behandlung können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

- Nach einer 3 h-Inkubation mit CDDP dauerte es weitere 24 h, bis eine Abnahme der Zellviabilität gemessen werden konnte. CDDP zeigte hier eine zusätzliche zeitabhängige Wirkung.
- In den NT-2- und NT-2-R-Zellen führte bereits eine CDDP-Konzentration von 10 μ M über 3 h zum Verlust der Proliferationsfähigkeit. In den TCam-2-Zellen führten zwar alle untersuchten Bedingungen zu einem verminderten Koloniewachstum aber nicht zum Verlust der Proliferationsfähigkeit.
- TCam-2-Zellen zeigten sowohl im CFA als auch im Lumineszenz-Zellviabilitäts-Assay eine CDDP-Resistenz. Sowohl NT-2- als auch NT-2-R-Zellen waren deutlich empfindlicher gegenüber einer CDDP-Behandlung, wobei die NT-2-R-Zellen resistenter als die NT-2-Zellen waren.
- In den NT-2- und NT-2-R-Zellen kam es über die Zeit nach einer CDDP-Inkubation zu einer Verschiebung der Zellen in die G₂/M-Phase gefolgt von einem Anstieg an Zellen der sub-G₁-Fraktion. Dieser Anstieg war in den NT-2 Zellen deutlich stärker ausgeprägt.
- Um einen ähnlichen Anstieg an Zellen der sub-G₁-Fraktion in den TCam-2 zu erreichen, war eine Inkubation mit 30 μ M CDDP über 48 h notwendig.
- Im Gegensatz zu NT-2-R-Zellen gingen NT-2-Zellen einen Zelltod ein, der durch eine DNA-Fragmentierung und einen Verlust der Membranintegrität charakterisiert war. Diesem fehlte aber eine Präsentation von Phosphatidylserin, einem Kennzeichen der Apoptose. Erst 48 h nach Beginn einer CDDP-Behandlung trat eine für den Zelltod charakteristische DNA-Fragmentierung auf. Diese war unabhängig von der tatsächlichen CDDP-Inkubationsdauer.
- CDDP bildete in allen Zelllinien die gleiche Menge an DNA-Addukten. Diese DNA-Intrastrang-Crosslinks wurden nur minimal wieder von der DNA entfernt.
- Die Zelllinien unterschieden sich nicht im Anteil γ H2AX-positiver Zellen. Tendenziell zeigten die NT-2-R-Zellen weniger und die TCam-2-Zellen mehr γ H2AX-Bildung als die NT-2-Zellen.

- Die unbehandelten TCam-2-Zellen wiesen den höchsten ERCC1-Gehalt auf. Sie hatten dafür den niedrigsten Gehalt an pol η und pol β und zeigten als einzige der untersuchten Zelllinien eine BRCA1 -Expression.
- Eine CDDP-Behandlung über 3 h induzierte in den NT-2-R-Zellen die ERCC1- und pol β -Expression. In den NT-2- und NT-2-R-Zellen führte sie außerdem zu einer Abnahme an BRCA2. In den TCam-2-Zellen kam es bei allen untersuchten Proteinen zu einer verminderten Expression.
- Eine CDDP-Behandlung über 24 h induzierte in den NT-2-R-Zellen auch die ERCC1- und pol β -Expression. In den NT-2-Zellen kam es zu einer verminderten ERCC1-Expression und über die Zeit zu einer Induktion an pol β . In den TCam-2-Zellen führte die CDDP-Behandlung zu einer Induktion an BRCA1 und einer Abnahme an ERCC1.

3.6 Untersuchung der TCam-2-Zellen nach Bestrahlung

Seminome gelten als radiosensitiv. Die adjuvante Radiotherapie gilt als Standard bei der Behandlung von Seminomen der Stadien I bis IIb. So können zwischen 80 % und 95 % der Patienten im Stadium II durch eine postoperative Radio- oder auch Chemotherapie geheilt werden [7, 8, 10, 11].

Der erste Teil der Untersuchungen zeigte, dass die TCam-2-Zellen, die bisher einzige Zelllinie mit gesicherten Seminomeigenschaften [18, 19], nach einer CDDP-Behandlung eine deutliche DNA-Schädigung aufwies. Diese stand in keinem Zusammenhang mit der Chemosensitivität. Im zweiten Teil soll nun untersucht werden, wie die TCam-2-Zellen auf eine Strahlenbehandlung reagieren und ob ein Zusammenhang zwischen der resultierenden DNA-Schädigung und der Radiosensitivität besteht.

Es erfolgte eine kombinierte Untersuchung der TCam-2-Zellen auf Koloniewachstum, DSB und Zellzyklusverteilung. Zunächst wurden $1-1.5 \times 10^5$ Zellen in 10 ml Medium in T₂₅-Kulturflaschen kultiviert, anschließend bestrahlt und 24 h bzw. 48 h später geerntet. Der Ansatz wurde geteilt. Eine Hälfte wurde für den γ H2AX-Assay verwendet (siehe Abschnitt 7.6.2). Von dieser Hälfte wurden außerdem für den CFA 1000 Zellen pro well in 3 ml Medium ausplattiert (6-well Platten). Die Bestimmung des Koloniebildungsvermögens erfolgte ausschließlich 24 h nach der Bestrahlung. Die andere Hälfte wurde zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung verwendet (siehe Abschnitt 7.5.1).

3.6.1 Koloniebildung in TCam-2-Zellen nach Bestrahlung

Um eine Aussage über die Sensitivität der TCam-2-Zellen gegenüber einer Strahlenbehandlung treffen zu können, wurden die Zellen mit einer Dosisreihe von 0-6 Gy bestrahlt und anschließend per CFA untersucht. Das Koloniewachstum der behandelten Zellen wurde auch hier bezogen auf die unbehandelten Kontrollen in Prozent [%] angegeben. Die 1000 ausplattierten Kontrollzellen bildeten nach Bestrahlung 149.1 ± 48.0 Kolonien.

Die Koloniezahl wurde graphisch gegen die Strahlendosis aufgetragen und die Regressionsgerade bestimmt. Aus ihr wurde die IC_{50} berechnet (Abbildung 3.26). Die dosisabhängige Abnahme der Koloniebildung verlief annähernd linear. Die IC_{50} lag bei 3.9 Gy.

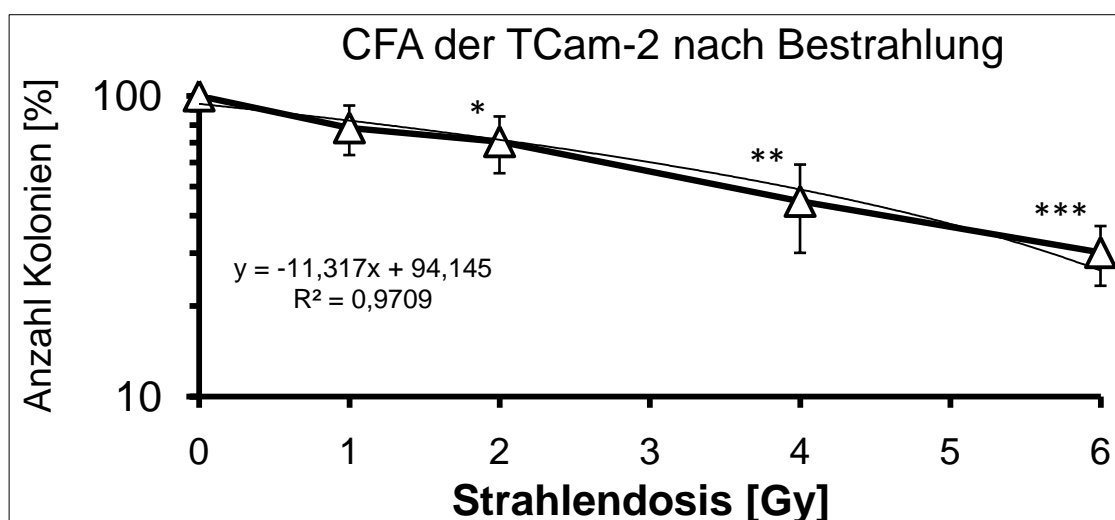


Abbildung 3.26: Koloniebildung nach Bestrahlung von TCam-2-Zellen. Die Grafiken zeigen die Anzahl der Kolonien [%] im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen (0). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ und *** = $p < 0.001$ gegen die Kontrolle). Zu beachten ist die halblogarithmische Darstellung.

3.6.2 Analyse der Zellverteilung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen

Um den Einfluss einer Strahlenbehandlung auf die Zellzyklusverteilung zu untersuchen, wurde der DNA-Gehalt behandelter Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abschnitte 7.5.1 und 3.2.2). Es wurden im Mittel 30.000 mit PI markierte Zellen vermessen. Anhand des PI-Signals erfolgte dann die Einteilung der Zellen in die jeweilige Zellzyklusphase.

Unbehandelte Kontrollen waren zu 57.6 % \pm 3.6 % in der G₁-Phase, zu 12.4 % \pm 0.6 % in der S- und zu 27.2 % \pm 3.0 % in der G₂/M-Phase. 2.8 % \pm 1.2 % der Zellen befanden sich in der sub-G₁-Fraktion. Sie zeigten somit die gleiche Zellzyklusverteilung wie die Kontrollzellen in den Versuchen nach CDDP-Behandlung (siehe Abschnitt 3.2.2).

Nach einer Bestrahlung kam es nur zu minimalen Veränderungen in der Zellzyklusverteilung der TCam-2-Zellen. Die Messungen erfolgten 24 h und 48 h nach der Bestrahlung. Die Zellzyklusverteilung zu den beiden Zeitpunkten unterschied sich nicht signifikant (Abbildung 3.27).

Nach der Bestrahlung mit 6 Gy kam es zu einem minimalen Anstieg an Zellen der sub-G₁-Phase auf 4.2 % \pm 1.2 % (24 h nach Bestrahlung) bzw. auf 5.2 % \pm 0.9 % (48 h nach Bestrahlung, $p < 0.05$). Eine Dosis von 6 Gy führte 24 h nach der Bestrahlung außerdem zu einer leichten Abnahme an Zellen in der S-Phase (8.5 % \pm 1.9 %, $p < 0.05$). 48 h nach der Bestrahlung mit 6 Gy nahm der Anteil der Zellen in der G₁-Phase geringfügig ab und dafür der Anteil Zellen in der G₂/M-Phase zu ($p < 0.05$) (Abbildung 3.27).

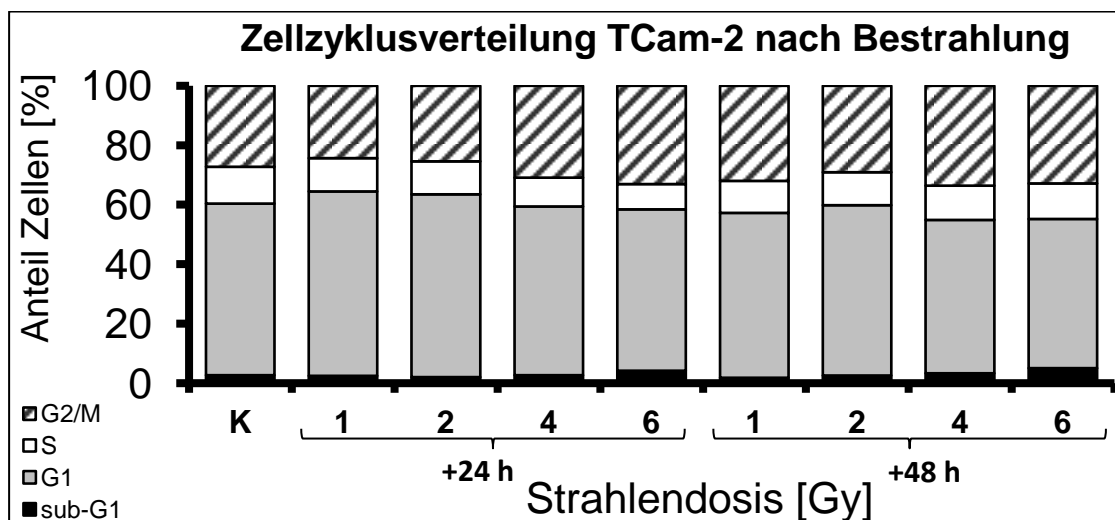


Abbildung 3.27: Veränderung der Zellzyklusverteilung in den TCam-2-Zellen nach Bestrahlung. Der Anteil an Zellen je Zellzyklusphase [sub-G₁ (■), G₁ (■), S (□) und G₂/M (▨)] wurde in Prozent gegen die Strahlendosis aufgetragen. K zeigt die Verteilung unbehandelter Kontrollzellen. Alle Werte wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt. Die absoluten Standardabweichungen waren ≤ 1.2 % für sub-G₁, ≤ 8.8 % für G₁, ≤ 2.2 % für S und ≤ 8.4 % für G₂/M.

3.6.3 Bildung von DNA-Schäden nach Bestrahlung

Die Auswirkungen von Strahlenbehandlungen auf die DNA sind gut dokumentiert. So ist bekannt, dass eine Bestrahlung offene DNA-Doppelstrangbrüche induziert. An diesen kommt es zur Bildung von γ H2AX-Foci. Die Messung der gebildeten γ H2AX-Foci ist eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung dieser DNA-Schädigungen nach Bestrahlung. Im Bereich klinisch relevanter Dosierungen ist sie anderen Verfahren überlegen. So ist es möglich, auch Schädigungen nach Behandlung mit < 1 mGy oder von 1 Foci auf 30 Zellkerne zu bestimmen. Desweiteren könnte γ H2AX als Marker für die Radiosensitivität dienen [110].

Um eine Aussage über das Ausmaß der DNA-Schädigung nach einer Strahlenbehandlung treffen zu können, wurden die TCam-2-Zellen zunächst bestrahlt und anschließend die Bildung der γ H2AX-Foci bestimmt. Wieder zeigten bereits die unbehandelten Kontrollzellen einen relativ hohen Anteil γ H2AX-positiver Zellen ($11.7 \% \pm 3.3 \%$, siehe Abschnitt 3.3.2).

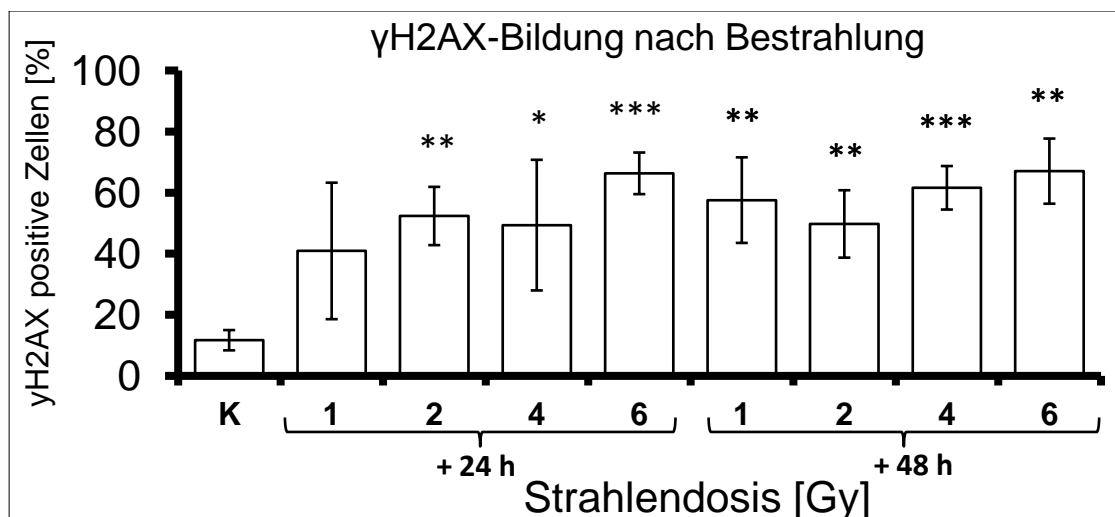


Abbildung 3.28: Bestimmung von γ H2AX-Foci mittels immunhistochemischer Färbung nach Bestrahlung. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mind. drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ und *** = $p < 0.001$ gegen die Kontrolle).

Auch hier erfolgten die Messungen 24 h und 48 h nach der Bestrahlung. Entsprechend vorangegangener Versuche konnte auch bei diesen Messungen zu beiden Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 3.28). Eine Bestrahlung induzierte in den TCam-2-Zellen eine Zunahme an γ H2AX-positiven Zellen. Ein Minimum zeigte sich 24 h nach Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 1 Gy ($40.9 \% \pm 22.3 \%$) und ein Maximum 48 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 6 Gy ($67.0 \% \pm 10.7 \%$). Im Vergleich dazu induzierte eine CDDP-Behandlung einen maximalen Anteil an γ H2AX-positiven Zellen von $47.6 \% \pm 13.5 \%$ nach 48 h Inkubation mit $2.5 \mu\text{M}$ und anschließender cisplatinfreien Inkubationszeit von weiteren 24 h (siehe Abschnitt 3.3.2).

3.7 Ergebnisüberblick nach Bestrahlung

Aus der Untersuchung der TCam-2-Zellen nach Bestrahlung und dem Vergleich mit der CDDP-Behandlung können folgende Resultate festgehalten werden:

- Eine Bestrahlung führte in den TCam-2-Zellen zu einer dosisabhängigen Abnahme der Proliferationsfähigkeit. Eine Dosis von 6 Gy reduzierte die Zahl gebildeter Kolonien auf $30.2 \% \pm 6.8 \%$; das war vergleichbar mit einer CDDP-Behandlung von $15 \mu\text{M}$ über 3 h ($31.7 \% \pm 11.2 \%$).
- Nach Bestrahlung kam es nur zu minimalen Veränderungen in der Zellzyklusverteilung. Es zeigte sich keine dosisabhängige Zunahme an Zellen der sub-G₁-Fraktion, anders als nach einer CDDP-Behandlung, wonach ein konzentrationsabhängiger Anstieg zu beobachten war.
- Die DNA-Schädigung, gemessen als phosphoryliertes H2AX (γH2AX), war nach Bestrahlung größer als nach einer CDDP-Behandlung. Es kam zu keiner Reduktion an γH2AX -positiven Zellen über die Zeit.

4 Diskussion

Das Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit war, die Sensitivität und das Ansprechen der Embryonalkarzinomzelllinie NT-2 und ihrer CDDP-adaptierten Sublinie NT-2-R auf eine CDDP-Behandlung zu charakterisieren. Die resistente Subzelllinie NT-2-R wurde unter kontinuierlicher CDDP-Behandlung aus der NT-2-Zelllinie generiert. Sie gilt somit als Beispiel für eine erworbene CDDP-Resistenz. Die Charakterisierung der Sublinie erfolgte mittels MTT und zeigte in diesem Assay eine 14-fache Resistenz gegenüber der Elternzelllinie NT-2 nach 48 h CDDP-Inkubation (siehe Abschnitt 1.1.2.2). Vergleichende Untersuchungen erfolgten auch an der ersten und bisher einzigen etablierten Seminomzelllinie TCam-2.

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss eine CDDP-Behandlung auf die Proliferationsfähigkeit und Viabilität der Zellen hat. Außerdem wurde der CDDP-Einfluss auf die Zellzyklusverteilung und die Apoptose betrachtet. Es handelt sich bei beiden um Charakteristika der Zellantwort und vermeintliche Determinanten der Resistenz.

Anschließend wurde auf die durch CDDP verursachten DNA-Schädigungen eingegangen. Besonderes Augenmerk lag dabei in der Analyse der primären Folgen einer CDDP-Behandlung, der Bildung von DNA-Addukten und den sekundären Folgen, wie z.B. der Bildung von DSB.

Ferner wurden mögliche weitere Faktoren untersucht und diskutiert, die das Ansprechen auf und die Resistenz gegen CDDP beeinflussen könnten. Dazu wurden die Auswirkungen auf die Expression der DNA-Reparaturproteine ERCC1, BRCA1 und BRCA2 untersucht. Diese Proteine sind auch in die DNA damage response involviert. Die Beteiligung einer TLS an der CDDP-Resistenz wurde ebenfalls analysiert. Hierfür erfolgte die Bestimmung der spezialisierten DNA-Polymerasen η (pol η) und β (pol β).

4.1 Zytotoxische Effekte nach CDDP-Behandlung

Die in dieser Arbeit verwendete Embryonalkarzinomzelllinie NT-2 ist eine bekannte und gut charakterisierte Zelllinie, die bereits für diverse Untersuchungen zur Chemosensitivität und -resistenz herangezogen wurde [65, 137-139].

Die Verwendung einer Elternzelllinie und ihrer resistenten Sublinie erlaubt die direkte Identifizierung veränderter zellulärer Prozesse sowie die vergleichende Analyse der CDDP-Wirkungen. Studien an Tumorzelllinien dienen dem Gewinn erster Einblicke, um zytotoxische Eigenschaften einschätzen zu können und um Mechanismen zu erforschen, die die Toxizität modulieren können. Obwohl die aus Zellkulturversuchen gewonnenen Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf die klinische Situation übertragen werden können, ist diese Methode anerkannt, um Einblicke in Mechanismen und Prozesse wie Zellzyklusarrest, Zellmetabolismus, DNA-Reparatur und Zelltod zu gewinnen. Alle diese Faktoren können die zelluläre Empfindlichkeit auf zytotoxische Substanzen beeinflussen [4].

4.1.1 Koloniebildungsvermögen

Die Ergebnisse zeigten, dass die NT-2-R-Zelllinie resistenter als ihre Elternzelllinie NT-2 ist. Das galt insbesondere für kürzere Inkubationszeiten (< 48 h) und niedrigere CDDP-Konzentrationen, was auch im Viabilitäts-Assay beobachtet wurde (siehe Abschnitt 3.2.2).

Die Ermittlung der IC_{50} -Konzentrationen von CDDP zeigte im Vergleich der Zelllinien untereinander, dass die NT-2-Zellen am sensitivsten auf die Behandlung mit CDDP reagierten, gefolgt von ihrer resistenten Sublinie NT-2-R und den TCam-2-Zellen. Frühere von NT-2-Zellen gewonnene Ergebnisse, die ebenfalls deren außergewöhnlich hohe CDDP-Sensitivität zeigten, konnten somit bestätigt werden. Koch *et al.* zeigten in einem Vergleich mehrerer TGCT-Zelllinien untereinander, dass die NT-2-Zellen am sensitivsten waren [138].

Diese Beobachtungen sind von klinischem Interesse, da sogar eine 2- bis 4-fach höhere CDDP-Resistenz *in vitro* mit einem verringerten Tumoransprechen *in vivo* korreliert [4, 140].

Diesbezüglich ähneln die NT-2- und NT-2-R Zellen der TGCT-Zelllinie 833k und deren Subklon 833kr, in dem eine Resistenz bei moderaten CDDP-Konzentrationen ausgeprägter war als bei höheren CDDP-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu war die Resistenz in den korrespondierenden Subklonen der GCT27 und SuSa TGCT-Zelllinien bei höheren CDDP-Konzentrationen deutlicher ausgeprägt [141].

Die in diesem Zusammenhang untersuchte Seminomzelllinie TCam-2 wies im Vergleich zu den NT-2- und NT-2-R-Zellen ein deutlich höheres Resistenzniveau unter CDDP-Behandlung auf. Diese Resistenz war ebenfalls für kurze Inkubationszeiten ausgeprägter. Dennoch reichte auch eine CDDP-Inkubation über 48 h mit einer Konzentration von 100 μ M nicht aus, um einen Verlust der Proliferationsfähigkeit hervorzurufen. Die höhere Resistenz widerspricht den klinischen Daten zu Seminomen. Diese gelten als höchst sensitiv gegenüber einer Chemo- und Radiotherapie [7, 8, 10, 11]. Es könnte ein Zusammenhang mit der *in vitro* Kultivierung der Zellen bestehen, da die Bedingungen in der Zellkultur nicht zwangsläufig mit denen im Tumor (*in vivo*) übereinstimmen. Es ist zu beachten, dass die TCam-2-Zelllinie eine Ausnahme darstellen muss. Bisherige Versuche, eine Seminomzelllinie zu etablieren, sind daran gescheitert, dass Seminome eine sehr hohe Apoptoseanfälligkeit zeigen [59, 142]. In der TCam-2-Zelllinie muss somit eine veränderte Anlage zur Apoptoseinduktion bzw. eine Apoptoseresistenz vorliegen [19].

4.1.2 CellTiter-Glo[®] Luminescence Cell Viability Assay

Anschließend wurde mit dem CellTiter-Glo[®] Luminescence Cell Viability Assay ein Test durchgeführt, der den ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen bestimmt. Das von den Zellen produzierte ATP wird in Gegenwart von Luciferin durch das Enzym Luciferase unter Lichtemission zu AMP umgesetzt.

Da die Intensität des emittierten Lichts proportional der Anzahl lebender Zellen (Zellviabilität) ist, wird dieser Assay als Zytotoxizitätstest eingesetzt [143, 144]. Allerdings kann dieser Test nicht zwischen teilungsfähigen und ruhenden, metabolisch aktiven Zellen (G_0 -Phase) unterscheiden.

Die Untersuchungen der Zellviabilität bestätigten die unterschiedlichen Sensitivitäts- bzw. Resistenzniveaus der drei Zelllinien. Die TCam-2-Zellen zeigten auch hier zu allen Zeitpunkten die größte Resistenz. Die Unterschiede zwischen der NT-2- und der NT-2-R-Zelllinie waren moderat. Allerdings liegen die ermittelten IC_{50} -Werte höher als im CFA. Das hängt damit zusammen, dass Zellen, die ausschließlich in ihrer Proliferation gehemmt sind, noch erfasst und lediglich tote Zellen von der Bestimmung ausgeschlossen werden können. Desweiteren braucht es mind. 24 h, unabhängig von der tatsächlichen Inkubationszeit, bis Veränderungen im ATP-Gehalt messbar wurden.

