

Präklinische Ansätze zur Überwindung einer Cisplatinresistenz:  
Evaluierung der neuen Platinverbindung THP-12 in  
Cisplatin-sensitiven und in Cisplatin-resistenten Tumorzelllinien

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl.-Pharmazeutin Andrea Dietrich  
geboren am 28.08.1978 in Zeitz

Gutachter/in

1. Prof. C. Kloft
2. Prof. H.-J. Schmoll
3. Prof. U. Jaehde

Halle (Saale), den 10.02.2010

*Meiner Familie gewidmet.*

---

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Chemotherapie mit Cisplatin (CDDP).....	1
1.1.1	Stellenwert der antineoplastischen Chemotherapie .....	1
1.1.2	CDDP-basierte Chemotherapie.....	1
1.1.3	Wirkungsmechanismus von CDDP .....	3
1.1.4	Unerwünschte Wirkungen von CDDP und Resistenzproblematik .....	5
1.2	Neue Platinverbindungen.....	8
1.2.1	Historischer Überblick .....	8
1.2.2	Vorstellung ausgewählter Platinsubstanzen.....	11
1.3	Programmierter Zelltod (Apoptose).....	16
1.3.1	Kennzeichen der Apoptose .....	16
1.3.2	Rolle der Caspasen.....	17
1.3.3	Mechanismen der apoptotischen Signaltransduktion.....	19
1.3.4	CDDP-induzierte Apoptose .....	26
1.4	Zielsetzung der Arbeit .....	27
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.1	Zelllinien und primäre Zellen .....	29
2.2	Medien und Supplemente .....	30
2.3	Chemikalien und Antikörper .....	30
2.4	Geräte und Verbrauchsmittel.....	36
2.5	Zellkultivierung .....	37
2.6	Zytotoxizitäts-Analysen.....	37
2.6.1	SRB-Zytotoxizitäts-Assay .....	37
2.6.2	SRB-Langzeit-Zytotoxizitäts-Assay .....	38
2.7	Apoptose-Analyse.....	39
2.7.1	Trypanblau-Ausschluss-Test.....	39
2.7.2	DNA-Fragmentierungs-Assay .....	39
2.7.3	Analyse der PARP-Spaltung.....	39

---

2.8	Platinakkumulations-Analysen .....	40
2.8.1	AAS platinierter Zellen .....	40
2.8.2	AAS platinierter DNA .....	40
2.9	Reaktivitäten von THP-12 und von CDDP mit pCR <sup>®</sup> 3.1 Plasmid-DNA .....	40
2.10	Charakterisierung der Wirkmechanismen von THP-12 und von CDDP .....	41
2.10.1	Durchflusszytometrische Analysen .....	41
2.10.2	Western Blot-Analysen .....	41
2.10.3	Caspasenaktivitäts-Assay .....	43
2.10.4	Calciumflux-Assay .....	44
2.10.5	Lucigenin-Assay .....	44
2.10.6	GSH-Assay .....	44
2.10.7	Analyse des mitochondrialen Membranpotentials .....	45
2.11	Statistik .....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>47</b>
3.1	Analyse der zytotoxischen Aktivitäten von THP-12 und von CDDP .....	47
3.1.1	Bestimmung der IC <sub>50</sub> /IC <sub>90</sub> in humanen TKZT-Zelllinien .....	47
3.1.2	Bestimmung der IC <sub>50</sub> /IC <sub>90</sub> in humanen Zelllinien anderer solider Tumoren ..	49
3.1.3	Bestimmung der IC <sub>50</sub> /IC <sub>90</sub> in hMSC .....	50
3.1.4	Zytotoxische Langzeiteffekte von THP-12 und von CDDP .....	50
3.1.5	Zytotoxische Aktivitäten der strukturellen Bestandteile von THP-12 .....	51
3.1.6	Erstellte Behandlungsschemata .....	52
3.2	Analyse der Art des THP-12- und des CDDP-vermittelten Zelltodes .....	53
3.2.1	Mikroskopische Aufnahmen .....	53
3.2.2	Analyse des apoptotischen Zelltodes mittels Trypanblau-Ausschluss-Test ...	54
3.2.3	Analyse des apoptotischen Zelltodes mittels DNA-Fragmentierungs-Assay .	55
3.2.4	Analyse des apoptotischen Zelltodes mittels PARP-Spaltung .....	55
3.3	Analyse der zellulären Akkumulationen von THP-12 und von CDDP .....	56
3.3.1	Zelluläre Platinakkumulationen äquimolarer Konzentrationen .....	56
3.3.2	Zelluläre Platinakkumulationen äquitoxischer Konzentrationen .....	58
3.3.3	Zelluläre Platinakkumulationen höherer CDDP-Konzentrationen .....	59
3.3.4	Platinakkumulationen in Abhängigkeit von den THP-Derivaten .....	60
3.3.5	Platinakkumulationen in Abhängigkeit von den IC .....	61
3.3.6	Platinakkumulationen an der genomischen DNA .....	61

---

3.4	Analyse der DNA-Bindungen von THP-12 und von CDDP im zellfreien System.....	62
3.5	Analyse der THP-12- und der CDDP-induzierten Apoptosemechanismen.....	64
3.5.1	Beeinflussung des Zellzyklus.....	64
3.5.2	Akkumulation von p53.....	67
3.5.3	Analyse verschiedener proapoptotischer und antiapoptotischer Proteine.....	68
3.5.4	Spaltung von Caspase 3 und von PARP .....	70
3.5.5	Aktivierung und Relevanz von Apoptose-assoziierten Caspasen.....	71
3.5.6	Beeinflussung und Relevanz der intrazellulären Calcium-Homöostase .....	77
3.5.7	Beeinflussung und Relevanz der intrazellulären ROS-Homöostase.....	81
3.5.8	Beeinflussung und Relevanz der intrazellulären GSH-Homöostase.....	84
3.5.9	Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials .....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
4.1	Charakterisierung der Zytotoxizität von THP-12 im Vergleich mit CDDP .....	91
4.2	Charakterisierung des THP-12-initiierten Zelltodes im Vergleich mit CDDP.....	93
4.3	Charakterisierung der zellulären Substanzakkumulation und der DNA-Platinierung von THP-12 im Vergleich mit CDDP.....	93
4.4	Aufklärung des THP-12-initiierten Zelltodmechanismus im Vergleich mit CDDP....	98
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>III</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>VII</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>XIX</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>XX</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>XXII</b>
	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>XXIV</b>

## II Abkürzungsverzeichnis

- $\alpha$  angenommene Irrtumswahrscheinlichkeit
- AAS Atomabsorptionsspektroskopie
- Abb. Abbildung
- AIF *Apoptosis Inducing Factor*
- Amin/Ammin Schreibweise gemäß IUPAC  
(International Union of Pure and Applied Chemistry)
- ANT *Adenine Nucleotide Translocator*
- APAF-1 *Apoptotic Protease Activating Factor-1*
- ATP Adenosintriphosphat
- BAK *BCL-2 Antagonist Killer*
- BAX *BCL-2 Associated X-Protein*
- BCL-2 *B-Cell Lymphoma-2*
- BCL-X<sub>L</sub> *BCL-2-like 1*
- BH *BCL-2 Homology*
- BID *BCL-2 Interacting Domain Death Agonist*
- bp Basenpaare
- BSO Buthioninsulfoximin
- CAD *Caspase Activated DNase*
- Calpain *Calcium activated neutral protease*
- CARD *Caspase Recruitment Domain*
- Caspase *Cysteinylnyl aspartate specific protease*
- ccc *covalently closed circular*
- CDDP Cisplatin, *cis*-Diammindichloroplatin(II)
- CSA Cyclosporin A
- DISC *Death-Inducing Signal Complex*
- DNA *Deoxyribonucleic Acid*
- DNA-PK *DNA-dependent Protein Kinase*
- ENDO G *Endonuclease G*
- ER Endoplasmatisches Retikulum
- FADD *Fas-Associated Protein with Death Domain*
- FasL Fas-Ligand
- FasR Fas-Rezeptor

---

➤ FKS	Fetales Kälberserum
➤ GSH	Glutathion
➤ hCTR1	<i>human Copper Transporter Receptor 1</i>
➤ HMG	<i>High Mobility Group</i>
➤ hMSC	<i>human Multipotent Stroma Cells, human Mesenchymal Stem Cells</i>
➤ IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>
➤ IC	<i>Inhibitory Concentration</i>
➤ ICAD	<i>Inhibitor of CAD</i>
➤ i. v.	intravenös
➤ kDA	Kilo-Dalton
➤ M	Molar, Mol/Liter
➤ MMR	<i>Mismatch Repair</i>
➤ NAC	N-Acetylcystein
➤ NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
➤ NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
➤ NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
➤ oc	<i>open circular</i>
➤ OD	Optische Dichte
➤ OMI/HTRA2	<i>OMI/High Temperature Requirement A2</i>
➤ PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
➤ PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
➤ PCD	<i>Programmed Cell Death</i> , programmierter Zelltod
➤ PE	CDDP und Etoposid
➤ PEB	CDDP und Etoposid und Bleomycin
➤ PEI	CDDP und Etoposid und Ifosfamid
➤ PIDDosom	<i>p53 Inducible Protein with a Death Domain</i>
➤ ppm	<i>parts per million</i>
➤ PTP	<i>Permeability Transition Pore</i> , mitochondriale Membranpore
➤ RAIDD	<i>RIP-Associated Protein with a Death Domain</i>
➤ RIP	<i>Receptor-Interacting Protein</i>
➤ RLU	<i>Relative Light Units</i>
➤ ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , reaktive Sauerstoffverbindungen
➤ RT	Raumtemperatur
➤ SD	<i>Standard Deviation</i> , Standardabweichung

---

➤ signif.	signifikant
➤ SMAC/DIABLO	<i>human Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/murine Direct IAP Binding Protein with LOw pI</i>
➤ t-BID	<i>truncated-BID</i>
➤ THP	Tetrahydropyran
➤ TKZT	Testikulärer Keimzelltumor
➤ TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
➤ TNFR	TNF-Rezeptor
➤ TRADD	<i>TNFR-Associated Protein with a Death Domain</i>
➤ UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
➤ U/min	Umdrehungen pro Minute
➤ VDAC	<i>Voltage-Dependent Anion Channel</i>
➤ x	Mittelwert
➤ $\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential



# 1 Einleitung

## 1.1 Chemotherapie mit Cisplatin (CDDP)

### 1.1.1 Stellenwert der antineoplastischen Chemotherapie

Krebserkrankungen sind nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern. Eine kürzlich veröffentlichte Schätzung des Robert-Koch-Institutes (RKI) in Zusammenarbeit mit der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) weist für das Jahr 2004 436.500 Tumorneuerkrankungen in Deutschland aus (Männer 230.500, Frauen 206.000). Im selben Jahr verursachten Tumorerkrankungen 208.824 Todesfälle (Männer 110.745, Frauen 98.079) <sup>1</sup>.

Im Falle eines diagnostizierten malignen Tumors sind für die Therapieentscheidung u. a. das Ausmaß und die Art der Tumorerkrankung ausschlaggebend. Während bei lokal begrenzten Tumoren eine chirurgische Entfernung oder eine Strahlentherapie im Vordergrund der Behandlung stehen, stellt bei metastasierten soliden Tumoren oder bei Hämoblastosen eine systemische Chemotherapie das Mittel der Wahl dar. Hierbei kommen sogenannte Zytostatika zum Einsatz, die die Zellteilung und somit das unkontrollierte Wachstum der Tumorzellen hemmen sollen <sup>2</sup>.

Die moderne Chemotherapie kann vielfältig genutzt werden. Chemotherapieempfindliche Tumoren können durch eine Mono- oder Kombinationschemotherapie z. T. kurativ behandelt werden. Eine *adjuvante* Therapie, d. h. eine Zytostatikagabe nach einer Operation, kann das Risiko der Entstehung eines Tumorrezidivs verringern. Demgegenüber ermöglicht eine *neoadjuvante* Therapie, d. h. eine Gabe der Zytostatika vor einer Operation, einen zunächst nicht operablen Tumor vorbereitend zu verkleinern. Die palliative Krebstherapie hat zum Ziel, die Lebensqualität der Patienten zu verbessern, wenn eine Heilung der Tumorerkrankung nicht möglich ist. Für eine Intensivierung der Behandlung kann eine *adjuvante* oder eine *neoadjuvante* Chemotherapie mit einer Strahlentherapie kombiniert werden <sup>2</sup>.

### 1.1.2 CDDP-basierte Chemotherapie

30 Jahre nach der Einführung von Platinkomplexen in die klinische Onkologie gehören diese noch immer zu den am häufigsten eingesetzten Zytostatika in der Chemotherapie solider Tumoren. Die Entdeckung der hochpotenten, die Zellteilung von *Escherichia coli*-Bakterien hemmenden Eigenschaften der Substanz Cisplatin (*cis*-Diammindichloroplatin(II), CDDP)

1965 durch den Biophysiker B. Rosenberg legte den Grundstein für die Verwendung platinhaltiger Verbindungen in der Therapie maligner Tumore<sup>3</sup>. CDDP wurde 1979 von der *Food and Drug Administration* (FDA) als Zytostatikum zugelassen. Heute stellt die Substanz in alleiniger Gabe oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika eines der potentesten Medikamente in der antitumoralen Therapie zahlreicher Tumorentitäten dar. CDDP bildet einen festen Bestandteil in der kurativen Behandlung von testikulären Keimzelltumoren (TKZT) und in den Chemotherapieschemata von Ovarial-, Zervix-, Endometrium-, Blasen-, Prostata-, Ösophagus-, klein- und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich sowie von Melanomen und von Sarkomen<sup>4</sup>. Insbesondere TKZT können aufgrund ihrer hohen Sensitivität gegenüber CDDP sehr effizient behandelt werden.

Obwohl der TKZT nur ca. 2 % aller malignen Erkrankungen ausmacht, stellt er den häufigsten bösartigen Tumor des jungen Mannes im Alter zwischen 25 Jahren und 45 Jahren mit der am schnellsten steigenden Inzidenz aller Tumoren dar<sup>1</sup>. Die Einführung von CDDP in das Therapieregime von TKZT führte zu einer drastischen Abnahme der Mortalität der Patienten und zur Erzielung einer der höchsten Heilungsraten bei einem Malignom im Erwachsenenalter von nahezu 90 %. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate von TKZT-Patienten je nach Prognoseklassifikation der *International Germ Cell Cancer Collaborative Group* (IGCCCG) ca. 80 % einschließlich der metastasierten Stadien<sup>5-7</sup>. TKZT sind damit zu einem Modell einer kurativ behandelbaren malignen Neoplasie geworden und werden als einer der chemotherapieempfindlichsten Tumoren angesehen<sup>6, 8, 9</sup>. Trotzdem kommt es in etwa 10 % bis 20 % der Fälle zum Auftreten bzw. zur Entwicklung einer CDDP-Resistenz. Diese Patienten besitzen weiterhin eine sehr schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 45 %<sup>10-12</sup>.

Die Behandlung metastasierter TKZT erfolgt seit 1984 fast ausschließlich als PEB-Kombinationschemotherapie mit CDDP (i. d. R. 20 mg/m<sup>2</sup> i. v. als 30 min-Infusion d 1 bis d 5), Etoposid (100 mg/m<sup>2</sup> i. v. als 1 h-Infusion d 1 bis d 5) und Bleomycin (30 mg i. v. als Bolus d 1, d 8, d 15). Patienten mit einer guten Prognose sollten nach den Empfehlungen der *European Germ Cell Cancer Consensus Group* (EGCCCG) drei Zyklen PEB erhalten, Patienten mit einer intermediären oder ungünstigen Prognose vier Zyklen. Bei Kontraindikationen gegen Bleomycin können alternativ bei guter Prognose vier Zyklen PE bzw. bei mittelmäßiger und schlechter Prognose vier Zyklen PEI (CDDP, Etoposid, Ifosfamid) eingesetzt werden<sup>12, 13</sup>. Klinische Studien untersuchen zudem die Effizienz primärer Hochdosischemotherapien mit autologer Stammzelltransplantation bei CDDP-refraktären Tumoren<sup>14, 15</sup>.

### 1.1.3 Wirkungsmechanismus von CDDP

CDDP stellt einen neutralen, quadratisch planaren *cis*-Diamminkomplex mit einem zweiwertigen Platin als Zentralatom dar und verfügt über jeweils zwei koordinativ gebundene Chlorid- und Amminliganden. Die Substanz wird ausschließlich i. v. verabreicht und zu mehr als 90 % an Serumproteine gebunden. Eine Anreicherung von CDDP ist besonders in Nieren, Leber, Gonaden, Milz, Prostata, Blase, Pankreas, Muskulatur und Nebennieren nachweisbar. Die Ausscheidung erfolgt vorwiegend renal mit einer biphasischen Eliminationskinetik und wird durch eine initiale rasche, gefolgt von einer terminalen langen Halbwertszeitphase charakterisiert<sup>16</sup>.

Obwohl CDDP seit drei Jahrzehnten eine zentrale Rolle in der Chemotherapie verschiedener solider Tumoren zukommt, ist der exakte Wirkmechanismus der Substanz noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Basierend auf einer fehlenden Hemmung der Aufnahme durch höhere Konzentrationen oder Einsatz strukturanaloger Verbindungen wird vermutet, dass CDDP mittels einfacher Diffusion zellulär angereichert wird<sup>17, 18</sup>. Zugleich wird eine Aufnahme über einen bisher nicht eindeutig aufgeklärten Transportmechanismus oder Kanal diskutiert. In diesem Zusammenhang kommt dem plasmamembranständigen *human Copper Transporter Receptor 1* (hCTR1) eine Bedeutung zu, für den eine Aufnahme von CDDP über eine Anbindung der Substanz an Thiol-haltige Bindungsdomänen des Rezeptors oder über eine Kanalbildung aus drei hCTR1-Molekülen diskutiert wird<sup>19-22</sup>. In der Literatur werden zudem zwei Kupfer-Efflux-Transporter der P-Typ-ATPasen ATP7A und ATP7B beschrieben, die als Transporter für CDDP aus der Zelle fungieren können<sup>21, 22</sup>.

Die geringeren Chloridkonzentrationen des intrazellulären Milieus (ca. 3 mM bis 20 mM) gegenüber denen des extrazellulären Milieus (ca. 100 mM) ermöglichen einen intrazellulären Austausch der relativ labil gebundenen Chloridliganden von CDDP und die Bildung eines komplexen Gleichgewichtes reaktiver kationischer und neutraler Aqua- und Hydroxokomplexe. Die elektrophilen Hydrolyseprodukte, der Diamminaquachloroplatin(II)-Komplex  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$  und der Diammindiaquaplatin(II)-Komplex  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ , zeichnen sich durch ihre hohe Reaktivität aus und stellen die eigentlichen aktiven Wirkformen der Substanz dar. Ihre Deprotonierung führt zu ungeladenen Hydroxo- und Dihydroxoplatin(II)-Komplexen, die hochtoxische Dimere oder Trimere ausbilden können (*Abb. 1*)<sup>23-25</sup>.

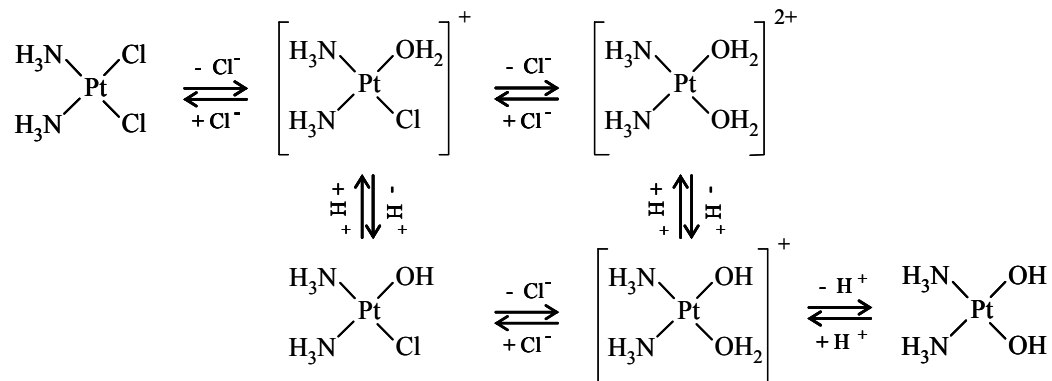


Abb. 1: *In-vivo*-Aktivierung von CDDP im wässrigen Milieu bei physiologischem pH-Wert.

Die Mechanismen der CDDP-vermittelten Zytotoxizität sind noch nicht vollständig verstanden. Es ist allgemein anerkannt, dass einer Schädigung der genomischen DNA durch die Platinierung eine essenzielle Bedeutung in der Wirkung von CDDP zukommt<sup>23, 24, 26</sup>. Die zytotoxische Effizienz der Platinverbindung lässt sich hierbei auf eine kovalente Bindung an die Nucleobasen der DNA zurückführen. Aufgrund der Parallelen im Wirkmechanismus mit dem bifunktioneller DNA-Alkylanzien wird CDDP auch als DNA-Alkylanz im weiteren Sinn bezeichnet<sup>27</sup>. Die Interaktionen mit den nukleophilen N7-Positionen des Guanins und des Adenins, die zu einer Bildung von 1,2-Intrastrang-(*cis*-GpG)-Quervernetzungen (ca. 65 %) und von 1,2-Intrastrang-(*cis*-GpA)-Quervernetzungen (ca. 25 %) führen, werden wesentlich für die zytotoxischen Effekte von CDDP verantwortlich gemacht. Ferner wurden 1,3-Intrastrang-(*cis*-GpXpG)-Quervernetzungen nichtbenachbarter Guanine, hochtoxische Interstrang-Addukte (< 1 %), DNA-Mono-Addukte, DNA-Protein-Addukte und Protein-Mono-Addukte nachgewiesen (Abb. 2). Die gestörte helikale Struktur der DNA resultiert in einer Hemmung der DNA-Replikation, die mit einer Störung im Ablauf des Zellzyklus der Zellen einhergeht und letztlich über einen noch nicht vollends entschlüsselten Signalweg zur Initiierung des Zelltodes führt<sup>23-25</sup>.

Obwohl die DNA-Platinierung als wesentlicher Mechanismus der zytotoxischen Wirkung von CDDP angesehen wird, bindet nur ca. 1 % der Substanz an nukleäre DNA<sup>26, 28</sup>. Daneben stellen mitochondriale DNA, RNA, Membranphospholipide und Membranphosphatidylserine der Zellmembranen, Mikrofilamente des Zytoskelettes und Thiol-enhaltende Moleküle, wie Glutathion (GSH), Metallothionein und Methionin, potente nukleophile Targets für CDDP dar, wobei das Ausmaß ihrer Bindungsaffinitäten noch nicht aufgeklärt wurde<sup>23, 24, 28, 29</sup>.

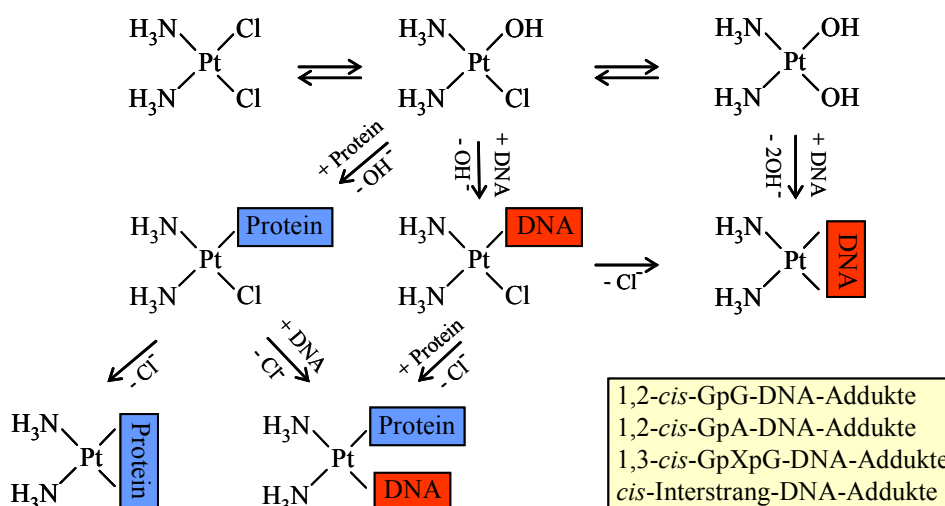


Abb. 2: Bildung von CDDP-DNA-Addukten. 1,2-*cis*-GpG-Intrastrang- und 1,2-*cis*-GpA-Intrastrang-Quervernetzungen stellen die Hauptaddukte einer Reaktion von CDDP mit der DNA dar.

### 1.1.4 Unerwünschte Wirkungen von CDDP und Resistenzproblematik

Die hohe antitumorale Aktivität von CDDP und die Reaktivität mit zellulären Nukleophilen bedingen das Auftreten z. T. schwerer unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW), die den klinischen Einsatz der Verbindung begrenzen und CDDP als Substanz mit geringer therapeutischer Breite einstufen. Insbesondere Gewebe mit hoher Proliferationsrate werden geschädigt, was sich in einer Störung der Hämatopoese, Mukositis, Diarrhoe und Alopezie äußern kann. Neben dem hohen emetogenen Potential der Substanz stellen eine akute Nephrotoxizität sowie chronisch verlaufende Neuro- und Ototoxizitäten, die von peripherer Neuropathie, Tinnitus und einem irreversiblen Verlust des hochfrequenten Hörens begleitet sind, die dosislimitierenden UAW dar<sup>16, 30, 31</sup>. Die ausgeprägte Nephrotoxizität kann zu einer irreversiblen Schädigung der Nierenfunktion führen, die durch eine ausreichende Prä- und Posthydratisierung in Kombination mit einer forcierten Diurese mit Mannitol oder mit Furosemid verhindert werden kann. Aufgrund der Verschiebung des Elektrolythaushaltes durch die großen Flüssigkeitsmengen müssen Kalium und Magnesium supplementiert werden. Die Tumorthherapie mit CDDP erfordert zudem eine adäquate antiemetische Prophylaxe mit 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten in Kombination mit Dexamethason oder der Gabe der Neurokinin-1-Rezeptor-Antagonisten Aprepitant oder Fosaprepitant<sup>16, 32-34</sup>.

Neben den beschriebenen ausgeprägten UAW stellt das Auftreten bzw. die Entwicklung einer Chemotherapieresistenz ein weitaus größeres Problem dar, das die Therapieerfolge von CDDP z. T. stark limitiert<sup>35, 36</sup>. Mit Ausnahme des TKZT, bei dem die Verbindung auch im

fortgeschrittenen Stadium kurativ wirken kann, treten in der Behandlung verschiedener anderer Tumorerkrankungen häufig Resistenzen oder Tumorrezidive auf. Diese resistenten Krebszellen zeichnen sich durch eine verminderte Sensitivität gegenüber dem Zytostatikum aus. Ein resistenzbedingter Verlust der zytoreduktiven Effekte von CDDP mindert daher entscheidend das Ansprechen der malignen Tumore auf die Therapie und die Prognose für die Patienten. Hierbei kann zwischen einer von Anfang an bestehenden, intrinsischen CDDP-Resistenz und einer im Verlauf einer Chemotherapie mit CDDP auftretenden, erworbenen Resistenz unterschieden werden<sup>27</sup>.

In vielen Studien zur Aufklärung der für eine CDDP-Resistenz verantwortlichen zellulären und molekularen Prinzipien wurden verschiedene zelltypabhängige, multifaktorielle Mechanismen der CDDP-Resistenz beschrieben (*Abb. 3*)<sup>29, 35-37</sup>. So kann eine verminderte intrazelluläre CDDP-Konzentration infolge einer verringerten Aufnahme oder infolge eines gesteigerten Ausschleusens der Substanz aus den Zellen zur Ausprägung einer CDDP-Resistenz beitragen. Hierbei werden den humanen Kupfertransportern hCTR1, ATP7A und ATP7B Beteiligungen an einer Resistenz gegenüber CDDP zugesprochen<sup>21, 38-41</sup>. Neben Änderungen im transmembranösen Transport kann ferner eine enzymatische Inaktivierung von CDDP durch zytoplasmatische, Thiol-enthaltende Moleküle hervorgerufen werden. Insbesondere das Tripeptid GSH und die Schwermetallionen-detoxifizierenden Metallothioneine weisen eine hohe Affinität zu der Platinverbindung auf<sup>18, 25, 42</sup>. GSH bildet mit einer Konzentration von 0,5 mM bis 10 mM das zellulär vorherrschende Thiol<sup>43, 44</sup>. Eine GSH-vermittelte Inaktivierung von CDDP kann auf die Bildung eines Platin-Thiol-Komplexes zurückgeführt werden, der aus den Zellen über eine ATP-abhängige GSH-Konjugat-Exportpumpe eliminiert wird<sup>41, 45, 46</sup>. Zudem trägt GSH als endogenes Antioxidans zu einer Neutralisation von reaktiven Sauerstoffverbindungen (*Reactive Oxygen Species*, ROS) bei. Neben diesem direkten antioxidativen Effekt ist GSH als Substrat der GSH-Peroxidase indirekt über eine enzymatische Reaktion an einem ROS-Abbau beteiligt<sup>44, 47, 48</sup>. In einigen Tumormodellen konnte ein erhöhter GSH- oder Metallothionein-Gehalt mit einer geringeren CDDP-Sensitivität in Verbindung gebracht werden<sup>35, 49-51</sup>. Weitere mögliche Faktoren einer CDDP-Resistenz umfassen eine verminderte DNA-Platinierung oder eine gesteigerte Reparatur des induzierten DNA-Schadens. Das Reparatursystem des *Nucleotide Excision Repair* (NER) stellt den wichtigsten zellulären Signalweg zur Reparatur von CDDP-DNA-Addukten dar<sup>8</sup>. Es beinhaltet einen komplexen Prozess, der die Erkennung der DNA-Läsionen, die Entfernung der Oligonukleotidstränge und den Einbau der neu synthetisierten DNA-Abschnitte einschließt. Viele Studien belegen eine verminderte NER-Reparaturleistung

von TKZT-Zelllinien, die mit der hohen Sensitivität dieser Zellen für CDDP korreliert<sup>52, 53</sup>. Weiterhin können fehlerhafte Basenpaarungen durch das System des *Mismatch Repair* (MMR) erkannt und repariert werden. Einige Literaturdaten berichten über eine paradoxe Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von CDDP infolge einer MMR-vermittelten Erkennung der induzierten DNA-Schäden und einem Ausbleiben der Reparatur. So kann ein Defekt des MMR-Signalweges mit einer erhöhten Toleranz der Zellen gegenüber CDDP verbunden sein<sup>53-55</sup>. Weiterhin kann eine Bindung der *High Mobility Group* (HMG)-Proteine an CDDP-modifizierte DNA-Läsionen zu einer Hemmung der Anbindung des NER-Systems und zu einer Hemmung der Reparatur des DNA-Schadens führen<sup>56</sup>. Die zelluläre Tolerierung eines durch CDDP gesetzten DNA-Schadens stellt einen weiteren wichtigen Schwerpunkt in der Resistenz gegenüber der Substanz dar. In diesem Zusammenhang werden Veränderungen in der Zelltod-vermittelnden Signalkaskade, Dysfunktionen des Tumorsuppressorproteins p53, eine Überexpression Zelltod-hemmender Proteine, wie *B-Cell Lymphoma-2* (BCL-2) oder *BCL-2-like 1* (BCL-X<sub>L</sub>), und eine Herabregulierung Zelltod-fördernder Proteine, wie *BCL-2 Associated X-Protein* (BAX) und *BCL-2 Antagonist Killer* (BAK), beschrieben<sup>8, 57</sup>.

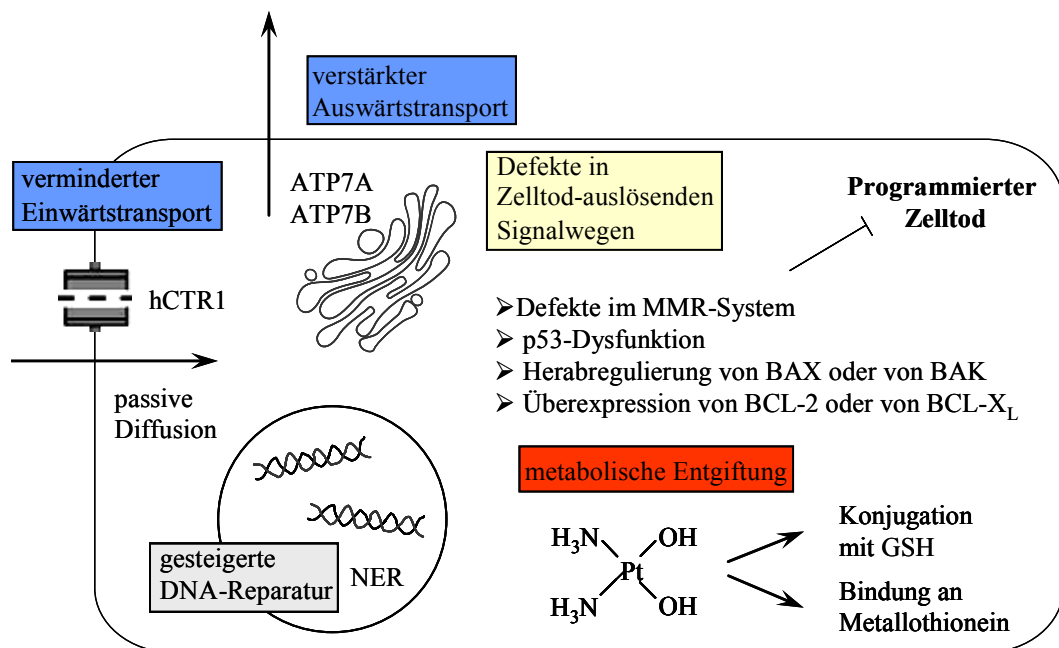


Abb. 3: Mögliche Resistenzmechanismen von CDDP. Eine Resistenz gegenüber CDDP ist multifaktoriell bedingt und kann Veränderungen in der Aufnahme oder dem Efflux der Substanz, eine intrazelluläre Detoxifikation durch GSH oder Metallothioneine, eine verminderte Platin-DNA-Adduktbildung, eine gesteigerte DNA-Reparatur, eine Toleranz des induzierten Schadens oder Defekte in den Zelltod-vermittelnden Signalwegen beinhalten.

## 1.2 Neue Platinverbindungen

### 1.2.1 Historischer Überblick

Die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Tumorerkrankungen gehört zu einer der wichtigsten Aufgaben in der medizinischen Forschung. Das Auftreten von Resistenzen und von UAW unter CDDP führt zu einer stetigen Entwicklung strukturanaloger CDDP-Derivate und strukturell neuer Platinverbindungen. Im Mittelpunkt der Forschungen steht die Synthese zytotoxischer Agenzien mit einer gesteigerten antitumoralen Wirkung, einem gegenüber CDDP verbesserten therapeutischen Wirkspektrum oder mit einer selektiven Aktivität in einzelnen Tumorentitäten. Zudem wird die Suche auf neue Platinstrukturen mit einem günstigen Nebenwirkungsprofil, einer oralen Bioverfügbarkeit oder der Ausnutzung eines alternativen Wirkmechanismus fokussiert. Die Überwindung der CDDP-Resistenz bleibt in den gegenwärtigen Programmen zur Entwicklung alternativer Behandlungsstrategien für CDDP-refraktäre Tumoren das unveränderte Hauptziel <sup>16, 58-60</sup>.

Eine Weiterentwicklung von CDDP führte zur Synthese von Carboplatin (*cis*-Diammin(cyclobutan-1,1-dicarboxylato)platin(II)) und von Oxaliplatin ((*cis*-1*R*,2*R*-Cyclohexandiamino)-oxalatplatin(II)), die zu den CDDP-Derivaten der zweiten und dritten Generation zählen und weltweit therapeutischen Einsatz finden. Weiterhin besitzen Nedaplatin (*cis*-Diamminglycolatoplatin(II)) in Japan und Lobaplatin (*cis*-[1*R*,2*R*-Bis(aminomethyl)cyclobutan]lactatoplatin(II)) in China klinische Akzeptanz <sup>59-64</sup>. Alle genannten Substanzen verfügen über ein milderes Toxizitätsprofil als CDDP, zeigen jedoch mit Ausnahme von Oxaliplatin, das beim metastasierten Kolonkarzinom eingesetzt wird, keine Aktivitäten in CDDP-resistenten Tumoren. Nahezu 40 Platinverbindungen erreichten bisher präklinische und klinische Studien, von denen annähernd die Hälfte aufgrund mangelnder antitumoraler Wirksamkeiten oder nicht vertretbarer UAW aufgegeben werden mussten. Die zunehmenden Kenntnisse über die multiplen Mechanismen einer CDDP-Resistenz führten in den letzten Jahren zur Synthese von multinuklearen, von Platin(IV)- und von aktiven *trans*-Platinverbindungen, die einen von der klassischen CDDP-Struktur abweichenden Aufbau zeigen. Diese Substanzen zeichnen sich durch ein verändertes DNA-Bindungsmuster und einer dadurch verbesserten Wirkung in CDDP-resistenten Tumoren aus. Des Weiteren wird durch eine Kopplung platinhaltiger Substanzen an biologisch aktive Träger eine gezielte Steigerung des Tumoransprechens angestrebt <sup>64-66</sup>.



Ein Überblick der bisher entwickelten Platinverbindungen wird in *Tab. 1* gezeigt. Im Anschluss werden einige ausgewählte Substanzen mit neuen Wirkmechanismen hinsichtlich ihres Wirkprofils und klinischen Status näher vorgestellt.

*(1A) CDDP-Analoga*

➤ CDDP	therapeutischer Einsatz bei verschiedenen soliden Neoplasien weltweit
➤ Nedaplatin (254S, CDGP)	therapeutischer Einsatz bei verschiedenen soliden Neoplasien in Japan, u. a. bei Ovarial-, Zervix-, Kopf-Hals- und klein- und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen
➤ Lipoplatin	Phase-III-Studien, u. a. bei Kopf-Hals- und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen
➤ Cycloplatom	Phase-II-Studien, u. a. bei Ovarial- und Prostatakarzinomen
➤ Heptaplatin (SKI2053R)	therapeutischer Einsatz bei fortgeschrittenen Magenkarzinomen in Korea, Phase-II-Studien bei Kopf-Hals-Karzinomen
➤ PAD	in Phase-I-Studien wegen fehlender Löslichkeit aufgegeben
➤ Platinuracilblau (PUB)	in Phase-I-Studien wegen kardiotoxischer Wirkung aufgegeben
➤ JM40	in Phase-I-Studien wegen nephrotoxischer Wirkung aufgegeben
➤ SPI077	Phase-II-Studien, u. a. bei Kopf-Hals-Karzinomen

*(1B) Carboplatin-Analoga*

➤ Carboplatin (JM8, CBDCA)	therapeutischer Einsatz bei verschiedenen soliden Neoplasien weltweit
➤ Lobaplatin (D19466)	therapeutischer Einsatz bei verschiedenen soliden Neoplasien in China, u. a. bei Mamma- und klein- und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen
➤ Enloplatin (CL287, 110)	in Phase-II-Studien wegen nephrotoxischer Wirkung aufgegeben
➤ Zeniplatin (CL286, 558)	in Phase-II-Studien wegen nephrotoxischer Wirkung aufgegeben
➤ Miboplatin (DWA2114R)	in Phase-III-Studien wegen fehlender Wirksamkeit aufgegeben
➤ NK121 (CI973)	in Phase-II-Studien wegen fehlender Wirksamkeit aufgegeben

*(1C) Diaminocyclohexan (DACH)-Verbindungen*

➤ Oxaliplatin (LOHP)	therapeutischer Einsatz bei fortgeschrittenen Kolonkarzinomen weltweit
➤ Aroplatin (LNDDP)	Phase-II-Studien, u. a. bei Kolonkarzinomen
➤ Spiroplatin (SPAC)	in Phase-II-Studien wegen nephrotoxischer Wirkung aufgegeben

➤ MBA	in Phase-I-Studien wegen allergenem Potential aufgegeben
➤ PYP	in Phase-I-Studien wegen nephrotoxischer Wirkung aufgegeben
➤ PHIC	in Phase-I-Studien wegen Syntheseproblemen aufgegeben
➤ JM82 (DACCP)	in Phase-II-Studien wegen Instabilität aufgegeben
➤ BOP (DACO)	in Phase-I-Studien wegen fehlender Löslichkeit aufgegeben
➤ JM20 (SHP, NeoSHP)	in Phase-I-Studien wegen allergenem Potential aufgegeben
➤ JM74 (PHM, NeoPHM)	in Phase-II-Studien wegen nephrotoxischer Wirkung aufgegeben

*(1D) Sterisch gehinderte Platinkomplexe*

➤ Picoplatin (AMD473, ZD0473, JM473, NX473)	Phase-III-Studien, u. a. bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen
---	--

*(1E) Platin(IV)-Verbindungen*

➤ Satraplatin (JM216, BMS182751, BMY45594)	Phase-III-Studien, u. a. bei refraktären Prostatakarzinomen
➤ JM118	präklinische Phase
➤ Ormaplatin (Tetraplatin, NSC36812)	in Phase-I-Studien wegen neurotoxischer Wirkung aufgegeben
➤ Iproplatin (JM9, CHIP)	in Phase-III-Studien wegen fehlender Wirksamkeit aufgegeben

*(1F) Aktive trans-Platinkomplexe*

➤ JM335	präklinische Phase
---------	--------------------

*(1G) Multinukleare Platinverbindungen*

➤ BBR3005	präklinische Phase
➤ BBR3464	Phase-II-Studien, u. a. bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen

*(1H) Platinverbindungen mit bioreaktiven Liganden*

➤ AP5280	Phase-I-Studien
➤ Bamet-H2	präklinische Phase
➤ Bamet-R2	präklinische Phase
➤ Bamet-D3	präklinische Phase
➤ Bamet-UD2	präklinische Phase

Tab. 1: Übersicht der bisher synthetisierten Platinverbindungen und ihr Entwicklungsstatus<sup>4, 59-61, 64, 67</sup>.

## 1.2.2 Vorstellung ausgewählter Platinsubstanzen

### *Picoplatin (AMD473, ZD0473, JM473, NX473)*

Picoplatin wurde von der Firma Astra Zeneca in Zusammenarbeit mit der AnorMed Incorporation entwickelt und stellt einen sterisch gehinderten Platinkomplex dar (*Abb. 4*). Die verbesserte Wirkung der Substanz im Vergleich mit CDDP beruht auf dem Austausch einer Ammingruppe der CDDP-Struktur durch einen methylsubstituierten Pyridinring, der eine intrazelluläre Detoxifikation durch GSH oder durch Metallothioneine infolge einer sterischen Abschirmung des Platinzentrums erschwert<sup>61, 68, 69</sup>. Der Einbau des Pyridinringes führte zudem zu einer Erhöhung der Lipophilie der Substanz und ermöglicht dadurch eine orale Applizierbarkeit. Picoplatin zeigte in präklinischen Studien eine dem CDDP vergleichbare zytotoxische Aktivität in murinen Plasmozytom- und Leukämie modellen sowie eine höhere Effizienz in humanen ovariellen Tumoxenograften<sup>61, 68</sup>. Die hohe antitumorale Wirkung der Substanz konnte ferner in verschiedenen soliden Tumoren im Rahmen von Phase-I/II-Studien bei Ovarial-, Prostata-, Blasen-, Zervix- und Mammakarzinomen und bei klein- und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen bestätigt werden<sup>64, 70</sup>. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird die Wirksamkeit von Picoplatin in einer Phase-III-Studie bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen untersucht<sup>66, 71</sup>.

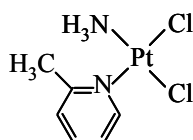


Abb. 4: *cis*-Amminodichloro(2-methylpyridin)platin(II) (Picoplatin).

### *Satraplatin (JM216, BMS182751, BMY45594)*

Satraplatin wurde ursprünglich von der Firma Bristol Myers Squibb entwickelt und im Oktober 2002 von GPC Biotech AG einlizensiert. Seit Dezember 2005 fungiert Spectrum Pharmaceuticals als Entwicklungs- und Lizenzpartner in den USA. Die oktaedrale Platin(IV)-Substanz zeichnet sich durch eine hohe Beständigkeit gegenüber hydrolytischen Prozessen und Ligandensubstitutionen aus, die eine orale Verfügbarkeit der Verbindung ermöglichen (*Abb. 5*)<sup>72, 73</sup>. In präklinischen Studien löste Satraplatin dem CDDP vergleich-

bare zytotoxische Effekte ohne ein Auftreten von Resistenzen aus. *In vivo* entsteht ein Metabolitengemisch aus mindestens sechs Komponenten, wobei der Platin(II)-Komplex JM118 als Hauptmetabolit charakterisiert wurde. Phase-II-Studien konnten die Wirkung von Satraplatin bei Ovarial-, Kolon-, Mamma-, Zervix-, Prostata- und kleinzelligen Bronchialkarzinomen belegen<sup>60, 61, 73</sup>. Die im Herbst 2006 veröffentlichten ersten Daten einer Phase-III-Studie der Substanz in Kombination mit Prednisolon beim hormonrefraktären Prostatakarzinom zeigten eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens der Patienten unter Satraplatin gegenüber einer alleinigen Prednisolongabe<sup>74, 75</sup>. Auf Grundlage dieser Daten beantragte das Unternehmen die beschleunigte Zulassung in den USA. Diese wurde im Juni 2008 zurückgezogen, da eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit durch Satraplatin nicht erreicht werden konnte. GPC Biotech AG überprüft derzeit die Pläne für eine weitere Entwicklung des Wirkstoffes<sup>76</sup>.

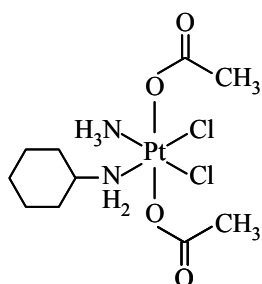


Abb. 5: *cis*-Diacetatoamminodichloro(cyclohexylamin)platin(IV) (Satraplatin).

### BBR3464

Die trinukleare, bifunktionelle Substanz BBR3464 stellt die erste klinisch relevante polynukleare Verbindung mit einer effizienten therapeutischen Aktivität dar. Sie besteht aus zwei monofunktionalen *trans*-Platineinheiten, die über eine aliphatische Platintetramineinheit überbrückt werden (Abb. 6). Der Wirkmechanismus von BBR3464 beruht auf einer beschleunigten DNA-Adduktbildung im Vergleich mit CDDP sowie auf einem veränderten DNA-Bindungsmuster durch Ausbildung langkettiger Intrastrang- und Interstrang-Quervernetzungen. Eine fehlende Erkennung der DNA-Interstrang-Quervernetzungen durch die Reparaturenzyme des NER wird als Hauptursache für die zytotoxische Wirkung der Substanz angesehen<sup>77</sup>. Die aliphatische Platintetramineinheit von BBR3464 trägt zudem zu einer verbesserten DNA-Bindung durch Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischer Wechselwirkungen bei<sup>78, 79</sup>.

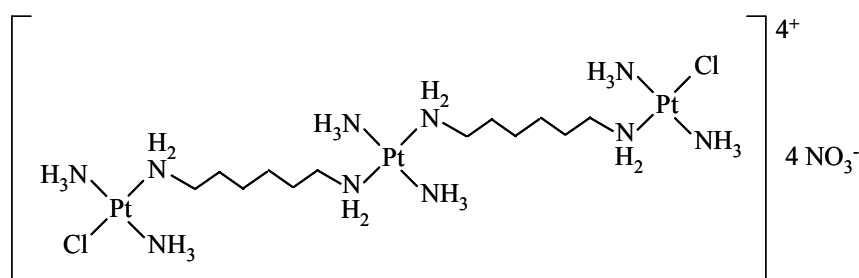


Abb. 6: *trans*-{Bis-[*trans*-diamminchloro- $\mu$ -(1,6-diaminohexan)platin(II)]}diamminplatin(II)nitrat (BBR3464).

BBR3464 zeigte in verschiedenen Tumorzelllinien eine höhere intrazelluläre Aufnahme als CDDP<sup>61, 78, 80</sup>. Neuere Studien belegten die Fähigkeit der Platinverbindung zur Überwindung einer CDDP-Resistenz durch Auslösung eines p53-unabhängigen Zelltodes<sup>64, 81</sup>. Das vielversprechende Potential von BBR3464 konnte in Phase-I/II-Studien bei Pankreas-, Ovarial- und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen und bei Melanomen nachgewiesen werden<sup>77</sup>. Phase-II-Studien bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Magenkarzinomen belegten demgegenüber keine Wirksamkeit von BBR3464 in diesen Tumorentitäten<sup>82, 83</sup>.

#### *Bamet-UD2*

Die neue Platinsubstanz Bamet-UD2 aus der Gruppe der Bamet-Verbindungen (Ba - *Bile acid*, met - *metal*) stellt ein Platin(II)-Derivat dar, das mit zwei Molekülen Ursodesoxycholsäure verknüpft ist (Abb. 7). Bamet-UD2 zeichnete sich im Tiermodell durch eine erhöhte Lebergängigkeit und eine verlängerte Verweildauer im Organismus unter einer Ausnutzung des Enterohepatischen Kreislaufes aus<sup>84</sup>. Eine Kopplung platinhaltiger Strukturen an biologisch aktive Träger erlangt in der onkologischen Forschung zunehmende Bedeutung. Die Nutzung organspezifischer Liganden verspricht ein effizientes Ansprechen des Tumorgewebes durch einen gezielten Transport der Substanz zum Wirkort. Dieses Prinzip des *Drug Targeting* resultiert in einer erhöhten Bioverfügbarkeit der Verbindung und in einer Reduktion der Dosis und der UAW. Bisher wurden u. a. Polymerkonjugate von Platin mit DNA-Interkalatoren, Estrogenderivaten, Porphyrinen und Gallensäuren entwickelt<sup>65, 85, 86</sup>. In präklinischen Studien wurden eine im Vergleich mit CDDP gesteigerte intrazelluläre Platinakkumulation von Bamet-UD2, eine verbesserte zytotoxische Wirkung und eine Überwindung der CDDP-Resistenz nachgewiesen. Das milde Nebenwirkungsprofil und die orale Applizierbarkeit erlauben weitere Untersuchungen der Verbindung<sup>84</sup>.

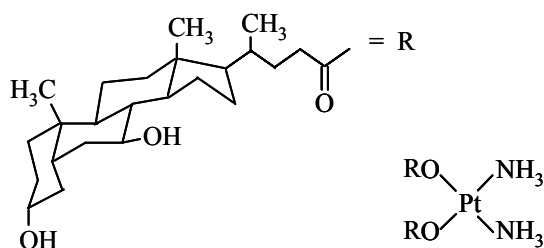


Abb. 7: *cis*-Diamminbis(ursodesoxycholato)platin(II) (Bamet-UD2).

*ChAPt-11 und Verbindungen vom cis-Dichloro(m-{n-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]Alkyl<sup>1</sup>}-Alkyl<sup>2</sup>-diamino)platin(II)-Typ (THP-1 bis THP-12)*

Mit dem ursprünglichen Ziel, eine *Drug Targeting*-orientierte Chemotherapie von Gallengangkarzinomen zu entwickeln, wurde von der Arbeitsgruppe Paschke et al. der Medizinisch-Pharmazeutischen Chemie der MLU Halle-Wittenberg die neue CDDP-Substanz ChAPt-11 (ChA - *Cholic Acid*, Pt - Platin) synthetisiert<sup>87-89</sup>. ChAPt-11 zeigt im chemischen Aufbau eine CDDP-Grundstruktur, die über eine 13-Amino-12-(aminomethyl)tridecyl-Alkylkette mit einer Cholsäure verknüpft ist (Abb. 8). Neben einer hohen zytotoxischen Aktivität der Substanz in einer humanen Cholangiokarzinomzelllinie und in einer humanen Kopf-Hals-Karzinomzelllinie konnten überraschend hohe Wirksamkeiten von ChAPt-11 in der humanen CDDP-sensitiven TKZT-Zelllinie H12.1 und der humanen CDDP-resistenten TKZT-Zelllinie 1411HP nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte die Verbindung die Fähigkeit zur Überwindung der intrinsischen CDDP-Resistenz der Zelllinie 1411HP<sup>87, 89</sup>.

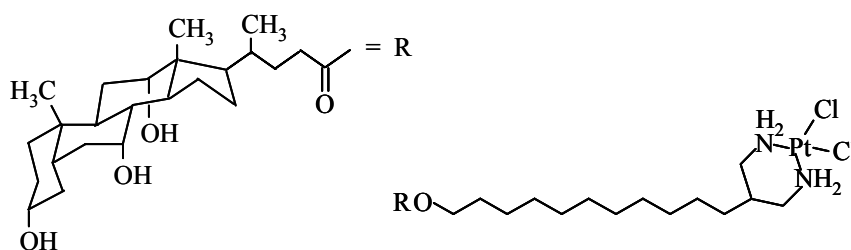
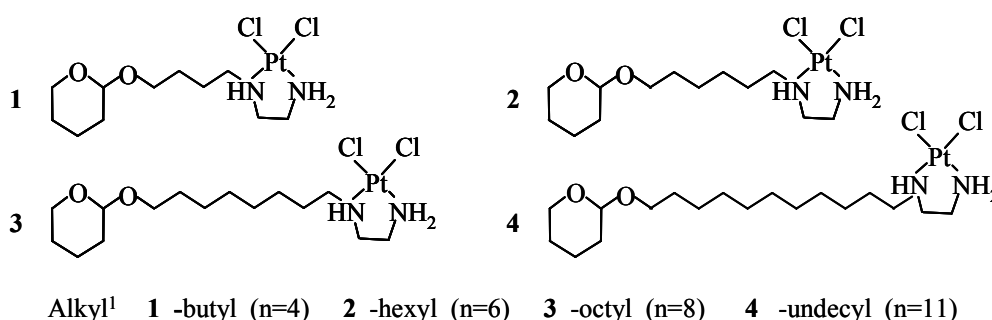


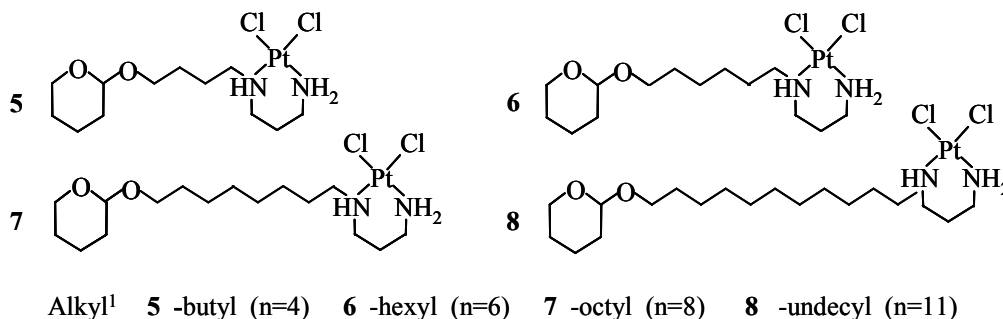
Abb. 8: *cis*-Dichloro[13-amino-12-(aminomethyl)tridecylcholato]platin(II) (ChAPt-11).

Die Synthesevorstufe *cis*-Dichloro(2-{11-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]undecyl}propan-1,3-diamino)platin(II) (THP-12) und strukturverwandte *cis*-Dichloro(*m*-{*n*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]Alkyl<sup>1</sup>}Alkyl<sup>2</sup>-diamino)platin(II)-Verbindungen (THP-1 bis THP-11)<sup>88-90</sup> riefen im gleichen Tumormodell in ersten *In-vitro*-Analysen dem ChAPt-11 vergleichbare zytotoxische Wirkungen hervor. Hierbei wurde THP-12 als das CDDP-Derivat mit dem höchsten zytotoxischen Potential und analog zu ChAPt-11 mit der Fähigkeit zur Überwindung der CDDP-Resistenz der TKZT-Zelllinie 1411HP identifiziert (Abb. 9)<sup>91</sup>.