4.1.3 Beeinflussung des Zellzyklus

Es ist bekannt, dass Zellen als Reaktion auf die Entstehung von DNA-Schädigungen, wie z.B. DNA-DSB, die Progression durch den Zellzyklus stoppen und so gegebenenfalls Zeit für die DNA-Reparatur erhalten [32, 95]. Veränderungen in der Zellzyklusverteilung nach einer CDDP-Behandlung waren in den NT-2- und NT-2-R-Zellen qualitativ vergleichbar. Beide Zelllinien zeigten eine verlängerte S-Phase nach 24 h-Inkubation, welche in einen G₂/M-Arrest überging und letztlich, 48 h nach einem Mediumwechsel, zur Apoptose führte (siehe Abschnitt 3.2.3). Diese wurde als Anstieg der Zellen in der sub-G₁-Fraktion gemessen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Gruppen überein, die ebenfalls eine verlängerte S-Phase sowie einen vorübergehenden oder irreversiblen G₂/M-Arrest, abhängig von der CDDP-Dosierung, beschrieben haben [65, 67, 145].

Mueller *et al.* beobachteten einen transienten G₂/M-Arrest nach subletalen CDDP-Dosierungen [65]. Nach Behandlung mit höheren CDDP-Konzentrationen verzeichneten sie einen G₂/M-Block, der direkt zum Zelltod führte. Sorenson und Eastman wiesen in murinen Leukämie L1210-Zellen bei niedrigen CDDP-Konzentrationen um 3 µM eine verlängerte S-Phase und einen vorübergehenden G₂/M-Arrest nach. Dieser G₂/M-Arrest blieb nach höheren CDDP-Konzentrationen um 6 µM für mehrere Tage bestehen [67]. Die in dieser Arbeit eingesetzte CDDP-Konzentration von 2.5 µM führte ebenfalls zu einem transienten S-Phase-Arrest. Fest steht allerdings, dass die Zellen nicht dauerhaft in ihrer Replikation gehemmt werden, da sie nach der verlängerten S-Phase in die G₂/M-Phase übergehen können.

In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die TCam-2-Zellen nach einer 48 h-Inkubation mit 30 µM CDDP einen G₁-Arrest zeigten [17]. Diese Ergebnisse konnten hier nicht bestätigt werden. Nach einer Inkubation mit 30 µM bzw. 100 µM CDDP über 24 h und 48 h wurde ein deutlicher Anstieg an Zellen der sub-G₁-Fraktion beobachtet. Allerdings bestätigte sich, dass sich die Seminomzelllinie TCam-2 nicht wie die Embryonalzelllinien NT-2 und NT-2-R verhielt. Die TCam-2-Zellen zeigten nach einer Behandlung mit 2.5 µM CDDP zu keinem Zeitpunkt eine Verschiebung der Zellen in die S-Phase (siehe Abbildung 3.10). Auch der Anstieg an Zellen in der G₂/M-Phase war nur mäßig ausgeprägt. Darüber hinaus führte dieser im weiteren Verlauf nicht zu einer Erhöhung der Zellen in der sub-G₁-Fraktion.

Die Zeit, die Zellen benötigen, um in der S- bzw. G₂/M-Phase zu akkumulieren und die Zeit zur Apoptoseinduktion sind abhängig von der Populationsverdopplungszeit. Diese betrug etwa 31 h für die NT-2-Zellen und etwa 35 h für die NT-2-R- sowie etwa 50 h für die TCam-2-Zellen. Desweiteren besteht für einen Zellzyklusarrest eine Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Addukt-Bildung. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in den NT-2-Zellen die CDDP-Bindung an die DNA in den ersten 28 h der Inkubation ansteigt [14]. Es ist naheliegend, dass das Maximum der Addukt-Bildung mit einer Zeitverzögerung hinsichtlich der Inkubationszeit erreicht wird.

Da sich in den NT-2- und NT-2-R-Zellen weder die Populationsverdopplungszeiten noch die Verläufe der Adduktbildung signifikant unterscheiden, überrascht es nicht, dass auch der G₂/M-Arrest in beiden Zelllinien den gleichen Zeitverlauf zeigte. Allerdings war der Anteil an Zellen, der nach 24 h CDDP-Behandlung mit anschließender cisplatinfreier Inkubation für weitere 24 h einen G₂/M-Arrest zeigte, in den NT-2-R-Zellen signifikant niedriger ($p < 0.05$). Diese geringere Akkumulation der Zellen in der G₂/M-Phase kann zu der beobachteten Resistenz der NT-2-R-Zellen beitragen. Da die Zahl abgelöster Zellen auch bei längeren Inkubationszeiten nicht signifikant anstieg, kam es auch nicht zu einem Verlust stark geschädigter Zellen, die sich der Analyse entzogen hätten. Im Unterschied zu den beiden Embryonalkarzinomzelllinien zeigten die TCam-2-Zellen nur eine minimale Verschiebung in die G₂/M-Phase. Es akkumulierten hochsignifikant weniger Zellen in der G₂/M-Phase ($p < 0.01$). Die TCam-2-Zellen wiesen allerdings auch eine deutlich längere Verdopplungszeit auf. Die G₂/M-Phase scheint von entscheidender Wichtigkeit für die Zytotoxizität von CDDP in TGCTs zu sein [65].

Außerdem zeigten die NT-2-R-Zellen eine kleinere sub-G₁-Fraktion als deren Elternlinie NT-2, wohingegen in der Seminomzelllinie TCam-2 kein Anstieg zu beobachten war. In diesem Zusammenhang erscheint es plausibel, dass die TCam-2-Zellen nach einer CDDP-Behandlung mehr Kolonien bilden konnten und höhere IC₅₀-Werte als die NT-2- und NT-2-R-Zellen aufwiesen. Auch hier könnte deren veränderte Apoptoseneigung eine Erklärung für den fast unveränderten Zellzyklusverlauf liefern.

Eine Behandlung der TCam-2-Zellen mit höheren CDDP-Konzentrationen von 30 µM bzw. 100 µM über längere Zeiten konnte einen Anstieg der Zellen in der sub-G₁-Fraktion induzieren. Die eingesetzten Konzentrationen führten zu einem direkten Anstieg ohne eine vorangegangene, sichtbare Akkumulation in der G₂/M-Phase. Sie führten also direkt zum Zelltod. Dennoch reichten diese Bedingungen im CFA nicht aus, um die Proliferationsfähigkeit vollständig zu inhibieren.

Interessanterweise zeigte sich zwischen den NT-2- und NT-2-R-Zellen ein statistisch signifikanter Unterschied in der Proliferationshemmung nach einer 3 h-Inkubation mit 2.5 µM CDDP. Diese Bedingung war nicht ausreichend, um einen G₂/M-Arrest oder einen Anstieg an Zellen der sub-G₁-Fraktion zu initiieren. Da allerdings nur der erste mitotische Zyklus (vorübergehender G₂/M-Arrest und Entlassung in die G₁-Phase) untersucht wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass nach einer 3 h-Behandlung die Einleitung des Zelltods erst nach späteren Replikationsrunden auftritt. Dieses Phänomen wurde für zwei andere Arten des Zelltods beschrieben, die sich in einigen Aspekten von der Apoptose unterscheiden: mitotische Katastrophe und frühzeitige Seneszenz. Beide wurden in anderen Zellarten nach niedrig dosierter CDDP-Behandlung beobachtet [146-149].

Die mitotische Katastrophe führt während der Mitosezyklen zum Zelltod. Eine verfrühte Seneszenz führt die Zellen in einen Ruhezustand [150]. Der Seneszenz-Phänotyp ist gekennzeichnet durch überlebende Zellen, die keine Kolonien mehr bilden können. Seneszenten Zellen sind noch immer metabolisch aktiv. Die mitotische Katastrophe ist eine Form des Zelltods, die von einer anormalen Mitose herrührt und zur Bildung von Interphase-Zellen mit multiplen Mikronuklei führt. Molekulare Untersuchungen an TGCT-Zelllinien konnten CDDP-induzierte Gene identifizieren, die mit einem terminalen Wachstumsarrest über eine Seneszenz assoziiert sind [145].

4.1.4 Charakterisierung des Zelltods

Zwischen den Zelllinien bestanden deutliche Unterschiede in der Bildung und im Ausmaß der sub-G₁-Fraktion. In einer weiteren Versuchsreihe wurde daher die Art des Zelltods näher charakterisiert. Es wurde ausgenutzt, dass Apoptose und Nekrose unterschiedliche Veränderungen der Zellmembran verursachen [123], die sich durch Inkubation mit Annexin-V und Propidiumiodid differenzieren lassen (Abschnitt 1.6).

Es konnten keine Veränderungen in der Annexin-V-Bindung zwischen den Kontrollen und den behandelten Zellen sowie zwischen den NT-2- und NT-2-R Zellen beobachtet werden. In den NT-2-Zellen konnte nach einer 48 h-Inkubation mit anschließender cisplatinfreier Inkubation von 24 h eine massive Aufnahme an PI gemessen werden. Sie gingen somit einen Zelltod ein, der durch eine DNA-Fragmentierung (sub-G₁-Fraktion) und einen Verlust der Membranintegrität (PI-Aufnahme) charakterisiert war. Es fehlte allerdings ein Kennzeichen der Apoptose: die Präsentation von Phosphatidylserin. Die Untersuchungen zur Annexin-V-Bindung und zur PI-Aufnahme lassen vermuten, dass NT-2- und NT-2-R-Zellen nicht durch klassische Apoptose untergehen. Auch hier lässt sich vermuten, dass der Zelltod via frühzeitiger Seneszenz oder mitotischer Katastrophe vermittelt sein könnte.

4.1.5 Ausblick

In weiteren Untersuchungen an den TCam-2-Zellen wäre interessant zu klären, ob CDDP-Konzentrationen zwischen 2.5 μM und 30 μM zu einem S- oder G₂/M-Arrest und darüber zum Zelltod führen oder ob auch hier ohne vorherigen Zellzyklusarrest der Zelltod eintritt.

In einem nächsten Schritt sollten weitere Untersuchungen zur Art des Zelltods erfolgen. In den TCam-2-Zellen könnte das unter zwei Gesichtspunkten interessante Einblicke geben: auf die Art des Zelltods bei den Bedingungen, die einen Anstieg der sub-G₁-Fraktion bedingen und auf die Frage, ob tatsächlich eine veränderte Apoptosetoleranz bzw. -resistenz vorliegt. Desweiteren sollte untersucht werden, ob der Zelltod in den NT-2- und NT-2-R-Zellen tatsächlich via mitotischer Katastrophe oder frühzeitiger Seneszenz eintritt. Für letzteres eignet sich die Bestimmung der SA- β -Galaktosidase-Expression mittels Anfärbung von X-gal [150].

4.2 DNA-Schädigung durch CDDP

4.2.1 DNA-Platinierung nach CDDP-Behandlung und deren Verlauf

Da im Zuge der CDDP-Aktivität zunächst die DNA-Addukte gebildet werden, wurde untersucht, ob sich Ausmaß und Verlauf der DNA-Schädigungen zwischen den Zelllinien unterscheiden und somit eine Erklärung für die unterschiedlichen Resistenzniveaus liefern könnte. Gemessen wurde dies anhand der 1,2-d(GpG)-Intrastrang-Addukte.

Andere Arbeitsgruppen haben beschrieben, dass CDDP-sensitive Zelllinien höhere initiale Adduktspiegel zeigen als deren korrespondierende, resistente Sublinien [37]. Im Unterschied dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit in den drei Zelllinien vergleichbare DNA-Adduktspiegel gemessen. In den TCam-2-Zellen waren diese sogar minimal höher als in den NT-2- und NT-2-R-Zellen. Dies entspricht den Beobachtungen anderer Gruppen, die in sensitiven und resistenten TGCT-Zellen nach CDDP-Behandlung mit äquimolaren Dosierungen ebenfalls ähnliche Mengen an platinierter DNA gefunden haben [4, 82]. Diese fehlende Korrelation zwischen CDDP-Sensitivität und DNA-Adduktspiegeln wurde auch in Ovarialkarzinom- [106], Kolonkarzinom- [14], kleinzelligen Lungenkarzinom- und weiteren TGCT-Zelllinien [13, 15, 71] beschrieben.

Diese fehlende Korrelation zwischen CDDP-Sensitivität bzw. CDDP-Resistenz und den DNA-Adduktspiegeln wird in den TCam-2-Zellen besonders deutlich. Sie wiesen die höchsten Adduktspiegel auf, waren aber die resistenteste der drei Zelllinien.

Desweiteren haben Masters und Köberle angegeben, dass die Behandlung mit CDDP in unterschiedlichen Krebsarten zu einer großen Spanne im Gehalt an platinierter DNA führt, was den Gehalt in TGCTs mit einschließt [4]. Im Gegensatz zu resistenten Ovarialkarzinom- und Melanomzellen [151, 152] wurde in den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit über die Beobachtungszeit nach einer 24 h-Inkubation in keiner der drei TGCT-Zelllinien eine statistisch signifikante Abnahme der DNA-Platinierung festgestellt. Tendenziell zeigten alle Zelllinien 24 h nach dieser Inkubation leicht verminderte Adduktspiegel. Ob diese Reduktion auf einer Reparatur der Addukte zurückzuführen ist, sollte durch weitere Untersuchungen des Zeitverlaufs geklärt werden.

Unterschiede in der CDDP-Aufnahme bzw. CDDP-Eliminierung oder DNA-Bindung scheinen auf Grund vergleichbar hoher Adduktspiegel in den Zelllinien für die Unterschiede in der CDDP-Empfindlichkeit keine Rolle zu spielen.

Versuche nach einer 3 h-Inkubation mit 2.5 μ M CDDP haben in den NT-2-R-Zellen gezeigt, dass die Menge an platinierter DNA in der Zeit nach einem Mediumwechsel abnimmt. Da die Unterschiede im Koloniebildungsvermögen zwischen der Elternzelllinie NT-2 und dem resistenten Subklon NT-2-R nach einer 3 h-Inkubation am größten waren, ist diese Beobachtung von Interesse. Es scheint, als könnten die NT-2-R-Zellen eine geringe DNA-Schädigung noch reparieren. Diese Annahme würde zumindest die beobachteten Unterschiede erklären. Im weiteren Verlauf der Arbeit erfolgte daher auch eine Untersuchung der DNA-Reparaturproteine nach einer 3 h-Inkubation.

4.2.2 Sekundäre DNA-Schädigungen durch CDDP und deren Verlauf

Es ist bekannt, dass CDDP-Interstrang-Crosslinks über geblockte Replikationsgabeln zu DSB führen können [34, 66, 67]. Der Einfluss dieser sekundären DNA-Schädigungen auf die CDDP-Toxizität und -Resistenz in TGCT-Zelllinien wurde untersucht. Von Interesse ist außerdem, dass auch die 1,2-d(GpG)-Intrastrang-Addukte potente Inhibitoren der DNA-Polymerasen sind und somit ebenso die Replikationsgabeln blockieren können ([153], zitiert nach [154]). Die Bestimmung der sekundär-induzierten DSB erfolgte mittels immunhistochemischer Färbung von γ H2AX-Foci. Diese Methode ist sensitiver als andere Methoden zur DSB-Bestimmung wie z.B. der Comet-Assay [69, 109, 132, 155].

Banath *et al.* beobachteten, dass die Retention der γ H2AX-Foci auf eine letale DNA-Schädigung hinweist. Sie fanden eine annähernde 1:1 Korrelation zwischen dem Koloniebildungsvermögen und dem Anteil γ H2AX-positiver Zellen 24 h nach einer Inkubation [156]. Dies wird durch die hier gefundenen Ergebnisse jedoch widerlegt. NT-2-R-Zellen zeigten zwar weniger γ H2AX-Foci als NT-2- aber auch weniger als TCam-2-Zellen. Die Unterschiede waren allerdings weder im Ausmaß noch im Zeitverlauf statistisch signifikant. Eine hohe Anzahl γ H2AX-negativer Zellen wurde zudem auch bei Bedingungen gefunden, die die Proliferationsfähigkeit vollständig inhibierten. Außerdem wiesen insbesondere die primär resistenten TCam-2-Zellen, trotz ihres vergleichbar hohen Anteils an γ H2AX-Foci, bei keiner der untersuchten Bedingung einen Verlust ihrer Proliferationsfähigkeit auf. Das Ausmaß der sekundär gebildeten DNA-Schädigungen liefert keine Erklärung für die unterschiedlichen Resistenzniveaus.

Es konnte in keiner der Zelllinien eine Dephosphorylierung von γ H2AX beobachtet werden. Da eine Korrelation zwischen dem Verschwinden eines γ H2AX-Signals und einer DSB-Reparatur widersprüchlich diskutiert wird [110, 157, 158], kann eine Reparatur bzw. ein Reparaturversuch der Zellen nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Zudem fanden Huang *et al.* nach einer CDDP-Behandlung im Vergleich mit einer Topotecan-Behandlung γ H2AX-Foci, die schwächer und zellzyklusunabhängig waren und im Zeitverlauf deutlich später ein Maximum aufwiesen [69]. Topotecan gilt im Gegensatz zu CDDP als direkter DSB-Induktor. Sie postulieren, dass, wenn DSB erst im Rahmen einer Reparatur gebildet werden (wie bei CDDP), die Bestimmung von γ H2AX das Ausmaß dieser Reparaturprozesse widerspiegelt. Wenn sich dies als richtig herausstellen sollte, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit an, dass die drei untersuchten Zelllinien die induzierten DNA-Addukte zu reparieren versuchen. Da allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien vorliegen, scheint eine veränderte bzw. unterschiedliche Reparaturkapazität für die beobachteten Differenzen nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Almeida *et al.* haben in NSCLC-Zellen nach einer CDDP-Behandlung inverse Korrelationen zwischen CDDP-Sensitivität und Schadensbildung sowie zwischen Resistenz und Schadensreparatur gefunden [159]. Sie halten eine verstärkte Schadenstoleranz für die Ursache. Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse aus den TCam-2-Zellen lassen somit vermuten, dass diese Zelllinie eine erhöhte Toleranz gegenüber den CDDP-induzierten DNA-Schädigungen zeigt. Eine solche Toleranz ist als CDDP-Resistenzmechanismus bekannt und kann durch eine TLS hervorgerufen werden [29].

UV-induzierte Pyrimidindimere und Psoralen-induzierte Interstrang-Crosslinks zeigen eine γ H2AX-Phosphorylierung, allerdings keine Co-Lokalisation dieser Foci mit 53BP1 [135, 136]. 53BP1 scheint überwiegend an strahleninduzierten DSB mit γ H2AX co-lokalisiert zu sein [111]. Im Einklang mit der Vermutung der indirekt-induzierten DSB nach CDDP-Behandlung und gegen die Anwesenheit von direkt gebildeten, offenen DSB, wurde hier festgestellt, dass in den NT-2- und NT-2-R-Zellen nur wenige γ H2AX-Foci mit 53BP1 co-lokalisiert waren.

Die hohen Standardabweichungen dieses Assays beruhen vermutlich auf der nicht-synchronisierten Zellkultur. So liegen die Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen vor, aber Interstrang-induzierte DSB auf Grund blockierter Replikationsgabeln werden in der S-Phase gebildet. Hinzu kommt, dass der Anteil γ H2AX-positiver Zellen niemals den Anteil an Zellen in der S-Phase überschritt. Die in dieser Arbeit gefundenen Daten harmonisieren also mit einem bereits postulierten Modell, wonach Platinaddukte in der S-Phase Replikationsgabeln blockieren und somit eine stabile H2AX-Phosphorylierung ermöglichen [68].

Es war nicht möglich, nach einer CDDP-Behandlung einzelne Foci pro Zelle zu zählen. Die Auswertung erfolgte daher nicht durch ein Zählen der Foci, sondern lediglich durch die Bestimmung γ H2AX-positiver Zellen.

So kann auch verhindert werden, dass Zellen der S- oder G₂/M-Phase, die einen 1.5-2-fach höheren DNA-Gehalt und damit auch Histon-Gehalt aufweisen, einen größeren als den tatsächlich induzierten Schaden vortäuschen können. γ H2AX-Foci werden außerdem auf Grund der DNA-Fragmentierung bei der Apoptose gebildet [155]. Die hohen Standardabweichungen könnten also auch auf falsch-positive apoptotische Zellen zurück zu führen sein.

Zusammengenommen deuten die gefundenen Daten darauf hin, dass die unterschiedliche Toxizität von CDDP in den NT-2- bzw. NT-2-R- und TCam-2-Zellen nicht mit der Bildung von DSB oder deren weiterer Prozessierung zusammenhängt. Faktoren, die für die unterschiedliche Sensitivität der einzelnen Zelllinien verantwortlich sind, müssen also nachfolgend oder unabhängig von der DNA-Bindung und der direkten Schadensbearbeitung sein, da unterschiedliche Aufnahme- oder Eliminierungsraten zu einer Diskrepanz in den Adduktspiegeln geführt hätten. Diese Faktoren modulieren vermutlich die Signalwege der DNA damage response bzw. die Signalwege des Zelltods. Die folgenden nachgeschalteten Faktoren sollen, wie bereits beschrieben, die Resistenz beeinflussen: vermehrte Bildung von Transporterproteinen [151, 152], Herunterregulation von MAD2 (mitotic arrest deficient-2 Protein) [62, 160], Hemmung des Fas-Signalweges [84], Veränderungen im ATM / Chk2 / p53 Signalweg, eine Verschiebung zu Mitgliedern der anti-apoptotischen Bcl-2 Familie, fehlende Caspase-Kaskaden [4, 47, 66, 82, 161] und eine Translesion-Synthese (TLS) [114, 115, 117-119, 136].

4.2.3 Ausblick

Untersuchungen an TCam-2-Zellen mit anderen Inkubationszeiten könnten Aufschluss darüber geben, ob diese Zellen grundsätzlich höhere Adduktspiegel aufweisen als die Embryonalzelllinien und somit die Vermutungen bestärken, dass keine Korrelation zwischen DNA-Platinierung und Resistenz besteht, sondern eine veränderte Apoptosetoleranz in den TCam-2-Zellen vorliegen muss.

Die Bestimmung der sekundären DNA-Schädigungen mittels γ H2AX sollte in weiteren Versuchen die gleichzeitige Bestimmung der Zellzyklusphasen beinhalten. So kann der Anteil falsch-positiver Zellen, z.B. hervorgerufen durch eine DNA-Fragmentierung, herausgerechnet werden. Eine geeignete Methode hierfür ist eine kombinierte durchflusszytometrische Bestimmung [109, 132, 155].

Nachdem Unterschiede in der Bildung der DNA-Schädigungen und deren weiterer Verlauf bzw. deren Bearbeitung als Mechanismen der beobachteten Resistenzen ausgeschlossen werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass eine verminderte Apoptoseein- und -weiterleitung und/oder eine TLS Kandidaten für die Resistenzfaktoren sind. Insbesondere, da zum einen in TGCTs generell die Apoptoseschwelle niedrig ist [57] und zum anderen die TLS einen modulierenden Einfluss auf die CDDP-Aktivität hat [114, 115, 117-119].

Die im weiteren Verlauf der Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf Proteinebene befassen sich vornehmlich mit möglichen Veränderungen in der DNA damage response bzw. den daran beteiligten DNA-Reparaturproteinen sowie dem Einfluss einer TLS auf die Resistenzentwicklung.

4.3 Veränderte Proteinexpression nach CDDP-Behandlung

Die Analyse der unbehandelten Kontrollzellen hinsichtlich ihres Gehalts an ausgewählten Proteinen zeigte, dass die NT-2- und NT-2-R-Zellen ein ähnliches Expressionsmuster aufwiesen. Diese unterscheidet sich von den TCam-2-Zellen. Dafür kommen zwei Ursachen in Frage. Zum einen unterscheiden sich die Tumorarten an sich und zum anderen könnten die Veränderungen, die zu einer Kultivierung der TCam-2-Zellen beigetragen haben, auch für die hier beobachteten Unterschiede verantwortlich sein. Ersteres ist plausibel, da auch die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 ein von den TGCT-Zelllinien abweichendes Proteinmuster aufweist. Da sich das initiale Proteinexpressionsmuster in den NT-2- und NT-2-R-Zellen nicht unterscheidet, gibt es keinen direkten Hinweis auf die zugrundeliegenden Resistenzmechanismen in den NT-2-R Zellen.

4.3.1 Untersuchung der an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine

Es stellt sich die Frage, inwieweit (sekundäre) CDDP-Resistenzen in TGCTs auf Grund einer gesteigerten Expression von Proteinen der NER und HR bzw. der DNA damage response auftreten.

Studien deuten darauf hin, dass viele TGCT-Zelllinien ein Reparaturdefizit aufweisen [30, 50]. Dieses Defizit kann zu der außergewöhnlichen Sensitivität dieser Zellen gegenüber DNA-schädigender Agenzien beitragen [13, 51]. Wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, kam es außer in den NT-2-R-Zellen nach einer 3 h Inkubation mit 2.5 µM CDDP nicht zu einer ausgeprägten Abnahme der Platinaddukte. Auch die CDDP-induzierten γH2AX-Foci, d.h. die sekundär-induzierten DSB, veränderten sich in keiner der untersuchten Zelllinien.

Die geringe Kapazität des NER-Reparatursystems ist oftmals mit einer geringen Expression der Schlüsselproteine XPA, XPF und ERCC1 verbunden [4, 13, 52-54]. Da XPF und ERCC1 ebenfalls für die HR zur Reparatur der DSB bzw. der Interstrang-Crosslinks und blockierter Replikationsgabeln notwendig sind [55, 88, 104, 162, 163], kann eine niedrige Expression gleichzeitig die DSB-Reparatur beeinflussen. ERCC1 interagiert außerdem mit dem Mismatch-Reparatur-Protein MSH2. Beide zusammen sollen an einer replikationsunabhängigen Interstrang-Crosslink Reparatur beteiligt sein [105, 164]. Im Umkehrschluss könnte die NER- und HR-Effizienz daher durch eine erhöhte ERCC1-Expression gesteigert werden.