***cis*-Dichloro(N<sup>1</sup>-{*n*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]Alkyl<sup>1</sup>}ethan-1,2-diamino)platin(II)**



***cis*-Dichloro(N<sup>1</sup>-{*n*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]Alkyl<sup>1</sup>}propan-1,3-diamino)platin(II)**



***cis*-Dichloro(2-{*n*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]Alkyl<sup>1</sup>}propan-1,3-diamino)platin(II)**

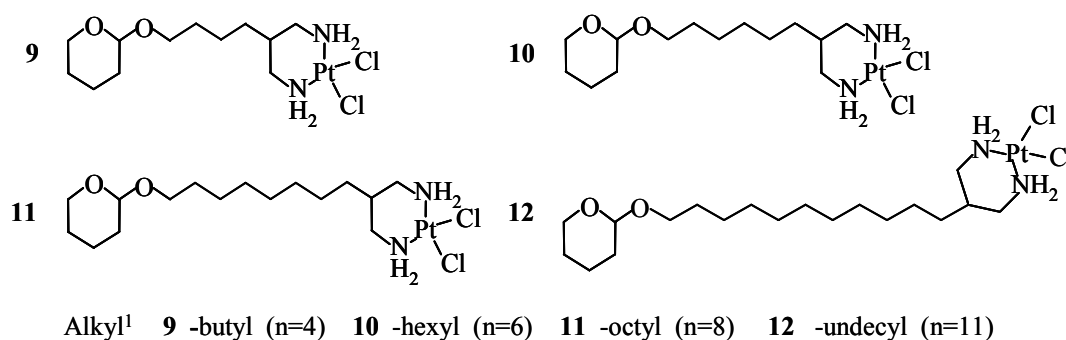


Abb. 9: *cis*-Dichloro(*m*-{*n*-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]Alkyl<sup>1</sup>}Alkyl<sup>2</sup>-diamino)platin(II)-Verbindungen (THP-1 bis THP-12); Alkyl<sup>1</sup> -butyl/-hexyl/-octyl/-undecyl; Alkyl<sup>2</sup> -ethan/-propan.

### 1.3 Programmierter Zelltod (Apoptose)

#### 1.3.1 Kennzeichen der Apoptose

Die Apoptose stellt eine Form des programmierten Zelltodes (*Programmed Cell Death*, PCD) dar und beschreibt den Vorgang eines natürlichen Absterbens von Zellen. Dieser genetisch kontrollierte Prozess dient der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen proliferierenden und sterbenden Zellen und befähigt höhere Organismen, gealterte oder durch z. B. Zytostatika, Strahlen oder Mutagene geschädigte Zellen gezielt zu eliminieren. Apoptose ist sowohl für die Entwicklung während der Embryogenese als auch für die Beibehaltung der Gewebshomöostase im Erwachsenenalter unverzichtbar<sup>92</sup>. Fehlregulationen der Apoptose werden eine Beteiligung an der Pathogenese von AIDS, Alzheimer, Parkinson, Diabetes mellitus und von verschiedenen Autoimmunerkrankungen zugesprochen. Zudem trägt eine ineffiziente Apoptose durch eine unvollständige Eliminierung geschädigter Zellen wesentlich zur Entstehung einer Tumorerkrankung bei<sup>93, 94</sup>.

Im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod, der als pathologischer, passiver und unregelmäßiger Prozess infolge einer mechanischen Verletzung oder aufgrund eines Toxin-, Hypoxie- oder eines Hyperthermie-bedingten irreparablen Schadens eingeleitet wird, erfolgt die Apoptose als eine physiologische und aktive Form des Zelltodes (*Abb. 10*). Morphologisch kommt es zu einer Schrumpfung der Zellen mit einem Verlust ihrer spezifischen Zell-Zell-Kontakte und zu Ausstülpungen der Zytoplasmamembran unter Beibehaltung ihrer Integrität und der Integrität der Organellenstrukturen. Apoptose zeichnet sich darüber hinaus durch eine Aggregation der Zytoskelettfilamente, eine Kondensation des Chromatins und eine Fragmentierung des Zellkerns aus. Die Einwirkung nichtlysosomaler Endonukleasen, u. a. der *Caspase Activated DNase* (CAD), resultiert in einer internukleosomalen Spaltung des Chromatins und der Entstehung von DNA-Bruchstücken mit einer Größe von ca. 200 Basenpaaren oder einem Vielfachen, die in der Gelelektrophorese das charakteristische Bild einer DNA-Leiterstruktur ergeben. In der Endphase der Apoptose werden membranumschlossene apoptotische Vesikel gebildet, die sogenannten *apoptotic bodies*, die im Gewebe von phagozytierenden Zellen aufgenommen und eliminiert werden<sup>95-97</sup>.

Der Ablauf einer Apoptose kann in drei Stadien eingeteilt werden. In der Induktionsphase lösen verschiedene Zelltod-vermittelnde Signale eine Aktivierung des apoptotischen Programms aus. Während der Exekutionsphase wird das Todessignal ausgeführt und die Zellen degradiert. Die Endphase der Apoptose dient einer Beseitigung der verbliebenen Zellreste<sup>98</sup>.



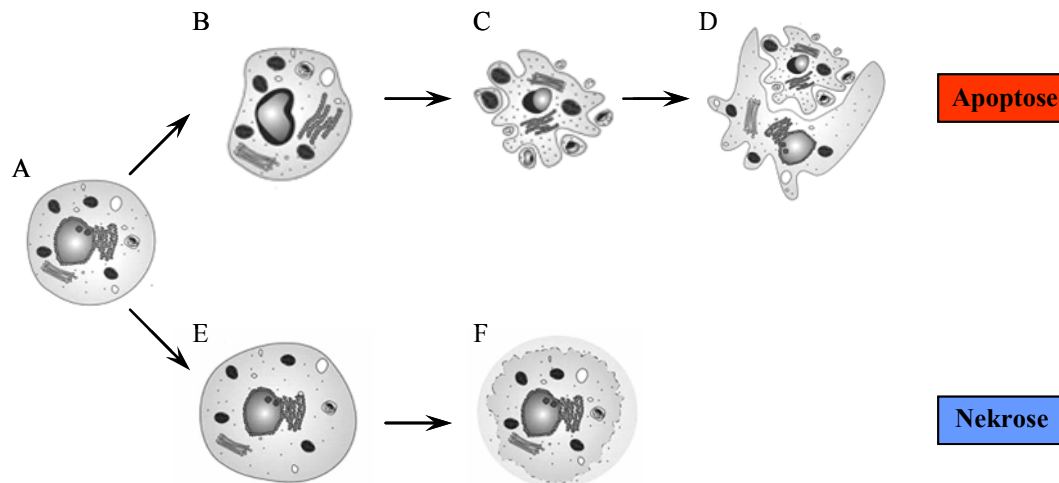


Abb. 10: Morphologische Veränderungen einer Zelle durch eine Induktion von Apoptose oder von Nekrose. Apoptose: A normale Zelle, B Schrumpfung der Zelle und Kondensation des Chromatins, C Bildung von *apoptotic bodies* und Fragmentierung des Chromatins, D Phagozytose durch Makrophagen und durch Nachbarzellen. Nekrose: E Anschwellen der Zellen und Schädigung der Organellen, F Zellyse.

### 1.3.2 Rolle der Caspasen

Das Auftreten einer irreparablen zellulären Schädigung führt über verschiedene Stimuli zur Aktivierung eines zentralen Bestandteiles des Apoptosemechanismus, des proteolytischen Systems der *Cysteinyll aspartate specific proteases* (Caspasen). Caspasen gehören zur Familie der Aspartat-spezifischen Cysteinproteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Peptidbindungen von Proteinen C-terminal der Aminosäure Aspartat spalten. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnten 14 Caspasen identifiziert werden, die funktionell und entsprechend der Homologie ihrer Aminosäuresequenzen in zwei Gruppen eingeteilt werden<sup>99, 100</sup>. Die Caspasen 1, 4, 5, 11, 12, 13 und 14 gehören zur Gruppe der inflammatorischen Caspasen und sind an der Prozessierung entzündungsfördernder Zytokine beteiligt. Die Caspasen 2, 3, 6, 7, 8, 9 und 10 übernehmen wichtige Funktionen in der Regulierung und der Ausführung der Apoptose und werden aufgrund ihrer Variation in der Größe und der Aminosäuresequenz der N-terminalen Prodomäne in Initiatorcaspasen und in Effektorcaspasen unterschieden. Die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10 verfügen über lange Prodomänen (> 90 Aminosäuren), während die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 kurze Prodomänen zeigen (20 bis 30 Aminosäuren). Zusätzlich weisen die Initiatorcaspasen spezifische Oligomerisierungsdomänen innerhalb ihrer Prodomänen auf, wie die *Death Effector Domain* (DED) der Caspasen 8 und 10 und die *Caspase Recruitment Domain* (CARD) der Caspasen 2 und 9<sup>101, 102</sup>. Der Caspase 2 wird neben ihrer Einstufung als Initiatorcaspase eine Funktion als

Effektorcaspase in der Apoptose zugesprochen<sup>103, 104</sup>. Für Caspase 12, die aufgrund von Sequenzhomologien den inflammatorischen Caspasen zuzuordnen ist, wird zudem eine Rolle als Initiatorcaspase in der stressinduzierten, über das Endoplasmatische Retikulum (ER) ausgelösten Apoptose diskutiert<sup>105, 106</sup>.

Caspasen werden als inaktive Vorstufen (Procaspasen, Zymogene) im Zytoplasma der Zellen synthetisiert und sind aus einer regulatorischen Prodomäne, einer großen Untereinheit (ca. 20 kDa) und einer kleinen Untereinheit (ca. 10 kDa) aufgebaut. Die Aktivierung der Caspasen erfolgt durch eine proteolytische Separierung der kleinen von der großen Untereinheit und der nachfolgenden Abspaltung der Prodomäne. Zur Bildung der aktiven Form lagern sich je zwei kleine und zwei große Untereinheiten zu einem Heterotetramerkomplex zusammen<sup>102, 107</sup>. Jüngere Daten belegen, dass die Procaspasen der Initiatorcaspasen als Monomere vorliegen und ihre Aktivierung über eine Formierung von Multikomponentenkomplexen unter Beteiligung spezifischer Adaptermoleküle initiiert wird. So werden für die Caspasen 8 und 10 die Bildung des *Death-Inducing Signal Complex* (DISC), für Caspase 9 die Bildung des Apoptosoms und für Caspase 2 die Bildung des *p53 Inducible Protein with a Death Domain* (PIDDosom) als Aktivierungsplattformen beschrieben, an denen die Procaspasen durch Dimerisierung aktiviert werden. Während eine Spaltung der Effektorcaspasen für ihre katalytische Aktivität zwingend erforderlich ist, scheint sie im Falle der Initiatorcaspasen vielmehr für ihre Stabilität verantwortlich zu sein<sup>104, 108-110</sup>.

Eine Aktivierung der Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10 führt zu einer kaskadenartigen Aktivierung und einer proteolytischen Spaltung der nachgeschalteten Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Diese können sowohl in einer positiven Rückkoppelung erneut die Initiatorcaspasen aktivieren als auch verschiedene strukturelle und regulatorische Proteine des Zellkerns, des Zytoplasmas und des Zytoskelettes degradieren und die charakteristischen morphologischen Kennzeichen der Apoptose auslösen. So werden die DNA-Reparaturenzyme *Poly(ADP-Ribose)-Polymerase* (PARP) durch die Caspasen 3 und 7 und die *DNA-dependent Protein Kinase* (DNA-PK) durch Caspase 3 gespalten<sup>111-113</sup>. PARP katalysiert nach einer vorangegangenen DNA-Schädigung unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+$  die Synthese und die Übertragung von ADP-Ribose-Polymeren auf nukleäre Proteine und sich selbst. Eine exzessive Aktivitätssteigerung von PARP kann über einen Verbrauch von  $\text{NAD}^+$  und ATP die Einleitung nekrotischer Prozesse bedingen. Eine Degradierung von PARP stellt somit ein zentrales Ereignis innerhalb der Apoptose zur Gewährleistung ihres Ablaufes dar, wenn der DNA-Schaden nicht reparabel ist<sup>111, 114</sup>. Caspase 3 prozessiert ferner den *Inhibitor of CAD* (ICAD), wodurch die Endonuklease CAD freigesetzt wird und nach einer Translokation in den

Zellkern die charakteristische Fragmentierung der genomischen DNA hervorruft<sup>107, 115</sup>. Der durch Caspase 6 vermittelte Abbau von Lamin A, des Hauptstrukturproteins der Kernhülle, bewirkt eine Kondensation des Chromatins und eine Schrumpfung des Zellkerns<sup>113</sup>. Eine Spaltung der Zytoskelettproteine Fodrin und Aktin durch Caspase 3 führt zur Bildung der *apoptotic bodies*<sup>113</sup>. Die Effektorcaspasen-getriggerte zelluläre Proteolyse und die Degradierung der DNA resultieren letztlich in einem irreversiblen Übergang der Zellen in die Endphase der Apoptose.

### 1.3.3 Mechanismen der apoptotischen Signaltransduktion

Die Weiterleitung eines initialen, proapoptotischen Reizes erfolgt durch eine Aktivierung von verschiedenen Signalwegen, die einer Kontrolle proapoptotischer und antiapoptotischer Regulationsfaktoren unterliegen. Die unterschiedlich initiierten Signalwege konvergieren und münden über eine Aktivierung der Effektorcaspasen in einer Exekution der Apoptose und in einer Degradierung der Zellen.

#### *Extrinsischer, Todesrezeptor-vermittelter Apoptosesignalweg*

Eine Induktion von Apoptose über sogenannte Todesrezeptoren wird als extrinsischer Apoptosesignalweg bezeichnet. Hierbei wird ein extrazelluläres Signal über die Anbindung eines Liganden an einen Todesrezeptor, wie z. B. des Tumornekrosefaktors (TNF) an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) oder des Fas-Liganden (FasL) an den Fas/CD95/APO-1-Rezeptor (FasR), in die Zelle weitergeleitet<sup>115-117</sup>. Durch Kopplung dreier Liganden in Form eines Trimers an drei Rezeptormoleküle werden über hochkonservierte Bindungsstellen des Rezeptors spezifische Adapterproteine rekrutiert. Zu diesen zählen *TNFR-Associated Protein with a Death Domain* (TRADD), *Fas-Associated Protein with a Death Domain* (FADD) und *RIP-Associated Protein with a Death Domain* (RAIDD). Eine Anbindung der DED bzw. der CARD der zytosolischen Procaspasen 2, 8 und 10 an die Adapterproteine resultiert in einer Bildung der hochmolekularen Signalkomplexe DISC bzw. PIDDosom und in einer kaskadenartigen autokatalytischen Aktivierung der Caspasen 2, 8 und 10<sup>102, 104, 115</sup>. Während in Typ-I-Zellen eine drastische DISC-Formierung und eine Caspase 8-Aktivierung erfolgt, die eine direkte Aktivierung der Effektorcaspase 3 nach sich zieht, wird in Typ-II-Zellen eine eher gemäßigte Aktivierung der Caspase 8 induziert. Eine Verstärkung des apoptotischen Signals wird in diesen Zellen über eine Caspase 8-induzierte Spaltung des *BCL-2 Interacting Domain Death Agonist* (BID) in *truncated-BID* (t-BID) realisiert, die eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges einleitet und indirekt zu einer Aktivierung

von Caspase 3 führt. Caspase 3 prozessiert im Folgenden die Caspasen 2 und 6. Caspase 6 kann eine erneute Stimulierung der Caspasen 8 und 10 vermitteln. Eine Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 leitet schließlich unumkehrbar den apoptotischen Zelltod ein (*Abb. 11 siehe S. 23*)<sup>101, 115, 118</sup>.

#### *Intrinsischer, mitochondrial-vermittelter Apoptosesignalweg*

Die Mitochondrien übernehmen durch die Synthese von ATP und einer Aufrechterhaltung der Calcium-, ROS- und pH-Homöostase wesentliche Aufgaben zur Beibehaltung der vitalen zellulären Lebensfunktionen. Des Weiteren kommt ihnen eine essenzielle regulatorische Bedeutung im intrinsischen Apoptosesignalweg über eine Weiterleitung der proapoptotischen Signale oder über eine Verstärkung der Signale des extrinsischen Apoptoseweges zu. Der intrinsische, mitochondrial-vermittelte Apoptoseweg wird als klassischer Weg nach einer Chemotherapie, einer Bestrahlung, einer DNA-Schädigung oder nach zellulärem Stress eingeleitet<sup>102, 115, 116</sup>. Über einen komplexen und bisher noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus kommt es zur Öffnung einer mitochondrialen *Permeability Transition Pore* (PTP) und zu einer Freisetzung verschiedener proapoptotischer Moleküle aus dem Inter-membranraum zwischen der äußeren und der inneren mitochondrialen Membran in das Zytosol<sup>119-123</sup>. Eine mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c, das als ein Elektronenüberträger zwischen dem Komplex III und dem Komplex IV der Atmungskette fungiert, stellt ein Schlüsselereignis im mitochondrial-vermittelten Apoptoseweg dar. Die Anbindung von Cytochrom c an *Apoptotic Protease Activating Factor-1* (APAF-1) führt in Gegenwart von d-ATP zu einer Heptamerisierung von APAF-1 und zur Rekrutierung der Procaspase 9. Durch Formierung des Multiproteinkomplexes des Apoptosoms wird Caspase 9 aktiviert. Aktivierte Caspase 9 induziert die Prozessierung der Effektorcaspasen 3 und 7. Caspase 3 aktiviert sowohl die Caspasen 2 und 6 als auch erneut Caspase 9. Durch Degeneration und Spaltung zellulärer Strukturen werden schließlich die finalen Schritte des apoptotischen Programms realisiert (*Abb. 11 siehe S. 23*)<sup>101, 115, 124</sup>.

Neben Cytochrom c werden die Proteine *Apoptosis Inducing Factor* (AIF), *Endonuclease G* (ENDO G), *OMI/High Temperature Requirement A2* (OMI/HTRA2) und *human Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/murine Direct IAP Binding Protein with low pI* (SMAC/DIABLO) aus den Mitochondrien freigesetzt, die pleiotrope Effekte hervorrufen und die apoptotische Kaskade vorantreiben. So können SMAC/DIABLO und OMI/HTRA2 die Inhibitoren der Caspasen (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*, IAP) binden, wohingegen AIF und ENDO G zu einer zusätzlichen DNA-Fragmentierung führen<sup>121-123, 125-129</sup>. Die Freisetzung

dieser mitochondrialen Proteine wird durch die Proteine der BCL-2-Familie kontrolliert. Ihre Mitglieder unterscheiden sich im Besitz verschiedener *BCL-2 Homology* (BH)-Domänen und werden in die proapoptotischen *BH3-only*-Proteine (z. B. BID) und die *BH1-BH3*-Proteine (z. B. BAX, BAK) sowie die antiapoptotischen *BH1-BH4*-Proteine (z. B. BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>) eingeteilt<sup>120, 130</sup>. Das Expressionslevel und der Aktivierungszustand der BCL-2-Mitglieder beeinflusst entscheidend die Initiierung und den Ablauf einer Apoptose. Für BAX und BAK wurde neben einer Öffnung der mitochondrialen PTP eine direkte Permeabilisierung der Mitochondrienmembran beschrieben. Ferner können BCL-2 und BCL-X<sub>L</sub> eine Aktivierung von BAX oder von BAK direkt durch eine Bindung verhindern oder über eine Assoziation mit den *BH3-only*-Proteinen indirekt zu einer Unterbindung der proapoptotischen Signalübertragung führen<sup>123, 131-133</sup>.

Die auslösenden Signale für die Öffnung einer mitochondrialen PTP und für eine Freisetzung der proapoptotischen Faktoren sind noch nicht gänzlich erforscht. Das *VDAC-Opening*-Modell postuliert die Formierung eines intramembranären Kanals zwischen der Matrix der Mitochondrien und dem Zytosol, der aus dem *Voltage-Dependent Anion Channel* (VDAC) in der äußeren mitochondrialen Membran, dem *Adenine Nucleotide Translocator* (ANT) in der inneren mitochondrialen Membran, dem mitochondrialen Benzodiazepin-Rezeptor und dem mitochondrialen Matrixprotein Cyclophilin D gebildet wird<sup>134, 135</sup>. Die Anbindung eines Apoptose-induzierenden Agens oder von BAX an VDAC resultiert in einer permanenten Öffnung der mitochondrialen PTP und in einem irreversiblen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ), wodurch ein ungehindertes Eindringen von Wasser und von gelösten Stoffen mit einer molekularen Masse < 1,5 kDa ermöglicht wird. Die Volumenzunahme der Matrix führt zu einer starken Ausdehnung der inneren mitochondrialen Membran, in deren Folge die äußere mitochondriale Membran aufreißt. Calcium, ROS, Ceramiden, BAX und BAK werden Beteiligungen an einer Öffnung der mitochondrialen PTP zugesprochen, während Calciumchelatbildner, Antioxidantien, PTP-hemmende Substanzen, wie Cyclosporin A und Bongkrekensäure, und BCL-2 und BCL-X<sub>L</sub> zu einer Schließung der mitochondrialen PTP beitragen. Das *Conducting Channel*-Modell diskutiert eine Bildung von Kanälen in der äußeren mitochondrialen Membran, die durch den Einbau von oligomertem BAX oder BAK hervorgerufen werden. Eine Bildung dieser Kanäle kann durch BCL-2 gehemmt werden. Darüber hinaus wurde eine Formierung von BAX/BID-Lipidporen oder von BAX-VDAC-Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran beschrieben<sup>119, 132-137</sup>.

*Intrinsischer, ER-vermittelter Apoptosesignalweg*

Neben dem extrinsischen, Rezeptor-vermittelten Apoptosesignalweg und einer intrinsischen, mitochondrial-initiierten Apoptoseauslösung wurde in jüngeren Untersuchungen auch eine stressinduzierte, über das ER vermittelte Apoptoseinduktion beschrieben<sup>115, 138, 139</sup>. Das ER übernimmt wichtige Aufgaben in der Biosynthese, der Faltung und dem Transport von Proteinen. Zudem fungiert das ER als intrazellulärer Calciumspeicher, womit ihm wie den Mitochondrien eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion zukommt<sup>140, 141</sup>. Zunehmender ER-Stress infolge eines veränderten Calciummetabolismus, einer Akkumulation ungefalteter oder missgefalteter Proteine oder infolge von oxidativem Stress führt zu einer zytosolischen Freisetzung von Calcium, das zu einer Bewahrung der zellulären Calcium-Homöostase durch benachbarte Mitochondrien aufgenommen werden kann<sup>141-143</sup>. Die Freisetzung von Calcium aus den ER-Speichern wird durch die proapoptotischen und die antiapoptotischen Proteine der BCL-2-Familie reguliert<sup>132, 138</sup>. Eine Überlastung der mitochondrialen Aufnahmekapazitäten infolge einer exzessiven zytoplasmatischen Calciummobilisierung kann eine direkte Öffnung der mitochondrialen PTP hervorrufen, die in einer Depolarisierung von  $\Delta\Psi_m$  und in einer Freisetzung von proapoptotischen Faktoren resultiert<sup>141, 144</sup>. Freie Calciumionen können darüber hinaus die Aktivierung verschiedener Calcium-abhängiger Proteasen, Phospholipasen und Nukleasen bewirken<sup>141, 145, 146</sup>. So kann eine Stimulation der Cysteinproteasenfamilie der *Calcium-activated neutral proteases* (Calpaine) durch Calcium hervorgerufen werden, zu deren zellulären Targets die Procaspasen 3 und 7, die Zytoskelettproteine Fodrin und Aktin sowie BAX, BID, BCL-2 und BCL-X<sub>L</sub> zählen<sup>141, 147-149</sup>. Daneben können Calpaine zu einer Aktivierung der ER-membrangebundenen Caspase 12 führen, die eine Prozessierung der Caspase 9 unabhängig von einer mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom c sowie eine nachfolgende Aktivierung der Effektorcaspase 3 veranlassen kann<sup>150</sup>. Neben einer Calpain-getriggerten Aktivierung der Caspase 12 konnte ferner eine Spaltung der Caspase durch Caspase 7 nachgewiesen werden<sup>100, 139</sup>. Die Bedeutung der menschlichen Caspase 12 wird allerdings noch kontrovers diskutiert, da in humanen Zellen im Gegensatz zu murinen Zellen häufig eine mutierte Form des Proteins exprimiert wird (*Abb. 11 siehe S. 23*)<sup>105, 138, 139, 151</sup>.

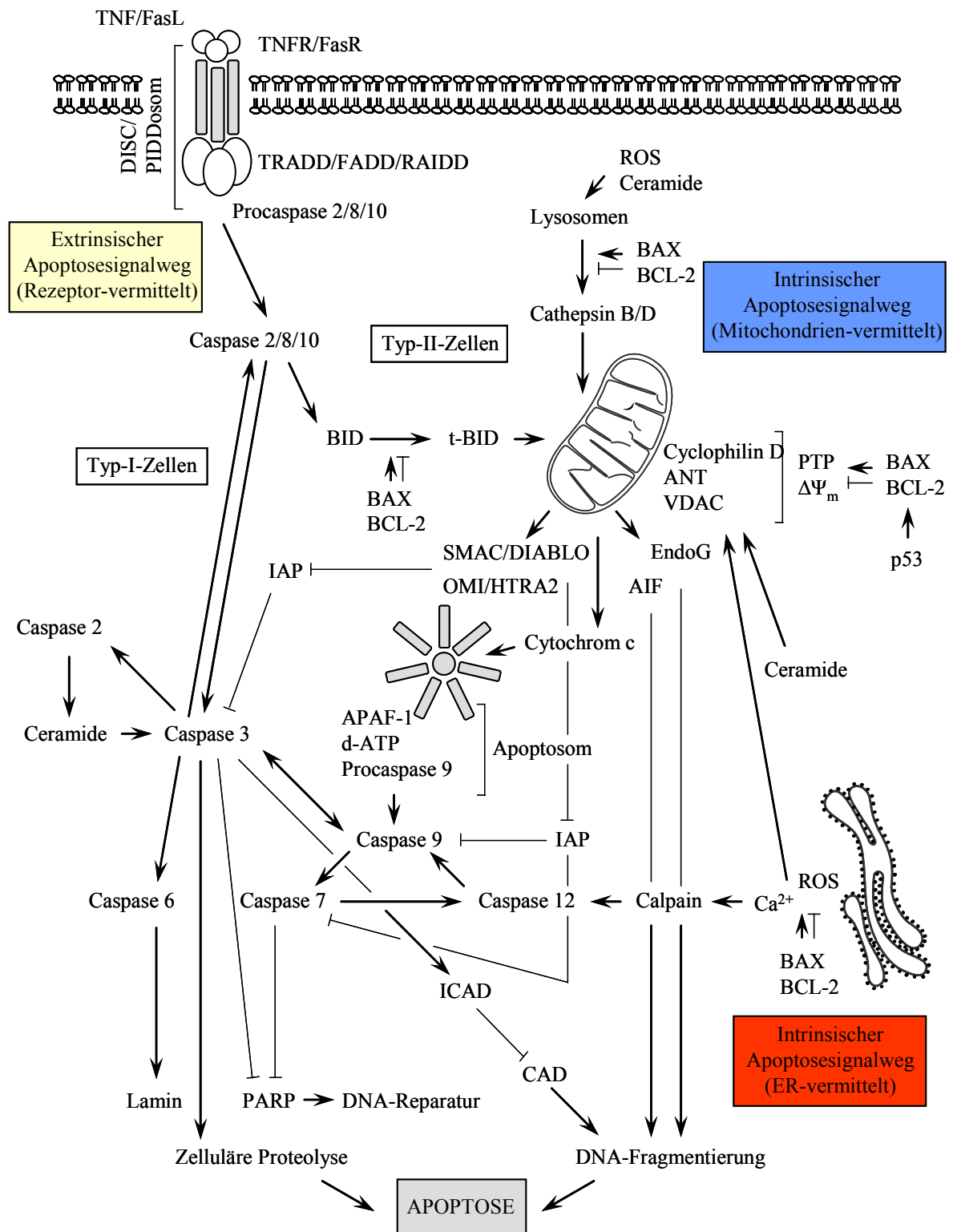


Abb. 11: Signalkaskaden zur Initiierung von Apoptose. Dargestellt sind der extrinsische, Rezeptor-vermittelte Apoptosesignalweg, der intrinsische, mitochondrial-vermittelte Apoptosesignalweg und der intrinsische, ER-vermittelte Apoptosesignalweg.

*Caspasen-unabhängiger PCD*

Zusätzlich zu einer klassisch verlaufenden Apoptose wurden in den letzten Jahren verschiedene alternative Formen des PCD charakterisiert, die ebenfalls einem aktiven, genetisch kontrollierten Prozess unterliegen und „Apoptose-ähnliche“ Kennzeichen einer Chromatinkondensation, einer zytoplasmatischen Vakuolisierung und einer mitochondrialen Membranpermeabilisierung zeigen. Zu ihnen werden die Autophagie, die Paraptosis, die mitotische Katastrophe und der „Apoptose-ähnliche“ Zelltod gezählt, die alle Caspasen-unabhängig durch Beteiligung anderer zellulärer Proteasen vermittelt werden<sup>152-157</sup>. Eine Aktivierung der Caspasen ist somit nicht in jedem Fall für den Ablauf einer Apoptose notwendig. Viele Stimuli können einen „Apoptose-ähnlichen“ Zelltod durch zelluläre Schädigungen herbeiführen, der nicht über eine Hemmung der Caspasenaktivitäten aufgehalten werden kann. Mitochondrien, Lysosomen und dem ER werden zentrale Rollen innerhalb eines Caspasen-unabhängig vermittelten PCD zugesprochen<sup>143, 153, 158, 159</sup>. Ferner kommen freien Calciumionen, Ceramiden und ROS Schlüsselfunktionen als initiale Signalmoleküle zu, die direkt durch einen Angriff an der mitochondrialen PTP oder indirekt über eine Aktivierung verschiedener, bislang nicht eindeutig identifizierter zellulärer Targets Caspasen-unabhängigen Zelltod initiieren können<sup>141, 146, 160</sup>. ROS werden physiologisch als Nebenprodukte des oxidativen Metabolismus durch die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette und die Cytochrom-P450-Monooxygenasen des ER generiert<sup>137, 161, 162</sup>. Oxidativ getriggert Stress kann eine mitochondriale Bildung von Superoxidanionradikalen initiieren, die zu Wasserstoffperoxid und hochreaktiven Hydroxylradikalanionen oder zu Peroxynitriten umgesetzt werden. Diese können eine Schädigung der Nukleinsäuren und der Proteine hervorrufen sowie über eine Lipidperoxidation ungesättigter Fettsäuregruppen reaktive Lipidradikale und Lipidhydroperoxide bilden und eine progressive Destabilisierung der Zellorganellen und der Plasmamembranen auslösen<sup>47, 161, 163-165</sup>. Um einer schädigenden Wirkung von ROS zu entgehen, verfügen Zellen über unspezifische antioxidative Schutzmechanismen, wie Vitamine und GSH, und über spezifische ROS-abbauende Enzyme<sup>47, 137</sup>. Im Zusammenhang mit einem Caspasen-unabhängig ausgelösten PCD ist weiterhin bekannt, dass nach einer Öffnung der mitochondrialen PTP die Endonukleasen AIF und ENDO G freigesetzt werden können, die nach einer Translokation in den Zellkern eine Bildung hochmolekularer DNA-Fragmente unabhängig von der durch Caspase 3 aktivierten DNase CAD bewirken<sup>121, 133, 166, 167</sup>. Ferner wurde eine durch DNA-Schädigung induzierte Aktivierung von PARP, verbunden mit einer nachfolgenden Freisetzung von AIF und einer



Auslösung Caspasen-unabhängiger Zelltodprozesse, beschrieben<sup>168, 169</sup>. Die ebenfalls mitochondrial entlassene Serinprotease OMI/HTRA2, deren Expression durch ER-Stress induziert werden kann, löst neben einer Aktivierung Caspasen-abhängiger Ereignisse durch eine Spaltung der IAP auch einen Caspasen-unabhängigen Zelltod über eine Modellierung bisher noch unbekannter Substrate aus<sup>123, 133, 166</sup>. Darüber hinaus wird der lysosomalen Proteasenfamilie der Cathepsine eine Beteiligung in einem Caspasen-unabhängigen PCD zugesprochen<sup>153, 157</sup>. Lysosomen, die aufgrund ihrer hydrolytischen Enzyme unter physiologischen Bedingungen zelleigene Proteine oder Fremdpartikel degradieren, können infolge einer selektiven Permeabilisierung ihrer Membranen einen „Apoptose-ähnlichen“ Zelltod induzieren. So wurde gezeigt, dass eine lysosomale Akkumulation von Ceramiden oder eine Produktion von ROS zu einer Freisetzung der Cathepsine B und D führen, die einen Caspasen-unabhängigen Zelltod durch Triggerung einer mitochondrialen Dysfunktion und durch eine Freisetzung proapoptotischer Proteine auslösen<sup>153, 170, 171</sup>. Eine Kontrolle des lysosomalen Efflux der Cathepsine durch die Mitglieder der BCL-2-Familie wurde nachgewiesen (Abb. 12)<sup>159</sup>.

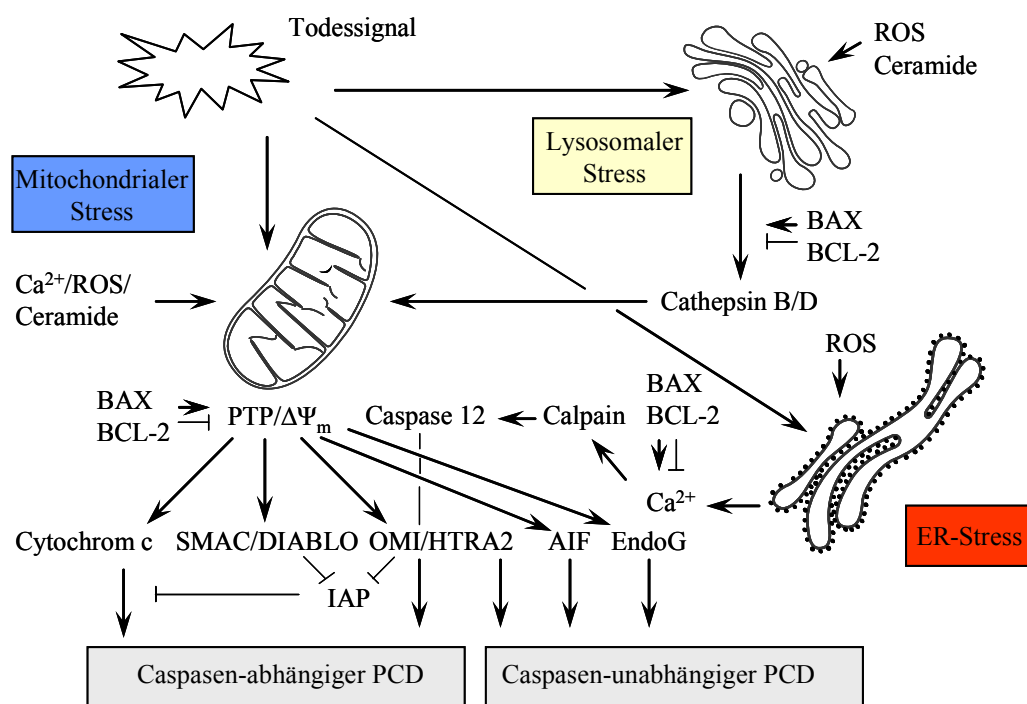


Abb. 12: Caspasen-abhängiger PCD und Caspasen-unabhängiger PCD.

### 1.3.4 CDDP-induzierte Apoptose

Aus zahlreichen Literaturdaten ist bekannt, dass die Auslösung eines apoptotischen Zelltodes ein zentrales Schlüsselereignis der CDDP-vermittelten Zytotoxizität darstellt. Die Initiierung von Apoptose durch CDDP wurde in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen<sup>18, 23, 24, 26, 29</sup>. Proapoptotische Signale können hierbei sowohl im Zellkern als auch in den Zellorganellen, wie z. B. in Mitochondrien, im ER und in Lysosomen, entstehen. Eine Induktion von Intrastrang- und Interstrang-Quervernetzungen der DNA wird als eine wesentliche Ursache der Apoptoseinitiierung durch CDDP angesehen<sup>23</sup>. Innerhalb der zellulären Antwort auf einen CDDP-gesetzten DNA-Schaden kommt dem humanen Tumorsuppressorprotein p53 eine Bedeutung zu<sup>17, 28</sup>. Als Transkriptionsfaktor reguliert p53 die Expression von Genen, die an einer Kontrolle des Zellzyklus und an einer Reparatur der DNA-Läsionen oder einer Induktion von Apoptose beteiligt sind<sup>172, 173</sup>. Aufgrund dieser Eigenschaft wird p53 auch als „Wächter der Genomintegrität“ bezeichnet. So kann p53 eine transkriptionale Aktivierung von proapoptotischen Genen (z. B. BAX, BAK) und eine Repression von antiapoptotischen Genen (z. B. BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>) bewirken. Zudem wurde für p53 eine direkte Aktivierung von BAX nach einer mitochondrialen Translokation des Tumorsuppressorproteins beschrieben<sup>174-176</sup>. Die Schädigung der DNA führt zu einer posttranslationalen Stabilisierung von p53, das über eine Aktivierung weiterer Mediatoren eine Arretierung des Zellzyklus am G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunkt zur Reparatur des DNA-Schadens vor der Replikation und am G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt zur Reparatur der Schädigung vor der Chromosomenseparation initiiert<sup>177-179</sup>. Die zytotoxische Wirkung von CDDP wird vor allem mit der Auslösung eines G<sub>2</sub>/M-Phasen-Arrestes in Verbindung gebracht<sup>18, 26, 180, 181</sup>. Im Falle irreparabler DNA-Läsionen wird über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus die apoptotische Signalkaskade aktiviert und der Zelltod ausgelöst.

Die Signaltransduktion und die Steuerung der CDDP-induzierten Apoptose erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Zahlreiche *In-vitro*-Untersuchungen belegen, dass die zytotoxischen Effekte der Substanz durch eine Initiierung des intrinsischen, mitochondrial-vermittelten Apoptosesignalweges, verbunden mit einer mitochondrialen Freisetzung proapoptotischer Proteine und einer Caspasenaktivierung, hervorgerufen werden<sup>182-185</sup>. Einige Arbeitsgruppen konnten zudem eine Aktivierung des extrinsischen, Rezeptor-vermittelten Apoptoseweges nachweisen<sup>186, 187</sup>. Neuere Daten weisen darüber hinaus auf eine Beteiligung stressinduzierter, ER-vermittelter Apoptosemechanismen und Caspasen-unabhängiger apoptotischer Prozesse in einer CDDP-initiierten Zytotoxizität hin<sup>188-193</sup>.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Patienten mit einem CDDP-refraktären Tumor besitzen mit einer konventionellen CDDP-basierenden Chemotherapie meist nur geringe Überlebenschancen. Vielfach steht einer Heilung der Tumorerkrankung eine Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegenüber CDDP oder ein Auftreten schwerwiegender UAW entgegen. Die Synthese alternativer Platinderivate mit einer fehlenden CDDP-Resistenz bildet daher einen wesentlichen Eckpfeiler in der onkologischen Substanzforschung. Mit Ausnahme einiger neuer Substanzen, wie Picoplatin, Satraplatin, BBR3464 und Bamat-UD2, die sich zum aktuellen Zeitpunkt in präklinischen und in klinischen Testungen befinden, gab es in den letzten 30 Jahren nur wenige Fortschritte, eine intrinsische oder erworbene CDDP-Resistenz zu überwinden. Die Entwicklung hochpotenter Platinkomplexe und die Erforschung ihrer Wirkmechanismen ermöglichen neue Erkenntnisse zur multifaktoriellen Entstehung einer CDDP-Resistenz und ihrer Überwindung durch gezielte chemische Modifizierung der Substanz. Platinverbindungen mit neuartigen Ansatzpunkten zur Auslösung eines spezifischen Apoptosesignalweges stellen daher hoffnungsvolle Kandidaten für innovative Medikamente in der Tumorthherapie dar.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte eine detaillierte molekularpharmakologische Charakterisierung des neuen vielversprechenden CDDP-Derivates THP-12 (*cis*-Dichloro-(2-{11-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]undecyl}propan-1,3-diamino)platin(II)) hinsichtlich der zytotoxischen Aktivität *in vitro* im Vergleich mit CDDP erfolgen. Alle Testungen sollten dabei schwerpunktmäßig an einem etablierten humanen TKZT-Modell durchgeführt werden, das die CDDP-sensitive TKZT-Zelllinie H12.1 und die intrinsisch CDDP-resistente TKZT-Zelllinie 1411HP umfasst. Die Untersuchungen dienen der Zielsetzung, das zytotoxische Potential der Platinverbindung zu bewerten und Erkenntnisse über die Fähigkeit von THP-12 zur Überwindung der CDDP-Resistenz der Zelllinie 1411HP zu erhalten. Weiterhin sollten ausgewählte Analysen zur zellulären Anreicherung der Substanz und zur Reaktivität mit der genomischen DNA der Zellen durchgeführt werden. Darüber hinaus sollte die Art des durch THP-12 ausgelösten Zelltodes charakterisiert werden. Den Schwerpunkt der Arbeit bildete die Aufklärung des Mechanismus des THP-12-vermittelten Zelltodes, um die Relevanz der Substanz für nachfolgende *In-vivo*-Testungen unter Beweis zu stellen.

Folgende Fragestellungen sollten untersucht werden:

(1) *Charakterisierung der Zytotoxizität von THP-12 im Vergleich mit CDDP in vitro*

Die zytotoxische Wirkung von THP-12 sollte im Vergleich mit CDDP an einem Panel humaner TKZT-Zelllinien mit unterschiedlicher CDDP-Sensitivität untersucht und die Testungen gegebenenfalls auf humane Zelllinien anderer solider Tumoren ausgeweitet werden. Zudem sollte eine Analyse der zytotoxischen Aktivität der Substanz in humanen nichtmalignen Zellen erfolgen.

(2) *Analyse der Art des THP-12-initiierten Zelltodes im Vergleich mit CDDP in vitro*

Der THP-12-induzierte Zelltod sollte im Vergleich mit CDDP anhand standardisierter Methoden zum Nachweis von Apoptose im humanen TKZT-Modell der H12.1- und 1411HP-Zelllinie charakterisiert werden.

(3) *Untersuchungen zur zellulären Substanzakkumulation und zur DNA-Platinierung von THP-12 im Vergleich mit CDDP in vitro*

Die zellulären Akkumulationen von THP-12 und von CDDP sollte anhand von Platinakkumulations-Analysen im humanen TKZT-Modell der H12.1- und 1411HP-Zelllinie untersucht und die Testungen gegebenenfalls auf humane Zelllinien anderer solider Tumoren ausgedehnt werden. Weiterhin sollte das Bindungsverhalten von THP-12 an genomische DNA im Vergleich mit CDDP überprüft werden.

(4) *Aufklärung des Mechanismus des THP-12-induzierten Zelltodes im Vergleich mit CDDP in vitro*

Die zellbiologischen Effekte von THP-12 sollten im Vergleich mit CDDP im humanen TKZT-Modell der H12.1- und 1411HP-Zelllinie charakterisiert werden. Hierfür sollte eine Analyse verschiedener relevanter Parameter erfolgen, u. a. einer Zellzyklusbeeinflussung der Zellen, einer Expression von p53 und von Proteinen der BCL-2-Familie, einer mitochondrialen Entlassung von Cytochrom c und von SMAC/DIABLO, einer Aktivierung von Caspasen und einer Spaltung von PARP. Zudem sollte eine Beeinflussung der intrazellulären Calcium-, ROS- und GSH-Homöostase sowie des mitochondrialen Membranpotentials durch THP-12 im Vergleich mit CDDP untersucht werden. Projektrelevante Methoden sollten etabliert und die Testungen gegebenenfalls auf humane Zelllinien anderer solider Tumoren ausgeweitet werden. Es wurde angestrebt, den Wirkmechanismus von THP-12 zu identifizieren.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Zelllinien und primäre Zellen

Die verwendeten etablierten humanen Tumorzelllinien und die humanen primären nichtmalignen Zellen, ihr Ursprung und die entsprechenden Literaturquellen bzw. die Kennzeichen der Zelllinien-Banken wurden nachfolgend tabellarisch aufgeführt.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Referenzen</i>
H12.1	TKZT	194
H12.5	TKZT	194
833KE	TKZT	ECACC-Nr.: 06072611 <sup>195</sup>
2102EP	TKZT	196
577MF	TKZT	ECACC-Nr.: 06011802 <sup>196</sup>
1777NRpmet	TKZT	ECACC-Nr.: 06011801 <sup>197</sup>
1411HP	TKZT	198
A253	Kopf-Hals-Karzinom	ATCC-Nr.: CRL-7902
FaDu	Kopf-Hals-Karzinom	ATCC-Nr.: HTB-43
A549	Bronchialkarzinom (nichtkleinzellig)	ATCC-Nr.: CCL-185
518A2	Melanom	199
A2780	Ovarialkarzinom	ECACC-Nr.: 93112519
A431	Zervixkarzinom	ATCC-Nr.: CRL-1555
8505C	Schilddrüsenkarzinom	ECACC-Nr.: 94090184 <sup>200</sup>
SW1736	Schilddrüsenkarzinom	201
SW480	Kolonkarzinom	ATCC-Nr.: CCL-228
HCT8	Kolonkarzinom	ATCC-Nr.: CCL-244
HT29	Kolonkarzinom	ATCC-Nr.: HTB-38
DLD1	Kolonkarzinom	ATCC-Nr.: CCL-221
MCF7	Mammakarzinom	ATCC-Nr.: HTB-22
M2	Magenkarzinom	202
hMSC	Knochenmark	203

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Zelllinien und primären Zellen, ihren Ursprung und ihre Charakterisierung; *American Type Culture Collection (ATCC)*; *European Collection of Cell Cultures (ECACC)*.

Die *human Multipotent Stroma Cells (hMSC)* wurden aus Knochenmarkbiopsien von Patienten nach einer erfolgten Einverständniserklärung gewonnen und freundlicherweise von Herrn Dr. L. P. Müller, Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor KIM IV Halle, zur

Verfügung gestellt. Für das Studienprotokoll lag ein positives Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor („Untersuchung humaner adulter mesenchymaler Stammzellen *in vitro* und im Tiermodell II“, 6.12.2006).

## 2.2 Medien und Supplemente

RPMI-1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
DMEM (Low Glucose) mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
Fetales Kälberserum (FKS) Charge 611F	Biochrom AG, Berlin, D
Charge 0446K	Biochrom AG, Berlin, D
Charge 40F9121K	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
Dulbeccos PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
Trypsin-EDTA 0,05 %/0,02 %	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D

## 2.3 Chemikalien und Antikörper

<i>Substanzen</i>	<i>IUPAC-Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Stammkonzentration</i>
CDDP	<i>cis</i> -Diammindichloroplatin(II)	Sigma-Aldrich	20 mM (in DMF)
THP-9	<i>cis</i> -Dichloro(2-{4-[(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy]butyl}propan-1,3-diamino)platin(II)	Paschke et al. <sup>90</sup>	20 mM (in DMF)
THP-10	<i>cis</i> -Dichloro(2-{6-[(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy]hexyl}propan-1,3-diamino)platin(II)	Paschke et al. <sup>90</sup>	20 mM (in DMF)
THP-12	<i>cis</i> -Dichloro(2-{11-[(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy]undecyl}propan-1,3-diamino)platin(II)	Paschke et al. <sup>90</sup>	20 mM (in DMF)
THP(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OH	11-[(Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy]undecan-1-ol	Paschke et al.	20 mM (in DMF)
HO(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> PtCl <sub>2</sub>	<i>cis</i> -Dichloro[2-(11-hydroxyundecyl)propan-1,3-diamino]platin(II)	Paschke et al.	20 mM (in DMF)

Tab. 3: Liste der getesteten Platinverbindungen und Referenzsubstanzen.

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, D), von Merck KGaA (Darmstadt, D) oder von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D) bezogen.

*Substanzen zur Beeinflussung der THP-12- und CDDP-induzierten zellulären Mechanismen:*

BAPTA-AM 5 mM (in DMSO)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Buthioninsulfoximin (BSO) 100 mM (in A. dest.)	
Cyclosporin A (CSA) 50 mM (in DMSO)	
N-Acetylcystein (NAC) 100 mM (in A. dest.)	
PAN-Caspaseninhibitor 10 mM (in DMF)	Axxora GmbH, Lörrach, D

*SRB-Zytotoxizitäts-Assay:*

Essigsäure 1 % (in A. dest.)	
Sulforhodamin B (SRB)-Lösung 0,4 % (in Essigsäure 1 %)	
Trichloressigsäure (TCA) 10 % (in A. dest.)	
Tris-HCl 10 mM pH 10,0 (in A. dest.)	

*Trypanblau-Ausschluss-Test:*

Trypanblau-Lösung 0,4 %	
-------------------------	--

*DNA-Fragmentierungs-Assay:*

Agarose (Seakem LE)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
DNA-Beladungs-Puffer (6 x) R0611	MBI Fermentas GmbH, Leon-Rot, D
DNA-Lyse-Puffer:	
> EDTA 20 mM	
> Sodiumdodecylsulfat (SDS) 0,8 %	
> Tris-HCl 100 mM pH 8,0 (in A. dest.)	
Ethidiumbromid (EB) 10 mg/ml (in PBS)	
Proteinase K 20 mg/ml (in PBS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Ribonuklease A (RNase A) 10 mg/ml (in PBS)	
TAE-Puffer:	
> EDTA 1 mM pH 8,3	
> Essigsäure 20 mM	
> Tris-HCl 40 mM (in A. dest.)	

*DNA-Extraktion:*

Blut & Zellkultur DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Heringssperma-DNA	

*Mobilitätstestung THP-12- und CDDP-behandelter pCR<sup>®</sup>3.1 Plasmid-DNA:*

Agarose (Seakem LE)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
DNA-Beladungs-Puffer (6 x) R0611	MBI Fermentas GmbH, Leon-Rot, D
DNA-Marker Gene Ruler 1 kb	MBI Fermentas GmbH, Leon-Rot, D
Ethidiumbromid (EB) 10 mg/ml (in PBS)	
pCR <sup>®</sup> 3.1 Plasmid-DNA 1 µg/µl (in A. dest.)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
TAE-Puffer (s. o.)	

*Zellzyklus-Analyse:*

Ethanol 70 %	
Färbe-Puffer:	
➤ FKS 2 %	
➤ Natriumazid 0,01 % (in PBS)	
Propidiumiodid (PI) 1 mg/ml (in A. dest.)	
Ribonuklease A (RNase A) 1 mg/ml (in PBS)	

*Proteinisolierung und Proteinbestimmung:*

Dithiothreitol (DTT) 10 mM (in A. dest.)	
Proteinaseinhibitor (40 Units)	
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 100 mM (in Ethanol 96 %)	
Protein-Assay Färbereagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Ripa-Puffer:	
➤ Desoxycholsäure 0,5 %	
➤ Igepal 0,5 %	
➤ NaCl 100 mM	
➤ SDS 0,5 %	
➤ Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (in A. dest.)	

*Zytosolisolierung:*

Mitochondrien-Zytosol-Fraktionierungs-Kit	Bio-Cat GmbH, Heidelberg, D
---	-----------------------------

*Proteinanalyse mittels Western Blotting:*

PAGE-Ruler Protein Ladder (Marker)	MBI Fermentas GmbH, Leon-Rot, D
------------------------------------	---------------------------------



## PAGE-Lade-Puffer (4 x):

- Bromphenolblau 0,05 %
- Glycerol 30 %
- $\beta$ -Mercaptoethanol 5 %
- SDS 2 %
- Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 12,5 % (in A. dest.)

## PAGE-Lauf-Puffer:

- Rotiphorese-SDS-Page 1 x

## Ponceau S

## Protein-Block-Puffer:

- Trockenmilch 5 % (in PBST)

## Roti-Lumin 1+2

## Sammelgel 5 %:

- Acrylamid 4,96 %
- Ammoniumpersulfat (APS) 0,05 %
- SDS 0,1 %
- *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) 0,12 %
- Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 24,8 % (in A. dest.)

## Transfer-Puffer:

- Methanol 20 %
- Rotiphorese 10 x 8 % (in A. dest.)

## Trenngel 15 %:

- Acrylamid 15,7 %
- APS 0,05 %
- SDS 0,1 %
- TEMED 0,04 %
- Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 25,12 % (in A. dest.)

*Caspasenaktivitäts-Assay:*

Ac-VDVAD-pNA 4 mM (DMSO)	Axxora GmbH, Lörrach, D
Ac-DEVD-pNA 4 mM (DMSO)	Axxora GmbH, Lörrach, D
Ac-IETD-pNA 4 mM (DMSO)	Axxora GmbH, Lörrach, D
Ac-LEHD-pNA 4 mM (DMSO)	Axxora GmbH, Lörrach, D

*Caspasen-Lyse-Puffer:*

- Hepes 50 mM pH 7,4
- Triton X 100 1 % (in A. dest.)

*Caspasen-Reaktions-Puffer:*

- Chaps 0,1 %
- EGTA 5 mM
- Glycerol 5 %
- Hepes 50 mM pH 7,4 (in A. dest.)

DTT 1 M (in A. dest.)

*Calciumflux-Assay:*

PBX Calcium Assay Kit

BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, D

*Lucigenin-Assay:*

Lucigenin 10 mM (in PBS)

β-NADPH 1 mM (in PBS)

*Glutathionspiegel-Analyse:*

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) 0,01 M

(in EDTA-Phosphat-Puffer)

EDTA-Phosphat-Puffer:

- EDTA 6,3 mM
- Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 143 mM
- L-Glutathion (GSH) (in SSA 5 %)

GSH-Reaktions-Puffer:

- GSH-Reduktase (100 Units/ml bis 300 Units/ml) 5,6 %
- β-NADPH 2,39 mM 11,1 % (in EDTA-Phosphat-Puffer)

Rinderserumalbumin (RSA) (in A. dest.)

5-Sulfosalicylsäure (SSA) 5 % (in A. dest.)

Triton X 100 0,1 % (in EDTA-Phosphat-Puffer)

*Analyse des mitochondrialen Membranpotentials:*

DePsipher Kit

R&D-Systems GmbH, Wiesbaden, D

*Lösungsmittel:*

Aqua destilliert (A. dest.)

Melsungen AG, Melsungen, D

*N,N'*-Dimethylformamid (DMF)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Phosphate-Buffered Saline (PBS): 10 x pH 6,8

- KCl 0,2 %
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 %
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 12 H<sub>2</sub>O pH 8,0 3,58 %
- NaCl 8 % (in A. dest.)

PBST (Tween 20 0,1 % in PBS)

*Antikörper:*

In der folgenden Tabelle wurden alle verwendeten Antikörper, ihre Hersteller und die eingesetzten Konzentrationen aufgeführt. Die Primärantikörper wurden in Protein-Block-Puffer hergestellt. Die Sekundärantikörper wurden in PBST verdünnt.

<i>Antikörper (Klon)</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Konzentration</i>
β-Aktin (C-2)	Ziege polyklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D	0,2 µg/ml
APAF-1 (24)	Maus monoklonal	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, D	1,0 µg/ml
BAK (G-23)	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc.	0,5 µg/ml
BAX	Kaninchen polyklonal	DAKO GmbH, Hamburg, D	1,0 µg/ml
BCL-2 (124)	Maus monoklonal	DAKO GmbH	2,0 µg/ml
BCL-X <sub>S/L</sub> (S-18)	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc.	0,5 µg/ml
Caspase 3 (C-33)	Maus monoklonal	MBL/Biozol Diagnostika, Eching, D	0,5 µg/ml
Cytochrom c	Maus monoklonal	MBL/Biozol Diagnostika	0,5 µg/ml
p53 (DO-1)	Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc.	0,1 µg/ml
PARP (4C10-5)	Maus monoklonal	BD Biosciences Pharmingen	1,0 µg/ml
SMAC/DIABLO	Kaninchen polyklonal	Merck Biosciences GmbH	1,0 µg/ml
α-Tubulin (DM1A)	Maus monoklonal	Dianova GmbH, Hamburg, D	0,02 µg/ml
Anti-Maus IgG	HRP-konj. Schaf-AK	Santa Cruz Biotechnology Inc.	0,08 µg/ml
Anti-Kaninchen IgG	HRP-konj. Schaf-AK	Santa Cruz Biotechnology Inc.	0,08 µg/ml
Anti-Ziege IgG	HRP-konj. Esel-AK	Santa Cruz Biotechnology Inc.	0,08 µg/ml

Tab. 4: Liste der verwendeten Antikörper, ihre Hersteller und ihre eingesetzten Konzentrationen; *Horse Radish Peroxidase* (HRP)-konjugiert.