Dies konnte bereits in Studien an Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkrebs [76], sowie Patienten mit Ovarial- und Magenkrebs [77-79] gezeigt werden. Andere Studien konnten diese Korrelation hingegen nicht bestätigen [80, 81], was die multifaktorielle Natur einer CDDP-Resistenz unterstreicht.

Entsprechend der in der Literatur beschriebenen Korrelation zwischen der ERCC1-Expression und dem Resistenzniveau der Zellen, wurden in den TCam-2-Zellen die höchsten ERCC1-Spiegel gemessen. Nach einer 24 h-Inkubation war der Gehalt unverändert, nahm aber im nachfolgenden Zeitverlauf leicht ab. Dies kann daran liegen, dass im Rahmen eines Reparaturversuchs ERCC1 an die DNA bindet. Bei der verwendeten Standardmethode (siehe Abschnitt 7.7.1) zur Proteinisolierung werden Proteine, die an die DNA gebunden sind, jedoch nicht miterfasst. Da es in den TCam-2-Zellen aber nicht zu einer statistisch signifikanten Abnahme an platinierter DNA kam, ist es eher unwahrscheinlich, dass ERCC1 für die beobachtete Resistenz der Zellen verantwortlich ist. Nach einer 3 h Inkubation kam es ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme an ERCC1.

In den NT-2-R-Zellen kam es nach einer CDDP-Behandlung zu einer Induktion von ERCC1, wohingegen eine 3 h-Inkubation in den NT-2-Zellen den ERCC1-Gehalt unverändert ließ und in der Zeit nach einer 24 h-Inkubation sogar reduzierte. Da die Versuche hier gezeigt hatten, dass Platinaddukte nach einer 3 h-Inkubation in den NT-2-R-Zellen reduziert werden können, ist diese ERCC1-Induktion nicht unerwartet. Da die Unterschiede in der Adduktreduktion nach längeren Inkubationszeiten geringer bzw. nicht mehr feststellbar waren, bleibt zu klären, wie hoch die Kapazität des in den NT-2-R-Zellen möglicherweise induzierten NER-Reparatursystems ist. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass andere Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass Zellen mit einem beeinträchtigten HR- bzw. TLS-System trotz eines funktionierenden NER-Systems eine hohe CDDP-Sensitivität aufweisen [165].

Es ist bekannt, dass Krebszellen, die ein BRCA1- bzw. BRCA2-Defizit aufweisen, oftmals besser auf eine Therapie mit DNA-verknüpfenden Substanzen wie CDDP ansprechen als BRCA1- / BRCA2-exprimierende Krebszellen [70, 97]. In einer Studie an Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom konnten Rosell *et al.* eine Korrelation zwischen der BRCA1-Expression und einer CDDP-Resistenz feststellen [166]. Wang und Figg fanden in den meisten CDDP-resistenten CAPAN1-Zellklonen multiple Kopien des BRCA2-Gens [101]. Zellen, in denen durch sekundäre Mutationen in diesen Genen der Wild-Typ wieder hergestellt wurde, zeigten eine CDDP-Resistenz.

Für die Regulierung der DSB-Reparatur via HR stehen drei Proteine im Vordergrund: Nbs1, BRCA1 und c-Abl. BRCA1 und c-Abl sind für die Regulation von RAD51 zuständig. BRCA1 bewirkt dies durch subzelluläre Relokalisation von RAD51 vom Zytoplasma in den Nukleus mittels BRCA2 [93], welches als Mediator die RAD51-Foci-Bildung kontrolliert. BRCA1 co-lokalisiert zudem mit dem Nbs1 / RAD50 / Mre11-Komplex [95] und ist somit für die Zellantwort nach einer DSB-Bildung mitverantwortlich [90]. Es wird im Zuge der DSB-Erkennung und einer HR an Doppelstrangbrüchen angereichert. Außerdem wird BRCA1 eine Rolle in der Mismatch-Reparatur (MMR) zugeschrieben [96].

Interessanterweise exprimierten ausschließlich die TCam-2-Zellen eine nachweisbare Menge BRCA1. Von den hier untersuchten Zelllinien zeigten sie die größte Resistenz, was in diesem Zusammenhang im Einklang mit den Ergebnissen anderer Gruppen steht [101, 166]. Nach einer 3 h-Behandlung mit CDDP reduzierte sich der Gehalt an BRCA1, wohingegen er nach einer 24 h-Inkubation anstieg. Es ist möglich, dass nach einer Kurzbehandlung mit CDDP andere Signalwege und Resistenzmechanismen eingeschaltet werden als nach einer längeren Behandlungszeit. Von den hier untersuchten Proteinen veränderte sich in den TCam-2-Zellen nach einer 24 h-Behandlung nur der BRCA1-Gehalt. Ein Einfluss auf die beobachtete Resistenz ist daher wahrscheinlich. In den NT-2- und NT-2-R-Zellen konnte durch eine CDDP-Behandlung keine BRCA1-Expression induziert werden. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass ein BRCA1-Defizit zu einer verfrühten Seneszenz nach Behandlung mit DNA-verknüpfenden Substanzen zu führen scheint [149]. Die hier aufgestellte Theorie, dass CDDP möglicherweise einen Zelltods mittels frühzeitiger Seneszenz und nicht mittels Apoptose / Nekrose induziert, wird gestützt.

Quinn *et al.* fanden außerdem heraus, dass BRCA1 als Modulator der Apoptose fungiert und dabei eine unterschiedliche Rolle einnimmt, abhängig von der Art der Zellschädigung [102]. Eine BRCA1-Expression führte in DBS-verursachenden Stoffen zu einer Resistenz, wohingegen bei Stoffen, die die Mikrotubuli beeinflussen, ein Anstieg der Apoptosesensitivität zu beobachten war. Auch andere Gruppen konnten zeigen, dass Zellen mit einem BRCA1-Defizit einen radiosensitiven bzw. CDDP-sensitiven Phänotyp aufweisen [70, 97, 100]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Seminomzelllinie TCam-2.

Eine BRCA1-Expression führt zu einem antiapoptotischen Phänotyp [167]. Die vermutete veränderte Apoptoseneigung in den TCam-2-Zellen und die damit verbundene CDDP-Resistenz können durch diese Ergebnisse weiter bestärkt werden.

Der initiale Gehalt an BRCA2 war in den NT-2- und NT-2-R-Zellen im Vergleich zu den TCam-2- und HT-29-Zellen minimal höher. Die Expression wurde in den hier untersuchten Keimzelltumorzelllinien kaum beeinflusst. Eine 24 h-Inkubation veränderte in keiner der Zelllinien den Gehalt an BRCA2. Nach einer 3 h-Inkubation verminderte sich der Gehalt in allen Zelllinien leicht. BRCA2 scheint daher für die beobachteten Resistenzunterschiede der Zelllinien keine Bedeutung zu haben.

4.3.2 Untersuchung der an der TLS beteiligten Proteine

Ein zelluläres Überleben trotz persistierender DNA-Addukte kann durch eine TLS vermittelt werden. Die Polymerasen, die an der Umgehung der Addukte beteiligt sind, sind pol η , pol ζ , REV1 und pol β . Hohe Konzentrationen dieser Polymerasen werden mit einer CDDP-Resistenz in Verbindung gebracht [114-119].

Eine TLS durch pol η gilt als überwiegend fehlerfrei [120]. Pol η ist *in vitro* die effizienteste Polymerase für eine TLS von Platinaddukten [121], insbesondere von den 1,2-d(GpG)-Intrastrang-Addukten [115]. Albertella *et al.* postulierten, dass für die Festlegung eines zellulären Überlebens nach einer CDDP-Behandlung eine TLS durch pol η genauso wichtig sei wie ein funktionsfähiges NER-System [114].

Die pol β scheint hingegen fehleranfälliger. Eine Überexpression wird vor allem für CDDP-induzierte Mutationen verantwortlich gemacht [117, 120]. Pol β wird daher auch als potentiell onkogenes Protein gehandelt, d.h., das pol β -codierende Gen gilt als proto-Onkogen. Albertella *et al.* konnten in einer weiteren Studie zeigen, dass pol β sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in annähernd einem Drittel aller untersuchten Tumorarten überexprimiert war [118].

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Erkenntnissen zeigten die hoch resistenten TCam-2-Zellen eine niedrigere Expression von sowohl pol η als auch pol β im Vergleich mit den NT-2-, NT-2-R- und HT-29-Zellen. Eine Behandlung mit CDDP führte in den TCam-2-Zellen weder nach einer 3 h- noch nach einer 24 h-Inkubation zu einer Induktion der Proteine. Im Verlauf nach einer 3 h-Inkubation kam es im Gegenteil sogar zu einer verminderten Expression beider Polymerasen. Die hohe Resistenz der TCam-2-Zellen scheint, gerade bei kurzen Inkubationszeiten, multifaktoriell. So verminderte sich der Gehalt aller untersuchten Proteine nach einer 3 h-Inkubation. Nach einer 24 h-Inkubation blieb die Expression beider Polymerasen hingegen unverändert.

Wie bereits die verstärkte BRCA1-Expression vermuten lässt, sind nach längeren CDDP-Expositionen andere als die hier bestimmte TLS für das zelluläre Überleben entscheidend.

Die initialen Mengen an pol β und pol η waren in den NT-2- und NT-2-R-Zellen vergleichbar hoch und liefern daher keine grundsätzliche Erklärung für deren unterschiedliche Resistenzniveaus. In den NT-2-R-Zellen induzierte eine CDDP-Behandlung sowohl nach 3 h als auch nach 24 h und der Zeit nach dem Mediumwechsel die Expression von pol β . Nach 24 h und dem weiteren Zeitverlauf stieg die Menge an pol β bis auf das 2.87-fache der Kontrolle an. Die Menge an pol η stieg im Zeitverlauf nach einer 24 h-Inkubation ebenfalls leicht an. In den NT-2-Zellen veränderte sich der Gehalt an pol η zu keinem Zeitpunkt merklich. In der Zeit nach einer 24 h Inkubation fiel er minimal ab, wohingegen der Gehalt an pol β zu dieser Zeit leicht anstieg. Pol η scheint somit für die Unterschiede im Ansprechen auf eine CDDP-Behandlung zwischen NT-2-, NT-2-R- und TCam-2-Zellen von untergeordneter Bedeutung zu sein. Hingegen sind die Unterschiede in der pol β Expression nach einer CDDP-Inkubation deutlich ausgeprägt. Vor allem eine 24 h-Behandlung induzierte in den NT-2-R-Zellen eine massive Expression.

Es scheint möglich, dass die NT-2-R-Zellen eine geringe CDDP-Schädigung nach einer kurzen Behandlungszeit mittels $\text{pol } \beta$ -vermittelter TLS tolerieren können und daher resistenter als ihre Elternzelllinie NT-2 sind. Eine höhere DNA-Schädigung scheint die Kapazität der Polymerase zu übersteigen. Auch eine massive Expressionssteigerung kann das nicht mehr ausgleichen. Auch die bekannte Fehleranfälligkeit der $\text{pol } \beta$ könnte die Kapazität begrenzen. In diesem Zusammenhang ist die Theorie von Hicks *et al.* interessant: Zur Reparatur von Interstrang-Crosslinks werden sowohl ein funktionsfähiges HR- als auch TLS-System unter Einbezug des NER-Proteins ERCC1 benötigt [115]. Auch die hier beschriebenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass in den untersuchten Zelllinien mind. eines der aufgeführten Reparatursysteme bzw. das Toleranz-System ein Defizit aufweist.

Welches CDDP-DNA-Addukt tatsächlich für die zytotoxische Wirkung verantwortlich ist, ist noch immer nicht eindeutig geklärt. Zwar gelten die 1,2-d(GpG)-Intrastrang-Addukte als Hauptkomponente der CDDP-Wirkung [29], aber auch die 1,3-d(GNG)-Intrastrang-Addukte und die Interstrang-Crosslinks werden weiter diskutiert. Untersuchungen von Chijiwa *et al.* deuten darauf hin, dass die 1,3-d(GNG)-Intrastrang-Addukte in Zellen mit einem NER-Defizit für die Zytotoxizität verantwortlich sind [168]. In Rahmen dieser Arbeit wurden die 1,2-d(GpG)-Intrastrang-Addukte und die DNA-Interstrang-Crosslinks untersucht. Welchen Einfluss die 1,3-d(GNG)-Intrastrang-Addukte auf die unterschiedlichen Resistenzniveaus der Keimzelltumorzelllinien haben, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.3.3 Ausblick

Alle bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die CDDP-Resistenz ein multifaktorielles Ereignis darstellt. Eine Chemoresistenz in TGCTs wird nicht nur durch einen einzelnen Prozess vermittelt [83].

Inwieweit die beobachteten Unterschiede in der CDDP-Sensitivität zwischen NT-2- und NT-2-R-Zellen nach einer Kurzbehandlung von 3 h durch eine NER-vermittelte Schadensreparatur bedingt sind, könnte durch weitere Untersuchungen geklärt werden. So könnte z.B. die nähere Beobachtung der Adduktspiegel nach einer 3 h-Inkubation Aufschluss geben. Die Untersuchung weiterer am NER beteiligter Proteine und deren Expression in den NT-2- bzw. NT-2-R- und TCam-Zellen könnten Ergebnisse über die Kapazität des NER-Systems in den Keimzelltumoren liefern.

Pol β ist die zudem die wichtigste Polymerase des Basen-Exzisions-Reparatur-Systems (BER) [34]. In der Literatur finden sich vereinzelte Hinweise, dass auch die BER an einer CDDP-Resistenz beteiligt sei [169]. Ob nun eine TLS oder eine BER unter pol β -Beteiligung zu der in den NT-2-R-Zellen induzierten CDDP-Resistenz beiträgt, sollte in weiteren Untersuchungen ebenfalls geklärt werden.

Analysen des chromosomalen Musters, der RNA und der Proteine sind notwendig und ergänzen sich, da Veränderungen auf chromosomaler Ebene z.B. nicht zwangsläufig auf den späteren Proteinstatus oder deren Funktionsfähigkeit übertragen lassen. Knockdown- sowie Knockin-Experimente mittels Transfektion hinsichtlich der hier identifizierten Proteine können ebenfalls Aufschluss über deren Bedeutung für die CDDP-Resistenz geben. Von besonderem Interesse sollte hierbei auch die BRCA1-Expression in den TCam-2-Zellen und deren Einfluss auf die Apoptosekaskade sein. Desweiteren scheint die Inkubationsdauer einen Einfluss auf die Zellantwort zu haben und bedarf somit ebenfalls weiterer Untersuchungen.

Ein Protein, dem eine wichtige Rolle für die Chemosensitivität von Keimzelltumoren zugeordnet wird, ist p53 [4]. Allerdings konnten Untersuchungen zeigen, dass diese Sensitivität in Keimzelltumoren in p53-unabhängigen Signalwegen begründet sein kann [63, 64]. Inwieweit diese Signalwege für die Resistenzentwicklung der NT-2-R-Zellen mitverantwortlich sind, sollte in weiteren Analysen ebenfalls bestimmt werden. Interessant ist hierbei auch die tiefere Analyse der in den TCam-2-Zellen vermutlich veränderten Apoptoseneigung. Hierfür sollten auch Analysen der Signalproteine ATM, ATR, Chk1 und Chk2 erfolgen.

Die in dieser Arbeit zusammengetragenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass in allen untersuchten Zelllinien mind. eines der aufgeführten Reparatursysteme und / oder das TLS-System, ein Defizit aufweist. Das Zusammenspiel der an der DNA-Schadensbearbeitung beteiligten Mechanismen und die Bestimmung des Einflusses der 1,3-d(GNG)-Intrastrang-Addukte könnten Hinweise für die unterschiedlichen Resistenzniveaus liefern.

Hinsichtlich der hohen intrinsischen CDDP-Resistenz der TCam-2-Zellen ist es interessant, dass Glaesener in einem Proteomvergleich der Seminomzelllinie TCam-2 im Vergleich mit deutlich sensitiveren Embryonalkarzinomzelllinien (auch NT-2 und NT-2-R) zeigen konnte, dass mehrere Proteine, die im Zusammenhang mit Detoxifizierungsmechanismen stehen, in den TCam-2-Zellen stärker exprimiert waren. Dazu gehörten z.B. Glutathion-S-Transferase P1 (GSTP1) und Peroxiredoxin [17]. Möglicherweise steht den TCam-2-Zellen so ein Weg zur Verfügung, die Behandlung mit CDDP eher zu tolerieren, wodurch sich auch das hohe Resistenzniveau erklären ließe. Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ließen zwischen den Zelllinien keine Unterschiede in der CDDP-induzierten DNA-Schädigung sowie dem Gehalt an platinierter DNA erkennen. Weitere Untersuchungen, wie Western Blot Analysen der identifizierten Proteine und siRNA- bzw. Antisenseexperimente nach CDDP-Behandlung, könnten weitere Erkenntnisse zur Resistenzentwicklung und Zellkulturadaption der TCam-2 Zellen hervorbringen.

Ergänzend dazu sollte in den drei Zelllinien der MMR-Status bestimmt werden. Das MMR-System ist in viele der hier untersuchten Systeme involviert und kann diese vielfältig modulieren.

Die hier beschriebenen Daten liefern eine vergleichende Analyse zur CDDP-Toxizität, zur Bildung von Platinaddukten und der DNA-Reparatur sowie über die Effekte auf die Zellzyklusregulation in der CDDP-sensitiven Embryonalzelllinie NT-2, ihrem resistenten Subklon NT-2-R und der ersten etablierten Seminomzelllinie TCam-2. Die Vermutung, dass die Chemoresistenz gegen CDDP in Keimzelltumoren nicht auf wenige klar definierte Prozesse beschränkt ist, sondern ein multifaktorielles Ereignis darstellt, wird bestärkt.

4.4 Untersuchung der TCam-2 Zellen nach Bestrahlung

Die Zelllinie TCam-2 stellt die erste und bisher einzig etablierte Seminomzelllinie dar [18, 19]. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, einen Gruppenvergleich mit anderen Seminomzelllinien durchzuführen. Die hier durchgeführten Untersuchungen liefern somit entscheidende neue Erkenntnisse. Untersuchungen an Seminomen ermöglichen außerdem die Erforschung früherer Schritte der Keimzelltumorigenese.

Seminome gelten als radiosensitiv und die adjuvante Radiotherapie gilt als Standard bei der Behandlung von Seminomen der Stadien I bis IIb. [7, 8, 10, 11]. Im Stadium der Organmetastasierung ist die adjuvante Chemotherapie indiziert. Mit dem Einsatz dieser beiden effizienten Behandlungsverfahren haben Seminom-Patienten heutzutage eine normale Lebenserwartung.

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die TCam-2-Zellen trotz der deutlich ausgeprägten CDDP-induzierten DNA-Schädigungen eine Chemosensitivität aufwiesen. Die im abschließenden Teil der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollten nun klären, welche Zellantworten durch eine Bestrahlung ausgelöst werden und ob sich diese vom Ansprechen nach einer CDDP-Behandlung unterscheiden. Insbesondere sollte analysiert werden, ob eine Bestrahlung einen Zellzyklusarrest verursachen kann und inwieweit ein Zusammenhang zwischen der strahleninduzierten DNA-Schädigung und der Radiosensitivität besteht. Schwerpunkt war die vergleichende Analyse der beiden Therapieoptionen.

4.4.1 Betrachtung der strahleninduzierten Toxizität

4.4.1.1 Koloniebildungsvermögen

Analog der CDDP-Behandlung wurde eine IC_{50} der Strahlendosis bestimmt. Die dosisabhängige Abnahme der Koloniebildung verlief annähernd linear. Die IC_{50} lag bei 3.9 Gy. Eine Dosis von 6 Gy reduzierte die Zahl gebildeter Kolonien auf $30.2\% \pm 6.8\%$. Das war vergleichbar mit einer CDDP-Behandlung von $15\ \mu\text{M}$ über 3 h ($31.7\% \pm 11.2\%$). Auch nach einer Bestrahlung konnte kein Verlust der Proliferationsfähigkeit beobachtet werden. Die vergleichende Analyse ergibt somit eine relative Radioresistenz für die TCam-2-Zellen.

Es ist interessant zu wissen, wie Zellüberlebenskurven nach einer Strahlentherapie erklärt und normalerweise interpretiert werden. Im linearen Maßstab gezeichnet, verlaufen Zellüberlebenskurven (Dosis-Effekt-Kurven) nach Bestrahlung gewöhnlich sigmoidal. Die Darstellung erfolgt daher halblogarithmisch. Je nach untersuchtem System ergeben sich unterschiedlich stark gekrümmte Kurven (sogenannte Schulterkurven). Bei niedrigen Dosen verlaufen sie flach, gefolgt von einer „Schulter“

und fallen dann bei hohen Dosen gerade, also exponentiell, ab. Die Breite der Schulter zeigt die Erholungsfähigkeit des betreffenden Systems. Zur Interpretation der Zellüberlebenskurven nach Bestrahlung gibt es zwei Modelle: Das Multitarget-Modell und das Linear-quadratische-Modell. Die jeweils enthaltenen Parameter geben Auskunft über die Strahlenresistenz und Reparatur- bzw. Erholungsfähigkeit der Zellen [170]. Das linear-quadratische-Modell dient der mathematischen Behandlung von Zellüberlebenskurven und zur Beschreibung klinischer Endpunkte in der Strahlentherapie. Es wird daher nicht näher besprochen. Im Multitarget-Modell beschreiben drei Parameter die Schulterkurve (siehe Abbildung 4.1).

D_0 beschreibt die Dosis im geradlinigen Teil der Dosis-Effekt-Kurve, die die Zahl der überlebenden Zellen auf 37 % vermindert und ist ein Maß der Strahlenresistenz.

Die Extrapolation des linearen Anteils auf die Dosis 0 ergibt am Schnittpunkt mit der Ordinate die Extrapolationszahl n . Diese beschreibt die Zahl der empfindlichen Bereiche einer Zelle und charakterisiert die Breite der „Schulter“. Ist $n = 1$, so erhält man in der halblogarithmischen Darstellung eine Gerade, d.h. es findet keine Reparatur statt. Je größer n , desto höher ist die Reparaturleistung der Zelle.

D_q ist der Schnittpunkt der Geraden mit der 100 % Überlebensrate 1. Sie ist ebenfalls ein Maß für die Breite der Schulter.

Es besteht folgende Beziehung: $D_q = D_0 \times \log n$

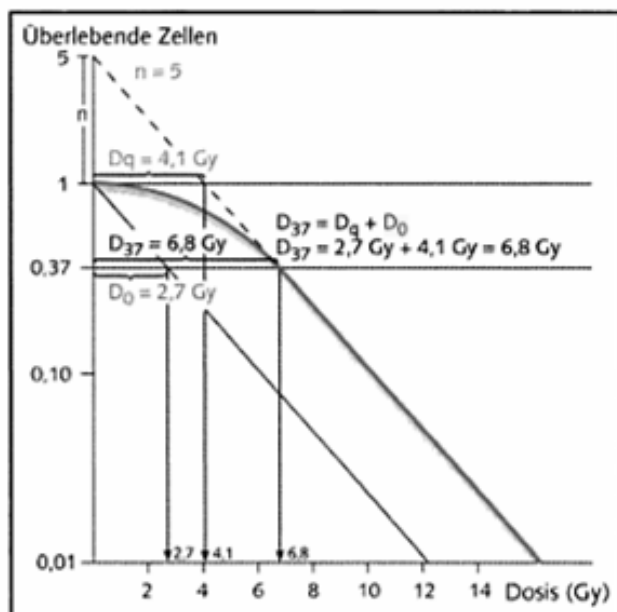


Abbildung 4.1:

Schematische Darstellung des Multitarget-Modells, mit freundlicher Genehmigung des Huber Verlags, aus Fritz-Niggli, H.: Strahlengefährdung / Strahlenschutz. Ein Leitfaden für die Praxis, 4. Aufl., Huber Verlag, Bern-Stuttgart-Toronto 1997 [171], zitiert nach [170]. Erläuterungen siehe Text.

Die Dosis-Effekt-Kurve des CFA nach Bestrahlung ergab einen linearen Verlauf der Proliferationshemmung. Unter Anwendung des Multitarget-Modells ergibt sich, dass in den TCam-2-Zellen keine Reparatur der induzierten Schädigungen stattfindet.

Der SF(2)-Wert ist ein weiterer Parameter zur Interpretation der Strahlensensitivität. Er beschreibt den Anteil überlebender Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy. In den TCam-2-Zellen lag er bei 0.71. Van den Aardweg *et al.* haben in ihren Untersuchungen an primären und metastasierenden uvealen sowie kutanen Melanomzelllinien für den SF(2)-Wert eine Spanne 0.026-0.69 gefunden [172]. Im Vergleich dazu fanden El-Awady *et al.* hinsichtlich der Radiosensitivität von neun Zelllinien unterschiedlicher Tumorarten SF(2)-Werte von 0.17-0.63 [173]. Der hier gefundene Wert (0.71) in den TCam-2-Zellen ist damit vergleichsweise hoch und spricht für eine relative Radioresistenz.

Die TCam-2-Zellen können also nicht nur eine CDDP-Behandlung sondern auch eine Bestrahlung überleben. Dies widerspricht erneut den klinischen Daten und bestärkt die Vermutung einer veränderten Anlage zur Apoptoseinduktion bzw. einer Apoptoseresistenz in der TCam-2-Zelllinie.