## 2.4 Geräte und Verbrauchsmittel

### AAS-Feststoff-Systeme:

- AAS-5 EA Analytik AG, Jena, D
- ZEEnit 700 Analytik AG, Jena, D

### *Dounce*-Homogenisator

Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D

### FACSCalibur (CellQuest Software)

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D

### Gelelektrophorese-Apparatur Sub-Cell GT

Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D

### Kamera Axio Cam Color (Axio Vision 3.1)

Carl Zeiss AG, Jena, D

### Luminometer Lumat LB 9507

Berthold Technologies, Bad Wildbad, D

### Mikroskope:

- Axiovert 25 CA Carl Zeiss AG, Jena, D
- Axiovert 40 CFL Carl Zeiss AG, Jena, D

### Plattenlesegeräte:

- Spectra Rainbow SLT Tecan LabInstruments GmbH, Crailsheim, D
- SpectraFluorPlus SLT Tecan LabInstruments GmbH, Crailsheim, D

### Plattenwascher PW96 SLT Tecan

LabInstruments GmbH, Crailsheim, D

### Spektrophotometer BioSpec-1601E

Shimadzu GmbH, Duisburg, D

### Thermoblock Uno II Biometra Biotron

Biomedizin. Analytik GmbH, Göttingen, D

### Transilluminator Bio Doc Analyze Biotron

Biomedizin. Analytik GmbH, Göttingen, D

### Western-Blot-Zubehör:

- Hyperprocessor SRX-101A Amersham Bioscience GmbH, Freiburg, D
- Mini Protean II TM Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
- Nitrozellulosemembran Whatman GmbH, Dassel, D
- Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell BioRad Laboratories GmbH, München, D

### Zentrifugen:

- Biofuge fresco Heraeus Instruments, Hanau, D
- Labofuge 400 Heraeus Instruments, Hanau, D
- Ultrazentrifuge Sorvall Discovery 100SE Thermo Scientific, Karlsruhe, D

Alle verwendeten Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen TPP (Trasadingen, CH), Eppendorf AG (Hamburg, D) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D) bezogen. Weitere Geräte und Verbrauchsmittel entsprachen den üblichen Laborstandards und wurden nicht gesondert aufgeführt.

## 2.5 Zellkultivierung

Alle Arbeiten der Zellkultivierung wurden unter *Laminar-Flow*-Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Die etablierten humanen Tumorzelllinien wurden als Monolayer unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) in RPMI 1640 mit 10 % FKS (Biochrom AG) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Kultivierung der hMSC erfolgte als Monolayer in DMEM (Low Glucose) mit 15 % FKS (Invitrogen GmbH, hitzeinaktiviert) und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Medien wurden täglich gewechselt. Bei einer Konfluenz von 90 % bis 100 % wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA suspendiert und passagiert. Für Versuche wurden die Zellen trypsiniert, die Zellzahlen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die benötigten Zellzahlen unter Gewährleistung eines exponentiellen Wachstums der Zellen über die gesamte Versuchszeit oder zur Gewährleistung einer Konfluenz zum Versuchsbeginn in die entsprechenden Zellkulturgefäße überführt.

## 2.6 Zytotoxizitäts-Analysen

### 2.6.1 SRB-Zytotoxizitäts-Assay

Für eine Bestimmung der Zytotoxizitäten der Platinverbindungen, der Referenzsubstanzen und der Substanzen zur Beeinflussung der THP-12- und der CDDP-induzierten Mechanismen (*siehe 2.3 S. 31*) wurde der Sulforhodamin B (SRB)-Assay verwendet<sup>204</sup>. Das Prinzip dieses Assays beruht auf einer Anbindung von SRB an zelluläre Proteine im sauren Milieu und einer Freisetzung des gebundenen Farbstoffes und einer kolorimetrischen Quantifizierung im basischen Bereich. Die Zellen wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten in einer definierten Zellzahl ausgesät, um ein exponentielles Wachstum während der gesamten Behandlungszeit zu gewährleisten (*Tab 5*). Nach 24 h wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen für 2 h, 24 h oder 96 h gemäß eines 2 h-, 24 h- oder 96 h-Behandlungsschemas exponiert. Die Endkonzentrationen an DMF und DMSO betragen zur Vermeidung membrantoxischer Einflüsse maximal 0,5 %. Bei einer 2 h- oder 24 h-Behandlung gemäß eines 2 h- oder 24 h-Behandlungsschemas wurden die Substanzlösungen nach der entsprechenden Inkubationszeit dekantiert, die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und mit Zytostatika-freiem Medium für weitere 94 h oder 72 h inkubiert. Der Prozentsatz an lebensfähigen Zellen wurde jeweils 96 h nach Behandlungsbeginn relativ zu unbehandelten Kontrollzellen bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit je 100 µl/Loch 10 % TCA für mindestens 2 h bei 4 °C fixiert, 5 x mit A. dest. gewaschen (Plattenwascher PW96 SLT) und

die verbliebenen adhärennten Zellen mit je 100 µl/Loch 0,4 % SRB-Lösung für 1 h gefärbt. Anschließend wurde der nichtgebundene Farbstoff 5 x mit 1 % Essigsäure ausgewaschen (Plattenwascher PW96 SLT) und die Platten über Nacht getrocknet. Nach Herauslösen des gebundenen Farbstoffes mit je 100 µl/Loch 10 mM Tris-HCl wurde die Optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen (Spectra Rainbow SLT oder SpectraFluorPlus SLT). Die Ermittlung der jeweiligen *Inhibitory Concentration* IC<sub>50</sub> oder IC<sub>90</sub>, die das Zellwachstum zu 50 % oder zu 90 % inhibiert, erfolgte graphisch aus den Konzentrations-Zellwachstums-Kurven.

<i>Zelllinie/primäre Zellen</i>	<i>Zellzahl/Loch</i>	<i>Zelllinie/primäre Zellen</i>	<i>Zellzahl/Loch</i>
H12.1	3.000	A431	350
H12.5	1.500	8505C	3.000
833KE	3.000	SW1736	3.000
2102EP	3.000	SW480	3.500
577MF	4.000	HCT8	600
1777NRpmet	1.500	HT29	1.000
1411HP	8.000	DLD1	2.000
A253	2.000	MCF7	1.000
FaDu	3.000	M2	4.000
A549	3.000	hMSC	1.000
518A2	1.000		
A2780	1.000		

Tab. 5: Für den SRB-Assay verwendete Zellzahlen zur Gewährleistung eines exponentiellen Wachstums der Zelllinien und der primären nichtmalignen Zellen über die gesamte Versuchszeit.

### 2.6.2 SRB-Langzeit-Zytotoxizitäts-Assay

Eine durch THP-12 und durch CDDP induzierte Hemmung des Zellneuwachstums wurde mittels einer modifizierten Methode des SRB-Zytotoxizitäts-Assays untersucht. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit THP-12 oder mit CDDP für 96 h gemäß eines 96 h-Behandlungsschemas exponiert, nachfolgend gründlich mit PBS gewaschen, mit Zytostatika-freiem Medium versetzt und für weitere 2 d, 4 d, 6 d, 8 d und 14 d inkubiert. Die Fixierung, Färbung und die Vermessung der Zellen erfolgten wie unter 2.6.1 angegeben.

## 2.7 Apoptose-Analyse

### 2.7.1 Trypanblau-Ausschluss-Test

Zur Analyse des THP-12- und des CDDP-induzierten Zelltodes wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit beiden Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* exponiert (*siehe 3.1.6 S. 52*), die flotierenden Zellen 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn gesammelt, zentrifugiert (1300 U/min 5 min RT, Labofuge 400), mit Trypanblau-Lösung (1 : 2 in PBS) inkubiert und ihre Fähigkeit zum Farbausschluss sofort mikroskopisch beurteilt. Für eine Charakterisierung der unter THP-12 und dem PAN-Caspaseninhibitor (60  $\mu$ M) gebildeten flotierenden Zellen wurde der Hemmstoff für die gesamte Versuchsdauer zugesetzt (*Abb. 45 siehe S. 76*).

### 2.7.2 DNA-Fragmentierungs-Assay

Für eine Überprüfung einer THP-12- und CDDP-ausgelösten DNA-Fragmentierung wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema II* exponiert (*siehe 3.1.6 S. 52*) und die flotierenden Zellen 24 h nach Behandlungsbeginn gesammelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, zentrifugiert (1300 U/min 5 min RT, Labofuge 400) und mit DNA-Lyse-Puffer (je 40  $\mu$ l pro 1 Million Zellen) für 20 min auf Eis lysiert. Nach einer Behandlung mit 10 mg/ml RNase A (je 15  $\mu$ l pro 1 Million Zellen) bei 37 °C für 2 h und mit 20 mg/ml Proteinase K (je 15  $\mu$ l pro 1 Million Zellen) bei 50 °C über Nacht (Thermoblock Uno II) wurden die Proben mit DNA-Beladungspuffer (1 x) gemischt und auf einem 2 % Agarosegel in TAE-Puffer bei 100 V (SubCell GT) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit EB-Lösung (Endkonzentration 0,5  $\mu$ g/ml) für 30 min gefärbt, mit A. dest. für 20 min gespült und das Laufverhalten der Proben mittels UV-Licht (Transilluminator Bio Doc Analyze) visualisiert. Zur Charakterisierung der unter THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema I* und dem PAN-Caspaseninhibitor (60  $\mu$ M) gebildeten flotierenden Zellen wurde der Hemmstoff für die gesamte Versuchsdauer zu den Zellen zugesetzt (*Abb. 45 siehe S. 76*).

### 2.7.3 Analyse der PARP-Spaltung

Eine Analyse der THP-12- und der CDDP-initiierten PARP-Spaltung wurde mittels Western Blot-Technik durchgeführt. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* exponiert (*siehe 3.1.6 S. 52*) und die flotierenden Zellen und die adhärenen Kontrollzellen 24 h nach Behandlungsbeginn gesammelt. Der Proteinaufschluss und die Aufbereitung der Proben erfolgten wie unter 2.10.2 *siehe S. 41* angegeben.

## 2.8 Platinakkumulations-Analysen

### 2.8.1 AAS platinierter Zellen

Für eine Bestimmung der zellulären Akkumulationen von THP-12 und von CDDP wurden die Zelllinien und hMSC mit jeweils 30  $\mu\text{M}$  THP-12 oder CDDP oder mit beiden Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I und II* (siehe 3.1.6 S. 52) oder mit 200  $\mu\text{M}$  CDDP oder mit den  $\text{IC}_{10}$ ,  $\text{IC}_{20}$ ,  $\text{IC}_{30}$ ,  $\text{IC}_{40}$ ,  $\text{IC}_{70}$  oder  $\text{IC}_{90}$  beider Substanzen gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas exponiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (bis 2 h nach Behandlungsbeginn) wurden die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, zentrifugiert (1300 U/min 5 min RT, Labofuge 400) und erneut gewaschen. Nach Gefriertrocknung und Homogenisierung wurden die Proben mittels Feststoff-Atomabsorptionsspektroskopie (AAS-5 EA) gemessen. Die Vermessung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. B. Kalinowski und Herrn Dr. G. Kaludević, Medizinisch-Pharmazeutische Chemie der MLU Halle-Wittenberg, übernommen.

### 2.8.2 AAS platinierter DNA

Für eine Bestimmung der Anbindung von THP-12 und von CDDP an genomische DNA wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit jeweils 30  $\mu\text{M}$  der Substanzen behandelt und die adhärenen Zellen 6 h nach Behandlungsbeginn nach einer Waschung mit PBS gemäß dem Blut & Zellkultur DNA Mini Kit aufgearbeitet. Die Quantifizierung erfolgte mittels Feststoff-AAS (ZEE nit 700) und wurde freundlicherweise von Analytik AG Jena durchgeführt.

Zum Nachweis einer Anbindung von THP-12 und von CDDP an Heringssperma-DNA im zellfreien System wurde diese mit jeweils 30  $\mu\text{M}$  beider Substanzen inkubiert, 3 h, 6 h und 13 h nach Behandlungsbeginn mit Isopropanol ausgefällt und 3 x mit DMF und 70 % Ethanol gewaschen. Die AAS erfolgte gemäß 2.8.1 mittels AAS-5 EA-System.

## 2.9 Reaktivitäten von THP-12 und von CDDP mit pCR<sup>®</sup>3.1 Plasmid-DNA

Für eine weitere Analyse der DNA-Bindungsfähigkeiten von THP-12 und von CDDP wurden je 2  $\mu\text{g}$  zirkuläre pCR<sup>®</sup>3.1 Plasmid-DNA mit jeweils 2,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  oder 30  $\mu\text{M}$  beider Substanzen bei 37 °C in A. dest. exponiert, 2 h nach Behandlungsbeginn mit DNA-Beladungs-Puffer (1 x) gemischt und einer Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel in TAE-Puffer bei 100 V (SubCell GT) zugeführt. Nach einem Anfärben des Gels mit EB-Lösung (Endkonzentration 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 30 min und Spülen mit A. dest. für 20 min wurde das Laufverhalten der Proben mittels UV-Licht (Transilluminator Bio Doc Analyse) visualisiert.



## 2.10 Charakterisierung der Wirkmechanismen von THP-12 und von CDDP

### 2.10.1 Durchflusszytometrische Analysen

Für eine Untersuchung der THP-12- und der CDDP-initiierten Zellzyklusstörungen wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit beiden Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* (siehe 3.1.6 S. 52) oder mit 200  $\mu$ M CDDP exponiert, die adhärenen Zellen 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn durch Trypsinierung geerntet und mit den flotierenden Zellen vereinigt. Die Kontrollen wurden 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn geerntet. Nach einer Zentrifugation der Proben (1300 U/min 5 min RT, Labofuge 400) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und mit je 2 ml 70 % eiskaltem Ethanol für mindestens 1 h bei 4 °C fixiert. Zur Vermessung wurden die Proben pelletiert (1500 U/min 5 min RT, Labofuge 400), mit je 2 ml Färbe-Puffer gewaschen, erneut pelletiert und mit je 80  $\mu$ l 1 mg/ml RNase A für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer Inkubation unter Lichtausschluss mit PI (je 20  $\mu$ g pro 1 ml Färbe-Puffer) für 30 min erfolgte die Detektion der Fluoreszenzintensitäten der Proben am Durchflusszytometer (FACSCalibur), wobei zu jeder Messung eine Mindestzellzahl von 10.000 Zellen herangezogen wurde.

Die Beeinflussung des THP-12- und des CDDP-vermittelten Zelltodes durch Zugabe verschiedener Substanzen (siehe 2.3 S. 31) wurde durchflusszytometrisch über eine Bestimmung der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen als Maß für die flotierenden Zellen untersucht. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert (siehe 3.1.6 S. 52; gegebenenfalls in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors, von BAPTA-AM, NAC oder BSO) und 24 h nach Behandlungsbeginn der oben beschriebenen Aufarbeitung zugeführt. Der PAN-Caspaseninhibitor (60  $\mu$ M; Abb. 44 siehe S. 76) wurde für die gesamte Versuchsdauer zu den Zellen zugesetzt, wohingegen BAPTA-AM (10  $\mu$ M; Abb. 50 siehe S. 80) und NAC (5 mM; Abb. 53 siehe S. 83) nur für die Dauer der Platininkubation eingesetzt wurden. Der GSH-Syntheseinhibitor BSO (100  $\mu$ M; Abb. 56 siehe S. 85) wurde den Zellen 24 h vor einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP zugesetzt.

### 2.10.2 Western Blot-Analysen

#### *Probengewinnung und Proteinbestimmung*

Zur Charakterisierung der Expression Apoptose-relevanter Proteine durch THP-12 und durch CDDP wurde die Western Blot-Technik angewendet. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* exponiert (siehe 3.1.6 S. 52;

gegebenenfalls in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors oder von NAC), die flotierenden Zellen 8 h, 24 h und 48 h nach Behandlungsbeginn gesammelt und mit den trypsinierten, adhären Zellen vereinigt. Der PAN-Caspaseninhibitor (60  $\mu$ M; *Abb. 42 siehe S. 75 und Abb. 43 siehe Anhang S. XV*) wurde für die gesamte Versuchsdauer zu den Zellen zugesetzt, während NAC (5 mM; *Abb. 52 siehe S. 82*) nur für die Dauer der Platininkubation eingesetzt wurde. Nach einer Waschung mit PBS und einer Zentrifugation (1300 U/min 5 min RT, Labofuge 400) wurden die Zellen einem Proteinauflösung gemäß der Methode nach Bradford zugeführt<sup>205</sup>. Hierfür wurden die Zellpellets auf Eis in Ripa-Puffer aufgenommen (je 100  $\mu$ l pro 1 Million Zellen; versetzt mit je 10  $\mu$ l 10 mM DTT, 10  $\mu$ l 100 mM PMSF und 10  $\mu$ l Proteinaseinhibitor pro 1 ml Ripa-Puffer), die DNA durch mehrmaliges Passagieren mit einer 27 G-Kanüle geschert und die Zelllysate für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Proben (13000 U/min 15 min 4 °C, Biofuge fresco) wurden die Proteingehalte der Überstände mittels Protein-Assay Färbereagenz bei einer Wellenlänge von 595 nm (BioSpec-1601E) ermittelt und mit Ripa-Puffer auf gleiche Konzentrationen angeglichen.

#### *Zytosolisierung*

Zur Analyse einer THP-12- und CDDP-getriggerten Freisetzung Mitochondrien-assoziiierter Proteine und einer Beeinflussung der Expression zytoplasmatischer Proteine wurden Zytosolfractionen hergestellt. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I und II* exponiert (*siehe 3.1.6 S. 52*) und die adhären Zellen 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn durch Trypsinierung geerntet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, zentrifugiert (1300 U/min 5 min RT, Labofuge 400) und in hypotonem Zytosol-Extraktions-Puffer (je 200  $\mu$ l pro 10 Million Zellen; versetzt mit je 1  $\mu$ l 1 M DTT und 2  $\mu$ l Proteinaseinhibitor pro 1 ml Puffer) aufgenommen. Nach einer Inkubation auf Eis für 10 min wurden die Proben mittels *Dounce*-Homogenisator (je 50 Hübe) aufgeschlossen und die Kerne und die intakten Zellen abzentrifugiert (2500 U/min 10 min 4 °C, Biofuge fresco). Nach einer Zentrifugation (100.000 U/min 30 min 4 °C, Ultrazentrifuge Sorvall Discovery 100 SE) wurden die zytosolischen Überstände einer Proteinbestimmung (*s. o.*) zugeführt.

#### *Probenauftrennung und Antikörperinkubation*

Von den zu analysierenden Proteinen wurden jeweils 40  $\mu$ g Protein mit PAGE-Lade-Puffer (1 x) gemischt und 10 min bei 95 °C (Thermoblock Uno II) denaturiert. Die Auftrennung erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli durch Konzentration der Proben in einem 5 % Sammelgel und einer Separierung in einem 15 % Trenngel bei 200 V

und RT (Mini Protean II TM, PAGE-Laufpuffer)<sup>206</sup>. Als Molekulargewichtsmarker diente ein Proteingemisch bekannter Molekulargewichtsgrößen (PAGE-Ruler Protein Ladder). Nach Equilibrieren der Gele für 10 min in Transfer-Puffer wurden die Proben für 1 h bei 400 mA und RT auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell) und die Transfereffizienz und die Proteinbeladung durch eine Zugabe von Ponceau S beurteilt. Eine Absättigung der unbesetzten Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation der Membranen in Protein-Block-Puffer für 1 h bei RT, an die sich die Zugabe des Primärantikörpers für 2 h bei RT anschloss (*siehe 2.3 S. 35*). Nach 3 x 5 min und 3 x 10 min Waschen mit PBST wurden die Membranen mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert (*siehe 2.3 S. 35*), 3 x 5 min mit PBST gewaschen, mit Roti-Lumin 1 + 2 (1 : 1) versetzt und die immunologischen Komplexe mittels Chemilumineszenz (Hyperprocessor SRX-101A) visualisiert.  $\alpha$ -Tubulin oder  $\beta$ -Aktin wurden als Ladekontrolle mitgeführt.

### 2.10.3 Caspasenaktivitäts-Assay

Eine Beeinflussung der Aktivitäten der Caspasen 2, 3, 8 und 9 durch THP-12 und durch CDDP wurde mittels Caspasenaktivitäts-Assay überprüft. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit den  $IC_{50}$ ,  $IC_{70}$ ,  $IC_{90}$  von THP-12 oder den  $IC_{90}$  von CDDP gemäß eines 24 h-Behandlungsschemas oder mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert (*siehe 3.1.6 S. 52*; gegebenenfalls in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors) und die adhärenen Zellen 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn geerntet. Der PAN-Caspaseninhibitor (60  $\mu$ M; *Abb. 41 siehe S. 74*) wurde für die gesamte Versuchszeit zugesetzt. Zur Analyse der Caspasenaktivitäten nach einer Exposition mit THP-12 oder mit CDDP im zeitlichen Verlauf wurden die Zellen mit beiden Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* exponiert (*siehe 3.1.6 S. 52*) und stündlich Proben (bis 34 h nach Behandlungsbeginn) aufbereitet. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mittels Zellschaber von den Kulturschalen abgelöst und in Caspasen-Lyse-Puffer (je 100  $\mu$ l pro 1 Million Zellen) suspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 10 min und einer Zentrifugation (13000 U/min 1 min 4 °C, Biofuge fresco) wurden die Proteinkonzentrationen der Überstände gemäß 2.10.2 *siehe S. 41* bestimmt und auf jeweils 1  $\mu$ g/ml angeglichen. Je 50  $\mu$ g Probe wurden auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit je 50  $\mu$ l Caspasen-Reaktions-Puffer (versetzt mit 0,5  $\mu$ M 1 M DTT und 5,0  $\mu$ l spezifischem Caspase-Substrat) über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Extinktion des gebildeten p-Nitroanilins bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen (SpectraFluorPlus SLT). Die Angabe der Caspasenaktivitäten erfolgte relativ in Bezug zu unbehandelten Kontrollproben.

#### 2.10.4 Calciumflux-Assay

Für eine Analyse der THP-12- und CDDP-induzierten Störungen der Calcium-Homöostase wurde der Calciumflux-Assay in unserem Labor etabliert. Die getesteten Zelllinien wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit vorherrschender Konfluenz ausgesät und nach 24 h mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* (siehe 3.1.6 S. 52; gegebenenfalls in Anwesenheit von BAPTA-AM) oder mit den  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{70}$  und  $IC_{90}$  von THP-12 gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas oder mit 2,5  $\mu$ M THP-12 exponiert. BAPTA-AM (10  $\mu$ M; *Abb. 49 siehe Anhang S. XVI*) wurde nur für die Dauer der Platininkubation eingesetzt. Die Konzentration an zytosolischem Calcium wurde mittels PBX Calcium Assay Kit relativ zu unbehandelten Kontrollproben bis 2 h nach Behandlungsbeginn oder 8 h bis 10 h nach Behandlungsbeginn fluorimetrisch erfasst (Anregungswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 535 nm, SpectraFluorPlus SLT). Die Durchführung des Assays wurde freundlicherweise von Frau A. Frühauf, Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor KIM IV Halle, unterstützt.

#### 2.10.5 Lucigenin-Assay

Zur Bestimmung einer ROS-Bildung durch THP-12 und durch CDDP wurde der Lucigenin-Assay in unserem Labor etabliert. Durch eine Zugabe von NADPH werden unter Wirkung der zelleigenen NADPH-abhängigen Oxidase Superoxidationradikale generiert, die mittels einer Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz quantifiziert werden<sup>207</sup>. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert (siehe 3.1.6 S. 52), 2 h nach Behandlungsbeginn mit PBS gewaschen, trypsiniert und in PBS suspendiert. 10 min nach einer Zugabe von Lucigenin (Endkonzentration 50  $\mu$ M) und von  $\beta$ -NADPH (Endkonzentration 100  $\mu$ M) wurde die Chemilumineszenz der Proben (*Relative Light Units*, RLU), relativ zu unbehandelten Kontrollproben erfasst (Luminometer Lumat LB 9507).

#### 2.10.6 GSH-Assay

Eine Beeinflussung der zellulären GSH-Konzentrationen durch THP-12 und durch CDDP wurde mit der Methode nach Tietze überprüft und in unserem Labor etabliert<sup>208, 209</sup>. Das Prinzip dieses Assays basiert auf einer nichtenzymatischen Umsetzung von GSH mit DTNB zu Glutathiondisulfid und 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure (TNB), die spektralphotometrisch quantifiziert wird. Über eine GSH-Reduktase-vermittelte Reduktion von Glutathiondisulfid kann erneut GSH zur Verfügung gestellt und somit der zelluläre GSH-Gesamtgehalt bestimmt werden. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit vorherrschender

Konfluenz ausgesät und nach 24 h mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* (siehe 3.1.6 S. 52) oder mit 100  $\mu\text{M}$  BSO (*Abb. 55 siehe Anhang S. XVII*) exponiert. 4 h nach Behandlungsbeginn mit den Platinsubstanzen oder 24 h nach Behandlungsbeginn mit BSO wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 50  $\mu\text{l}$  0,1 % eiskaltem Triton X 100 homogenisiert. Je 25  $\mu\text{l}$  der Mischung wurden der Proteinbestimmung gemäß 2.10.2 S. 41 zugeführt und der Gehalt gegen RSA-Standardlösungen (0 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml in A. dest.) ermittelt. Die verbliebenen 25  $\mu\text{l}$  Probe wurden mit 25  $\mu\text{l}$  5 % SSA deproteinisiert und 12,5  $\mu\text{l}$  dieser Mischung mit 12,5  $\mu\text{l}$  0,1 % Triton X 100/5 % SSA (1 : 1) versetzt. Durch Zugabe von 125  $\mu\text{l}$  GSH-Reaktions-Puffer (gemischt mit 5,6 % 0,01 M DTNB vor Behandlungsbeginn) wurde die Enzymreaktion gestartet und die TNB-Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen analog behandelte GSH-Standardlösungen (0  $\mu\text{M}$ ; 2  $\mu\text{M}$ ; 4  $\mu\text{M}$ ; 6  $\mu\text{M}$ ; 8  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$  in 5 % SSA) bei 30 °C gemessen. Eine Normierung der GSH-Konzentrationen erfolgte über die Proteingehalte der Proben relativ zu unbehandelten Kontrollproben. Die Durchführung des Assays wurde freundlicherweise von Frau A. Frühauf, Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor KIM IV Halle, unterstützt.

### 2.10.7 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials

Zur Analyse einer THP-12- und CDDP-vermittelten Störung von  $\Delta\Psi_m$  wurde der DePsipher-Assay in unserem Labor etabliert. Der Einsatz des Farbstoffes DePsipher als mitochondrialer Aktivitätsmarker beruht auf einer orangefarbenen Fluoreszenz der aggregierten Farbstoffmoleküle (Emissionswellenlänge 590 nm) bei intaktem  $\Delta\Psi_m$  sowie einem Verlust der Aggregationsfähigkeit und einer grünen Fluoreszenz der Monomere (Emissionswellenlänge 527 nm) bei einem Verlust von  $\Delta\Psi_m$ . H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert (siehe 3.1.6 S. 52; gegebenenfalls in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors, von NAC oder von CSA; *Abb. 58 bis Abb. 60 siehe S. 87 bis S. 89*) und die Zellen 4 h, 8 h und 17 h nach Behandlungsbeginn geerntet. Der PAN-Caspaseninhibitor (60  $\mu\text{M}$ ) wurde für die gesamte Versuchsdauer zugesetzt, während NAC (5 mM) und CSA (10  $\mu\text{M}$ ) nur für die Dauer der Platininkubation eingesetzt wurden. Nach Vereinigung der adhären und flotierenden Zellen wurden die Proben gemäß DePsipher Kit aufgearbeitet. Die Detektion der Fluoreszenzen erfolgte am Mikroskop (Axiovert 25 CA, Anregungswellenlänge 510 nm) und am Durchflusszytometer (FACSCalibur) im Vergleich mit unbehandelten Kontrollproben. Die Durchführung des Assays wurde freundlicherweise von Frau A. Frühauf, Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor KIM IV Halle, unterstützt.