4.4.1.2 Beeinflussung des Zellzyklus

Bei Patienten sowie in der nichtsynchronisierten Zellkultur werden die Zellen bei einer Bestrahlung in ganz unterschiedlichen Zellzyklusphasen getroffen [170] und es kommt zu einer Umorganisation dieser. In den TCam-2-Zellen konnten sowohl 24 h als auch 48 h nach einer Bestrahlung weder ein Zellzyklusarrest noch Verschiebungen in der Zellzyklusverteilung beobachtet werden. Es war auch kein Einfluss der Strahlendosis auf die Zellzyklusverteilung feststellbar. Nach einer CDDP-Behandlung konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der sub-G₁-Fraktion und eine veränderte Zellzyklusverteilung beobachtet werden. Möglicherweise reichte eine Strahlendosis von 6 Gy noch nicht aus, eine solche Veränderung zu induzieren.

Vavrova *et al.* beobachteten, dass Leukämiezelllinien nach Bestrahlung mit einer niedrigen Dosisrate bis zu 2.5 Gy in der G₂-Phase akkumulierten. Sie gelangten daraufhin entweder in die Mitose oder, wenn der Zellschaden nicht ausreichend repariert wurde, in die Apoptose. Der Eintritt in die Mitose hatte einen radiosensibilisierenden Effekt [174]. Auch Short *et al.* postulierten, dass eine Unterbindung der Aktivierung des G₂-Kontrollpunkts in Gliomazelllinien diese selektiv für eine Bestrahlung sensibilisiert [175]. Andere Gruppen bestätigen die Wichtigkeit eines intakten G₂-Kontrollpunkts für das Überleben der Zellen [176, 177]. ATM, DNA-PK und p53 scheinen wichtige Mediatoren der Zellzykluskontrolle nach Bestrahlung zu sein [176, 178].

Interessanterweise scheint also auch nach einer Bestrahlung, ähnlich wie nach einer CDDP-Behandlung, die G₂-Phase für das zelluläre Überleben bzw. die strahleninduzierte Toxizität von entscheidender Wichtigkeit zu sein.

4.4.2 DNA-Schädigung nach Bestrahlung

Die Bildung der DSB stellt einen wichtigen toxischen Wirkungsmechanismus einer Strahlentherapie dar. Eine Bestrahlung führt direkt zur Bildung offener DNA-Doppelstrangbrüche. Die Bildung und der Verlauf von DSB sollen in den TCam-2-Zellen auch nach Bestrahlung betrachtet werden. Die Wirkung einer Strahlenbehandlung auf die Bildung von γ H2AX-Foci ist gut dokumentiert. Ein Focus steht dabei für einen DSB [107]. Die Bestimmung von γ H2AX und deren Verlauf gibt also eine Auskunft über die Schadensinduktion und den Verlauf der Schädigung. Umgekehrt bedeutet auch hier eine Reparatur der DNA-Schädigung nicht zwangsläufig ein Verlust an γ H2AX-Foci [157, 158]. Oftmals bleiben auch trotz erfolgreicher Re-Ligation γ H2AX-Foci detektierbar [110].

4.4.2.1 DSB und deren Verlauf

Die DNA-Schädigung war nach Bestrahlung größer als nach einer CDDP-Behandlung. Es kam ebenfalls zu keiner Reduktion an γ H2AX-positiven Zellen über die Zeit oder abhängig von der Strahlendosis. Ein Minimum an γ H2AX-positiven Zellen zeigte sich 24 h nach Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 1 Gy ($40.9 \% \pm 22.3 \%$) und ein Maximum an γ H2AX-positiven Zellen 48 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 6 Gy ($67.0 \% \pm 10.7 \%$). Im Vergleich dazu induzierte eine CDDP-Behandlung einen maximalen Anteil an γ H2AX-positiven Zellen von $47.6 \% \pm 13.5 \%$ nach 48 h Inkubation mit $2.5 \mu\text{M}$ und anschließender cisplatinfreier Inkubationszeit von weiteren 24 h. Interessanterweise scheint γ H2AX die Zellzykluskontrollpunkte nach geringer DNA-Schädigung selbst zu modulieren und somit Zeit für eine Reparatur zu ermöglichen. Eine Abnahme an γ H2AX-Foci scheint nur bei geringer DNA-Schädigung mit der Reparaturaktivität zu korrelieren, normalerweise bei weniger als 150 DSB pro Genom und nur in Zellen mit funktionsfähigen Reparatursystemen [110]. Eine Analyse der Anzahl der DSB je Zellkern nach einer Bestrahlung könnte zeigen, in welchem Ausmaß DSB in den TCam-2-Zellen induziert werden und inwieweit der hier aufgetretene Schaden die Reparaturkapazität beansprucht.

El-Awady *et al.* zeigten außerdem, dass die initiale Anzahl der DSB, aber nicht deren Reparatur, wichtig für die Radiosensitivität ist [173]. 24 h nach Bestrahlung konnte keine Korrelation mehr zwischen der Anzahl der DSB (gemessen mittels konstant- und graduiert-Feld Gel Elektrophorese (CFGE bzw. GFGE)) und der Radiosensitivität (gemessen mittels CFA und SF(2)-Wert) beobachtet werden. Der Restschaden nach 24 h war nicht nur durch die Anzahl der verbleibenden DSB, sondern auch durch Apoptose und einen fortschreitenden Zellzyklus beeinflusst. Diese Faktoren begrenzen auch die verwendete Methode zur DSB-Bestimmung.

Inwieweit diese Beobachtungen auch auf Keimzelltumore, und dabei insbesondere auf Seminome zutreffen, könnte die Bestimmung der initialen DNA-Schädigung direkt nach Bestrahlung zeigen.

Im Gegensatz dazu zeigten Banath *et al.*, dass die Retention der γ H2AX-Foci für die Voraussage einer letalen DNA-Schädigung geeignet sei [156]. Dies widerspricht den hier erhaltenen Daten. In den TCam-2-Zellen war die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen sowohl nach 24 h als auch nach 48 h sehr hoch, insbesondere im Vergleich mit einer CDDP-Behandlung. Sie konnten aber nach der Bestrahlung mehr Kolonien bilden als nach der CDDP-Behandlung.

4.4.3 Ausblick

Weitere Untersuchungen zum Koloniebildungsvermögen nach Bestrahlung, insbesondere mit höheren Dosen, könnten weitere Einblicke über die Radiosensitivität der TCam-2-Zellen geben. So wäre die Bestimmung einer Strahlendosis, die die Proliferationsfähigkeit vollständig inhibiert, zur Einordnung der Zelllinie hinsichtlich einer Radiosensitivität oder Radioresistenz hilfreich.

Hier erfolgten die Untersuchungen frühestens 24 h nach der Bestrahlung. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass in den ersten Stunden nach der Bestrahlung ein Zellzyklusarrest auftritt, der anschließend wieder behoben wird oder die eingesetzte Strahlendosis für einen Zellzyklusarrest noch zu niedrig war. Weitere Untersuchungen können Aufschluss geben. Ebenso sollte näher bestimmt werden, ob in den TCam-2-Zellen, wie bereits nach einer CDDP-Behandlung vermutet, Defizite in der Kontrollpunkt-Aktivierung sowie in der Expression und Funktionalität wichtiger Signalmediatoren vorliegen. So sollte der Status von ATM, DNA-PK und p53 analysiert werden. In der Literatur beschriebene Daten weisen darauf hin, dass das Fehlen eines Zellzyklusarrests eine Radiosensitivität erhöht [174, 175, 177].

Im Gegensatz zu der CDDP-Behandlung erfolgte die Untersuchungen ausschließlich 24 h bzw. 48 h nach der Bestrahlung. Ob die Anzahl der DSB über die Zeit zunächst ansteigt, könnten Untersuchungen zu früheren Zeitpunkten liefern. Die Bestimmung γ H2AX-positiver Zellen nach Bestrahlung weist eine größere Schädigung als nach einer CDDP-Behandlung auf. Die Bestimmung der Anzahl γ H2AX-Foci pro Zellkern könnte somit tiefere Einblicke in die strahleninduzierte Zellantwort liefern und genauere Aussagen über mögliche Reparaturerefolge erlauben.

Interessanterweise scheint die Expression von BRCA1 auch einen Einfluss auf die Radiosensitivität von Tumorzellen zu haben. BRCA1 ist als Tumorsuppressor für die genomische Stabilität mitverantwortlich. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass BRCA1-Mutationen zu chromosomaler Instabilität, frühzeitiger Alterung und der Bildung von Lymphomen, Ovarial- und Brusttumoren führen kann [100]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass BRCA1-Defizite einen Einfluss auf die Radiosensitivität haben. Allerdings wird die BRCA1-Beteiligung widersprüchlich diskutiert. So konnten Zhou *et al.* zwar eine Beteiligung von BRCA1 an der Rad51-Bildung nach CDDP-Behandlung feststellen. Die Rad51-Bildung nach strahleninduzierten DSB war allerdings BRCA2-abhängig [179]. Rad51 ist das zentrale Protein der HR und diese wiederum ist wichtig für die Reparatur strahleninduzierter DSB. Interessant ist daher die Bestimmung weiterer, insbesondere an der Bearbeitung von strahleninduzierten DNA-Schädigungen beteiligter Proteine.

Die in Seminomen geringe Expression des anti-apoptotisch wirkenden BRCA1 wird für deren hohe Apoptoseneigung mitverantwortlich gemacht [139]. In den TCam-2-Zellen sollten gerade auf diesem Gebiet weitere Untersuchungen folgen. Die Veränderungen hinsichtlich der Apoptoseneigung könnten auch für die Behandlung andere Tumorarten interessant sein, z.B. wenn dort Defizite in der Apoptoseeinleitung bzw. -weiterleitung für Resistenzen verantwortlich sind. Welche tiefere Bedeutung die vermeintlich veränderte Apoptoseneigung auf die Ergebnisse einer Strahlenbehandlung hat, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welche Mechanismen an einer Resistenz bzw. Resistenzentwicklung von Keimzelltumoren des Hodens gegenüber Cisplatin (CDDP) beteiligt sind. Die Untersuchungen erfolgten *in vitro* an den Embryonalkarzinomzelllinien NT-2 und ihrer generierten, CDDP-resistenten Sublinie NT-2-R sowie der Seminomzelllinie TCam-2. CDDP wurde in Anlehnung an die unterschiedlichen Therapieprotokolle über verschiedene Zeiten eingesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die drei Zelllinien ganz unterschiedliche Resistenzniveaus aufwiesen und dass diese Unterschiede für kurze Inkubationszeiten ausgeprägter waren. Es waren zwischen den Zelllinien keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Bildung der Platinaddukte zu beobachten. Unterschiede in der CDDP-Aufnahme bzw. CDDP-Eliminierung scheinen daher für die Unterschiede in der CDDP-Empfindlichkeit keine Rolle zu spielen. Nach einer Kurzbehandlung über 3 h schienen NT-2-R-Zellen diese Addukte allerdings effizienter entfernen zu können als die NT-2-Zellen und auch effizienter als nach einer längeren Behandlungszeit. Eine CDDP-Behandlung induzierte in den NT-2-R-Zellen die Expression von ERCC1 und $\text{pol } \beta$. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Zellen versuchen, die DNA-Schäden zu reparieren, aber die Kapazität des Reparatursystems begrenzt ist. Sie lassen außerdem vermuten, dass eine erhöhte Schadenstoleranz eher an der Resistenzentwicklung und den Unterschieden zur Elternzelllinie NT-2 beteiligt zu sein scheint. Auch hier scheint die Kapazität begrenzt. Die bekannte Fehleranfälligkeit der $\text{pol } \beta$ könnte zu dieser verminderten Kapazität zusätzlich beitragen.

In den TCam-2-Zellen wurde der höchste ERCC1-Gehalt gemessen. Der Gehalt dieses Proteins konnte in anderen Zellkulturmodellen sowie in Patientenzellen als Marker einer CDDP-Resistenz identifiziert werden. Die hier gewonnenen Ergebnisse unterstützen diese Vermutung. Die erhöhte ERCC1-Expression war allerdings nicht mit einer erhöhten Fähigkeit der Adduktentfernung assoziiert.

Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass nach einer CDDP-Inkubation in den untersuchten Keimzelltumorzelllinien die Bildung von γH2AX -Foci induziert wird. Es wird postuliert, dass aufgrund einer Adduktreparatur und geblockter Replikationsgabeln DNA-DSB entstehen. Induktion und Ausmaß dieser sekundären DNA-Schädigungen waren in den NT-2-R-Zellen tendenziell geringer und in den TCam-2-Zellen eher höher ausgeprägt. Die Unterschiede waren in den drei Zelllinien statistisch nicht signifikant. Die sekundären DNA-Schädigungen scheinen für die unterschiedlichen Resistenzniveaus weniger bedeutend zu sein.

Die größten Unterschiede zwischen den Zelllinien wurden in den Zellzyklusanalysen sowie in der Zelltodinduktion gefunden. Eine CDDP-Behandlung führte in den NT-2- und NT-2-R-Zellen zu einer transienten S-Phase-Verschiebung gefolgt von einem G₂/M-Arrest. Diese führte zu einem deutlichen Anstieg der sub-G₁-Fraktion. Diese Effekte waren in den NT-2-Zellen stärker ausgeprägt. Der Zelltod in den NT-2-Zellen war durch eine DNA-Fragmentierung und einen Verlust der Membranintegrität charakterisiert. Diesem fehlte aber eine Präsentation von Phosphatidylserin, einem Kennzeichen der Apoptose. Die TCam-2-Zellen zeigten nach einer CDDP-Behandlung nur minimale Veränderungen in der Zellzyklusverteilung. Auch eine Bestrahlung führte nicht zu einem Zellzyklusarrest. Es konnte auch keine Reparatur der strahleninduzierten DSB beobachtet werden. Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine BRCA1-Expression mit einer CDDP- und Radioresistenz assoziiert ist. Dies scheint an dessen Apoptose-modulierende Eigenschaft zu liegen. BRCA1 wurde einzig in den TCam-2-Zellen exprimiert.

Die Ursachen der beobachteten Resistenzunterschiede in den drei Zelllinien liegen vermutlich in veränderten, unterdrückten oder modulierten Zelltod-Signalwegen. Eine verstärkte DNA-Reparatur scheint nur eine untergeordnete Rolle für die Resistenzentwicklung zu spielen. Wie groß die klinische Bedeutung dieser Mechanismen ist, wird sich in zukünftigen Untersuchungen zeigen.

6 Summary

This thesis is dealing with the question, which molecular mechanisms are involved in resistance and development of resistance in testicular germ cell cancer against CDDP, respectively. In an *in vitro* model the embryonal carcinoma cell line NT-2 and its CDDP-adapted counterpart NT-2-R as well as the seminoma cell line TCam-2 were investigated. According to the existing therapy regimes CDDP was used for different time periods.

The results show that the three cell lines exhibit different resistance levels and that these differences were more pronounced for shorter incubation periods. Differences in adduct formation were statistically non significant. Therefore, neither CDDP uptake nor CDDP elimination seem to be responsible for the different resistance level. After 3 h of incubation, NT-2-R cells seemed to remove these adducts more efficiently than NT-2 cells and more efficiently than after longer incubation periods. In NT-2-R cells, incubation with CDDP induced the expression of ERCC1 and pol β . These data indicate that the cell lines try to repair the DNA damage but capacity of the repair system seems limited. Presumably, rather an elevated damage tolerance is involved in the development of resistance and the differences compared to the parental line NT-2. Likewise, capacity seems limited. Additionally, the proven low-fidelity of pol β might additionally restrict this capacity.

The highest ERCC1 level was measured in TCam-2 cells. ERCC1 expression level was found to be a marker for CDDP resistance, as shown in other cell culture models as well as tumor samples, which is confirmed by the results of the TCam-2 cells. However, the elevated protein expression was not associated with an elevated capability of adduct removal.

Here, it was shown that CDDP induced the formation of γ H2AX-Foci in the analyzed germ cell cancer cell lines. It is postulated that DNA double strand breaks occurred because of an adduct repair and stalled replication forks. By trend, induction and extent of such secondary DNA damage was less pronounced in NT-2-R cells and more pronounced in TCam-2 cells. Differences between the three cell lines were not statistically significant. However, formation of these secondary DNA damage seemed to be of minor importance for the explanation of the different resistance level.

Differences between NT-2, NT-2-R and TCam-2 cells were most pronounced in cell cycle modifications and cell death induction. In both NT-2 and NT-2-R cells CDDP incubation resulted in an extended S phase that gave way to a G₂/M arrest and finally to apoptosis, measured as an increase in sub-G₁ fraction. These effects were more pronounced in NT-2 cells.

Cell death in NT-2 cells was characterized by DNA fragmentation and loss of membrane integrity, but lacking phosphatidyl serine externalisation, a hallmark of apoptosis. TCam-2 cells only showed minor cell cycle modifications after CDDP incubation. In addition, radiation did not result in a cell cycle arrest either. No repair of the radiation-induced DSB was observed. Already, former analyses showed that expression of BRCA1 is associated with CDDP and radio-resistance. This might be due to its modulating effects on apoptosis. BRCA1 was expressed exclusively in TCam-2 cells.

Thus, the observed differences in resistance may be due to altered, suppressed or modulated cell death pathways. An elevated DNA repair seems to be of minor responsibility. Clinical impact of these mechanisms warrants further investigations.

7 Material und Methoden

7.1 Geräte

Elektrophorese + Western Blot (WB)

Mini-V 8.10 Vertical Gel Electrophoresis System + Blot module, Fa. Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

FACS

FACScalibur, Fa. BD, Franklin Lakes, NJ, USA

Fluoreszenzmikroskope

Zeiss Axioplan 2 imaging, Fa. Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland

Zeiss Axio Observer Z.1, Fa. Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland

Geldokumentationskammer

UVIchemi 12.1 mit Software UVIprochemi 12.1, Fa. Uvitec Ltd, Cambridge, UK

Inkubator

HeraCell, Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland

Lichtmikroskop

Olympus IX51, Fa. Olympus Optical GmbH, Hamburg, Deutschland

Luminometer

Anthos Lucy2 mit Software Lucysoft 1.6, Fa. Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland

pH-Meter

Metrohm 605 mit Glaselektrode Metrohm 6.0233.100, Deutsche Metrohm GmbH & Co.KG, Filderstadt, Deutschland

Röntgenröhre

Xstrahl RS225 research system, Fa. Gulmay Medical Ltd, Camberley, Surrey, UK

Thermoblock

Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

UV/VIS-Spektrometer

Wallac 1420 Victor² Multilabel Reader, Fa. Perkin-Elmer, Waltham, USA

Genesys 10uv scanning, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Zentrifugen

Heraeus Labofuge 400R, Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland

Mini Spin, Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Zytostatikawerkbank

Gelaire BSP 72, mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse 2, Fa. Gelaire^{PTY LTD}, Sydney, Australien

7.2 Zellkultur

Die Keimzelltumorzelllinien NT-2, NT-2-R und TCam-2 wurden freundlicherweise von Dr. Friedemann Honecker, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, zur Verfügung gestellt, die Zelllinie TCam-2 mit zusätzlicher Genehmigung von Prof. Looijenga, Erasmus MC-University Medical Center Rotterdam.

Die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wurde freundlicherweise von der Individumed GmbH, Hamburg, Deutschland zur Verfügung gestellt.

Um sicherzustellen, dass sich die Zelllinien während der Kultivierung und der Analysen nicht verändern, wurden das Wachstumsverhalten und die Morphologie der Zellen kontinuierlich beobachtet.

7.2.1 NT-2

Wie in Abschnitt 1.1.2.1 erwähnt, stammen die Zellen aus einem Xenograft-Tumor der humanen Teratokarzinomzelllinie Tera-2 [16].

Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C mit 5 % CO₂ in DMEM + Glutamax I, versetzt mit 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung.

Die Zellen wachsen adhärent im Monolayer. Alle zwei bis drei Tage werden die Kulturen passagiert: Hierfür werden die Zellen zunächst mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0.05) von der Kulturflasche gelöst, im Verhältnis 1:3 bis 1:6 aufgeteilt und in neue Kulturflaschen umgesetzt. Die Zelldichte nach dem Passagieren sollte 1-3x10⁶ Zellen betragen. Die Verdopplungszeit der NT-2 Zellen liegt bei 31 h. Das DSMZ gibt eine Populationsverdopplungszeit von 50-60 h an. Dort werden die Zellen allerdings anders kultiviert: 85 % Dulbecco's MEM + 10 % FBS + 5 % Pferdeserum bei 37 °C und 10 % CO₂.

Die Zellen werden spätestens in Passage n + 11 wieder eingefroren.

Zur langfristigen Lagerung werden 4-5x10⁶ Zellen in Kulturmedium versetzt mit 10 % DMSO zunächst über Nacht bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Nach dem Auftauen werden die Zellen in T₂₅-Kulturflaschen überführt, als n+1 bezeichnet und nach 24-48 h, je nach Zelldichte, das erste Mal passagiert.

Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passagen n+4 bis n+9 verwendet.

Tabelle 7.1: verwendete Reagenzien

Penicillin-Streptomycin-Lösung	10.000 Units/ml Penicillin + 10.000 µg/ml Streptomycin
1x Trypsin-EDTA-Lösung (0.05)	0.5 g/l Trypsin + 0.2 g/l EDTA•4Na

7.2.2 NT-2-R

Wie in Abschnitt 1.1.2.2 erwähnt, wurde die Zelllinie aus den NT-2-Zellen durch dauerhafte Kultivierung in cisplatinhaltigem Medium aufsteigender Konzentration gezüchtet. Die Klassifizierung einer daraus resultierenden Resistenz erfolgte mittels MTT-Assay. Verwendung fanden ausschließlich Zellen mit einer $IC_{50} = 5.5 \mu\text{M}$ (Stand bei Erhalt der Zellen). Außerdem unterscheiden sich die NT-2-R-Zellen morphologisch von den NT-2-Zellen (siehe Abbildung 7.1 und Abschnitt 7.3.1).

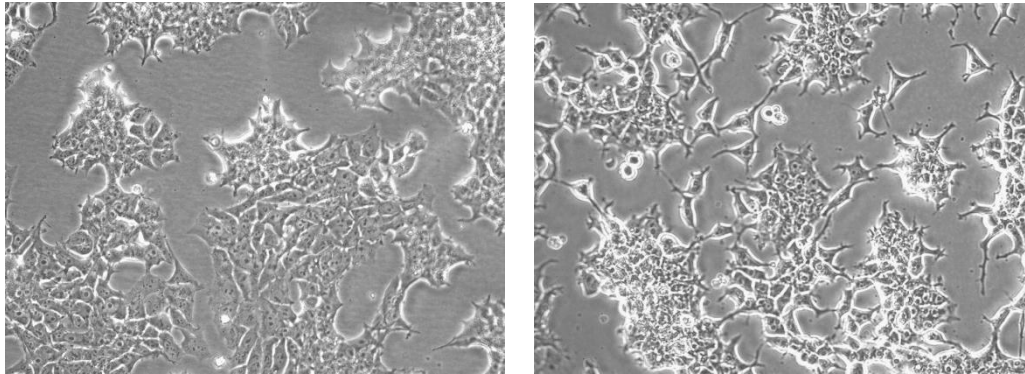


Abbildung 7.1: NT-2-Zellen (links) und NT-2-R-Zellen (rechts)

Die Kultivierung der NT-2-R Zellen erfolgt in Analogie zur Kultivierung der NT-2-Zellen (siehe Abschnitt 7.2.1).

Die Verdopplungszeit der NT-2-R-Zellen liegt bei 35 h. Zum Erhalt der Resistenz erfolgt zwei bis drei Passagen vor dem Wiedereinfrieren für 48 h eine Kultivierung in cisplatinhaltigem Medium ($0.66 \mu\text{mol}$). Die anschließende Kultivierung für mind. eine weitere Passage in cisplatinfreiem Medium dient der Erholung der Zellen. Die Zellen werden spätestens in Passage n+11 wieder eingefroren.

Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passagen n+4 bis n+9 verwendet.

Tabelle 7.2: Verwendete Reagenzien

Penicillin-Streptomycin-Lösung	10.000 Units/ml Penicillin + 10.000 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin
1x Trypsin-EDTA-Lösung (0.05)	0.5 g/l Trypsin + 0.2 g/l EDTA•4Na
cisplatinhaltiges Medium	10 μl CDDP Stammlösung 0.5 mg/ml auf 25 ml Medium

7.2.3 TCam-2

Die TCam-2-Zellen stammen aus dem primären testikulären Seminom eines 35-jährigen Patienten (siehe Abschnitt 1.1.2.3) [19].

Die Kultivierung erfolgt bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 5 % CO_2 in RPMI-1640-Medium + Glutamax I, versetzt mit 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung.

Die Zellen wachsen adhären im Monolayer. Alle drei bis vier Tage werden die Kulturen passagiert. Dafür werden die Zellen zunächst mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0.5) von der Kulturflasche gelöst, im Verhältnis 1:2 bis 1:3 aufgeteilt und in neue Kulturflaschen umgesetzt. Die Zelldichte nach dem Passagieren sollte $3-4.5 \times 10^5$ Zellen betragen. Die Verdopplungszeit der TCam-2 Zellen liegt bei ca. 50 h. Die Zellen werden spätestens in Passage n+10 wieder eingefroren.

Zur langfristigen Lagerung werden $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen in Kulturmedium versetzt mit 10 % DMSO zunächst über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Nach dem Auftauen werden die Zellen in T₂₅-Kulturflaschen gebracht und als n+1 bezeichnet. Spätestens nach 48 h erfolgt ein Mediumwechsel und je nach Zelldichte wird nach 72-96 h passagiert.

Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passagen n+3 bis n+8 verwendet.

Tabelle 7.3: Verwendete Reagenzien

Penicillin-Streptomycin-Lösung	10.000 Units/ml Penicillin + 10.000 µg/ml Streptomycin
10x Trypsin-EDTA-Lösung (0.5)	5 g/l Trypsin + 2 g/l EDTA•4Na

7.2.4 HT-29

Wie in Abschnitt 1.2.2 erwähnt, wurden die Zellen der Linie HT-29 im Jahr 1964 isoliert. Sie stammen aus dem primären Tumor einer 44-jährigen Patientin mit kolorektalem Adenokarzinom.

Die Kultivierung der adhären Zellen erfolgt bei 37°C und 5 % CO₂ in DMEM + Glutamax I, versetzt mit 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung. Das Passagieren erfolgt alle zwei bis drei Tage unter Verwendung von Trypsin-EDTA-Lösung (0.05) und anschließender Aufteilung im Verhältnis 1:3 bis 1:5. Zur längeren Konservierung werden die Zellen in Kulturmedium versetzt mit 10 % DMSO zunächst über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen werden die Zellen in 20 ml Medium (37°C) überführt und in T₇₅-Kulturflaschen inkubiert. Nach 24 h Anwachszeit wird das Medium gewechselt.

Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passagen 60-62 verwendet.

Tabelle 7.4: Verwendete Reagenzien

Penicillin-Streptomycin-Lösung	10.000 Units/ml Penicillin + 10.000 µg/ml Streptomycin
1x Trypsin-EDTA-Lösung (0.05)	0.5 g/l Trypsin + 0.2 g/l EDTA•4Na

7.3 Mikroskopie

7.3.1 Lichtmikroskopie

Je Ansatz werden 3×10^4 NT-2- / NT-2-R-Zellen in 1 ml Medium ausplattiert (6-well Platten) und nach frühestens 24 h mit CDDP behandelt. Am Ende der Inkubation erfolgt ein Mediumwechsel. Die Zellen werden entweder direkt nach Beendigung der Inkubation oder nach den entsprechenden Beobachtungszeiträumen auf morphologische Veränderungen beziehungsweise auf die Verteilung abgelöster Zellen hin untersucht und anschließend fotografiert.

Die Zellen werden bei 20-facher Vergrößerung (Hellfeld-Aufnahme) fotografiert.

7.4 Zytotoxizitätstests

7.4.1 Colony Formation Assay (CFA)

Der Colony Formation Assay beruht auf der von Zhu et al. publizierten Methode [180] und wurde wie folgt optimiert:

3×10^5 NT-2- / NT-2-R-Zellen bzw. $1.4-1.5 \times 10^5$ TCam-2-Zellen werden in 5 ml Medium ausplattiert (60 mm Zellkulturschalen). Die angewachsenen Zellen werden anschließend mit CDDP behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen mit Trypsin-EDTA (siehe Tabelle 7.5) abgelöst, die Reaktion mit Medium gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (2000 rpm / 5 min). Das Pellet wird in Medium suspendiert, die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt und die Zellsuspension anschließend weiter mit Medium verdünnt. Für den Assay werden in einer 6-well Platte je 100 Zellen pro Ansatz in 3 ml Medium ausplattiert (Dreifachbestimmung) und 14 Tage (NT-2 / NT-2-R) bzw. 21 Tage (TCam-2) inkubiert. Nach der Hälfte der Zeit erfolgt ein Mediumwechsel.

Zur Auswertung werden die Kolonien nach Giemsa gefärbt. Dafür wird nach Ende der Inkubationszeit das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Methanol 25 min fixiert. Anschließend wird mit 1xPBS gewaschen und kurz an der Luft getrocknet. Daraufhin erfolgt die Färbung mit 2 ml Giemsa-Lösung für weitere 25 min. Überschüssige Farbstoffreste werden nach Absaugen der Färbelösung mit ausreichend destilliertem Wasser ausgewaschen. Die Präparate werden an der Luft getrocknet und die Zahl der gebildeten Kolonien pro well bestimmt. Alle für das bloße Auge sichtbaren Kolonien wurden gezählt. In den NT-2- und NT-2-R-Zellen enthielt eine Kolonie mehrere Hundert Zellen. In den TCam-2-Zellen waren es mind. 50 Zellen. Der Mittelwert der drei Ansätze wird gebildet.

Die gebildeten Kolonien der unbehandelten Kontrollen werden als 100 % gesetzt. Die Angabe der Koloniebildung der behandelten Zellen wird prozentual bezogen auf die Kontrollen angegeben. Die unbehandelten NT-2-Zellen bildeten 84.0 ± 13.3 Kolonien, die NT-2-R-Zellen 116.3 ± 27.8 Kolonien. Die 100 ausplattierten Zellen der TCam-2 Kontrollen bildeten 28.9 ± 0.7 Kolonien.

Tabelle 7.5: Verwendete Reagenzien

Trypsin-EDTA-Lösung	NT-2 / NT-2-R: 1x Trypsin-EDTA-Lösung (0.05) TCam-2: 10x Trypsin-EDTA-Lösung (0.5)
1xPBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 2.7 mM KCl
Giemsa-Lösung	10 % Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung in Aqua dest.

7.4.2 Cell TiterGlo® Luminescence Cell Viability Assay

Der CellTiter-Glo® Luminescence Cell Viability Assay kann für Zytotoxizitäts- und Proliferationsmessungen in Zellkulturen und für Primärzellen eingesetzt werden. Als Maß für die Anzahl lebender Zellen wird der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen bestimmt. Das von den Zellen produzierte ATP wird in Gegenwart von Luciferin durch das Enzym Luciferase unter Lichtemission zu AMP umgesetzt (siehe Abbildung 7.2). Die Intensität des emittierten Lichts wird mit einem Luminometer gemessen.

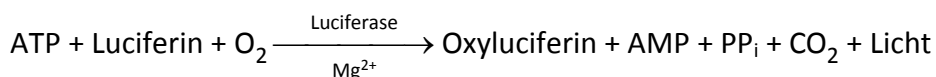


Abbildung 7.2: Biolumineszenzreaktion der Umsetzung von ATP

Der Assay wird als Dreifachbestimmung in einer weißen 96-well Platte (U-Form) durchgeführt. Pro well werden dazu 4000-5000 NT-2- / NT-2-R-Zellen bzw. 3000 TCam-2-Zellen in 100 µl Medium ausplattiert und 24-48 h inkubiert, bevor die Cisplatinzugabe erfolgt. Nach Ablauf der CDDP-Inkubationszeit wird entweder direkt gemessen oder das Medium gegen frisches getauscht und die Zellen für bis zu 24 h weiter inkubiert.

Zur Messung wird zunächst das tiefgekühlte und vorbereitete Reagenz aus CellTiter-Glo® Substrat und CellTiter-Glo® Puffer sowie die 96-well Platte auf Raumtemperatur gebracht. Jedes well wird mit 40 µl Reagenz beschickt und die Zell-Reagenz-Suspension 5 min gemischt. Zur vollständigen Lyse der Zellen und zur Inhibition endogener ATPasen wird die Suspension mind. 10 min stehen gelassen. Die Ansätze werden anschließend vermessen.

7.4.3 Bestimmung der Zahl abgelöster Zellen

Das auf der Platte befindliche Medium wird bei der Ernte separat aufgearbeitet. Es wird zunächst 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet anschließend in 20 µl 1xPBS aufgenommen. Die so erhaltene Zellsuspension wird 1+1 mit einer Trypanblau-Lösung gemischt. 10 µl dieser Mischung werden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop ausgezählt (10-fache Vergrößerung, Doppelbestimmung).

Die auf den Zellkulturschalen verbliebenen, adhären Zellen werden ebenfalls bestimmt. Zunächst werden die Zellen mit 1xPBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA (siehe Tabelle 7.6) abgelöst und die Reaktion mit Medium gestoppt. Die Zellsuspension wird bei 2000 rpm 5 min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend größenabhängig in 1xPBS resuspendiert. 10 µl dieser Zellsuspension werden ebenfalls 1+1 mit einer Trypanblau-Lösung gemischt und 10 µl dieser Mischung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop ausgezählt (10-fache Vergrößerung, Doppelbestimmung).

Tabelle 7.6: Verwendete Reagenzien

Trypsin-EDTA-Lösung	NT-2 / NT-2-R: 1x Trypsin-EDTA-Lösung (0.05) TCam-2: 10x Trypsin-EDTA-Lösung (0.5)
1xPBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 2.7 mM KCl
Trypanblau-Lösung	Trypan Blue solution 0.4 % Fa. Sigma-Aldrich, Heidelberg, Deutschland

7.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Das Messprinzip eines Durchflusszytometers beruht auf der Detektion optischer Signale, die von Zellen nach Anregung durch einen Laserstrahl ausgesendet werden. Die Abkürzung FACS bedeutet „Fluorescence Activated Cell Sorter“ und ist von der Funktionsweise her ein Durchflusszytometer.

Die in einer Suspension befindlichen Zellen werden einzeln durch eine Kapillare gesaugt und passieren den Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Side Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Nukleus und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird.

Neben der Zellgröße und -granularität kann mit der Durchflusszytometrie auch die Fluoreszenz der Zellen gemessen werden. Dazu verwendet man Fluorophore, die an bestimmte Bestandteile der Zellen binden. Setzt man z.B. die Farbstoffe DAPI oder Propidiumiodid ein, welche in die DNA einer Zelle interkalieren, lässt die Fluoreszenzintensität einer jeden Zelle Rückschlüsse auf deren DNA-Gehalt zu. Auch Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind, werden verwendet. So können zelluläre Strukturen spezifischer markiert werden. Die Antikörper sind meist gegen bestimmte Oberflächenproteine gerichtet. Durch Einsatz von verschiedenfarbigen Lasern sowie speziellen Filtern kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden.

7.5.1 Zellzyklusanalyse

Da Propidiumiodid in die DNA der Zellen interkaliert, ist die Höhe des Propidiumiodid-Signals ein Maß für die in einer Zelle enthaltene DNA-Menge. In der durchflusszytometrischen Analyse lassen sich die Zellen somit in Zellen mit einfacher DNA-Menge = Zellen der G₁-Phase, Zellen zwischen einfacher und zweifacher DNA-Menge = Zellen in der S-Phase, Zellen mit einer zweifachen DNA-Menge = G₂/M-Phase und Zellen mit einer DNA-Menge kleiner eins = sub-G₁ oder apoptotische Zellen einteilen.

Die Vermessung der Zellen erfolgt mit dem FACScalibur (Fa. BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Je Ansatz werden im Schnitt 10.000 Zellen vermessen.

3×10^5 NT-2- / NT-2-R-Zellen bzw. $1.4-1.5 \times 10^5$ TCam-2-Zellen werden in 5 ml Medium (60 mm Zellkulturschalen) ausplattiert und mind. 24 h auf den Platten inkubiert. Anschließend wird entsprechend der nachfolgenden Inkubationschemata behandelt.

Material und Methoden

Zur Ernte werden etwa 3.5×10^5 - 1.3×10^6 NT-2- bzw. NT-2-R-Zellen und 3×10^5 - 1.5×10^6 TCam-2-Zellen benötigt.

Tabelle 7.7: Inkubationsschemata

	Zelllinie	Zeiten	Bedingungen
Bestrahlung	TCam-2	+ 24 h / + 48 h	0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy
Konzentrationsreihe	TCam-2	3 h, 24 h, 48 h	0 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 100 μ M
Reparaturanalyse	TCam-2 und NT-2 / NT-2-R	3 h / + 3 h / + 6 h / + 24 h / + 48 h 24 h / + 3 h / + 6 h / + 24 h / (+ 48 h) 48 h / + 3 h / + 6 h / + 24 h	0 μ M, 2.5 μ M

Nach Ende der Inkubationszeit bzw. der anschließenden zytostatikafreien Zeit wird das Medium abgesaugt, mit 1xPBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (siehe Tabelle 7.8) abgelöst. Die Reaktion wird mit Medium gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (2000 rpm / 5 min). Das Zellpellet wird mit 1 ml kaltem PBS gewaschen, zur Auflösung von Zellklumpen gründlich gevortext und anschließend erneut zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 μ l 1xPBS resuspendiert und nach Zugabe von 900 μ l Ethanol 70 % über Nacht bei 4 °C oder 1-2 h auf Eis fixiert, um die Membran für PI permeabel zu machen. Somit können alle Zellen mit PI angefärbt und bestimmt werden. Danach wird wieder zentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml 1xPBS resuspendiert und mit PC-Puffer (siehe Tabelle 7.8) versetzt, um eine verbesserte Trennung von subdiploiden und Zellen der G₁-Phase zu erreichen. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wird ein letztes Mal zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 300 μ l einer Lösung von 250 μ g/ml RNase A und 10 μ g/ml PI in PBS resuspendiert, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen.

Die Zentrifugationsbedingungen für die weitere Aufbereitung entsprechen 2000 rpm / 5 min bei den NT-2 und NT-2-R Zellen. TCam-2 Zellen werden jeweils bei 3000 rpm / 5 min zentrifugiert.

Tabelle 7.8: Verwendete Reagenzien

Trypsin-EDTA-Lösung	NT-2 / NT-2-R: 1x Trypsin-EDTA-Lösung (0.05) TCam-2: 10x Trypsin-EDTA-Lösung (0.5)
1xPBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 2.7 mM KCl
PC-Puffer	192 mM Na ₂ HPO ₄ , 4 mM Zitronensäure, pH 7.8 NT-2 / NT-2-R: 0.5 ml TCam-2: 0.2 ml

7.5.2 Annexin V-Färbung

Bereits in der frühen Phase der Apoptose kommt es zu Veränderungen an der Zelloberfläche, wie z.B. der Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite. Diese Exposition des Phosphatidylserins dient als Markierung der apoptotischen Zellen, welche so von Makrophagen spezifisch erkannt und phagozytiert werden [123]. Diese Exposition kann zudem analytisch genutzt werden, um gesunde Zellen von apoptotischen und nekrotischen zu unterscheiden.

Es werden 3×10^5 NT-2 / NT-2-R Zellen in 6 ml Medium (60 mm Zellkulturschalen) ausplattiert und mind. 24 h auf den Platten inkubiert. Anschließend wird mit CDDP behandelt. Nach Ende der Inkubationszeit bzw. der anschließenden cisplatinfreien Zeit wird das Medium abgesaugt, mit 1xPBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin-EDTA (siehe Tabelle 7.9) abgelöst. Die Reaktion wird mit Medium gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (2000 rpm / 5 min). Das Zellpellet wird mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (2000 rpm / 5 min). Das Pellet wird mit 100 μ l Markierungspuffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Markierungspuffer enthält Annexin-V-FITC, ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin [129], welches an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt ist. Da nekrotische Zellen aufgrund der Membranschädigung Annexin-V ins Innere aufnehmen können und somit ebenfalls ein FITC-Signal geben, enthält der Puffer zudem Propidiumiodid (PI), das nur von nekrotischen Zellen aufgenommen werden kann. Nach Verdünnen der Probe mit 400 μ l Inkubationspuffer werden 30.000 Zellen durchflusszytometrisch vermessen. Man erhält drei Kategorien an Zellen: (i) gesunde Zellen binden weder Annexin-V, noch nehmen sie PI auf, (ii) apoptotische Zellen zeigen zwar ein Annexin-V-FITC-Signal, jedoch keine Anfärbung durch PI, wohingegen (iii) nekrotische Zellen sowohl Annexin-V-FITC- als auch PI-positiv sind. Die Einstellungen für FSC und SSC werden so gewählt, dass Zelltrümmer und -aggregate von der Analyse ausgeschlossen werden. Abbildung 7.3 zeigt diese Aufteilung beispielhaft an unbehandelten NT-2-R-Zellen.

Abbildung 7.3: Dot Plot unbehandelter NT-2-R-Zellen nach Annexin-V- / PI-Doppelfärbung. Gezeigt sind die Aufteilung der Quadranten und deren Zuordnung hinsichtlich lebender, apoptotischer und nekrotischer Zellen. NT-2-Zellen zeigten die gleiche Verteilung.

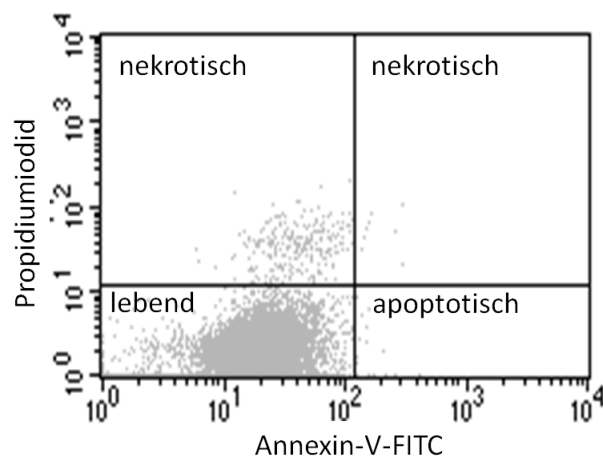


Tabelle 7.9: Verwendete Reagenzien

Trypsin-EDTA-Lösung	NT-2 / NT-2-R: 1x Trypsin-EDTA-Lösung (0.05) TCam-2: 10x Trypsin-EDTA-Lösung (0.5)
1xPBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 2.7 mM KCl
Markierungspuffer	20 µl/ml Annexin V-FLUOS™, 1 µg/ml PI, in Inkubationspuffer
Inkubationspuffer	140 mM NaCl, 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 5 mM CaCl ₂

7.6 Methoden zur Untersuchung der DNA

7.6.1 Immunocytological Assay (ICA)

3×10^5 NT-2- / NT-2-R-Zellen bzw. $1.4-1.5 \times 10^5$ TCam-2-Zellen werden in 5 ml Medium ausplattiert (60 mm Zellkulturschalen). Die angewachsenen Zellen werden anschließend mit Cisplatin behandelt. Zur Bestimmung der Reparaturfähigkeit der Zelllinien erfolgt nach Beenden der Inkubationszeit ein Mediumwechsel. Zur Ernte werden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (siehe Tabelle 7.5) abgelöst, mit einer HAES-steril-Verdünnung (siehe Tabelle 7.10) gewaschen und gezählt. Es wird eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in HAES-steril-Verdünnung eingestellt. 10 µl der Zellsuspension werden auf Squarix ImmunoSelect® Adhesion Slides (Squarix, Marl, Deutschland) getropft, an der Luft getrocknet und bei -80 °C gelagert. Pro OT können bis zu zehn Proben aufgebracht werden.

Die Proben werden mit Methanol fixiert (-20 °C, über Nacht), 5 min in 1xPBS gewaschen und anschließend 5 min im Eisbad in Alkali-Lösung inkubiert. Dadurch wird die DNA entspiralisiert und so für die Antikörper zugänglich gemacht. Nach erneutem Waschen in 1xPBS für 5 min erfolgt ein proteolytischer Verdau: Inkubation in Pepsin-Lösung (37 °C, 10 min), 5 min waschen in 1x PBS und Inkubation in Proteinase-K-Lösung (37 °C, 10 min). Nach dem anschließenden Waschschrift in PBS-Glycin-Lösung (10 min) erfolgt die Blockierung (30 min).

Die Proben werden mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer inkubiert. Die Proben werden wieder gewaschen (5 min mit PBS-Tween-Lösung und 5 min mit 1xPBS), blockiert (30 min) und schließlich mit der Sekundärantikörper-Lösung bei 37 °C für 1 h in der Feuchtkammer behandelt. Vor der DAPI-Färbung (30 min) wird wiederholt gewaschen (5 min mit PBS-Tween-Lösung und 5 min mit 1xPBS). Anschließend werden die Proben nochmals für 5 min in 1x PBS geschwenkt. Zum Erhalt der Fluoreszenz werden die OT mit Fluoromount G-Lösung (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) betropft und mit Glasdeckgläschen bedeckt. Diese werden abschließend mit Nagellack fixiert.

Material und Methoden

Tabelle 7.10: Verwendete Reagenzien

1xPBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 2.7 mM KCl
HAES-steril-Verdünnung (25 %)	250 ml HEAS-steril Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany + 750 ml 1xPBS
Alkali-Lösung	70 mM NaOH, 140 mM NaCl, 600 mL Aqua dem. ad 1000 ml mit Methanol, Lagerung bei 4 °C
Pepsin-Lösung (60 µg/ml)	60 µg/ml; bei 50 ml fertiger Lösung + 500 µl 2 M HCL
Proteinase-K-Puffer	20 mM Tris-OH, 2 mM CaCl ₂ , pH 7.5
Proteinase-K-Lösung (40 µg/ml)	40 µg/ml; mit Proteinase-K-Puffer herstellen
PBS-Glycin-Lösung	0.2 % Glycin in 1xPBS
Blockierungs-Lösung	5 % Magermilchpulver in 1xPBS
Primärantikörper-Lösung	1. AK R-C18 (Ratten-anti-Pt-GpG-Addukt-Antikörper) 1:150 in Aqua-Glycerol-Lösung (1+1)
Sekundärantikörper-Lösung	Cy3-Kaninchen-anti-Ratten-AK 1:200 in Aqua-Glycerol-Lösung (1+1)
Aqua-Glycerol-Lösung (1+1)	1 Teil Aqua dem. mit 1 Teil Glycerol mischen
PBS-Tween-Lösung	0.25 % Tween-20 in 1xPBS
DAPI-Lösung	200 µg/ml DAPI in 1xPBS

Die Cy3- und DAPI-Fluoreszenz wird auf Einzelzellebene mittels digitaler Bildanalyse (ACAS 6.0 Cytometry Analysis System, ACAS II, Ahrens Electronics, Bargteheide, Deutschland) für mind. 70 Zellkerne pro Probe gemessen. Da sich der DAPI-Gehalt der Proben nicht systematisch unterschied, erfolgte keine Korrektur der Platin-Adduktfluoreszenz um den DNA-Gehalt.

7.6.2 γ H2AX-Assay

Zur Untersuchung von DNA-Doppelstrangbrüchen wird die Bildung von γ H2AX-Foci untersucht. Phosphoryliertes Histon H2AX (γ H2AX) akkumuliert an DNA-Doppelstrangbrüchen und bildet sogenannte Foci, wobei ein Focus einem DSB entspricht.

Zunächst werden 3×10^5 NT-2- / NT-2-R-Zellen bzw. 2×10^5 TCam-2-Zellen in 5 ml Medium ausplattiert (60 mm Zellkulturschalen) und mind. 48 h inkubiert. Es folgt die Behandlung mit 2.5 µM CDDP für die definierten Zeiträume. Bei der Untersuchung zur Reparaturfähigkeit der Zelllinien erfolgt nach Beenden der Inkubationszeit ein Mediumwechsel. Zur Ernte werden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (siehe Tabelle 7.5) abgelöst und gezählt.

Mittels „Zytospin“ werden je Probe 100.000 Zellen auf die OT zentrifugiert (1300 rpm, 5 min). Die Zellen werden für 15 min mit Formaldehyd fixiert (siehe Tabelle 7.11), dann 3x 10 min in 1xPBS gewaschen und bis zur Antikörperfärbung bei -20 °C in einer Box auf befeuchtetem Zellstoff gelagert.

Der zweite Teil der Aufarbeitung beginnt mit einer Permeabilisierung der Zellmembranen mittels Triton X 100 (5 min auf Eis). Anschließend wird bei RT 1 h geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (50 µl/OT; anti-phospho-Histone H2A.X (Millipore, Schwalbach, Germany) 1:100 in Waschlösung I) erfolgt für 1 h in einer dunklen Feuchtkammer. Nach 3x 10 min waschen in Waschlösung I wird mit dem Sekundärantikörper (50 µl/OT; anti-Maus-ALEXA-Fluor 594 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) 1:600 in Waschlösung I) ebenfalls für 1 h in einer dunklen Feuchtkammer behandelt. Es wird 4x 10 min in Waschlösung II gewaschen. Die Zellkerne werden mit DAPI gefärbt (5 min) und die OT nochmals 2x 5 min in 1xPBS gewaschen. Zum Erhalt der Fluoreszenz wird ein Tropfen Mounting-Solution (Vectashield® mounting medium H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) auf die Proben gegeben und die OT mit einem Glasdeckgläschen bedeckt. Nachdem die so präparierten Proben im Trockenblock getrocknet wurden, werden die Deckgläschen mit Nagellack fixiert. Die Auswertung erfolgt mittels eines Fluoreszenzmikroskops.

Zellkerne, die mind. einen Doppelstrangbruch aufweisen, werden als positiv gewertet. Die Anzahl an positiven Zellkernen wird auf die Gesamtzellzahl bezogen und in Prozent [%] angegeben. Diese Form der Auswertung wurde gewählt, da im beobachteten Konzentrationsbereich der gesetzte Schaden i.d.R. so groß war, dass das Zählen einzelner γH2AX-Foci nicht praktikabel war. Eine Reduktion der CDDP-Konzentrationen ermöglichte eine vergleichende Analyse der beiden Auswertungsmöglichkeiten und führte zu gleichen Ergebnisse.

Tabelle 7.11: Verwendete Reagenzien

1xPBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 2.7 mM KCl
Fixierungslösung (2 %)	10.8 ml 37 % Formaldehyd + 189.2 ml 1xPBS
1 % BSA-Lösung	10 g BSA + 1000 ml 1xPBS
Permeabilisierungslösung	0.4 ml Triton X 100 + 200 ml 1 % BSA-Lösung
Blocklösung (3 %)	6 g BSA + 200 ml 1xPBS
Waschlösung I	3 ml Tween-20 + 600 ml 1 % BSA-Lösung
Waschlösung II	4 ml Tween-20 + 800 ml 1xPBS
DAPI-Lösung (1:1000)	200 µl der 1 mg/ml DAPI-Stammlösung in 200 ml 1xPBS

7.6.3 Kombinierte Färbung von γ H2AX und 53BP1

Um die Art der DNA Schäden näher zu bestimmen, wurde beispielhaft an den NT-2- und NT-2-R-Zellen untersucht, ob 53BP1, ein weiterer DSB-Marker [111], an den Enden der Schäden akkumuliert.