## 2.11 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens 2 x durchgeführt und gegebenenfalls die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $x \pm SD$ ) von n unabhängigen Experimenten berechnet. Die  $IC_{50}$  und  $IC_{90}$  von THP-12 und von CDDP wurden neben ihrer graphischen Erfassung mittels GraphPad Prism-Programm bestimmt. Bei einem Vergleich mehrerer Versuchsgruppen wurden die Probenwerte unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha \leq 0,05$  mittels einfacher Varianzanalyse (ANOVA) und dem nachfolgenden multiplen Vergleichstest nach Bonferroni auf ihre Signifikanz überprüft. Die Auswertung der Daten zur Bestimmung der zellulären GSH-Konzentrationen erfolgte mittels linearer Regression auf der Basis von Kalibriergeraden. Dabei lagen die Werte der Regressionskoeffizienten für die GSH-Bestimmung in einem Bereich zwischen 0,9975 und 0,9990 und für die Protein-Bestimmung zwischen 0,8718 und 0,9921. Ausreißer der Messwerte wurden auf Grundlage der doppelten Standardabweichung berechnet und nicht in der GSH-Auswertung erfasst.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Analyse der zytotoxischen Aktivitäten von THP-12 und von CDDP

##### 3.1.1 Bestimmung der $IC_{50}/IC_{90}$ in humanen TKZT-Zelllinien

Zu Beginn der Untersuchungen der neuen Platinverbindung THP-12 (siehe Abb. 9 S. 15) sollte das zytotoxische Potential der Substanz im Vergleich mit CDDP charakterisiert werden. Hierzu wurden zunächst Testungen zur Zytotoxizität beider Verbindungen in dem humanen TKZT-Modell der CDDP-sensitiven TKZT-Zelllinie H12.1 und der CDDP-resistenten TKZT-Zelllinie 1411HP durchgeführt (Abb. 13 und Tab. 6).

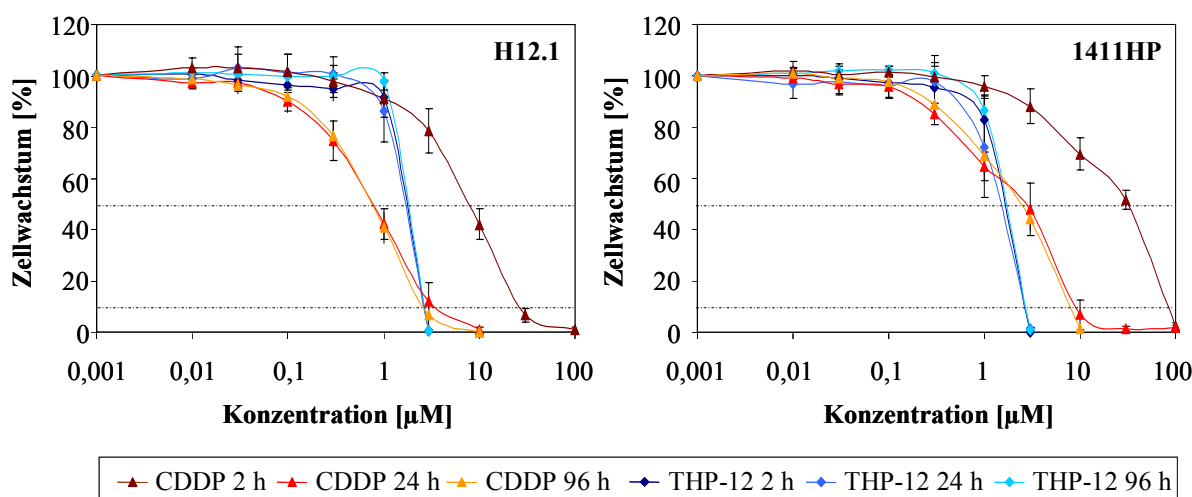


Abb. 13: Zellwachstum der TKZT-Zelllinie H12.1 und der TKZT-Zelllinie 1411HP nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß eines 2 h-, 24 h- oder 96 h-Behandlungsschemas; Analyse 96 h nach Behandlungsbeginn;  $\bar{x} \pm SD$ ;  $n = 3$ .

Bei einem Vergleich der in beiden Zelllinien für CDDP ermittelten  $IC_{90}$  eines 2 h-, 24 h- oder 96 h-Behandlungsschemas wies die Zelllinie 1411HP unabhängig von der Expositionszeit eine ca. 3-fache Resistenz im Vergleich mit der Zelllinie H12.1 auf. Im Bereich der  $IC_{50}$  offenbarte sich eine ca. 3-fache bis 4-fache CDDP-Resistenz der 1411HP gegenüber der H12.1. Für den neuen Platinkomplex THP-12 wurden unabhängig von der Expositionszeit in beiden Zelllinien im Vergleich mit CDDP geringere  $IC_{90}$  und zudem in der Zelllinie 1411HP ebenso geringere  $IC_{50}$  bestimmt. Die hohe zytotoxische Aktivität von THP-12 korrelierte mit der Fähigkeit der Substanz zur Überwindung der CDDP-Resistenz der 1411HP-Zellen. Interessanterweise resultierte sowohl eine Exposition beider Zelllinien mit THP-12 als auch eine Verwendung gleicher Behandlungszeiten von 2 h, 24 h oder 96 h gemäß eines 2 h-, 24 h- oder 96 h-Behandlungsschemas in nahezu gleichen  $IC_{50}$  und  $IC_{90}$ . In Tab. 6 wurden die  $IC_{50}$

und die IC<sub>90</sub> der Substanzen gemäß eines 2 h-, 24 h- oder 96 h-Behandlungsschemas und die sich ergebenden Resistenzfaktoren zusammenfassend gegenübergestellt.

	<i>H12.1</i>	<i>1411HP</i>	<i>Resistenzfaktor</i>	<i>α</i>
CDDP IC <sub>50</sub> [μM] 2 h	7,7 ± 1,6	31,7 ± 2,9	4,1	< 0,001
CDDP IC <sub>50</sub> [μM] 24 h	0,8 ± 0,2	2,8 ± 1,1	3,5	> 0,05
CDDP IC <sub>50</sub> [μM] 96 h	0,8 ± 0,1	2,4 ± 0,4	3,0	> 0,05
THP-12 IC <sub>50</sub> [μM] 2 h	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,9	> 0,05
THP-12 IC <sub>50</sub> [μM] 24 h	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,4	0,9	> 0,05
THP-12 IC <sub>50</sub> [μM] 96 h	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,9	> 0,05

	<i>H12.1</i>	<i>1411HP</i>	<i>Resistenzfaktor</i>	<i>α</i>
CDDP IC <sub>90</sub> [μM] 2 h	27,3 ± 2,3	85,0 ± 5,0	3,1	< 0,001
CDDP IC <sub>90</sub> [μM] 24 h	3,5 ± 1,2	9,1 ± 2,6	2,6	> 0,05
CDDP IC <sub>90</sub> [μM] 96 h	2,6 ± 0,5	7,0 ± 0,2	2,7	> 0,05
THP-12 IC <sub>90</sub> [μM] 2 h	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	1,0	> 0,05
THP-12 IC <sub>90</sub> [μM] 24 h	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	0,96	> 0,05
THP-12 IC <sub>90</sub> [μM] 96 h	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	1,0	> 0,05

Tab. 6: IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub> [μM] von THP-12 und von CDDP gemäß eines 2 h-, 24 h- oder 96 h-Behandlungsschemas in der CDDP-sensitiven TKZT-Zelllinie H12.1 und in der CDDP-resistenten TKZT-Zelllinie 1411HP; Analyse 96 h nach Behandlungsbeginn; n ≥ 3; Resistenzfaktor 1411HP/H12.1.

<i>Substanz</i>	<i>CDDP</i>	<i>THP-12</i>	<i>ES</i>	<i>α</i>	<i>CDDP</i>	<i>THP-12</i>	<i>ES</i>	<i>α</i>
<i>Zelllinie</i>	<i>IC<sub>50</sub> [μM] 2 h</i>				<i>IC<sub>90</sub> [μM] 2 h</i>			
H12.5	3,4 ± 1,4	1,8 ± 0,1	1,9	> 0,05	16,3 ± 3,5	2,5 ± 0,03	6,5	< 0,001
833KE	2,8 ± 0,8	1,4 ± 0,1	2,0	> 0,05	16,7 ± 3,2	2,4 ± 0,1	7,0	< 0,001
2102EP	3,7 ± 0,1	1,8 ± 0,03	2,1	< 0,05	14,3 ± 1,5	2,8 ± 0,1	5,1	< 0,001
577MF	5,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	4,2	> 0,05	25,3 ± 7,8	2,3 ± 0,1	11,0	< 0,001
1777NRpmet	12,4 ± 5,4	1,7 ± 0,1	7,3	< 0,001	> 100,0	2,5 ± 0,1	> 40,0	< 0,001

<i>Substanz</i>	<i>CDDP</i>	<i>THP-12</i>	<i>ES</i>	<i>α</i>	<i>CDDP</i>	<i>THP-12</i>	<i>ES</i>	<i>α</i>
<i>Zelllinie</i>	<i>IC<sub>50</sub> [μM] 96 h</i>				<i>IC<sub>90</sub> [μM] 96 h</i>			
H12.5	0,6 ± 0,1	1,8 ± 0,03	0,3	> 0,05	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,03	0,6	> 0,05
833KE	0,2 ± 0,02	1,5 ± 0,2	0,1	> 0,05	1,4 ± 0,4	2,4 ± 0,1	0,6	> 0,05
2102EP	0,5 ± 0,04	1,7 ± 0,1	0,3	> 0,05	1,1 ± 0,2	2,7 ± 0,2	0,4	> 0,05
577MF	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,8	> 0,05	2,5 ± 0,6	1,8 ± 0,7	1,4	> 0,05
1777NRpmet	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,9	> 0,05	8,2 ± 1,6	2,5 ± 0,1	3,3	> 0,05

Tab. 7: IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub> [μM] von THP-12 und von CDDP gemäß eines 2 h- oder 96 h-Behandlungsschemas in fünf weiteren TKZT-Zelllinien mit unterschiedlicher CDDP-Sensitivität; Analyse 96 h nach Behandlungsbeginn; n = 3; ES – Effizienzsteigerung durch THP-12 im Vergleich mit CDDP.



Für eine nähere zytotoxische Charakterisierung von THP-12 wurden die Studien auf fünf weitere TKZT-Zelllinien mit unterschiedlicher CDDP-Sensitivität ausgeweitet (Tab. 7). Nach einer Exposition der Zellen für 2 h gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas ließen sich in allen Zelllinien geringere  $IC_{50}$  und  $IC_{90}$  für THP-12 im Vergleich mit CDDP nachweisen. THP-12 zeigte somit in allen TKZT-Zelllinien bei Einsatz eines 2 h-Behandlungsschemas eine höhere Zytotoxizität. Bei Verwendung eines 96 h-Behandlungsschemas wurden hingegen nur in der für CDDP intrinsisch intermediär resistenten Zelllinie 577MF und der intrinsisch resistenten Zelllinie 1777NRpmet geringere  $IC_{90}$  für THP-12 im Vergleich mit CDDP bestimmt.

### 3.1.2 Bestimmung der $IC_{50}/IC_{90}$ in humanen Zelllinien anderer solider Tumoren

Die zytotoxische Aktivität von THP-12 sollte nachfolgend in weiteren 14 Zelllinien anderer solider Tumoren analysiert werden (Tab. 8). Die Verwendung eines 2 h-Behandlungsschemas führte zu einem differenziellen Ansprechen der Zellen auf die Substanz. Insbesondere die Zelllinien A549 (Bronchial-), A2780 (Ovarial-), A431 (Zervix-) und A253 (Kopf-Hals-Karzinom) wiesen eine den TKZT-Zelllinien vergleichbare Sensitivität für THP-12 auf. Darüber hinaus wurde bei einem Vergleich der  $IC_{50}$  und der  $IC_{90}$  beider Platinsubstanzen eine dem CDDP überlegene zytotoxische Effizienz von THP-12 in allen 14 Zelllinien deutlich.

Substanz	CDDP	THP-12	ES	$\alpha$	CDDP	THP-12	ES	$\alpha$
Zelllinie	$IC_{50} [\mu M] 2 h$				$IC_{90} [\mu M] 2 h$			
A549	14,7 ± 1,2	1,7 ± 0,1	8,6	< 0,001	31,3 ± 1,5	2,5 ± 0,00	12,5	< 0,001
A2780	6,1 ± 0,7	1,7 ± 0,03	3,6	< 0,01	23,3 ± 1,5	2,5 ± 0,00	9,3	< 0,001
A431	5,3 ± 0,4	1,8 ± 0,1	2,9	> 0,05	15,3 ± 2,5	2,5 ± 0,00	6,1	< 0,001
A253	6,6 ± 0,7	1,7 ± 0,03	3,9	< 0,001	21,5 ± 1,3	2,7 ± 0,1	8,0	< 0,001
SW480	31,3 ± 1,2	1,8 ± 0,00	17,4	< 0,001	> 100,0	2,9 ± 0,1	> 34,5	< 0,001
518A2	17,2 ± 0,3	1,9 ± 0,1	9,1	< 0,001	35,7 ± 4,0	3,9 ± 0,5	9,2	< 0,001
SW1736	29,0 ± 6,2	2,2 ± 0,1	13,2	< 0,001	> 100,0	6,4 ± 0,4	> 15,6	< 0,001
FaDu	9,3 ± 0,8	2,5 ± 0,3	3,7	< 0,01	29,0 ± 3,6	7,7 ± 0,7	3,8	< 0,001
8505C	45,0 ± 10,0	2,8 ± 0,7	16,1	< 0,001	> 100,0	7,9 ± 0,9	12,7	< 0,001
HCT8	15,5 ± 3,0	3,9 ± 0,6	4,0	< 0,001	> 100,0	8,4 ± 0,5	11,9	< 0,001
HT29	19,7 ± 0,6	3,5 ± 0,7	5,6	< 0,001	> 100,0	9,0 ± 1,3	11,1	< 0,001
MCF7	12,0 ± 3,5	2,3 ± 0,6	5,2	< 0,05	> 100,0	12,0 ± 4,1	> 8,3	< 0,001
DLD1	33,3 ± 2,9	4,9 ± 1,7	6,8	< 0,001	95,0 ± 4,4	20,1 ± 7,4	4,7	< 0,001
M2	29,0 ± 5,0	7,3 ± 0,3	4,0	< 0,01	89,0 ± 5,3	21,0 ± 6,1	4,2	< 0,001

Tab. 8:  $IC_{50}$  und  $IC_{90}$  [ $\mu M$ ] von THP-12 und von CDDP gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas in 14 Zelllinien anderer solider Tumoren mit unterschiedlicher CDDP-Sensitivität; Analyse 96 h nach Behandlungsbeginn; n = 3; ES – Effizienzsteigerung durch THP-12 im Vergleich mit CDDP.

### 3.1.3 Bestimmung der $IC_{50}/IC_{90}$ in hMSC

Für eine Klärung der Fragestellung, inwieweit THP-12 eine selektive Zytotoxizität in Tumorzellen aufweist, sollte im Weiteren die Aktivität in primären nichtmalignen hMSC untersucht werden (Tab. 9). Bei Verwendung eines 2 h-Behandlungsschemas konnten für CDDP und für THP-12 bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M keine  $IC_{90}$  bestimmt werden. Dies korrelierte mit der nahezu fehlenden Zytotoxizität der beiden Substanzen in diesen Zellen.

Substanz	CDDP	THP-12	ES	$\alpha$	CDDP	THP-12	ES	$\alpha$
Zelllinie	$IC_{50}$ [ $\mu$ M] 2 h				$IC_{90}$ [ $\mu$ M] 2 h			
hMSC	> 100,0	7,8 $\pm$ 2,4	12,8	< 0,001	> 100,0	> 100,0	-	-

Tab. 9:  $IC_{50}$  und  $IC_{90}$  [ $\mu$ M] von THP-12 und CDDP gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas in hMSC; Analyse 96 h nach Behandlungsbeginn; n = 3; ES – Effizienzsteigerung durch THP-12 im Vergleich mit CDDP.

### 3.1.4 Zytotoxische Langzeiteffekte von THP-12 und von CDDP

Um eine Evaluierung des Neuwachstums der Zellen nach einer vorangegangenen Behandlung mit THP-12 und mit CDDP zu erfassen, wurden Langzeit-Zytotoxizitäts-Studien mit den TKZT-Zelllinien H12.1 und 1411HP durchgeführt (Abb. 14).

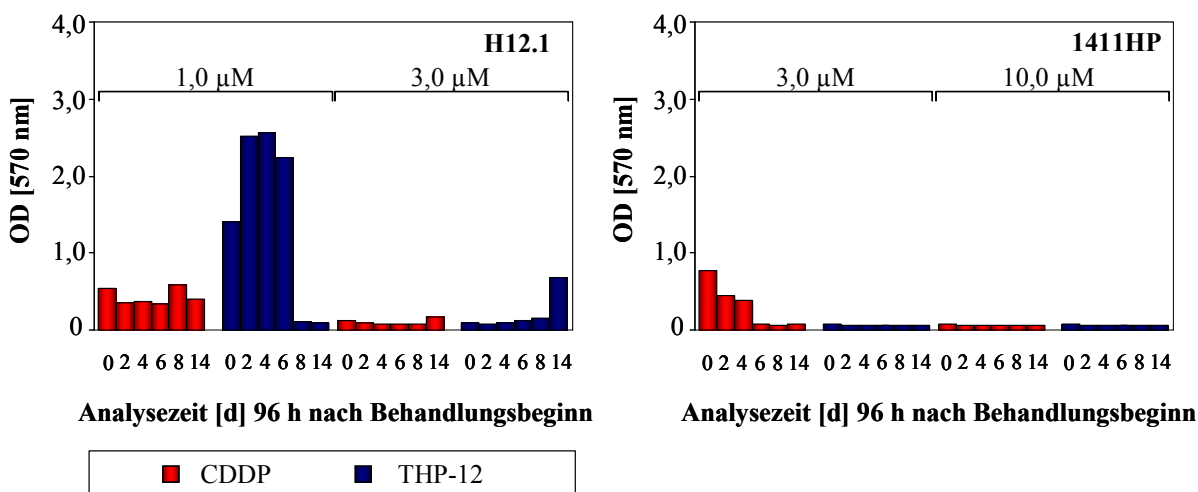


Abb. 14: Neuwachstum von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß eines 96 h-Behandlungsschemas und einer nachfolgenden Kultivierung in Zytostatika-freiem Medium; Analyse 96 h nach Behandlungsbeginn + 0 d, + 2 d, + 4 d, + 6 d, + 8 d und + 14 d; dargestellt anhand der mittels SRB-Langzeit-Zytotoxizitäts-Assay erfassten OD-Werte; x; repräsentatives Beispiel von 3 Versuchen.

Eine Exposition beider Zelllinien mit CDDP gemäß eines 96 h-Behandlungsschemas und eine nachfolgende Kultivierung in Zytostatika-freiem Medium rief eine anhaltende Hemmung des

Neuwachstums der Zellen über die Analysezeit von 14 d hervor. Dabei nahm die Zytotoxizität von CDDP insbesondere in den Zellen der resistenten 1411HP im Bereich der  $IC_{50}$  ( $3,0 \mu\text{M}$ ) mit zunehmender Zeit zu. Bei einer Behandlung von H12.1-Zellen mit THP-12 im Bereich der  $IC_{90}$  ( $3,0 \mu\text{M}$ ) wurde hingegen ein Anstieg des Zellneuwachstums im zeitlichen Verlauf sichtbar. Dieser Effekt war in 1411HP-Zellen unter THP-12 nicht zu beobachten. Die hohe Zytotoxizität von THP-12 schien daher mit einer eher kurzfristigen Wirkung in den Zellen der sensitiven H12.1 verbunden zu sein. Es gilt zu berücksichtigen, dass die geringen OD-Werte der H12.1-Proben an d 8 und d 14 nach einer Behandlung mit  $1,0 \mu\text{M}$  THP-12 auf die hohe Proliferationsrate der Zellen und den methodisch bedingten Verlust der Anhaftung an den Mikrotiterplatten und nicht auf die zytotoxische Wirkung der Substanz zurückzuführen sind.

### 3.1.5 Zytotoxische Aktivitäten der strukturellen Bestandteile von THP-12

Eine Bindung der Zytotoxizität von THP-12 an die Gesamtstruktur des Moleküls wurde über eine Analyse der Referenzsubstanzen erbracht (Abb. 15). Die Platinsubstanz  $\text{HO}(\text{CH}_2)_{11}\text{PtCl}_2$ , die Verbindung  $\text{THP}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$  und das Lösungsmittel DMF zeigten bei einer Exposition der H12.1- und 1411HP-Zellen gemäß eines 96 h-Behandlungsschemas keine dem THP-12 vergleichbaren Zytotoxizitäten. Eine simultane Behandlung der Zellen mit  $\text{THP}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$  und CDDP rief zudem eine Wirkung hervor, die einer alleinigen CDDP-Exposition entsprach.

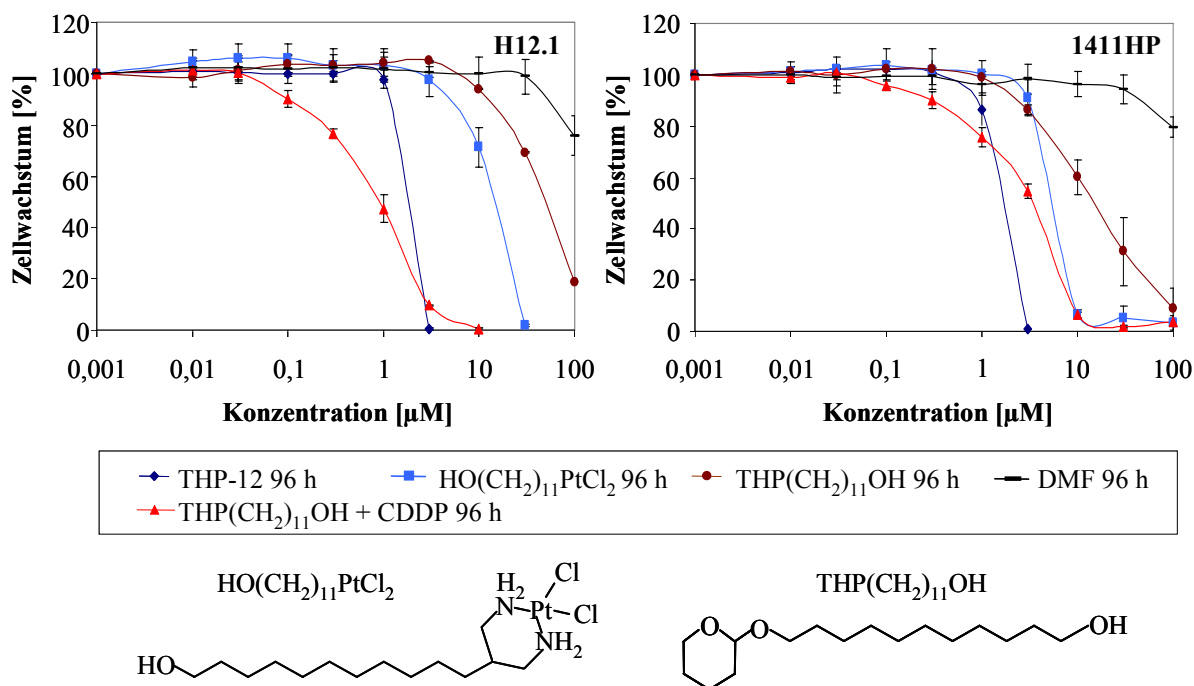


Abb. 15: Zellwachstum von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder Referenzsubstanzen gemäß eines 96 h-Behandlungsschemas; Analyse 96 h nach Behandlungsbeginn;  $x \pm \text{SD}$ ,  $n = 3$ .

### 3.1.6 Erstellte Behandlungsschemata

Alle nachfolgenden Studien zur Charakterisierung von THP-12 wurden vorrangig im TKZT-Modell der CDDP-sensitiven Zelllinie H12.1 und der CDDP-resistenten Zelllinie 1411HP im Vergleich mit CDDP durchgeführt. Gegebenenfalls wurden das Kolonkarzinom-Modell der CDDP-resistenten Zelllinien SW480 und DLD1 und das Kopf-Hals-Karzinom-Modell der CDDP-sensitiven Zelllinien A253 und FaDu als Vergleich hinzugezogen. In den Testungen wurden sowohl äquimolare Konzentrationen der Substanzen (gemäß den Konzentrationen gleicher Molarität) als auch äquitoxische Konzentrationen (gemäß den Konzentrationen gleicher zytotoxischer Wirkung) eingesetzt. Für eine Exposition der Zellen mit äquitoxischen Konzentrationen wurden zwei *Behandlungsschemata* (*I* und *II*) verwendet, die die auf dem SRB-Zytotoxizitäts-Assay basierenden verschiedenen Expositionszeiten und die ermittelten  $IC_{90}$  berücksichtigen. Im *Behandlungsschema I* wurden die Zellen mit THP-12 oder mit CDDP für 2 h exponiert, nachfolgend mit PBS gespült und bis zum Analysezeitpunkt mit Zytostatika-freiem Medium inkubiert. Das *Behandlungsschema II* beinhaltete die kontinuierliche Exposition der Zellen mit THP-12 oder mit CDDP bis zum gewählten Analysezeitpunkt. In *Tab. 10* sind die gewählten Behandlungsschemata mit den Konzentrationen dargestellt:

Behandlungsschemata	<i>H12.1</i>	<i>1411HP</i>	<i>H12.1</i>	<i>1411HP</i>
	<i>CDDP</i> [ $\mu\text{M}$ ] <i>Schema</i>		<i>THP-12</i> [ $\mu\text{M}$ ] <i>Schema</i>	
<i>Behandlungsschema I</i> ( $IC_{90}$ 2 h)	$30^I$	$100^I$	$2,5^I$	$2,5^I$
<i>Behandlungsschema II</i> ( $IC_{90}$ 96 h)	$3^{II}$	$10^{II}$	$2,5^{II}$	$2,5^{II}$

Tab. 10: Verwendete Behandlungsschemata (*Schema I* 2 h-Exposition, *Schema II* kontinuierliche Exposition) für alle folgenden Analysen zur Charakterisierung von THP-12 im Vergleich mit CDDP.

Es gilt zu erklären, dass bei der Festlegung der  $IC_{90}$  von CDDP bereits in der Arbeitsgruppe bestehende CDDP-Daten berücksichtigt wurden. So löste eine Behandlung der resistenten 1411HP mit  $85 \mu\text{M}$  CDDP (ermittelter  $IC_{90}$  gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas) und mit  $100 \mu\text{M}$  CDDP (verwendeter  $IC_{90}$  gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas) im Hinblick auf die mechanistischen Analysen gleiche zytotoxische Effekte aus und wurde somit äquivalent verwendet. Zudem wurden für THP-12 trotz gleicher  $IC_{90}$  beide Behandlungsschemata eingesetzt, da die Daten gemäß dem SRB-Zytotoxizitäts-Assay Endpunktmessungen nach 96 h repräsentieren, wohingegen alle funktionellen Analysen innerhalb von 24 h nach Expositionsbeginn durchgeführt wurden. Dies ist relevant, da die initialen Mechanismen zur Zelltodauslösung bei beiden Behandlungsschemata differieren können.