Es werden zunächst 3×10^5 NT-2- / NT-2-R-Zellen in 5 ml Medium ausplattiert (60 mm Zellkulturschalen) und mind. 24 h inkubiert. Es folgt die Behandlung mit 2.5 μ M CDDP für die definierten Zeiträume. Auch hier werden die Zellen zur Ernte mit Trypsin-EDTA-Lösung (siehe Tabelle 7.5) abgelöst und gezählt. Es werden 100.000 Zellen mittels „Zytospin“ auf die OT zentrifugiert (1300 rpm, 5 min). Die Zellen werden für 15 min in Formaldehyd fixiert, dann 3x 10 min in 1xPBS gewaschen und bis zur Antikörperfärbung bei -20 °C in einer Box auf befeuchtetem Zellstoff gelagert.

Die weitere Aufarbeitung erfolgt gemäß Abschnitt 7.6.2. Dabei erfolgt eine gleichzeitige Inkubation mit den anti- γ H2AX und anti-53BP1 Primär- und Sekundärantikörpern.

Tabelle 7.12: Verwendete Reagenzien

anti-Kaninchen-53BP1- Primärantikörper	1:500 in Waschlösung I NB100-305, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
Sekundärantikörper Anti-Kaninchen	1:100 in Waschlösung I GE Healthcare, München, Deutschland
1xPBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 2.7 mM KCl
Fixierungslösung (2 %)	10.8 ml 37 % Formaldehyd + 189.2 ml 1xPBS
1 % BSA-Lösung	10 g BSA + 1000 ml 1xPBS
Permeabilisierungslösung	0.4 ml Triton X 100 + 200 ml 1 % BSA-Lösung
Blocklösung (3 %)	6 g BSA + 200 ml 1xPBS
Waschlösung I	3 ml Tween-20 + 600 ml 1 % BSA-Lösung
Waschlösung II	4 ml Tween-20 + 800 ml 1xPBS
DAPI-Lösung (1:1000)	200 μ l der 1 mg/ml DAPI-Stammlösung in 200 ml 1xPBS

7.7 Methoden zur Proteinuntersuchung

7.7.1 Proteinisolierung

6×10^5 NT-2- und NT-2-R-Zellen (10 cm Zellkulturschale), 5×10^5 TCam-2-Zellen pro 10 cm Zellkulturschale (pro Bedingung 4x 10 cm Zellkulturschalen) und 4.5×10^6 HT-29-Zellen (1x 10 cm Zellkulturschale) werden in 12 ml Medium ausplattiert, mind. 24 h inkubiert und anschließend mit CDDP behandelt. Für die Untersuchung der Proteinexpression 24 h nach der Behandlung erfolgt nach Ende der Inkubationszeit ein Mediumwechsel gegen frisches, zytostatikafreies Medium.

Zur Ernte werden die Zellen mit einem Gummischaber von der Zellkulturschale abgelöst und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 10 ml kaltem 1xPBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wird das Zellpellet größenabhängig in 40-130 μ l P-RIPA (siehe Tabelle 7.13) gelöst und die Proben 30 min auf Eis gestellt. Hierbei kommt es zu einem Ausfällen der DNA und RNA. Gleichzeitig wird durch die in P-RIPA enthaltenen Protease-Inhibitoren ein Abbau der Proteine verhindert. Das Lysat wird bei 4 °C und 12.000 g für 12 min zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet verworfen und aus dem Überstand die enthaltene Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay ermittelt. Dabei bildet der zugesetzte Farbstoff Brilliantblau-G mit Proteinen einen blau gefärbten Komplex, wodurch dessen Absorptionsmaximum bathochrom von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Die Höhe der Absorption ist proportional zur vorhandenen Proteinmenge [181].

500 μ l Bradford-Reagenz werden dazu mit 1 μ l Überstand und 500 μ l destilliertem Wasser gemischt und nach 5 min Inkubationszeit vermessen (Doppelbestimmung). Die Absorption des Komplexes wird im Absorptionsmaximum gemessen. Als Blindprobe dient eine Lösung aus 500 μ l destilliertem Wasser und 500 μ l Bradford-Reagenz. Für die Kalibrierung werden Lösungen mit 0 / 0.625 / 1.25 / 2.5 / 5 / 10 und 20 μ g/ml BSA angesetzt (siehe Abbildung 7.4). Anhand derer wird die Proteinkonzentration des Lysats berechnet.

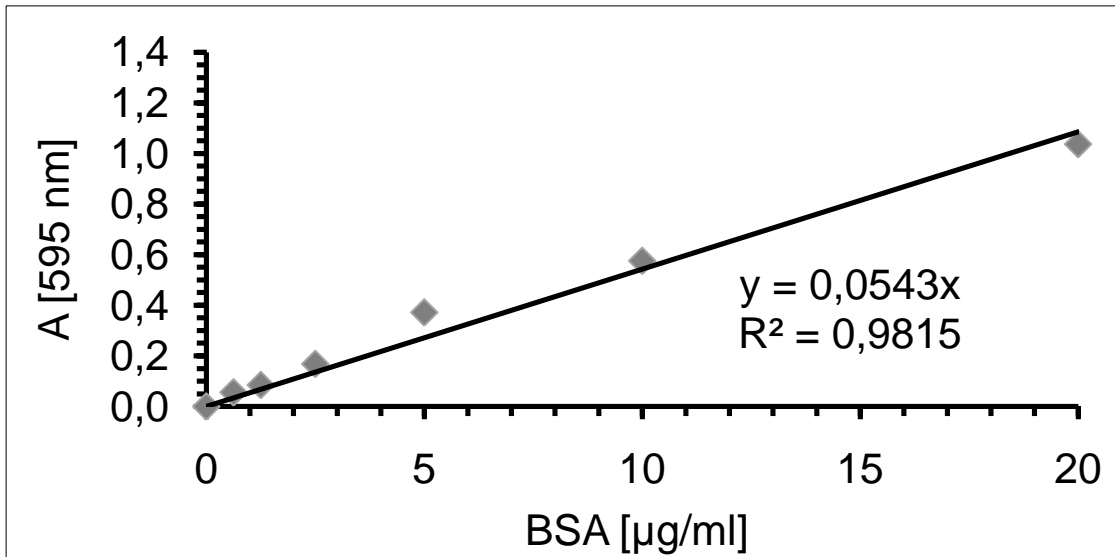


Abbildung 7.4: Kalibriergerade für die Proteinbestimmung. Das Diagramm zeigt beispielhaft die Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

Das Lysat wird im Verhältnis 3:1 mit Lämmli III-Puffer versetzt, bei 99 °C 5 min denaturiert, 5 min auf Eis gestellt und bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 7.13: Verwendete Reagenzien

Bradford-Reagenz	Brilliantblau G in Essigsäure/Methanol
Lämmli III-Puffer	30 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 4 % SDS, 140 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM Na_2EDTA (pH 7.4), 0.025 % Bromphenolblau
1xPBS	135 mM NaCl, 9 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 2.7 mM KCl
P-RIPA	10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 40 mM β -Glycerolphosphat, 10 mM Benzamidin, 10 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM NaF, 1 mM PMSF in RIPA-Lysispuffer
RIPA-Lysispuffer	154 mM NaCl, 50 mM Tris-OH, 6mM Desoxycholsäure-Natrium, 1 mM Na_2EDTA (pH 7.4), 1 % Nonidet P-40

7.7.2 Western Blot (WB)

Der Western Blot dient dazu, die in einer Lösung befindlichen Proteine qualitativ und semi-quantitativ nachzuweisen. Sie werden dazu unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch getrennt, auf eine Membran übertragen und dort mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.

7.7.2.1 Elektrophorese

Die Proteinlösungen werden mit PAGE-Puffer auf eine Konzentration von 20 µg Protein/20 µl (NT-2 und NT-2-R) bzw. 32 µg Protein/20 µl (TCam-2) eingestellt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Trennung der Proteine β-Tubulin, ERCC1 und pol β erfolgt auf einem 10 %-igen und die Trennung der Proteine BRCA2, BRCA1, pol η und β-Tubulin auf einem 8 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gel bei jeweils 200 V für 80 Min.

Tabelle 7.14: Verwendete Reagenzien

Elektrophoresepuffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris-OH, 0.1 % SDS
PAGE-Puffer	10 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol, 1 % SDS, 62 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.5 mM Na ₂ EDTA (pH 7.2), 0.015 % Bromphenolblau
SDS-Polyacrylamid-Gel 10 %	<u>Sammelgel:</u> 5 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg., 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1 % SDS, 0.1 % APS, 0.1 % TEMED <u>Trenngel:</u> 10 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg., 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 % SDS, 0.09 % APS, 0.06 % TEMED
SDS-Polyacrylamid-Gel 8 %	<u>Sammelgel:</u> 5 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg., 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1 % SDS, 0.1 % APS, 0.1 % TEMED <u>Trenngel:</u> 8 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg., 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 % SDS, 0.09 % APS, 0.06 % TEMED

7.7.2.2 Blotten

Die gemäß Abschnitt 7.7.2.1 erhaltenen Proteingele werden 3x 5 min in Blotpuffer (siehe Tabelle 7.15) gewaschen, um SDS-Reste zu entfernen. Danach erfolgt der Transfer der Proteine auf eine mit Methanol hydrophilisierte PVDF-Membran (Immobilon-P™, Fa. Millipore, Deutschland). Gel und Membran werden dazu in eine Blotting-Apparatur gespannt und unter Eiskühlung 90 Minuten (8 % Gel) bzw. 60 Minuten (10 % Gel) einer Stromstärke von 150 mA ausgesetzt. Nach Beendigung des Blottvorgangs wird die Membran 3x 5 min in 1xTBS gewaschen und anschließend auf Zellstoff getrocknet. So wird die Proteinbindung verstärkt.

Tabelle 7.15: Verwendete Reagenzien

Blotpuffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris-OH, 15 % Methanol
1xTBS	200 mM NaCl, 50 mM Tris-OH, pH 7.4

7.7.2.3 Coomassie-Färbung

Um bei der semi-quantitativen Auswertung Fehler, die auf einem unterschiedlich starken Proteinauftrag beruhen, zu vermeiden, wird das Gel nach dem Blotten nach Coomassie gefärbt und danach fotografiert. Die Aufnahme gilt als interne Kontrolle.

Bei der Coomassie-Färbung wird das Gel erst in destilliertem Wasser gewaschen und dann über Nacht bei 4 °C mit der Färbelösung behandelt. Um den Hintergrund zu entfärben, wird das Gel am nächsten Tag 1-4 h in 10 % Essigsäure (Entfärbelösung) geschwenkt. Dabei wird die Entfärbelösung regelmäßig ausgewechselt. Vor dem Fotografieren wird kurz in dest. Wasser gewaschen. Die Aufnahme des Fotos erfolgt in der Geldokumentationskammer.

Tabelle 7.16: Verwendete Reagenzien

Färbelösung	25 % Isopropanol, 19 % Essigsäure, 0.05 % Coomassie-Farbstoff R250
Entfärbelösung	10 % Essigsäure

7.7.2.4 Entwicklung

Die Detektion der Proteine erfolgt durch Behandlung der nach Abschnitt 7.7.2.2 erhaltenen Membranen mit spezifischen Primärantikörpern. An diese bindet wiederum ein Horseradish-Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden erfolgt eine ECL-Reaktion. Dabei wird das ECL Advance™-Detektionsreagenz (GE Healthcare, München, Deutschland) durch die Peroxidase umgesetzt. Es kommt zu einer konzentrationsabhängigen Chemilumineszenz, die in einer Dunkelkammer mit Hilfe einer besonders sensitiven Kamera (Geldokumentationskammer) aufgenommen wird.

Die Entwicklung erfordert mehrere Wasch- und Inkubationsschritte. Anhand des Markers werden die Membranen auf den interessierenden Größenbereich zugeschnitten. Anschließend werden die PVDF-Membranen 1 min in Methanol hydrophilisiert, dann 3x 5 min mit 1xTBS und 1x 10 min mit TBS-Tween gewaschen. Um Bereiche ohne Proteinbindung zu blockieren und so den Hintergrund zu verringern, werden die Membranen bei 4 °C über Nacht in Blocking-Lösung gegeben. Darauf folgt die Inkubation in Primärantikörper-Lösung (siehe Tabelle 7.17 und Tabelle 7.18). Überschüssige Antikörperlösung wird durch Waschen mit TBS-Tween (4x 5 min) entfernt.

Material und Methoden

Tabelle 7.17: Inkubationszeiten und -bedingungen für den 1. AK sowie alle Antikörperverdünnungen

β -Tubulin	1. AK (anti- β -Tubulin-IgG _{2b}) 1:600 2. AK (anti-Maus-IgG-HRP) 1:2000	1h / RT
BRCA2	1. AK (anti-BRCA2-IgG) 1:600 2. AK (anti-Kaninchen-IgG-HRP) 1:5000	1h / RT
BRCA1	1. AK (anti-BRCA1-IgG ₁) 1:200 2. AK (anti-Maus-IgG-HRP) 1:2000	2-3h / RT
pol η	1. AK (anti-pol η -IgG ₁) 1:600 2. AK (anti-Kaninchen-IgG-HRP) 1:5000	1h / RT
pol β	1. AK (anti-pol β -IgG _{2a}) 1:50 2. AK (anti-Maus-IgG-HRP) 1:2000	5h / 4°C
ERCC1	1. AK (anti-ERCC1-IgG) 1:600 2. AK (anti-Kaninchen-IgG-HRP) 1:2000	1h / RT

Die Inkubation mit der Sekundärantikörper-Lösung erfolgt in der Regel 1 h bei Raumtemperatur (siehe Tabelle 7.17 und Tabelle 7.18). Der Überschuss der Lösung wird ebenfalls durch Waschen mit TBS-Tween (4x 5 min) entfernt. Zur Detektion pipettiert man schließlich 0.6-1 ml ECL Advance™-Reagenz je Membran und fotografiert diese unter Lichtausschluss in der Geldokumentationskammer (UVitec™ Imaging System).

Tabelle 7.18: Verwendete Reagenzien

1xTBS	200 mM NaCl, 50 mM Tris-OH, pH 7.4
TBS-Tween	0.2 % Tween-20™ in 1xTBS
Blocking-Lösung	5 % Milchpulver, 0.02 % Natriumazid in TBS-Tween
Primärantikörper-Lösung	5 % Milchpulver, 0.02 % Natriumazid, Primärantikörper 1:50 oder 1:200 oder 1:600 in TBS-Tween
Sekundärantikörper-Lösung	5 % Milchpulver, Sekundärantikörper 1:2000 oder 1:6000 in TBS-Tween

7.8 Bestrahlung

Es erfolgte eine kombinierte Untersuchung der TCam-2-Zellen auf Koloniewachstum, DSB und Zellzyklusverteilung. Zunächst wurden $1-1.5 \times 10^5$ Zellen in 10 ml Medium in T₂₅-Kulturflaschen kultiviert, anschließend in einer Dosisreihe von 0-6 Gy und einer Dosisrate von 2 Gy/min mit Röntgenstrahlen bestrahlt. Die Zellen wurden 24 h bzw. 48 h später geerntet und die Ansätze geteilt. Eine Hälfte wurde für den γ H2AX-Assay verwendet (siehe Abschnitt 7.6.2). Von dieser Hälfte wurden außerdem für einen CFA (siehe Abschnitt 7.4.1) je Probe 1000 Zellen pro well in 3 ml Medium ausplattiert (6-well Platten). Die Bestimmung des Koloniebildungsvermögens erfolgte ausschließlich 24 h nach der Bestrahlung. Die andere Hälfte der Ansätze wurde zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung verwendet (siehe Abschnitt 7.5.1).

7.9 Statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Werte sind, sofern nicht anders aufgeführt, als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung und die Bestimmung der Signifikanzen erfolgten mittels F-Test und Student-t-Test ($p < 0.05$).

7.10 Gefahrstoffverzeichnis

Stoffname	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze
Acrylamid-/ Bisacrylamid-Lösung	T	R 45-46-20/21-25-6/38-43-48/23/24/25-62 S 53-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	R 8/26-36/37/38-42/43 S (2-)22-24-26-37
Benzamidinhydrochlorid	Xi	R 36/37/38 S 26-36
Bradford-Reagenz	C	R20/21/22 S26-36/37/39-45
Calciumchlorid	Xi	R 36 S (2-)22-24
Citronensäure	Xi	R 36 S 26-37/39
Cisplatin	T	R 45-25-36/27/38-42/43 S 53-22-24-37-45
Desoxycholsäure-Natrium	Xn	R 22-37 S 22-24/25
Dinatrium-EDTA	Xi	R 36/38 S 26-37/39
DMSO	Xi	R 36/38 S 24/25
EDTA	Xi	R 36 S (2-)26
Essigsäure 100%	C	R 10-35 S (1/2-)23-26-45
Ethanol 96%, vergällt	F, Xi	R 11-36-66-67 S 2-7-16-46
Flüssigstickstoff		S 9-23-26
Formaldehyd 37 %	T	R 23/24/25-34-40-43 S 24/25
Giemsa Färbelösung	Xi	R 36 S 26-36/37-45-51

Material und Methoden

Stoffname	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze
B-Glycerolphosphat	Xi	R 36/37/38 S 26-37/39
Isopropanol	F, Xi	R 11-36-67 S (2-)7-16-24/25-26
Kaliumhydroxid	C	R 22-35 S (1/2-)26-36/37/39-45
Magnesiumchlorid	Xi	R 36/37 S 26-39
β -Mercaptoethanol	T, C, N	R 22-24-34-51/53 S 23-26-29-36/37/39-61
Methanol	T, F	R 11-23/24/25-39 S (1/2-)7-16-36/37-45
Natriumazid	T+, N	R 28-32-50/53 S (1/2-)28-45-60-61
Natriumfluorid	T	R 25-32-36/38 S (1/2-)22-36-45
Natriumhydroxid	C	R 35 S (1/2-)26-37/39-45
Nonidet-P40	Xi	R 37-41 S 26-39
Penicillin	Xn	R 42/43 S 22-36/37-45
PMSF	T, C	R 25-34 S 26-28A-36/37/39-45
Propidiumiodid	Xi	R 36/37/38 S 26
Salzsäure 37%	C	R 34-37 S (1/2-)26-45
SDS	Xn, F	R 11-21/22-36/37/38 S 26-36/37/39
Streptomycinsulfat	T	R 61-22 S 45-36/37/39-22
TEMED	F, C	R 11-20/22-34 S (1/2-)16-26-36/37/39-45

Material und Methoden

Stoffname	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze
Tris-Base	Xi	R 36 S 26
Tris-HCl	Xi	R 36/37/38 S 24/25
Triton X 100	Xi, N	R 36/37/38-51/53 S 26-61
Trypanblau-Lösung 0,4%	T	R 45 S 53-45
Trypsin	Xn	R 36/37/38-42 S (2-)22-24-26-36/37
Wasserstoffperoxid 30 %	Xn	R 22-41 S 26-39

8 Literaturverzeichnis

- [1] Krebs in Deutschland 2005/2006: Häufigkeiten und Trends, in, Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2010.
- [2] Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010, in, Eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI, 2010.
- [3] Hodenkrebs: ein Ratgeber für Betroffene, Angehörige und Interessierte; die blauen Ratgeber 16, Deutsche Krebshilfe e.V., 2006.
- [4] J.R. Masters, B. Koberle, Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours, *Nat Rev Cancer*, 3 (2003) 517-525.
- [5] F. Mayer, A.J. Gillis, W. Dinjens, J.W. Oosterhuis, C. Bokemeyer, L.H. Looijenga, Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment, *Cancer Res*, 62 (2002) 2758-2760.
- [6] J.W. Oosterhuis, L.H. Looijenga, Testicular germ-cell tumours in a broader perspective, *Nat Rev Cancer*, 5 (2005) 210-222.
- [7] G.J. van de Geijn, R. Hersmus, L.H. Looijenga, Recent developments in testicular germ cell tumor research, *Birth Defects Res C Embryo Today*, 87 (2009) 96-113.
- [8] H. Schefer, A. Schöpfer, W. Arnold, S. Mattmann, P. Thum, P.M. Stucki, Hodentumore, *Schweiz Med Forum*, (2003) 950-959.
- [9] P. Chung, L.A. Mayhew, P. Warde, E. Winquist, H. Lukka, Management of stage I seminomatous testicular cancer: a systematic review, *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 22 (2010) 6-16.

- [10] S. Krege, J. Beyer, R. Souchon, P. Albers, W. Albrecht, F. Algaba, M. Bamberg, I. Bodrogi, C. Bokemeyer, E. Cavallin-Stahl, J. Classen, C. Clemm, G. Cohn-Cedermark, S. Culine, G. Daugaard, P.H. De Mulder, M. De Santis, M. de Wit, R. de Wit, H.G. Derigs, K.P. Dieckmann, A. Dieing, J.P. Droz, M. Fenner, K. Fizazi, A. Flechon, S.D. Fossa, X.G. del Muro, T. Gauler, L. Geczi, A. Gerl, J.R. Germa-Lluch, S. Gillessen, J.T. Hartmann, M. Hartmann, A. Heidenreich, W. Hoeltl, A. Horwich, R. Huddart, M. Jewett, J. Joffe, W.G. Jones, L. Kisbenedek, O. Klepp, S. Kliesch, K.U. Koehrmann, C. Kollmannsberger, M. Kuczyk, P. Laguna, O.L. Galvis, V. Loy, M.D. Mason, G.M. Mead, R. Mueller, C. Nichols, N. Nicolai, T. Oliver, D. Ondrus, G.O. Oosterhof, L.P. Ares, G. Pizzocaro, J. Pont, T. Pottek, T. Powles, O. Rick, G. Rosti, R. Salvioni, J. Scheiderbauer, H.U. Schmelz, H. Schmidberger, H.J. Schmoll, M. Schrader, F. Sedlmayer, N.E. Skakkebaek, A. Sohaib, S. Tjulandin, P. Warde, S. Weinknecht, L. Weissbach, C. Wittekind, E. Winter, L. Wood, H. von der Maase, European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the second meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus group (EGCCCG): part I, *Eur Urol*, 53 (2008) 478-496.
- [11] S. Krege, J. Beyer, R. Souchon, P. Albers, W. Albrecht, F. Algaba, M. Bamberg, I. Bodrogi, C. Bokemeyer, E. Cavallin-Stahl, J. Classen, C. Clemm, G. Cohn-Cedermark, S. Culine, G. Daugaard, P.H. De Mulder, M. De Santis, M. de Wit, R. de Wit, H.G. Derigs, K.P. Dieckmann, A. Dieing, J.P. Droz, M. Fenner, K. Fizazi, A. Flechon, S.D. Fossa, X.G. del Muro, T. Gauler, L. Geczi, A. Gerl, J.R. Germa-Lluch, S. Gillessen, J.T. Hartmann, M. Hartmann, A. Heidenreich, W. Hoeltl, A. Horwich, R. Huddart, M. Jewett, J. Joffe, W.G. Jones, L. Kisbenedek, O. Klepp, S. Kliesch, K.U. Koehrmann, C. Kollmannsberger, M. Kuczyk, P. Laguna, O.L. Galvis, V. Loy, M.D. Mason, G.M. Mead, R. Mueller, C. Nichols, N. Nicolai, T. Oliver, D. Ondrus, G.O. Oosterhof, L. Paz-Ares, G. Pizzocaro, J. Pont, T. Pottek, T. Powles, O. Rick, G. Rosti, R. Salvioni, J. Scheiderbauer, H.U. Schmelz, H. Schmidberger, H.J. Schmoll, M. Schrader, F. Sedlmayer, N.E. Skakkebaek, A. Sohaib, S. Tjulandin, P. Warde, S. Weinknecht, L. Weissbach, C. Wittekind, E. Winter, L. Wood, H. von der Maase, European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the second meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG): part II, *Eur Urol*, 53 (2008) 497-513.
- [12] S.J. Hotte, L.A. Mayhew, M. Jewett, J. Chin, E. Winquist, C. On Behalf Of The Genitourinary Cancer Disease Site Group Of The Cancer Care Ontario Program In Evidence-Based, Management of Stage I Non-seminomatous Testicular Cancer: a Systematic Review and Meta-analysis, *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 22 (2009) 17-26.
- [13] B. Köberle, K.A. Grimaldi, A. Suinters, J.A. Hartley, L.R. Kelland, J.R.W. Masters, DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells, *Int J Cancer*, 70 (1997) 551-555.

- [14] M.W. Sark, H. Timmer-Bosscha, C. Meijer, D.R. Uges, W.J. Sluiter, W.H. Peters, N.H. Mulder, E.G. de Vries, Cellular basis for differential sensitivity to cisplatin in human germ cell tumour and colon carcinoma cell lines, *Br J Cancer*, 71 (1995) 684-690.
- [15] P. Bedford, A.M. Fichtinger-Schepman, S.A. Shellard, M.C. Walker, J.R. Masters, B.T. Hill, Differential repair of platinum-DNA adducts in human bladder and testicular tumor continuous cell lines, *Cancer Res*, 48 (1988) 3019-3024.
- [16] P.W. Andrews, I. Damjanov, D. Simon, G.S. Banting, C. Carlin, N.C. Dracopoli, J. Fogh, Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2, *Lab Invest*, 50 (1984) 147-162.
- [17] S. Glaesener, Vergleichende globale Proteomanalyse zur Identifizierung von Mechanismen der Chemotherapieresistenz in Keimzelltumoren, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.), in: Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Universität Hamburg, 2010.
- [18] D. Eckert, D. Nettersheim, L.C. Heukamp, S. Kitazawa, K. Biermann, H. Schorle, TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture, *Cell Tissue Res*, 331 (2008) 529-538.
- [19] J. de Jong, H. Stoop, A.J.M. Gillis, R. Hersmus, R.J.H.L.M. van Gorp, G.-J.M. van de Geijn, E. van Drunen, H.B. Beverloo, D.T. Schneider, J.K. Sherlock, J. Baeten, S. Kitazawa, E.J. van Zoelen, K. van Roozendaal, J.W. Oosterhuis, L.H.J. Looijenga, Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2, *Genes Chromosomes Cancer*, 47 (2008) 185-196.
- [20] W. Schmiegel, A. Reinacher-Schick, D. Arnold, U. Graeven, V. Heinemann, R. Porschen, J. Riemann, C. Rodel, R. Sauer, M. Wieser, W. Schmitt, H.J. Schmoll, T. Seufferlein, I. Kopp, C. Pox, Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008, *Z Gastroenterol*, 46 (2008) 799-840.
- [21] J. Fogh, G. Trempe, in: *Human tumor cells in vitro*, Plenum Press, New York, 1975, pp. 115-141.
- [22] N.R. Rodrigues, A. Rowan, M.E. Smith, I.B. Kerr, W.F. Bodmer, J.V. Gannon, D.P. Lane, p53 mutations in colorectal cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (1990) 7555-7559.
- [23] M. Galanski, B.K. Keppler, Development, importance and perspectives. Tumor inhibiting metal compounds, *Pharm Unserer Zeit*, 35 (2006) 118-123.

- [24] Z.H. Siddik, Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene*, 22 (2003) 7265-7279.
- [25] M. Kartalou, J.M. Essigmann, Mechanisms of resistance to cisplatin, *Mutat Res*, 478 (2001) 23-43.
- [26] T. Boulikas, M. Vougiouka, Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review), *Oncol Rep*, 10 (2003) 1663-1682.
- [27] D. Wang, S.J. Lippard, Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat Rev Drug Discov*, 4 (2005) 307-320.
- [28] E. Reed, S.H. Yuspa, L.A. Zwelling, R.F. Ozols, M.C. Poirier, Quantitation of cis-diamminedichloroplatinum II (cisplatin)-DNA-intrastrand adducts in testicular and ovarian cancer patients receiving cisplatin chemotherapy, *J Clin Invest*, 77 (1986) 545-550.
- [29] C. Rabik, M. Dolan, Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents, *Cancer Treat Rev*, 33 (2007) 9-23.
- [30] L. Kelland, The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, *Nat Rev Cancer*, 7 (2007) 573-584.
- [31] S.G. Chaney, A. Vaisman, Specificity of platinum-DNA adduct repair, *J Inorg Biochem*, 77 (1999) 71-81.
- [32] G.D. Kao, W.G. McKenna, T.J. Yen, Detection of repair activity during the DNA damage-induced G2 delay in human cancer cells, *Oncogene*, 20 (2001) 3486-3496.
- [33] P.M. Chumakov, Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms, *Biochemistry (Mosc)*, 72 (2007) 1399-1421.
- [34] A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Ünsal-Kacmaz, S. Linn, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, *Annu Rev Biochem*, 73 (2004) 39-85.
- [35] S. Urien, F. Lokiec, Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients, *Br J Clin Pharmacol*, 57 (2004) 756-763.
- [36] ribosepharm, Standardinformation für Krankenhausapotheker, Ribosepharm Cisplatin-Lösung, ribosepharm GmbH München, (1998).

- [37] H. Timmer-Bosscha, A. Timmer, C. Meijer, E.G.E. de Vries, B. de Jong, J.W. Oosterhuis, N.H. Mulder, cis-Diamminedichloroplatinum(II) Resistance in Vitro and in Vivo in Human Embryonal Carcinoma Cells, *Cancer Res*, 53 (1993) 5707-5713.
- [38] L.P. Martin, T.C. Hamilton, R.J. Schilder, Platinum resistance: the role of DNA repair pathways, *Clin Cancer Res*, 14 (2008) 1291-1295.
- [39] H. Shibuya, Y. Kato, M. Saito, T. Isobe, R. Tsuboi, M. Koga, H. Toyota, j. Mizuguchi, Induction of apoptosis and/or necrosis following exposure to antitumor agents in a melanoma cell line, probably through modulation of Bcl-2 familx proteins, *Melanoma Res*, 13 (2003) 457-464.
- [40] W. Dempke, W. Voigt, A. Grothey, B.T. Hill, H.-J.-. Schmoll, Cisplatin resistance and oncogenes - a review, *Anticancer Drugs*, 11 (2000) 225-236.
- [41] F. Mayer, F. Honecker, L.H.J. Looijenga, C. Bokemeyer, Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors, *Ann Oncol*, 14 (2003) 825-832.
- [42] H. Zorbas, B.K. Keppler, Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell?, *Chembiochem*, 6 (2005) 1157-1166.
- [43] F. Honecker, H. Wermann, F. Mayer, A.J. Gillis, H. Stoop, R.J. van Gurp, K. Oechsle, E. Steyerberg, J.T. Hartmann, W.N. Dinjens, J.W. Oosterhuis, C. Bokemeyer, L.H. Looijenga, Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors, *J Clin Oncol*, 27 (2009) 2129-2136.
- [44] L. Stojic, R. Brun, J. Jiricny, Mismatch Repair and DNA damage signalling, *DNA Repair*, 3 (2004) 1091-1101.
- [45] X. Lin, S.B. Howell, DNA mismatch repair and p53 function are major determinants of the rate of development of cisplatin resistance, *Mol Cancer Ther*, 5 (2006) 1239-1247.
- [46] C. Meijer, E.G. de Vries, W.A. Dam, M.H. Wilkinson, H. Hollema, H.J. Hoekstra, N.H. Mulder, Immunocytochemical analysis of cisplatin-induced platinum-DNA adducts with double-fluorescence video microscopy, *Br J Cancer*, 76 (1997) 290-298.
- [47] J. Bartkova, E. Rajpert-De Meyts, N.E. Skakkebaek, J. Lukas, J. Bartek, DNA damage response in human testes and testicular germ cell tumours: biology and implications for therapy, *Int J Androl.*, 30 (2007) 282-291.

- [48] H. Lage, M. Dietel, Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance, *J Cancer Res Clin Oncol*, 125 (1999) 156-165.
- [49] E. Reed, Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy, *Cancer Treat Rev*, 24 (1998) 331-344.
- [50] L.R. Kelland, P. Mistry, G. Abel, F. Freidlos, S.Y. Loh, J.J. Roberts, K.R. Harrap, Establishment and characterization of an in vitro model of acquired resistance to cisplatin in a human testicular nonseminomatous germ cell line, *Cancer Res*, 52 (1992) 1710-1716.
- [51] J.E. Cleaver, K. Karplus, M. Kashani-Sabet, C.L. Limoli, Nucleotide excision repair "a legacy of creativity", *Mutat Res*, 485 (2001) 23-36.
- [52] B. Köberle, J. Masters, J. Hartley, R. Wood, Defective repair of cisplatin-induced DNA damage by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours, *Curr Biol*, 9 (1999) 273-276.
- [53] C. Welsh, R. Day, C. McGurk, J. Masters, R. Wood, B. Koberle, Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines, *Int J Cancer*, 110 (2004) 352-361.
- [54] T.R. Dunkern, G. Fritz, B. Kaina, Cisplatin-induced apoptosis in 43-3B and 27-1 cells defective in nucleotide excision repair, *Mutat Res*, 486 (2001) 249-258.
- [55] A.Z. Al-Minawi, Y.F. Lee, D. Hakansson, F. Johansson, C. Lundin, N. Saleh-Gohari, N. Schultz, D. Jenssen, H.E. Bryant, M. Meuth, J.M. Hinz, T. Helleday, The ERCC1/XPF endonuclease is required for completion of homologous recombination at DNA replication forks stalled by inter-strand cross-links, *Nucleic Acids Res*, 37 (2009) 6400-6413.
- [56] D. Branzei, M. Foiani, Regulation of DNA repair throughout the cell cycle, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (2008) 297-308.
- [57] P. Savage, J. Stebbing, M. Bower, T. Crook, Why does cytotoxic chemotherapy cure only some cancers?, *Nat Clin Pract Oncol*, 6 (2009) 43-52.
- [58] M. Sano, Y. Nakanishi, H. Yagasaki, T. Honma, T. Oinuma, Y. Obana, A. Suzuki, N. Nemoto, Overexpression of anti-apoptotic Mcl-1 in testicular germ cell tumours, *Histopathology*, 46 (2005) 532-539.
- [59] R. Grobholz, H. Zentgraf, K.U. Kohrmann, U. Bleyl, Bax, Bcl-2, fas and Fas-L antigen expression in human seminoma: correlation with the apoptotic index, *APMIS*, 110 (2002) 724-732.

- [60] A. Maheshwari, M.M. Misro, A. Aggarwal, R.K. Sharma, D. Nandan, Pathways involved in testicular germ cell apoptosis induced by H₂O₂ in vitro, *FEBS J*, 276 (2009) 870-881.
- [61] S. Schweyer, A. Soruri, O. Meschter, A. Heintze, F. Zschunke, N. Miosge, P. Thelen, T. Schlott, H.J. Radzun, A. Fayyazi, Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation, *Br J Cancer*, 91 (2004) 589-598.
- [62] M.K. Fung, H.W. Cheung, M.T. Ling, A.L. Cheung, Y.C. Wong, X. Wang, Role of MEK/ERK pathway in the MAD2-mediated cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumour cells, *Br J Cancer*, 95 (2006) 475-484.
- [63] A. di Pietro, E.G.E. de Vries, J.A. Gietema, D.C.J. Spierings, S. de Jong, Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemo-sensitive solid tumors, *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (2005) 2437-2456.
- [64] D.C.J. Spierings, E.G.E. de Vries, E. Vellenga, S. de Jong, The attractive Achilles heel of germ cell tumours: an inherent sensitivity to apoptos-inducing stimuli, *J Pathol*, 200 (2003) 137-148.
- [65] S. Mueller, M. Schittenhelm, F. Honecker, E. Malenke, K. Lauber, S. Wesselborg, J.T. Hartmann, C. Bokemeyer, F. Mayer, Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro, *Int J Oncol.*, 29 (2006) 471-479.
- [66] A. Brozovic, J. Damrot, R. Tsaryk, L. Helbig, T. Nikolova, C. Hartig, M. Osmak, W.P. Roos, B. Kaina, G. Fritz, Cisplatin sensitivity is related to late DNA damage processing and checkpoint control rather than to the early DNA damage response, *Mutat Res*, 670 (2009) 32-41.
- [67] C.M. Sorenson, A. Eastman, Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G₂ arrest and DNA double-strand breaks, *Cancer Res*, 48 (1988) 4484-4488.
- [68] A. Nowosielska, M.G. Marinus, DNA mismatch repair-induced double-strand breaks, *DNA Repair (Amst)*, 7 (2008) 48-56.
- [69] X. Huang, M. Okafuji, F. Traganos, E. Luther, E. Holden, Z. Darzynkiewicz, Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin, *Cytometry A*, 58A (2004) 99-110.
- [70] P. Borst, S. Rottenberg, J. Jonkers, How do real tumors become resistant to cisplatin?, *Cell Cycle*, 7 (2008) 1353-1359.

- [71] E. Fokkema, H.J.M. Groen, M.N. Helder, E.G.E. de Vries, C. Meijer, JM216-, JM118-, and cisplatin-induced cytotoxicity in relation to platinum-DNA adduct formation, glutathione levels and p53 status in tumour cell lines with different sensitivities to cisplatin, *Biochem Pharmacol*, 63 (2002) 1989-1996.
- [72] A. Vaisman, M. Varchenko, A. Umar, T.A. Kunkel, J.I. Risinger, J.C. Barrett, T.C. Hamilton, S.G. Chaney, The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts, *Cancer Res*, 58 (1998) 3579-3585.
- [73] A. Velasco, A. Corvalan, Wistuba, II, E. Riquelme, R. Chuaqui, A. Majerson, F.S. Leach, Mismatch repair expression in testicular cancer predicts recurrence and survival, *Int J Cancer*, 122 (2008) 1774-1777.
- [74] C. Kollmannsberger, C. Nichols, C. Bokemeyer, Recent advances in management of patients with platinum-refractory testicular germ cell tumors, *Cancer*, 106 (2006) 1217-1226.
- [75] F. Mayer, C. Kollmannsberger, C. Bokemeyer, Behandlung von Patienten mit cisplatinrefraktären Keimzelltumoren, *Der Onkologe*, 9 (2003) 1004-1008.
- [76] K.A. Olaussen, A. Dunant, P. Fouret, E. Brambilla, F. Andre, V. Haddad, E. Taranchon, M. Filipits, R. Pirker, H.H. Popper, R. Stahel, L. Sabatier, J.P. Pignon, T. Tursz, T. Le Chevalier, J.C. Soria, DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy, *N Engl J Med*, 355 (2006) 983-991.
- [77] R. Metzger, C.G. Leichman, K.D. Danenberg, P.V. Danenberg, H.J. Lenz, K. Hayashi, S. Groshen, D. Salonga, H. Cohen, L. Laine, P. Crookes, H. Silberman, J. Baranda, B. Konda, L. Leichman, ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy, *J Clin Oncol*, 16 (1998) 309-316.
- [78] M. Dabholkar, J. Vionnet, F. Bostick-Bruton, J.J. Yu, E. Reed, Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy, *J Clin Invest*, 94 (1994) 703-708.
- [79] B. Koberle, W. Brenner, A. Albers, S. Usanova, J.W. Thuroff, B. Kaina, ERCC1 and XPF expression in human testicular germ cell tumors, *Oncol Rep*, 23 (2010) 223-227.

- [80] M. Cobo, D. Isla, B. Massuti, A. Montes, J.M. Sanchez, M. Provencio, N. Vinolas, L. Paz-Ares, G. Lopez-Vivanco, M.A. Munoz, E. Felip, V. Alberola, C. Camps, M. Domine, J.J. Sanchez, M. Sanchez-Ronco, K. Danenberg, M. Taron, D. Gandara, R. Rosell, Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer, *J Clin Oncol*, 25 (2007) 2747-2754.
- [81] M.J. Laska, B.A. Nexø, K. Vistisen, H.E. Poulsen, S. Loft, U. Vogel, Polymorphisms in RAI and in genes of nucleotide and base excision repair are not associated with risk of testicular cancer, *Cancer Lett*, 225 (2005) 245-251.
- [82] T. Mueller, W. Voigt, H. Simon, A. Fruehauf, A. Bulankin, A. Grothey, H.J. Schmoll, Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer, *Cancer Res*, 63 (2003) 513-521.
- [83] F. Mayer, H. Stoop, G.L. Scheffer, R. Scheper, J.W. Oosterhuis, L.H. Looijenga, C. Bokemeyer, Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors, *Clin Cancer Res*, 9 (2003) 767-773.
- [84] D.C. Spierings, E.G. de Vries, E. Vellenga, S. de Jong, Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line, *Cell Death Differ*, 10 (2003) 808-822.
- [85] D.B. Zamble, T. Jacks, S.J. Lippard, p53-dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 6163-6168.
- [86] R. Dip, U. Camenisch, H. Naegli, Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair, *DNA Repair*, 2 (2004) 1409-1423.
- [87] S.H. Reed, Nucleotide excision repair in chromatin: the shape of things to come, *DNA Repair (Amst)*, 4 (2005) 909-918.
- [88] M. Cummings, K. Higginbottom, C. McGurk, O. Wong, B. Koberle, R. Oliver, J. Masters, XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: role of ERCC1 in homologous recombination repair, *Biochem Pharmacol*, 72 (2006) 166-175.
- [89] P. Karran, DNA double strand break repair in mammalian cells, *Curr Opin Genet Dev*, 10 (2000) 144-150.
- [90] T. Ohnishi, E. Mori, A. Takahashi, DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes, *Mutat Res*, 669 (2009) 8-12.

- [91] J.E. Haber, Partners and pathways repairing a double-strand break, *Trends Genet*, 16 (2000) 259-264.
- [92] S.P. Jackson, Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks, *Biochem Soc Trans*, 29 (2001) 655-661.
- [93] F. Daboussi, A. Dumay, F. Delacote, B.S. Lopez, DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation, *Cell Signal*, 14 (2002) 969-975.
- [94] G. Iliakis, H. Wang, A.R. Perrault, W. Boecker, B. Rosidi, F. Windhofer, W. Wu, J. Guan, G. Terzoudi, G. Pantelias, Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation, *Cytogenet Genome Res*, 104 (2004) 14-20.
- [95] K.K. Khanna, S.P. Jackson, DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, *Nat Genet*, 27 (2001) 247-254.
- [96] Y. Wang, D. Cortez, P. Yazdi, N. Neff, S.J. Elledge, J. Qin, BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures, *Genes Dev*, 14 (2000) 927-939.
- [97] H. Farmer, N. McCabe, C.J. Lord, A.N. Tutt, D.A. Johnson, T.B. Richardson, M. Santarosa, K.J. Dillon, I. Hickson, C. Knights, N.M. Martin, S.P. Jackson, G.C. Smith, A. Ashworth, Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy, *Nature*, 434 (2005) 917-921.
- [98] B. Evers, R. Drost, E. Schut, M. de Bruin, E. van der Burg, P.W. Derksen, H. Holstege, X. Liu, E. van Drunen, H.B. Beverloo, G.C. Smith, N.M. Martin, A. Lau, M.J. O'Connor, J. Jonkers, Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin, *Clin Cancer Res*, 14 (2008) 3916-3925.
- [99] W. Sakai, E.M. Swisher, B.Y. Karlan, M.K. Agarwal, J. Higgins, C. Friedman, E. Villegas, C. Jacquemont, D.J. Farrugia, F.J. Couch, N. Urban, T. Taniguchi, Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers, *Nature*, 451 (2008) 1116-1120.
- [100] J.M. Hair, G.I. Terzoudi, V.I. Hatzi, K.A. Lehockey, D. Srivastava, W. Wang, G.E. Pantelias, A.G. Georgakilas, BRCA1 role in the mitigation of radiotoxicity and chromosomal instability through repair of clustered DNA lesions, *Chem Biol Interact*, (2010).

- [101] W. Wang, W.D. Figg, Secondary BRCA1 and BRCA2 alterations and acquired chemoresistance, *Cancer Biol Ther*, 7 (2008) 1004-1005.
- [102] J.E. Quinn, R.D. Kennedy, P.B. Mullan, P.M. Gilmore, M. Carty, P.G. Johnston, D.P. Harkin, BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res*, 63 (2003) 6221-6228.
- [103] K.M. Vasquez, Targeting and processing of site-specific DNA interstrand crosslinks, *Environ Mol Mutagen*, (2010).
- [104] S. Arora, A. Kothandapani, K. Tillison, V. Kalman-Maltese, S.M. Patrick, Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells, *DNA Repair (Amst)*, 9 (2010) 745-753.
- [105] B. Orelli, T.B. McClendon, O.V. Tsodikov, T. Ellenberger, L.J. Niedernhofer, O.D. Scharer, The XPA-binding domain of ERCC1 is required for nucleotide excision repair but not other DNA repair pathways, *J Biol Chem*, 285 (2009) 3705-3712.
- [106] S.W. Johnson, R.P. Perez, A.K. Godwin, A.T. Yeung, L.M. Handel, R.F. Ozols, T.C. Hamilton, Role of platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines, *Biochem Pharmacol*, 47 (1994) 689-697.
- [107] E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, W.M. Bonner, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, *J Biol Chem*, 273 (1998) 5858-5868.
- [108] M. Lobrich, A. Shibata, A. Beucher, A. Fisher, M. Ensminger, A.A. Goodarzi, O. Barton, P.A. Jeggo, gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization, *Cell Cycle*, 9 (2010) 662-669.
- [109] X. Huang, H.D. Halicka, F. Traganos, T. Tanaka, A. Kurose, Z. Darzynkiewicz, Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis, *Cell Prolif.*, 38 (2005) 223-243.
- [110] L.J. Mah, A. El-Osta, T.C. Karagiannis, gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair, *Leukemia*, 24 (2010) 679-686.
- [111] B. Wang, S. Matsuoka, P.B. Carpenter, S.J. Elledge, 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint, *Science*, 298 (2002) 1435-1438.
- [112] J.E. FitzGerald, M. Grenon, N.F. Lowndes, 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment, *Biochem Soc Trans*, 37 (2009) 897-904.

- [113] K. Takata, R.D. Wood, Bypass specialists operate together, *EMBO J*, 28 (2009) 313-314.
- [114] M.R. Albertella, C.M. Green, A.R. Lehmann, M.J. O'Connor, A Role for Polymerase eta in the Cellular Tolerance to Cisplatin-Induced Damage, *Cancer Res*, 65 (2005) 9799-9806.
- [115] J.K. Hicks, C.L. Chute, M.T. Paulsen, R.L. Ragland, N.G. Howlett, Q. Gueranger, T.W. Glover, C.E. Canman, Differential roles for DNA polymerases eta, zeta, and REV1 in lesion bypass of intrastrand versus interstrand DNA cross-links, *Mol Cell Biol*, 30 (2010) 1217-1230.
- [116] S. Cruet-Hennequart, K. Gallagher, A.M. Sokol, S. Villalan, A.M. Prendergast, M.P. Carty, DNA Polymerase eta, a key protein in translesion synthesis in human cells, *Subcell Biochem*, 50 (2010) 189-209.
- [117] Y. Canitrot, C. Cazaux, M. Frechet, K. Bouayadi, C. Lesca, B. Salles, J.S. Hoffmann, Overexpression of DNA polymerase beta in cell results in a mutator phenotype and a decreased sensitivity to anticancer drugs, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 12586-12590.
- [118] M.R. Albertella, A. Lau, M.J. O'Connor, The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer, *DNA Repair (Amst)*, 4 (2005) 583-593.
- [119] A. Alt, K. Lammens, C. Chiocchini, A. Lammens, J.C. Pieck, D. Kuch, K.P. Hopfner, T. Carell, Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase eta, *Science*, 318 (2007) 967-970.
- [120] E. Bassett, A. Vaisman, J.M. Havener, C. Masutani, F. Hanaoka, S.G. Chaney, Efficiency of extension of mismatched primer termini across from cisplatin and oxaliplatin adducts by human DNA polymerases beta and eta in vitro, *Biochemistry*, 42 (2003) 14197-14206.
- [121] A. Vaisman, C. Masutani, F. Hanaoka, S.G. Chaney, Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta, *Biochemistry*, 39 (2000) 4575-4580.
- [122] A.H. Wyllie, J.F. Kerr, A.R. Currie, Cell death: the significance of apoptosis, *Int Rev Cytol*, 68 (1980) 251-306.
- [123] V.A. Fadok, D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton, P.M. Henson, Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J Immunol*, 148 (1992) 2207-2216.

- [124] L.G. Israels, E.D. Israels, Apoptosis, *Oncologist*, 4 (1999) 332-339.
- [125] H.J. Guchelaar, I. Vermes, R.P. Koopmans, C.P.M. Reutelingsperger, C. Haanen, Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model, *Cancer Chemother Pharmacol*, 42 (1998) 77-83.
- [126] J. Goodisman, A.K. Souid, Constancy in integrated cisplatin plasma concentrations among pediatric patients, *J Clin Pharmacol*, 46 (2006) 443-448.
- [127] N. Fuchs, S.S. Bielack, D. Epler, P. Bieling, G. Delling, D. Korholz, N. Graf, U. Heise, H. Jurgens, R. Kotz, M. Salzer-Kuntschik, P. Weinel, M. Werner, K. Winkler, Long-term results of the co-operative German-Austrian-Swiss osteosarcoma study group's protocol COSS-86 of intensive multidrug chemotherapy and surgery for osteosarcoma of the limbs, *Ann Oncol*, 9 (1998) 893-899.
- [128] S.S. Bielack, S. Flege, B. Kempf-Bielack, Behandlungskonzept des Osteosarkoms, *Der Onkologe*, 6 (2000) 747-759.
- [129] W.L. van Heerde, P.G. de Groot, C.P. Reutelingsperger, The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V, *Thromb Haemost*, 73 (1995) 172-179.
- [130] B. Liedert, D. Pluim, J. Schellens, J. Thomale, Adduct-specific monoclonal antibodies for measurement of cisplatin-induced DNA lesions in individual cell nuclei, *Nucleic Acids Res*, 34 (2006) e47.
- [131] A. Dzagnidze, Z. Katsarava, J. Makhalova, B. Liedert, M.-S. Yoon, H. Kaube, V. Limmroth, J. Thomale, Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy, *J Neurosci*, 27 (2007) 9451-9457.
- [132] X. Huang, Z. Darzynkiewicz, Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage, *Methods Mol Biol*, 314 (2006) 73-80.
- [133] I.M. Ward, J. Chen, Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress, *J Biol Chem*, 276 (2001) 47759-47762.
- [134] D.J. Smart, H.D. Halicka, G. Schmuck, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, G.M. Williams, Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone, *Mutat Res*, 641 (2008) 43-47.

- [135] S. de Feraudy, I. Revet, V. Bezrookove, L. Feeney, J.E. Cleaver, A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (2010) 6870-6875.
- [136] S. Mogi, C.E. Butcher, D.H. Oh, DNA polymerase eta reduces the gamma-H2AX response to psoralen interstrand crosslinks in human cells, *Exp Cell Res*, 314 (2008) 887-895.
- [137] S. Glaesener, F. Honecker, I.M. Veltman, A.J. Gillis, T. Rohlfing, T. Streichert, B. Otto, T.H. Brummendorf, L.H. Looijenga, C. Bokemeyer, S. Balabanov, Comparative proteome, transcriptome, and genome analysis of a gonadal and an extragonadal germ cell tumor cell line, *J Proteome Res*, 7 (2008) 3890-3899.
- [138] S. Koch, F. Mayer, F. Honecker, M. Schittenhelm, C. Bokemeyer, Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro, *Br J Cancer*, 89 (2003) 2133-2139.
- [139] F. Nuti, P. Luciani, E. Marinari, E. Erdei, M. Bak, C. Deledda, F. Rosati, B. Mazzinghi, G. Danza, H. Stoop, L.H. Looijenga, A. Peri, M. Serio, C. Krausz, Seladin-1 and testicular germ cell tumours: new insights into cisplatin responsiveness, *J Pathol*, 219 (2009) 491-500.
- [140] P.A. Andrews, J.A. Jones, N.M. Varki, S.B. Howell, Rapid emergence of acquired cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance in an in vivo model of human ovarian carcinoma, *Cancer Commun*, 2 (1990) 93-100.
- [141] J. Perry, T. Powles, J. Shamash, A. Veerupillai, E. McGrowder, E. Noel, Y.J. Lu, T. Oliver, S. Joel, The relative activity of cisplatin, oxaliplatin and satraplatin in testicular germ cell tumour sensitive and resistant cell lines, *Cancer Chemother Pharmacol*, 64 (2009) 925-933.
- [142] R.A. Olie, A.W. Boersma, M.C. Dekker, K. Nooter, L.H. Looijenga, J.W. Oosterhuis, Apoptosis of human seminoma cells upon disruption of their microenvironment, *Br J Cancer*, 73 (1996) 1031-1036.
- [143] R. Kuzmits, P. Aiginger, M.M. Muller, G. Steurer, W. Linkesch, Assessment of the sensitivity of leukaemic cells to cytotoxic drugs by bioluminescence measurement of ATP in cultured cells, *Clin Sci (Lond)*, 71 (1986) 81-88.
- [144] A.L. Niles, R.A. Moravec, T.L. Riss, In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening, *Curr Chem Genomics*, 3 (2009) 33-41.