## 3.2 Analyse der Art des THP-12- und des CDDP-vermittelten Zelltodes

### 3.2.1 Mikroskopische Aufnahmen

Basierend auf dem hohen zytotoxischen Potential von THP-12 sollte im Weiteren die Art des induzierten Zelltodes im Vergleich mit CDDP analysiert werden. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* exponiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mikroskopisch analysiert. Repräsentativ wurden Aufnahmen von CDDP 24 h nach Behandlungsbeginn und von THP-12 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn dargestellt (*Abb. 16*).

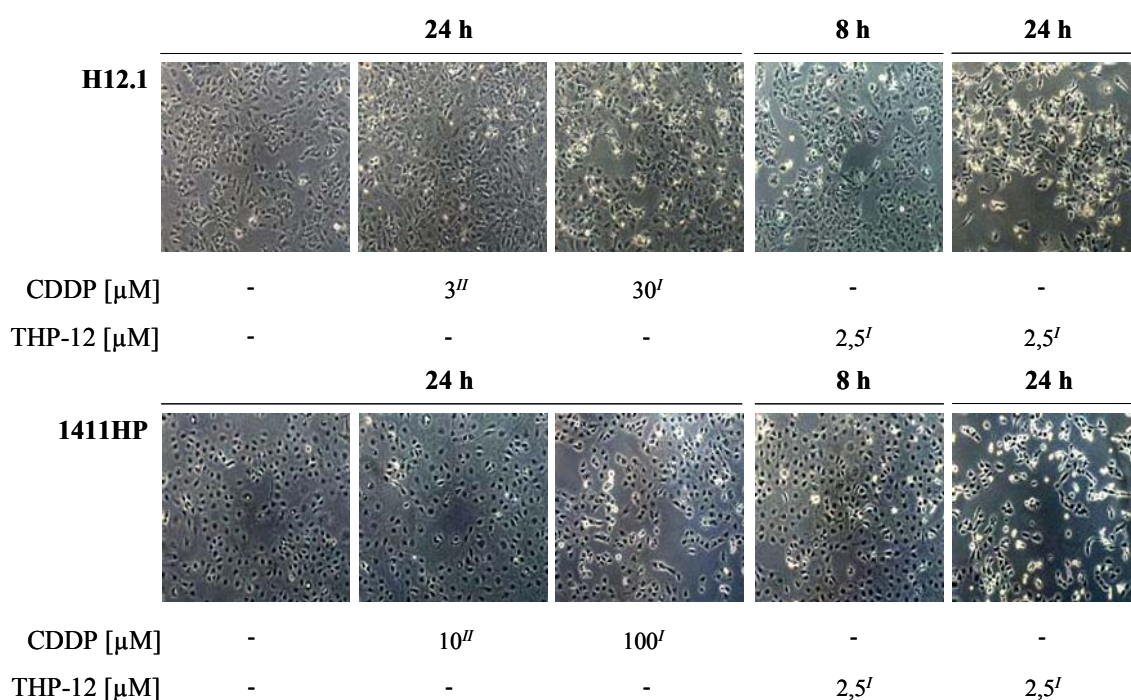


Abb. 16: Bildung von flotierenden H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II*; Analyse 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentative Beispiele von  $\geq 3$  Versuchen; Phasenkontrast; Vergrößerung 100-fach.

Bei einer Behandlung beider Zelllinien mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema II* wurde 24 h nach Behandlungsbeginn eine moderate Bildung von flotierenden Zellen beobachtet. Die Behandlung mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* führte zu einer stärkeren Bildung von flotierenden Zellen. Eine Exposition mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema I* resultierte im Vergleich mit CDDP in beiden Zelllinien in einem deutlich erhöhten Trend zur Formierung von flotierenden Zellen, der bereits 8 h nach Behandlungsbeginn sichtbar wurde. 24 h nach Behandlungsbeginn zeigten lediglich ca. 40 % bis 50 % der H12.1-Zellen und ca. 20 % bis 30 % der 1411HP-Zellen Adhärenz. Die flotierenden Zellen wurden nachfolgend drei standardisierten Methoden zur Unterscheidung von Apoptose und Nekrose zugeführt.

### 3.2.2 Analyse des apoptotischen Zelltodes mittels Trypanblau-Ausschluss-Test

Der Trypanblau-Ausschluss-Test basiert auf der temporären Fähigkeit apoptotischer Zellen mit intakter Zellmembran, Trypanblau im Gegensatz zu nekrotischen, membrangeschädigten Zellen ausschließen zu können. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit THP-12 oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* exponiert und die gebildeten flotierenden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Zugabe des Farbstoffes mikroskopisch analysiert. Repräsentativ wurden Aufnahmen von CDDP 24 h nach Behandlungsbeginn und von THP-12 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn dargestellt (*Abb. 17*).

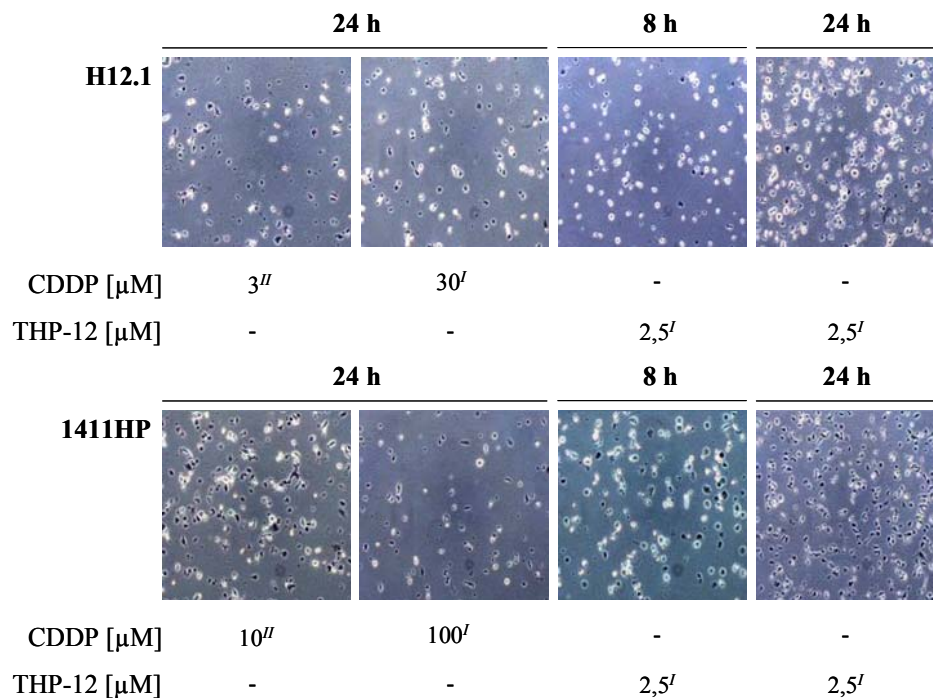


Abb. 17: Ausschluss des Farbstoffes Trypanblau durch flotierende H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II*; Analyse 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentative Beispiele von  $\geq 3$  Versuchen; Phasenkontrast; Vergrößerung 100-fach.

Bei beiden Zelllinien wurde nach einer Behandlung mit CDDP oder mit THP-12 gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* ein hoher Anteil an ungefärbten, flotierenden Zellen sichtbar. Die fehlende Färbung der Zellen ließ einen apoptotischen Zelltod vermuten. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass eine fortschreitende Degenerierung der Zellen in einem späten Stadium der Apoptose *in vitro* eine Rissbildung der Zellmembranen und eine dadurch bedingte Durchlässigkeit für Vitalfarbstoffe hervorrufen kann. Dieser Vorgang wurde insbesondere in THP-12-exponierten 1411HP-Zellen 24 h nach Behandlungsbeginn sichtbar und kann durch die frühzeitige Bildung der flotierenden Zellen erklärt werden.

### 3.2.3 Analyse des apoptotischen Zelltodes mittels DNA-Fragmentierungs-Assay

Zur Bestätigung einer Induktion von Apoptose durch THP-12 und durch CDDP wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema II* exponiert und die DNA der flotierenden Zellen 24 h nach Behandlungsbeginn untersucht. Wie *Abb. 18* veranschaulicht, zeigte die DNA der sowohl unter CDDP als auch der unter THP-12 gebildeten flotierenden Zellen das für Apoptose typische Muster der DNA-Fragmentierung.

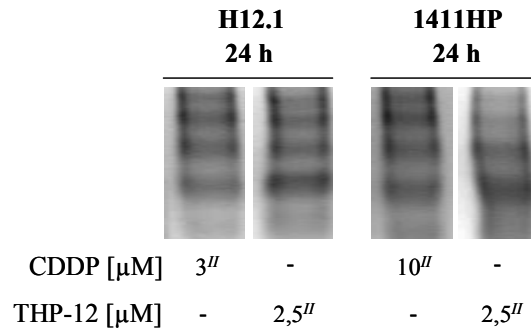


Abb. 18: DNA-Fragmentierung in flotierenden H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema II*; Analyse 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentatives Beispiel von 3 Versuchen.

### 3.2.4 Analyse des apoptotischen Zelltodes mittels PARP-Spaltung

Die Auslösung von Apoptose durch THP-12 wurde ferner über eine Analyse der Spaltung von PARP bestätigt. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit THP-12 oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* exponiert und die gebildeten flotierenden Zellen 24 h nach Behandlungsbeginn untersucht (*Abb. 19*). In beiden Zelllinien konnte das im Verlauf der Apoptose gebildete Spaltungsfragment p-85 von PARP nachgewiesen werden.

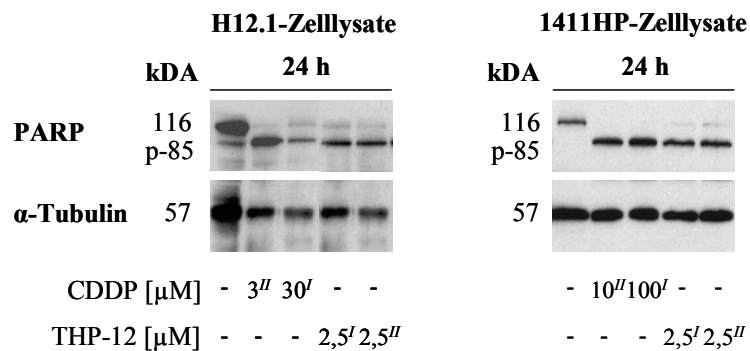


Abb. 19: PARP-Spaltung in Kontrollzellen und in flotierenden H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II*; Analyse 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentatives Beispiel von 2 Versuchen;  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle.



### 3.3 Analyse der zellulären Akkumulationen von THP-12 und von CDDP

#### 3.3.1 Zelluläre Platinakkumulationen äquimolarer Konzentrationen

Basierend auf der hohen zytotoxischen Aktivität von THP-12 sollte im Folgenden die zelluläre Platinakkumulation der Verbindung im Vergleich mit CDDP analysiert werden. Hierfür wurde zunächst die Anreicherung einer äquimolaren Konzentration beider Substanzen in H12.1- und 1411HP-Zellen über einen zeitlichen Verlauf von 2 h untersucht. Es wurde eine Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  gewählt, die der  $\text{IC}_{90}$  von CDDP in der sensitiven Zelllinie H12.1 gemäß dem *Behandlungsschema I* entspricht (siehe 3.1.6 S. 52). Eine Exposition beider Zelllinien mit THP-12 führte zu einer gegenüber CDDP schnelleren und stärkeren zellulären Platinanreicherung über die Zeit (Abb. 20A). 2 h nach Behandlungsbeginn mit CDDP wurden annähernd gleiche Konzentrationen in den Zellen der sensitiven H12.1 ( $33,7 \pm 5,5$  ppm) und in den Zellen der resistenten 1411HP ( $36,7 \pm 12,3$  ppm) bestimmt (Abb. 20B). Dies lässt die Vermutung zu, dass die CDDP-Resistenz der 1411HP-Zellen nicht durch eine verminderte Aufnahme der Substanz in diese Zellen bedingt wird. Die Exposition mit THP-12 resultierte 2 h nach Behandlungsbeginn in einer 20,7-fach (H12.1  $698,0 \pm 42,9$  ppm,  $\alpha < 0,001$ ) bzw. in einer 26,9-fach (1411HP  $988,7 \pm 62,5$  ppm,  $\alpha < 0,001$ ) höheren zellulären Akkumulation von Platin im Vergleich mit CDDP. Darüber hinaus wurde eine 1,4-fach stärkere Anreicherung von THP-12 in den Zellen der resistenten 1411HP im Vergleich mit denen der sensitiven H12.1 beobachtet ( $\alpha < 0,001$ ; Abb. 20B).

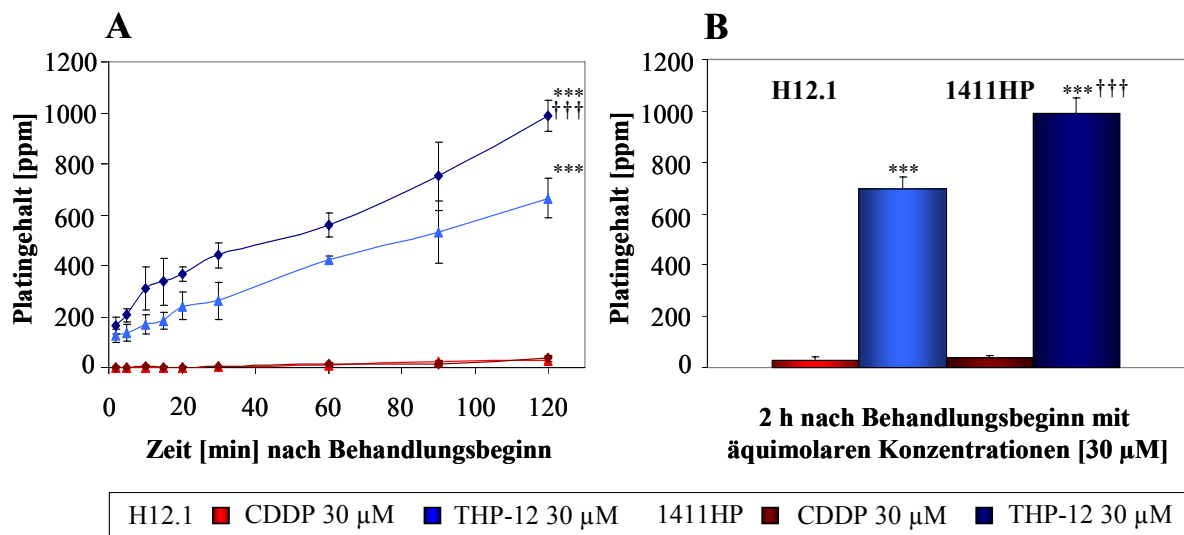


Abb. 20: Platinakkumulation in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit 30  $\mu\text{M}$  THP-12 oder CDDP; Analyse im zeitlichen Verlauf über 2 h (A) bzw. 2 h nach Behandlungsbeginn (B);  $x \pm \text{SD}$ ;  $n = 3$ ; \*\*\* signif. zu CDDP-behandelten Zellen nach 2 h  $\alpha < 0,001$ ; ††† signif. zu THP-12-behandelter H12.1 nach 2 h  $\alpha < 0,001$ .



Für eine weitere Analyse der zellulären Akkumulation von THP-12 wurden die Testungen auf das Kolonkarzinom-Modell der intrinsisch CDDP-resistenten Zelllinien SW480 und DLD1 und das Kopf-Hals-Karzinom-Modell der CDDP-sensitiven Zelllinien A253 und FaDu ausgeweitet (Abb. 21). Eine Exposition der SW480- und der DLD1-Zellen mit 30  $\mu$ M CDDP resultierte 2 h nach Behandlungsbeginn in einer nahezu gleichen Anreicherung von Platin in beiden Zelllinien (SW480  $30,4 \pm 8,2$  ppm; DLD1  $30,3 \pm 11,7$  ppm; Abb. 21A). Eine Behandlung mit 30  $\mu$ M THP-12 bewirkte 2 h nach Behandlungsbeginn erneut eine höhere zelluläre Platinakkumulation im Vergleich mit CDDP (SW480 24,3-fach,  $738,0 \pm 71,8$  ppm,  $\alpha < 0,001$ ; DLD1 15,6-fach,  $474,0 \pm 26,8$  ppm,  $\alpha < 0,001$ ). Die 1,6-fach höhere Akkumulation von THP-12 in SW480-Zellen im Vergleich mit DLD1-Zellen ( $\alpha < 0,001$ ) korrelierte mit der höheren Sensitivität dieser Zellen gegenüber der Substanz (siehe auch Tab. 8 S. 49). 2 h nach Behandlungsbeginn der Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien A253 und FaDu mit 30  $\mu$ M CDDP wurde eine 1,3-fach höhere Akkumulation in FaDu-Zellen ( $52,2 \pm 9,0$  ppm) im Vergleich mit A253-Zellen ( $39,5 \pm 7,6$  ppm) detektiert (Abb. 21B). Eine Zugabe von 30  $\mu$ M THP-12 führte 2 h nach Behandlungsbeginn wiederholt zu einer höheren Platinanreicherung im Vergleich mit CDDP (A253 13,9-fach,  $550,0 \pm 41,1$  ppm,  $\alpha < 0,001$ ; FaDu 16,5-fach,  $861,0 \pm 86,7$  ppm,  $\alpha < 0,001$ ). Die 1,6-fach höhere Akkumulation von THP-12 in den Zellen der FaDu im Vergleich mit denen der A253 ( $\alpha < 0,001$ ) korrelierte jedoch nicht mit der Sensitivität der Zellen gegenüber der Substanz (siehe auch Tab. 8 S. 49).

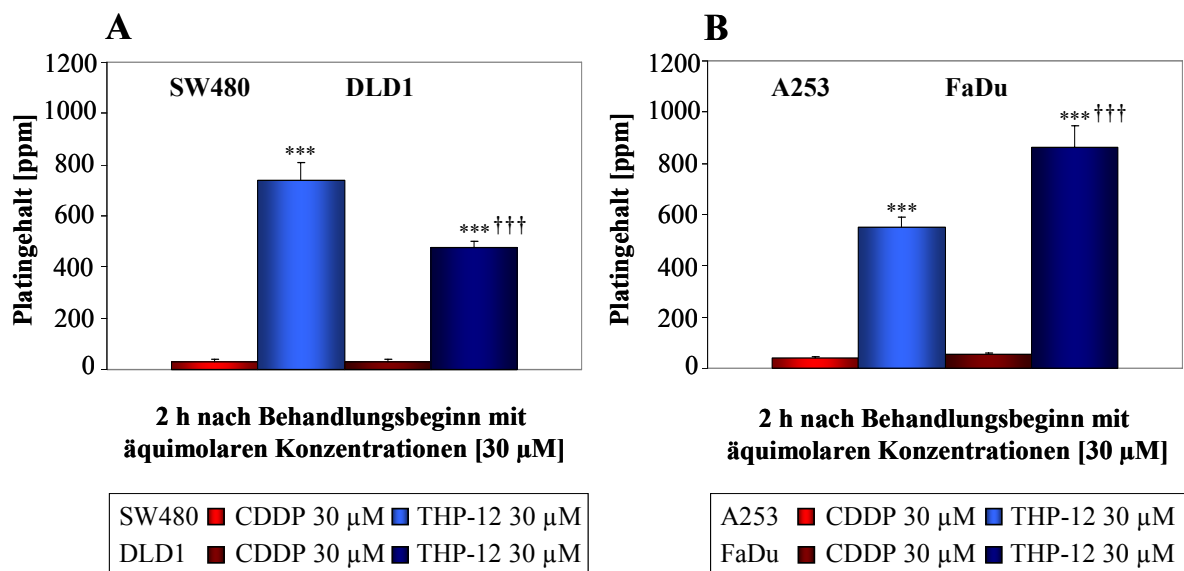


Abb. 21: Platinakkumulation in SW480- und DLD1-Zellen (A) und in A253- und FaDu-Zellen (B) nach einer Behandlung mit 30  $\mu$ M THP-12 oder CDDP; Analyse 2 h nach Behandlungsbeginn;  $x \pm SD$ ;  $n \geq 4$ ; \*\*\* signif. zu CDDP-behandelten Zellen  $\alpha < 0,001$ ; ††† signif. zu THP-12-behandelten Zellen der SW480 bzw. der A253  $\alpha < 0,001$ .

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob die nahezu fehlende Zytotoxizität von THP-12 in den primären nichtmalignen hMSC (siehe auch Tab. 9 S. 50) mit einer verminderten Platinakkumulation der Substanz in diesen Zellen einhergeht. 2 h nach Behandlungsbeginn mit jeweils 30  $\mu\text{M}$  THP-12 oder CDDP wurde erneut eine stärkere Anreicherung von THP-12 (9,3-fach,  $542,0 \pm 81,0$  ppm) in hMSC im Vergleich mit CDDP ( $58,5 \pm 30,9$  ppm,  $\alpha < 0,01$ ) sichtbar (Abb. 22). Diese Daten zeigen, dass die fehlende Zytotoxizität von THP-12 nicht auf eine verminderte Akkumulation in diesen Zellen zurückzuführen ist.

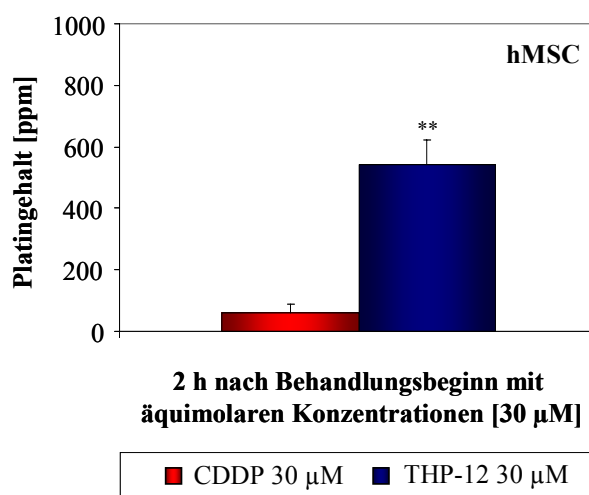


Abb. 22: Platinakkumulation in hMSC nach einer Behandlung mit 30  $\mu\text{M}$  THP-12 oder CDDP; Analyse 2 h nach Behandlungsbeginn;  $\bar{x} \pm \text{SD}$ ;  $n = 3$ ; \*\* signif. zu CDDP-behandelten Zellen  $\alpha < 0,01$ .

### 3.3.2 Zelluläre Platinakkumulationen äquitoxischer Konzentrationen

Zur Analyse der zellulären Akkumulationen äquitoxischer Konzentrationen von THP-12 und von CDDP wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert und über einen zeitlichen Verlauf von 2 h untersucht (Abb. 23). Die Behandlung beider Zelllinien mit THP-12 führte erneut zu einer gegenüber CDDP schnelleren und stärkeren Platinakkumulation über die Zeit (Abb. 23A). 2 h nach Behandlungsbeginn mit CDDP wurde eine 2,9-fach höhere Platinakkumulation in 1411HP-Zellen ( $96,7 \pm 19,7$  ppm) im Vergleich mit H12.1-Zellen ( $33,7 \pm 5,5$  ppm) nachgewiesen. Diese 2,9-fach höhere Platinanreicherung korrelierte mit der eingesetzten, 3,3-fach höheren CDDP-Konzentration gemäß dem *Behandlungsschema I* (Abb. 23B). Eine Exposition mit THP-12 bewirkte 2 h nach Behandlungsbeginn eine 6,7-fach (H12.1  $226,7 \pm 70,5$  ppm,  $\alpha < 0,01$ ) bzw. eine 4,4-fach (1411HP  $427,7 \pm 56,5$  ppm,  $\alpha < 0,001$ ) höhere Platinakkumulation im Vergleich mit CDDP. Zudem wurde eine selektiv 1,9-fach stärkere Akkumulation von THP-12 in den Zellen der resistenten 1411HP gegenüber denen der sensitiven H12.1 ( $\alpha < 0,01$ ) bestimmt (Abb. 23B).

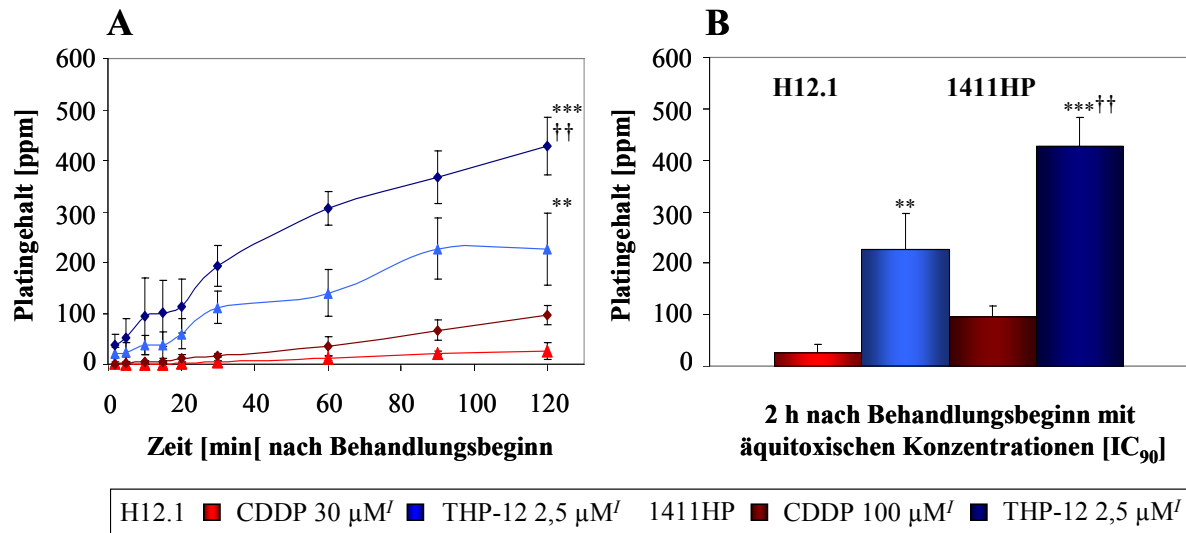


Abb. 23: Platinakkumulation in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I*; Analyse im zeitlichen Verlauf über 2 h (A) bzw. 2 h nach Behandlungsbeginn (B);  $x \pm SD$ ;  $n = 3$ ; \*\* signif. zu CDDP-behandelter H12.1 nach 2 h  $\alpha < 0,01$ ; \*\*\* signif. zu CDDP-behandelter 1411HP nach 2 h  $\alpha < 0,001$ ; †† signif. zu THP-12-behandelter H12.1 nach 2 h  $\alpha < 0,01$ .

### 3.3.3 Zelluläre Platinakkumulationen höherer CDDP-Konzentrationen

Mit dem Ziel, die für THP-12 nachgewiesene, hohe zelluläre Platinakkumulation durch eine Behandlung mit CDDP zu reproduzieren, wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit einer CDDP-Überkonzentration exponiert. Basierend auf den CDDP-Akkumulationsdaten gemäß dem *Behandlungsschema I* (Abb. 23B) wurden eine CDDP-Konzentration von 200 µM und eine THP-12-Konzentration von 2,5 µM ausgewählt (Abb. 24). 2 h nach Behandlungsbeginn mit CDDP wurden erneut ähnlich hohe Platinkonzentrationen in beiden Zelllinien bestimmt (H12.1  $177,6 \pm 48,4$  ppm; 1411HP  $221,1 \pm 45,5$  ppm). Die 5,3-fach (H12.1) bzw. 2,3-fach (1411HP) höheren Anreicherungen unter 200 µM CDDP korrelierten mit den eingesetzten, 6,7-fach (H12.1 30 µM) bzw. 2,0-fach (1411HP 100 µM) höheren Konzentrationen. Ferner ließ sich die unter THP-12 in den H12.1-Zellen bestimmte Akkumulation ( $207,9 \pm 63,4$  ppm) durch eine Behandlung mit 200 µM CDDP weitgehend simulieren. In 1411HP-Zellen rief eine Exposition mit 200 µM CDDP demgegenüber eine 1,5-fach verminderte Platinakkumulation im Vergleich mit 2,5 µM THP-12 ( $330,8 \pm 77,7$  ppm) hervor. In der resistenten Zelllinie konnte die THP-12-initiierte Anreicherung somit trotz einer eingesetzten, 80-fach höheren CDDP-Konzentration nicht reproduziert werden. Darüber hinaus wurde erneut selektiv mehr Platin unter THP-12 in den Zellen der resistenten 1411HP im Vergleich mit denen der sensitiven H12.1 (1,6-fach,  $\alpha < 0,01$ ) akkumuliert.