- [145] N. Duale, B. Lindeman, M. Komada, A.K. Olsen, A. Andreassen, E.J. Soderlund, G. Brunborg, Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles, *Mol Cancer*, 6 (2007) 53.
- [146] A.M. Havelka, M. Berndtsson, M.H. Olofsson, M.C. Shoshan, S. Linder, Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an "off-target" effect?, *Mini Rev Med Chem*, 7 (2007) 1035-1039.
- [147] H. Vakifahmetoglu, M. Olsson, C. Tamm, N. Heidari, S. Orrenius, B. Zhivotovsky, DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas, *Cell Death Differ*, 15 (2008) 555-566.
- [148] M. Berndtsson, M. Hagg, T. Panaretakis, A.M. Havelka, M.C. Shoshan, S. Linder, Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA, *Int J Cancer*, 120 (2007) 175-180.
- [149] M. Santarosa, L. Del Col, E. Tonin, A. Caragnano, A. Viel, R. Maestro, Premature senescence is a major response to DNA cross-linking agents in BRCA1-defective cells: implication for tailored treatments of BRCA1 mutation carriers, *Mol Cancer Ther*, 8 (2009) 844-854.
- [150] R. Singh, J. George, Y. Shukla, Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy, *Cell Div*, 5 (2010) 4.
- [151] B. Liedert, V. Materna, D. Schadendorf, J. Thomale, H. Lage, Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin, *J Invest Dermatol*, 121 (2003) 172-176.
- [152] V. Materna, B. Liedert, J. Thomale, H. Lage, Protection of platinum-DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells, *Int J Cancer*, 115 (2005) 393-402.
- [153] K.M. Comess, J.N. Burstyn, J.M. Essigmann, S.J. Lippard, Replication inhibition and translesion synthesis on templates containing site-specifically placed cis-diamminedichloroplatinum(II) DNA adducts, *Biochemistry*, 31 (1992) 3975-3990.
- [154] Z. Zhang, M.C. Poirier, Cisplatin-DNA adduct determination in the hepatic albumin gene as compared to whole genomic DNA, *Chem Res Toxicol*, 10 (1997) 971-977.

- [155] X. Huang, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, DNA damage induced by DNA topoisomerase I- and topoisomerase II-inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relation to the cell cycle phase and apoptosis, *Cell Cycle*, 2 (2003) 614-619.
- [156] J.P. Banath, D. Klokov, S.H. MacPhail, C.A. Banuelos, P.L. Olive, Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions, *BMC Cancer*, 10 (2010) 4.
- [157] F. Bouquet, C. Muller, B. Salles, The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage, *Cell Cycle*, 5 (2006) 1116-1122.
- [158] A. Forand, B. Dutrillaux, J. Bernardino-Sgherri, Gamma-H2AX expression pattern in non-irradiated neonatal mouse germ cells and after low-dose gamma-radiation: relationships between chromatid breaks and DNA double-strand breaks, *Biol Reprod*, 71 (2004) 643-649.
- [159] G.M. Almeida, T.L. Duarte, P.B. Farmer, W.P. Steward, G.D. Jones, Multiple end-point analysis reveals cisplatin damage tolerance to be a chemoresistance mechanism in a NSCLC model: implications for predictive testing, *Int J Cancer*, 122 (2008) 1810-1819.
- [160] H.W. Cheung, D.-Y. Jin, M.-T. Ling, Y.C. Wong, Q. Wang, S.W. Tsao, X. Wang, Mitotic Arrest Deficient 2 Expression Induces Chemosensitization to a DNA-Damaging Agent, Cisplatin, in Nasopharyngeal Carcinoma Cells, *Cancer Research*, 65 (2005) 1450-1458.
- [161] L. Mandoky, B. Szende, L. Geczi, I. Bodrogi, M. Kasler, M. Bak, Apoptosis regulation and spontaneous apoptosis index of testicular germ cell tumors are associated with differentiation and resistance to systemic treatment, *Anticancer Res*, 28 (2008) 1641-1649.
- [162] I.U. De Silva, P.J. McHugh, P.H. Clingen, J. Hartley, Defects in interstrand cross-link uncoupling do not account for the extreme sensitivity of ERCC1 and XPF cells to Cisplatin, *Nucleic Acids Res*, 30 (2002) 3848-3856.
- [163] K.M. McCabe, S.B. Olson, R.E. Moses, DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells, *J Cell Physiol*, 220 (2009) 569-573.
- [164] L. Lan, T. Hayashi, R.M. Rabeya, S. Nakajima, S. Kanno, M. Takao, T. Matsunaga, M. Yoshino, M. Ichikawa, H. Riele, S. Tsuchiya, K. Tanaka, A. Yasui, Functional and physical interactions between ERCC1 and MSH2 complexes for resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in mammalian cells, *DNA Repair (Amst)*, 3 (2004) 135-143.

- [165] V. Brabec, J. Kasparkova, Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs, *Drug Resist Updat*, 8 (2005) 131-146.
- [166] R. Rosell, L. Perez-Roca, J.J. Sanchez, M. Cobo, T. Moran, I. Chaib, M. Provencio, M. Domine, M.A. Sala, U. Jimenez, P. Diz, I. Barneto, J.A. Macias, R. de Las Penas, S. Catot, D. Isla, J.M. Sanchez, R. Ibeas, G. Lopez-Vivanco, J. Oramas, P. Mendez, N. Reguart, R. Blanco, M. Taron, Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression, *PLoS One*, 4 (2009) e5133.
- [167] A. Husain, G. He, E.S. Venkatraman, D.R. Spriggs, BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II), *Cancer Res*, 58 (1998) 1120-1123.
- [168] S. Chijiwa, C. Masutani, F. Hanaoka, S. Iwai, I. Kuraoka, Polymerization by DNA polymerase eta is blocked by cis-diamminedichloroplatinum(II) 1,3-d(GpTpG) cross-link: implications for cytotoxic effects in nucleotide excision repair-negative tumor cells, *Carcinogenesis*, 31 (2010) 388-393.
- [169] R. Zhang, Y. Niu, Y. Zhou, Increase the cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA damage in HepG2 cells by XRCC1 abrogation related mechanisms, *Toxicol Lett*, 192 (2010) 108-114.
- [170] R. Sauer, *Strahlentherapie und Onkologie*, in, 5. Auflage ed., Urban & Fischer bei Elsevier, 2009, pp. 118-120.
- [171] H. Fritz-Niggli, *Strahlengefährdung/Strahlenschutz. Ein Leitfaden für die Praxis*, 4. überarb. und erg. Auflage, Huber Verlag, Bern-Stuttgart-Toronto (1997).
- [172] G.J. van den Aardweg, N.C. Naus, A.C. Verhoeven, A. de Klein, G.P. Luyten, Cellular radiosensitivity of primary and metastatic human uveal melanoma cell lines, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (2002) 2561-2565.
- [173] R.A. El-Awady, E. Dikomey, J. Dahm-Daphi, Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks, *Br J Cancer*, 89 (2003) 593-601.
- [174] J. Vavrova, M. Rezacova, D. Vokurkova, J. Psutka, Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate, *Physiol Res*, 53 (2004) 335-342.

- [175] S.C. Short, C. Martindale, S. Bourne, G. Brand, M. Woodcock, P. Johnston, DNA repair after irradiation in glioma cells and normal human astrocytes, *Neuro Oncol*, 9 (2007) 404-411.
- [176] F. Teyssier, J.O. Bay, C. Dionet, P. Verrelle, [Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation], *Bull Cancer*, 86 (1999) 345-357.
- [177] K. Koniaras, A.R. Cuddihy, H. Christopoulos, A. Hogg, M.J. O'Connell, Inhibition of Chk1-dependent G2 DNA damage checkpoint radiosensitizes p53 mutant human cells, *Oncogene*, 20 (2001) 7453-7463.
- [178] R.E. Shackelford, W.K. Kaufmann, R.S. Paules, Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress, *Environ Health Perspect*, 107 Suppl 1 (1999) 5-24.
- [179] C. Zhou, P. Huang, J. Liu, The carboxyl-terminal of BRCA1 is required for subnuclear assembly of RAD51 after treatment with cisplatin but not ionizing radiation in human breast and ovarian cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 336 (2005) 952-960.
- [180] G. Zhu, R. Gilchrist, N. Borley, H.W. Chng, M. Morgan, J.F. Marshall, R.S. Camplejohn, G.H. Muir, I.R. Hart, Reduction of TSG101 protein has a negative impact on tumor cell growth, *Int J Cancer*, 109 (2004) 541-547.
- [181] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72 (1976) 248-254.

Curriculum Vitae

Annabelle Elisabeth Fenske

Persönliche Daten	Geburtsdatum: 29.08.1981 Geburtsort: Hamburg
Derzeitige Tätigkeiten	Seit Januar 2006 Apothekerin in der Apotheke am Kreideberg in Lüneburg Seit September 2007 Vortragsreihe zu saisonalen, gesundheitsbezogenen Themen unter ganzheitlicher Betrachtung; in Zusammenarbeit mit einer Heilpraktikerin
Promotion	Juli 2006 bis Juni 2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg (Bereich Klinische Pharmazie).
Studium	2000-2004 Studium der Pharmazie in Hamburg 10/2004 2. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung Praktisches Jahr: Institut für Spitalpharmazie in Basel/Schweiz mit dem Schwerpunkt pharmazeutische Analytik Lerchenfeld Apotheke Hamburg mit den Schwerpunkten Zytostatikaherstellung, Klinikbetreuung und Schulung von medizinischem Personal 12/2005 3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
Schulbildung	1987-2000 in Ahrensburg, Abschluss Abitur Auslandsaufenthalte in Castre/Frankreich, Villach/Österreich, Soderberg/Dänemark, Kolding/Dänemark und Peru

Veröffentlichungen

Kongressbeitrag (Poster): „Analysis of cisplatin-induced toxicity, adduct formation and γ -H2AX positivity in human teratocarcinoma cells“, DNA Repair, Berlin, 2008

Kongressbeitrag (Poster): „Lack of correlation between cisplatin-induced DNA-damage and cytotoxicity in testicular germ cell cancer cell lines“, DPhG-Doktorandentagung, Pichlarn, Österreich, 2009

Artikel (in Revision): “Cisplatin-induced toxicity, adduct formation, DNA repair, and global proteome analysis in the human embryonal carcinoma cell line NTERA-2 and its resistant counterpart NTERA-2R”, 2010

Mitarbeit am „Curriculum Klinische Pharmazie“ im Rahmen des Leonardo da Vinci Programms der Europäischen Union im Pilotprojekt Nr PL/06/B/F/PP-174049 (ISBN 978-3-89975-856-6)

Anhang

Zu Abschnitt 3.2.3: Analyse der Zellverteilung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen nach CDDP-Behandlung

Tabelle 0.1: Zellzyklusverteilung nach CDDP-Behandlung mit 2.5 μ M für 3 h, 24 h und 48 h mit anschließender cisplatinfreier Inkubation bis zu 48 h. Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung. Alle Werte wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Inkubationszeit / ZnM	Zellzyklusphasen	NT-2	NT-2-R	TCam-2
3 h Kontrolle	Sub-G ₁	1.3 % \pm 0.5 %	1.2 % \pm 0.7 %	3.0 % \pm 2.2 %
	G ₁	33.5 % \pm 5.5 %	34.0 % \pm 4.2 %	50.9 % \pm 4.7 %
	S	27.3 % \pm 2.0 %	30.3 % \pm 4.4 %	20.6 % \pm 1.0 %
	G ₂ /M	38.0 % \pm 3.6 %	26.4 % \pm 5.8 %	25.5 % \pm 1.6 %
3 h	Sub-G ₁	1.3 % \pm 0.3 %	1.1 % \pm 0.4 %	2.7 % \pm 1.3 %
	G ₁	35.2 % \pm 6.6 %	33.7 % \pm 4.9 %	52.8 % \pm 1.3 %
	S	27.0 % \pm 3.6 %	29.6 % \pm 4.8 %	20.7 % \pm 0.5 %
	G ₂ /M	26.5 % \pm 2.7 %	35.7 % \pm 7.5 %	23.8 % \pm 1.3 %
3 h / 3 h	Sub-G ₁	0.9 % \pm 0.1 %	1.0 % \pm 0.5 %	2.2 % \pm 0.5 %
	G ₁	35.1 % \pm 5.6 %	30.7 % \pm 3.9 %	53.3 % \pm 2.4 %
	S	29.1 % \pm 2.2 %	32.3 % \pm 5.1 %	21.1 % \pm 1.1 %
	G ₂ /M	34.9 % \pm 4.2 %	36.1 % \pm 3.7 %	23.4 % \pm 1.9 %
3 h / 6 h	Sub-G ₁	1.3 % \pm 0.4 %	1.1 % \pm 0.8 %	3.0 % \pm 2.0 %
	G ₁	37.4 % \pm 3.2 %	35.0 % \pm 3.5 %	52.8 % \pm 1.5 %
	S	31.7 % \pm 2.7 %	32.7 % \pm 6.1 %	22.2 % \pm 1.4 %
	G ₂ /M	29.6 % \pm 2.3 %	31.2 % \pm 3.4 %	22.0 % \pm 2.7 %
3 h / 24 h	Sub-G ₁	1.0 % \pm 0.3 %	1.3 % \pm 0.6 %	4.4 % \pm 1.6 %
	G ₁	11.2 % \pm 1.2 %	15.6 % \pm 7.6 %	49.3 % \pm 2.3 %
	S	30.5 % \pm 4.1 %	34.3 % \pm 5.4 %	20.8 % \pm 2.4 %
	G ₂ /M	57.4 % \pm 5.0 %	49.2 % \pm 7.4 %	25.5 % \pm 1.4 %
3 h / 48 h	Sub-G ₁	1.9 % \pm 0.9 %	1.4 % \pm 0.9 %	3.3 % \pm 1.4 %
	G ₁	33.3 % \pm 1.6 %	31.9 % \pm 1.1 %	54.9 % \pm 3.0 %
	S	20.8 % \pm 2.4 %	24.3 % \pm 4.7 %	13.5 % \pm 3.3 %
	G ₂ /M	44.1 % \pm 1.8 %	42.5 % \pm 3.4 %	28.3 % \pm 0.5 %

Anhang

Inkubationszeit / ZnM	Zellzyklusphasen	NT-2	NT-2-R	TCam-2
24 h Kontrolle	Sub-G ₁	1.6 % ± 0.6 %	2.3 % ± 0.7 %	2.8 % ± 1.2 %
	G ₁	40.3 % ± 1.2 %	40.7 % ± 6.7 %	55.2 % ± 1.3 %
	S	24.6 % ± 1.6 %	26.7 % ± 0.6 %	17.4 % ± 0.6 %
	G ₂ /M	33.5 % ± 1.6 %	30.3 % ± 6.2 %	24.7 % ± 3.2 %
24 h	Sub-G ₁	2.1 % ± 1.2 %	1.4 % ± 0.1 %	2.3 % ± 0.5 %
	G ₁	25.8 % ± 3.5 %	17.4 % ± 5.6 %	44.2 % ± 0.9 %
	S	45.3 % ± 5.8 %	48.7 % ± 2.8 %	26.6 % ± 0.9 %
	G ₂ /M	26.8 % ± 2.8 %	32.5 % ± 2.9 %	27.0 % ± 0.3 %
24 h / 3 h	Sub-G ₁	2.0 % ± 0.9 %	1.3 % ± 0.6 %	3.0 % ± 0.5 %
	G ₁	22.7 % ± 0.7 %	14.2 % ± 3.4 %	45.5 % ± 2.6 %
	S	45.2 % ± 4.7 %	48.8 % ± 2.9 %	26.2 % ± 1.4 %
	G ₂ /M	30.2 % ± 5.7 %	35.7 % ± 2.3 %	25.3 % ± 2.0 %
24 h / 6 h	Sub-G ₁	1.7 % ± 0.5 %	1.5 % ± 0.6 %	3.8 % ± 2.6 %
	G ₁	18.9 % ± 5.9 %	11.4 % ± 3.0 %	41.4 % ± 1.3 %
	S	43.9 % ± 7.2 %	43.5 % ± 1.6 %	26.2 % ± 1.1 %
	G ₂ /M	35.6 % ± 2.7 %	43.6 % ± 4.9 %	28.6 % ± 0.3 %
24 h / 24 h	Sub-G ₁	6.2 % ± 3.7 %	5.9 % ± 2.8 %	3.2 % ± 0.4
	G ₁	6.5 % ± 1.9 %	9.2 % ± 1.1 %	26.9 % ± 1.0 %
	S	13.6 % ± 2.8 %	16.5 % ± 1.9 %	16.1 % ± 0.8 %
	G ₂ /M	73.7 % ± 1.8 %	68.5 % ± 2.0 %	53.0 % ± 1.8 %
24 h / 48 h	Sub-G ₁	49.2 % ± 2.0 %	24.8 % ± 9.2 %	
	G ₁	8.0 % ± 0.7 %	11.1 % ± 1.0 %	
	S	10.1 % ± 0.8 %	18.7 % ± 2.0 %	
	G ₂ /M	32.7 % ± 3.0 %	45.5 % ± 7.9 %	
48 h Kontrolle	Sub-G ₁	1.4 % ± 0.4 %	0.7 % ± 0.3 %	4.3 % ± 2.0 %
	G ₁	41.9 % ± 3.4 %	42.8 % ± 1.6 %	52.7 % ± 3.3 %
	S	21.0 % ± 2.2 %	23.1 % ± 1.4 %	14.5 % ± 0.5 %
	G ₂ /M	35.8 % ± 1.3 %	33.4 % ± 3.3 %	28.6 % ± 2.3 %
48 h	Sub-G ₁	3.9 % ± 0.4 %	2.7 % ± 0.04 %	8.3 % ± 4.5 %
	G ₁	7.2 % ± 2.8 %	8.4 % ± 1.3 %	23.5 % ± 4.0 %
	S	15.6 % ± 0.6 %	17.4 % ± 4.3 %	19.4 % ± 2.7 %
	G ₂ /M	73.3 % ± 3.7 %	71.5 % ± 4.9 %	48.8 % ± 5.9 %
48 h / 3 h	Sub-G ₁	4.3 % ± 0.9 %	2.6 % ± 1.2 %	6.6 % ± 4.7 %
	G ₁	7.1 % ± 3.0 %	9.1 % ± 2.6 %	25.8 % ± 2.9 %
	S	14.8 % ± 2.1 %	15.7 % ± 3.6 %	16.9 % ± 1.6 %
	G ₂ /M	73.8 % ± 5.3 %	72.6 % ± 5.2 %	50.7 % ± 1.8 %

Anhang

Inkubationszeit / ZnM	Zellzyklusphasen	NT-2	NT-2-R	TCam-2
48 h / 6 h	Sub-G ₁	5.3 % ± 1.3 %	5.5 % ± 2.9 %	9.2 % ± 7.9 %
	G ₁	6.0 % ± 2.0 %	7.8 % ± 2.9 %	27.4 % ± 4.2 %
	S	12.9 % ± 3.3 %	13.4 % ± 1.4 %	14.7 % ± 2.4 %
	G ₂ /M	75.8 % ± 5.3 %	73.4 % ± 3.7 %	48.8 % ± 2.2 %
48 h / 24 h	Sub-G ₁	40.7 % ± 6.8 %	28.2 % ± 9.9 %	9.9 % ± 1.5 %
	G ₁	8.5 % ± 3.2 %	13.9 % ± 0.4 %	34.2 % ± 5.5 %
	S	10.3 % ± 2.5 %	12.6 % ± 1.8 %	13.4 % ± 0.8 %
	G ₂ /M	40.5 % ± 11.7 %	45.3 % ± 11.8 %	42.5 % ± 4.1 %

Tabelle 0.2: Konzentrationsabhängigkeit der Veränderung der Zellzyklusverteilung in den TCam-2-Zellen nach Behandlung mit 2.5 µM, 30 µM und 100 µM CDDP für 3 h, 24 h und 48 h. Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung. Alle Werte wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt

Inkubationszeit	CDDP-Konzentration	Zellzyklusphasen	TCam-2
3 h	Kontrolle	Sub-G ₁	3.2 % ± 2.4 %
		G ₁	54.8 % ± 2.4 %
		S	16.6 % ± 0.6 %
		G ₂ /M	25.5 % ± 0.8 %
	2.5 µM	Sub-G ₁	2.4 % ± 0.5 %
		G ₁	57.4 % ± 6.4 %
		S	16.2 % ± 1.2 %
		G ₂ /M	24.0 % ± 5.1 %
	30 µM	Sub-G ₁	2.3 % ± 0.4 %
		G ₁	6.1 % ± 5.3 %
		S	15.0 % ± 0.8 %
		G ₂ /M	21.7 % ± 4.6 %
100 µM	Sub-G ₁	2.2 % ± 0.5 %	
	G ₁	57.9 % ± 1.4 %	
	S	15.3 % ± 0.8 %	
	G ₂ /M	24.7 % ± 1.3 %	

Anhang

Inkubationszeit	CDDP-Konzentration	Zellzyklusphasen	TCam-2
24 h	Kontrolle	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	1.7 % ± 0.3 % 58.9 % ± 1.5 % 13.2 % ± 0.5 % 26.2 % ± 1.3 %
	2.5 µM	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	2.7 % ± 1.9 % 46.6 % ± 1.2 % 22.6 % ± 1.6 % 28.0 % ± 1.2 %
	30 µM	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	16.4 % ± 1.5 % 55.9 % ± 2.5 % 12.2 % ± 0.7 % 15.5 % ± 1.2 %
	100 µM	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	12.5 % ± 2.4 % 58.2 % ± 3.1 % 13.0 % ± 1.2 % 16.3 % ± 0.6 %
48 h	Kontrolle	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	2.9 % ± 0.5 % 53.6 % ± 3.1 % 10.5 % ± 1.8 % 33.0 % ± 3.6 %
	2.5 µM	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	11.5 % ± 6.5 % 25.0 % ± 5.2 % 23.4 % ± 2.1 % 40.1 % ± 11.7 %
	30 µM	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	40.9 % ± 10.6 % 40.3 % ± 3.8 % 9.7 % ± 4.0 % 9.2 % ± 2.8 %
	100 µM	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	23.9 % ± 5.3 % 49.4 % ± 5.1 % 11.7 % ± 1.9 % 15.0 % ± 1.4 %

Zu Abschnitt 4.4.1.2: Analyse der Zellverteilung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen nach Bestrahlung

Tabelle 0.3: Zellzyklusverteilung nach Bestrahlung mit 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy. Die Messungen erfolgten 24 h und 48 h nach der Bestrahlung. Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung. Alle Werte wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Zeit nach Bestrahlung	Strahlendosis	Zellzyklusphasen	TCam-2
24 h	Kontrolle	Sub-G ₁	2.8 % ± 1.2 %
		G ₁	57.6 % ± 3.6 %
		S	12.4 % ± 0.6 %
		G ₂ /M	27.2 % ± 3.0 %
	1 Gy	Sub-G ₁	2.6 % ± 1.1 %
		G ₁	62.0 % ± 7.7 %
		S	11.2 % ± 2.0 %
		G ₂ /M	24.3 % ± 5.8 %
	2 Gy	Sub-G ₁	2.1 % ± 0.04 %
		G ₁	61.5 % ± 5.2 %
		S	11.0 % ± 1.7 %
		G ₂ /M	25.4 % ± 3.6 %
	4 Gy	Sub-G ₁	2.7 % ± 0.5 %
		G ₁	56.8 % ± 4.0 %
		S	9.6 % ± 2.2 %
		G ₂ /M	30.9 % ± 2.7 %
	6 Gy	Sub-G ₁	4.2 % ± 1.2 %
		G ₁	54.3 % ± 8.8 %
		S	8.5 % ± 1.9 %
		G ₂ /M	33.0 % ± 8.4 %

Anhang

Zeit nach Bestrahlung	Strahlendosis	Zellzyklusphasen	TCam-2
48 h	Kontrolle	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	2.8 % ± 1.2 % 57.6 % ± 3.6 % 12.4 % ± 0.6 % 27.2 % ± 3.0 %
	1 Gy	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	1.9 % ± 0.5 % 55.4 % ± 1.0 % 10.8 % ± 0.6 % 32.0 % ± 1.2 %
	2 Gy	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	2.7 % ± 0.7 % 57.2 % ± 4.9 % 11.1 % ± 1.9 % 29.1 % ± 4.4 %
	4 Gy	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	3.4 % ± 0.8 % 51.6 % ± 1.5 % 11.5 % ± 1.5 % 33.5 % ± 1.3 %
	6 Gy	Sub-G ₁ G ₁ S G ₂ /M	5.2 % ± 0.9 % 50.1 % ± 1.1 % 12.0 % ± 1.9 % 32.8 % ± 1.1 %