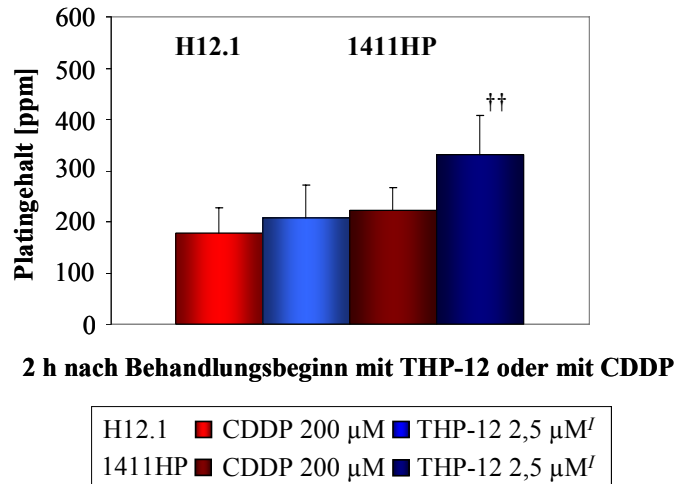


Abb. 24: Platinakkumulation in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit 2,5 µM THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema I* oder mit einer Überkonzentration CDDP von 200 µM; Analyse 2 h nach Behandlungsbeginn; x + SD; n ≥ 3; †† signif. zu THP-12-behandelter H12.1  $\alpha < 0,01$ .

### 3.3.4 Platinakkumulationen in Abhängigkeit von den THP-Derivaten

Um die hohe Platinakkumulation unter THP-12 weiter aufzuklären, wurde im Folgenden der Einfluss der Alkylkette der THP-Derivate analysiert. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit jeweils 30 µM THP-9, THP-10, THP-12 (*siehe auch Abb. 9 S. 15*) oder CDDP behandelt (*Abb. 25*). 2 h nach Behandlungsbeginn wurde eine Zunahme der zellulären Platingehalte mit einer Zunahme der Kettenlängen der THP-Derivate beobachtet. Für THP-12 wurde erneut die höchste Akkumulation bestimmt ( $\alpha < 0,001$ ), wobei 1,2-fach mehr Platin in 1411HP-Zellen ( $849,7 \pm 51,0$  ppm) gegenüber H12.1-Zellen ( $736,0 \pm 89,2$  ppm,  $\alpha < 0,05$ ) akkumuliert wurde.

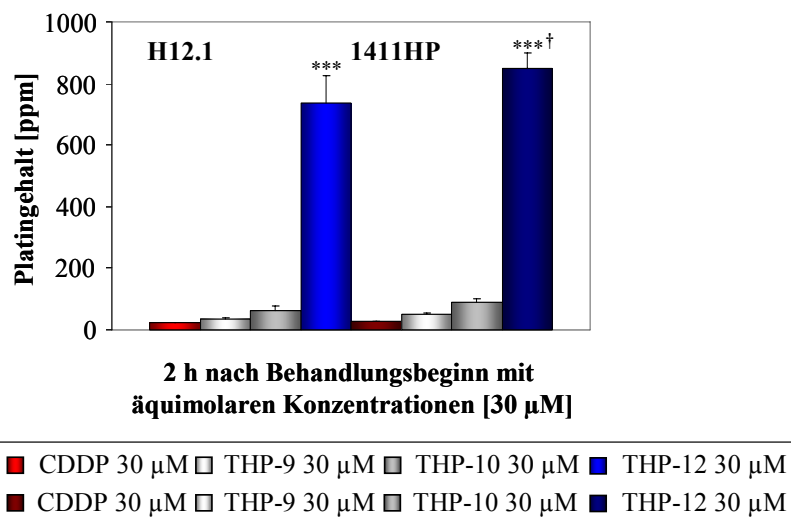


Abb. 25: Platinakkumulation in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit 30 µM THP-9, THP-10, THP-12 oder CDDP; Analyse 2 h nach Behandlungsbeginn; x + SD; n = 3; \*\*\* signif. zu CDDP-, THP-9- und THP-10-behandelten Zellen  $\alpha < 0,001$ ; † signif. zu THP-12-behandelter H12.1  $\alpha < 0,05$ .

### 3.3.5 Platinakkumulationen in Abhängigkeit von den IC

Zur Charakterisierung einer möglichen Korrelation zwischen der THP-12- und der CDDP-initiierten Zytotoxizität und den zellulär angereicherten Platinzentren wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit den IC<sub>10</sub>, IC<sub>20</sub>, IC<sub>30</sub>, IC<sub>40</sub>, IC<sub>70</sub> und den IC<sub>90</sub> beider Substanzen gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas exponiert und der Platingehalt 2 h nach Behandlungsbeginn ermittelt. Wie *Abb. 26 im Anhang S. VIII* zeigt, führte eine Exposition beider Zelllinien mit zunehmenden IC von CDDP zu einer nahezu linearen Zunahme von zellulär akkumuliertem Platin. Bei einer Behandlung beider Zelllinien mit THP-12 wurde hingegen im Bereich der IC<sub>20</sub> bis IC<sub>30</sub> eine sprunghafte Steigerung der Platinanreicherung sichtbar, die in 1411HP-Zellen im Vergleich mit H12.1-Zellen eine stärkere Ausprägung zeigte. Diese Daten bekräftigen die unterschiedlich schnelle Akkumulation von CDDP und von THP-12 in beiden Zelllinien sowie die zeitlich schnellere Platinanreicherung unter THP-12 in den Zellen der resistenten 1411HP im Vergleich mit denen der sensitiven H12.1.

### 3.3.6 Platinakkumulationen an der genomischen DNA

Da einer Platinierung der genomischen DNA eine wesentliche Relevanz in der zytotoxischen Wirkung von CDDP zukommt, sollte im Weiteren die Reaktivität von THP-12 mit der DNA im Vergleich mit CDDP untersucht werden. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit jeweils 30 µM von beiden Substanzen exponiert und eine Platinierung der genomischen DNA im Vergleich zur zellulären Platinakkumulation 6 h nach Behandlungsbeginn analysiert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um eine quantifizierbare Wiederfindungsrate an der DNA zu gewährleisten (*Abb. 27*). Eine Messung der zellulären Platingehalte zeigte eine 18,7-fach (H12.1 1170,3 ± 138,6 ppm,  $\alpha < 0,001$ ) bzw. eine 31,2-fach (1411HP 2182,7 ± 172,8 ppm,  $\alpha < 0,001$ ) höhere Akkumulation von Platin nach einer Exposition mit THP-12 im Vergleich mit CDDP (H12.1 62,5 ± 5,0 ppm; 1411HP 70,0 ± 9,5 ppm; *Abb. 27A*). Zudem wurde erneut selektiv mehr Platin unter THP-12 in den Zellen der resistenten 1411HP gegenüber denen der sensitiven H12.1 akkumuliert (1,9-fach,  $\alpha < 0,001$ ; *Abb. 27A*). Die Bestimmung der DNA-Platinierung offenbarte demgegenüber eine 9,6-fach (H12.1 8,6 ± 4,0 ppm,  $\alpha < 0,05$ ) bzw. eine 3,9-fach (1411HP 7,8 ± 2,2 ppm) höhere Akkumulation von Platin an der DNA nach einer Exposition mit CDDP im Vergleich mit einer Behandlung mit THP-12 (H12.1 0,9 ± 1,0 ppm; 1411HP 2,0 ± 2,3 ppm; *Abb. 27B*). Unter CDDP wurden somit 13,8 % (H12.1) bzw. 11,1 % (1411HP) des zellulär akkumulierten Platins an die DNA gebunden, während unter THP-12 nur jeweils 0,1 % des zellulären Platins an die DNA gebunden wurde.

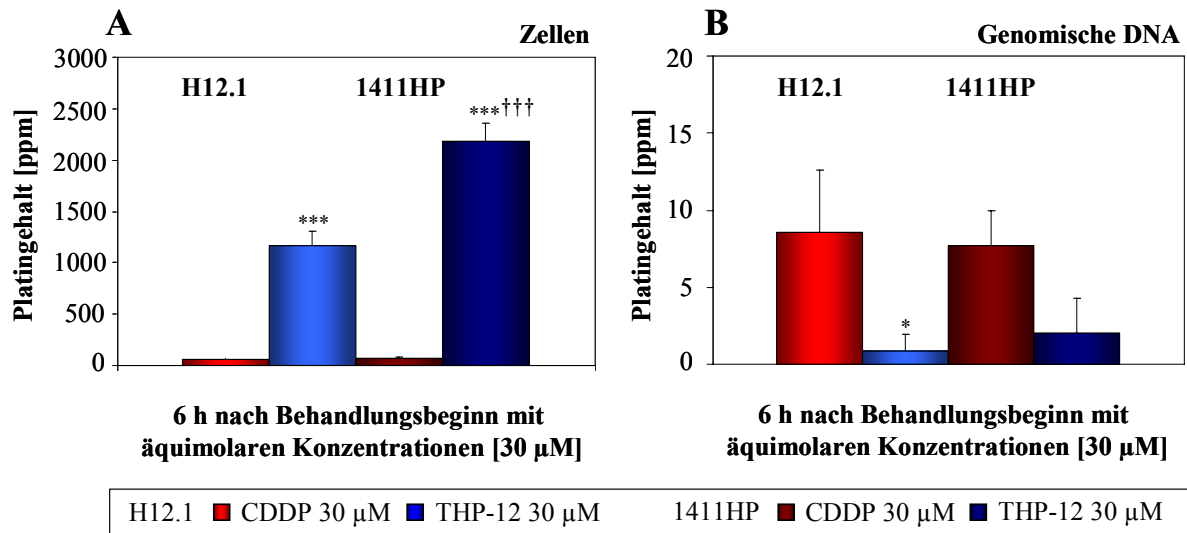


Abb. 27: Platinakkumulation in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit 30 µM THP-12 oder CDDP (A) im Vergleich zur Platinierung der genomischen DNA der Zellen (B); Analyse 6 h nach Behandlungsbeginn; x + SD; n ≥ 3; \*\*\* signif. zu CDDP-behandelten Zellen  $\alpha < 0,001$ ; \* signif. zu CDDP-behandelter H12.1  $\alpha < 0,05$ ; ††† signif. zu THP-12-behandelter H12.1  $\alpha < 0,001$ .

### 3.4 Analyse der DNA-Bindungen von THP-12 und von CDDP im zellfreien System

Für eine Überprüfung der differentiellen DNA-Platinierung durch THP-12 und durch CDDP sollte das Bindungsverhalten der beiden Substanzen an die DNA nachfolgend im zellfreien System untersucht werden. Heringssperma-DNA wurde hierfür zunächst mit jeweils 30 µM THP-12 oder CDDP behandelt und die Platinierung 3 h, 6 h und 13 h nach Behandlungsbeginn analysiert (Abb. 28).

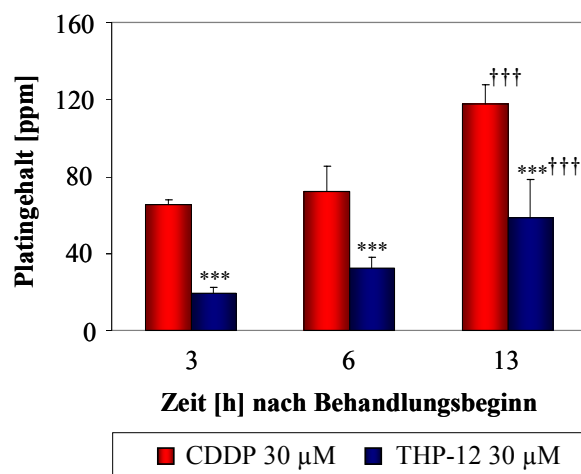
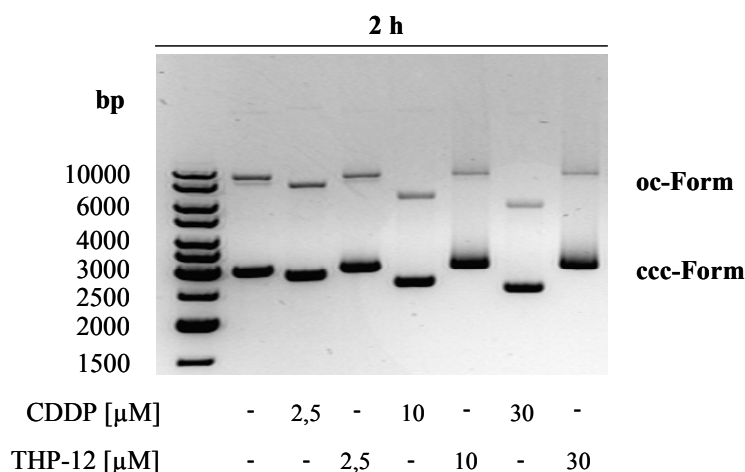


Abb. 28: Platinierung von Heringssperma-DNA nach einer Behandlung mit 30 µM THP-12 oder CDDP; Analyse 3 h, 6 h und 13 h nach Behandlungsbeginn; x + SD; n = 3 (\*\*\*) signif. zu CDDP-behandelter DNA für 3 h, 6 h und 13 h  $\alpha < 0,001$ ; ††† signif. zu THP-12- bzw. CDDP-behandelter DNA nach 3 h  $\alpha < 0,001$ ).

Wie *Abb. 28* veranschaulicht, wurde 3 h nach Behandlungsbeginn erneut eine verminderte Platinierung der DNA nach einer Behandlung mit THP-12 (3,4-fach,  $19,5 \pm 2,8$  ppm) im Vergleich mit CDDP ( $65,6 \pm 2,3$  ppm,  $\alpha < 0,001$ ) sichtbar. 6 h und 13 h nach Behandlungsbeginn zeigte sich eine Zunahme der Platinierung der DNA unter beiden Substanzen, wobei THP-12 (13 h  $58,4 \pm 19,8$  ppm) 2,0-fach geringer gegenüber CDDP (13 h  $117,5 \pm 10,2$  ppm,  $\alpha < 0,001$ ) gebunden wurde. Diese Daten bestätigen die geringere DNA-Bindung von THP-12 im Vergleich mit CDDP.

Für eine weitere Testung der Reaktivitäten von THP-12 und von CDDP mit der DNA wurden Bindungsstudien mit pCR<sup>®</sup>3.1 Plasmid-DNA durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit jeweils 2,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M von beiden Substanzen exponiert und das Laufverhalten der Proben 2 h nach Behandlungsbeginn analysiert (*Abb. 29*).



*Abb. 29*: Laufverhalten von pCR<sup>®</sup>3.1 Plasmid-DNA nach einer Behandlung mit 2,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M THP-12 oder CDDP; Analyse 2 h nach Behandlungsbeginn; repräsentatives Beispiel von 3 Versuchen.

Plasmidproben, die mit zunehmenden CDDP-Konzentrationen exponiert wurden, zeigten eine schnellere Wanderung der *open circular* (oc)- und der *covalently closed circular* (ccc)-Plasmidformen im Vergleich mit denen der unbehandelten Kontrolle. Dies kann auf eine Komprimierung der Plasmidstrukturen durch die Platin-DNA-Bindung und eine Erhöhung der Probenmobilitäten zurückgeführt werden. THP-12-behandelte Proben wiesen demgegenüber konzentrationsunabhängig ein den oc-Formen und ccc-Formen der unbehandelten Kontrolle vergleichbares Laufverhalten auf, was durch die nahezu fehlende Bindung der Substanz an die Plasmidstrukturen erklärt werden kann. Die Daten bekräftigen erneut die geringe Reaktivität von THP-12 mit der DNA und sprechen zudem für ein verändertes DNA-Bindungsverhalten von THP-12 im Vergleich mit CDDP.

### 3.5 Analyse der THP-12- und der CDDP-induzierten Apoptosemechanismen

#### 3.5.1 Beeinflussung des Zellzyklus

Basierend auf den für CDDP bekannten Störungen im Zellzyklusablauf der Zellen sollte im Weiteren untersucht werden, ob THP-12 ebenso eine Beeinflussung des Zellzyklus initiiert. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden hierzu zunächst mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert und 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn analysiert (siehe *Abb. 30 S. 65 und Tab. 11 siehe Anhang S. IX*). Die Zellen, die 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn untersucht wurden, wurden mit unbehandelten Zellen verglichen, die 24 h nach Behandlungsbeginn gewonnen wurden. Diese Kontrolle repräsentierte eine Normalverteilung der Zellpopulation und entsprach den Kontrollen, die 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn analysiert wurden. Für die Zellen, die 8 h nach Behandlungsbeginn untersucht wurden, wurde eine Kontrolle zum entsprechenden Zeitpunkt mitgeführt. Dies war notwendig, da eine Erneuerung des Mediums am Behandlungsstart die Proliferation der Zellen anregte und diese 8 h nach Behandlungsbeginn keine Normalverteilung zeigten.

Eine Exposition von H12.1-Zellen mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* führte 8 h nach Behandlungsbeginn zu einem Übergang der Zellen aus der G<sub>2</sub>/M-Phase in die G<sub>1</sub>-Phase (*Abb. 30A*). 24 h nach Behandlungsbeginn wurde eine S-Phasen-Akkumulation ( $\alpha < 0,01$ ) der Zellen sichtbar, die 48 h nach Behandlungsbeginn von einem Übergang der Zellen in die SubG<sub>1</sub>-Fraktion ( $\alpha < 0,001$ ) abgelöst wurde. Die SubG<sub>1</sub>-Fraktion definiert den Anteil der flotierenden Zellen und kann über die Abnahme des DNA-Gehaltes durch die Fragmentierung erklärt werden. 72 h nach Behandlungsbeginn wurde ein weiterer Anstieg der SubG<sub>1</sub>-Fraktion ( $\alpha < 0,001$ ) in H12.1-Zellen beobachtet. Eine Exposition der 1411HP-Zellen mit CDDP führte 8 h nach Behandlungsbeginn ebenfalls zu einem Übergang einiger Zellen aus der G<sub>2</sub>/M-Phase in die G<sub>1</sub>-Phase (*Abb. 30B*). 24 h nach Behandlungsbeginn zeigte sich jedoch, anders als in den Zellen der H12.1, eine direkte Anreicherung der Zellen in der SubG<sub>1</sub>-Fraktion ( $\alpha < 0,05$ ) ohne eine Akkumulation in der S-Phase. 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn wurde eine weitere Zunahme der SubG<sub>1</sub>-Fraktion ( $\alpha < 0,001$ ) sichtbar. Die Exposition beider Zelllinien mit THP-12 resultierte im Vergleich mit CDDP bereits 8 h nach Behandlungsbeginn in einer Anreicherung einiger Zellen in den SubG<sub>1</sub>-Fraktionen (1411HP  $\alpha < 0,001$ ; *Abb. 30C und Abb. 30D*). 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn wurde in beiden Zelllinien eine ausgeprägte Zunahme der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen ohne eine Akkumulation der Zellen in einer spezifischen Phase des Zellzyklus deutlich (H12.1  $\alpha < 0,001$ ; 1411HP  $\alpha < 0,001$ ).



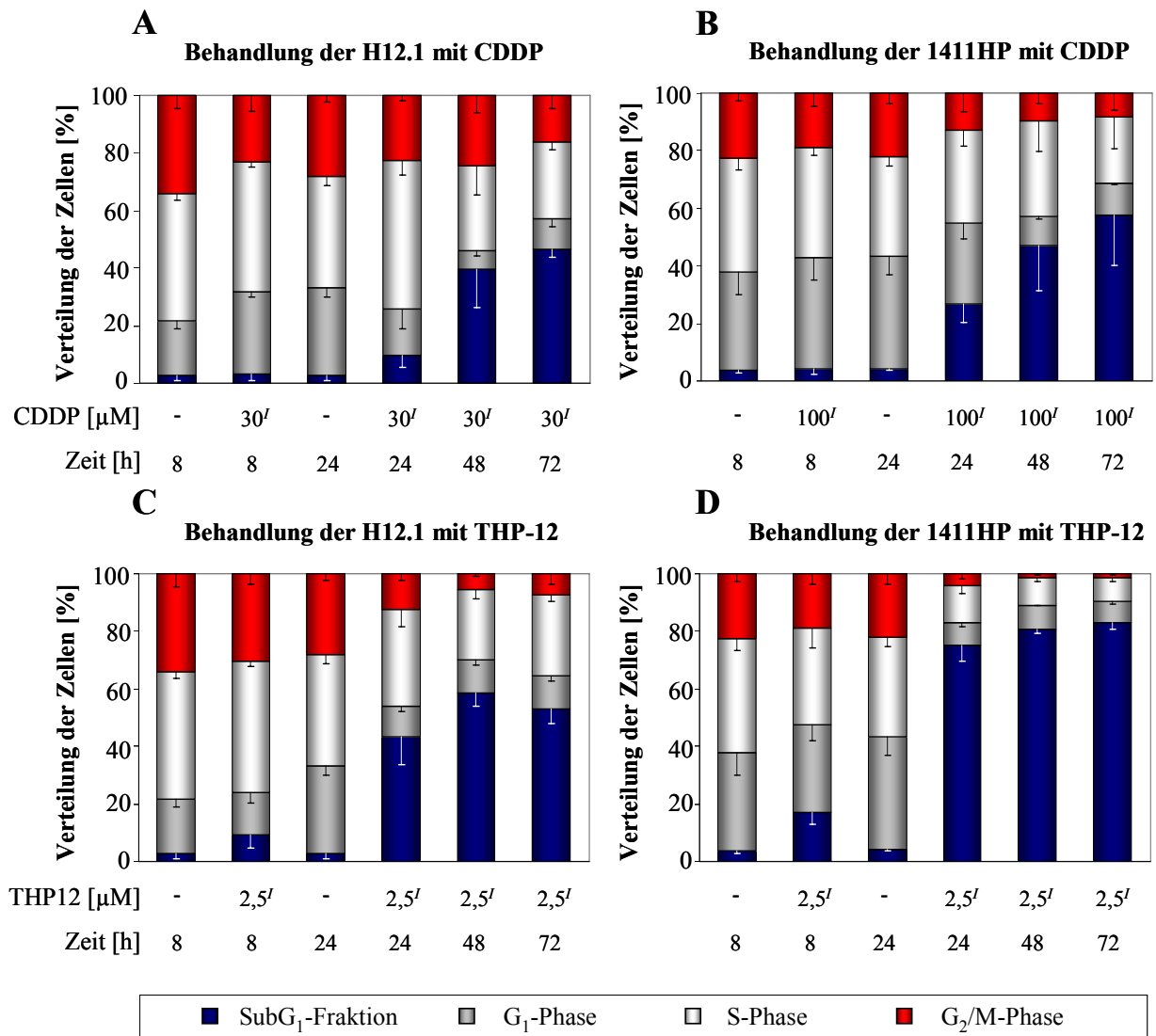


Abb. 30: Störungen im Zellzyklusablauf von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I*; Analyse 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn;  $\bar{x}$  - SD;  $n \geq 3$ .

Eine Exposition der H12.1- und 1411HP-Zellen mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema II* führte zu einer ähnlichen Beeinflussung des Zellzyklus wie nach einer Exposition gemäß dem *Behandlungsschema I* (Abb. 31 und Tab. 12 und Tab. 13 siehe Anhang S. X bis S. XII). 8 h nach Behandlungsbeginn mit CDDP wurde in beiden Zelllinien wiederholt ein Übergang einiger Zellen aus der G<sub>2</sub>/M-Phase in die G<sub>1</sub>-Phase sichtbar (Abb. 31A und Abb. 31B siehe Anhang). 24 h nach Behandlungsbeginn zeigte sich eine Akkumulation der Zellen der sensitiven H12.1 in der S-Phase ( $\alpha < 0,001$ ), die 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn von einem Übergang der Zellen in die SubG<sub>1</sub>-Fraktion ( $\alpha < 0,001$ ) abgelöst wurde. In der resistenten Zelllinie 1411HP wurden demgegenüber 24 h nach Behandlungsbeginn eine nur moderate Anreicherung der Zellen in der S-Phase und ein

beginnender Übergang in die SubG<sub>1</sub>-Fraktion beobachtet. 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn wurde ein deutlicher Übergang der Zellen in die SubG<sub>1</sub>-Fraktion ( $\alpha < 0,001$ ) sichtbar. Eine zusätzliche Behandlung der 1411HP-Zellen mit der IC<sub>90</sub> von CDDP in der sensitiven Zelllinie H12.1 gemäß dem *Behandlungsschema II*, die in diesen Zellen nahezu keine Apoptose auslöste, führte 24 h nach Behandlungsbeginn, analog zur H12.1, ebenfalls zu einer S-Phasen-Akkumulation der Zellen ( $\alpha < 0,001$ ; *Abb. 31E siehe Anhang*). 48 h nach Behandlungsbeginn wurde jedoch kein Übergang der Zellen in die SubG<sub>1</sub>-Fraktion, sondern eine Anreicherung in der G<sub>2</sub>/M-Phase ausgelöst ( $\alpha < 0,001$ ). Erst 72 h nach Behandlungsbeginn wurde unter einer Beibehaltung der G<sub>2</sub>/M-Phasen-Anreicherung ( $\alpha < 0,001$ ) ein geringer Anstieg der SubG<sub>1</sub>-Fraktion deutlich. Die Exposition beider Zelllinien mit THP-12 führte erneut bereits 8 h nach Behandlungsbeginn zu einem Übergang der Zellen in die SubG<sub>1</sub>-Fraktionen (1411HP  $\alpha < 0,01$ ; *Abb. 31C und Abb. 31D siehe Anhang*). 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn wurde zudem wiederholt eine beständige Zunahme der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen ohne eine Akkumulation der Zellen in einer spezifischen Phase des Zellzyklus nachgewiesen (H12.1  $\alpha < 0,001$ ; 1411HP  $\alpha < 0,001$ ).

Mit dem Ziel, die hohe Platinanreicherung unter THP-12 durch eine Behandlung mit CDDP wiederholt zu reproduzieren (*siehe auch Abb. 24 S. 60*), wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit einer Überkonzentration CDDP von 200µM exponiert und 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn analysiert (*Abb. 32 und Tab. 14 siehe Anhang S. XIII*). Eine Exposition beider Zelllinien mit 200µM CDDP führte 24 h nach Behandlungsbeginn zu einem direkten Übergang der Zellen in die SubG<sub>1</sub>-Fraktionen (H12.1  $\alpha < 0,001$ ; 1411HP  $\alpha < 0,001$ ). 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn zeigte sich wie nach einer Zugabe von THP-12 gemäß den *Behandlungsschemata I und II* eine Zunahme der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen ohne eine Akkumulation der Zellen in einer spezifischen Phase des Zellzyklus (H12.1  $\alpha < 0,001$ ; 1411HP  $\alpha < 0,001$ ). Diese Daten zeigen, dass die Zytotoxizität von CDDP bei einem Einsatz geringer, klinisch relevanterer Konzentrationen mit der Auslösung von Zellzyklusstörungen assoziiert ist. Dies konnte in H12.1-Zellen nach einer CDDP-Exposition gemäß den *Behandlungsschemata I und II* und in 1411HP-Zellen nach einer Exposition mit der IC<sub>90</sub> von CDDP in der sensitiven H12.1 gemäß dem *Behandlungsschema II*, die in diesen Zellen jedoch nahezu keine Apoptose auslöste, belegt werden. Höhere, klinisch nicht relevante CDDP-Konzentrationen gemäß den *Behandlungsschemata I und II* und der Einsatz einer Überkonzentration CDDP von 200µM, die auch in resistenten 1411HP-Zellen Apoptose auslösten, bewirkten demgegenüber wie THP-12 keine Zellzyklusveränderungen.

### 3.5.2 Akkumulation von p53

Unter Berücksichtigung der Daten einer geringen DNA-Platinierung durch THP-12 und einer weitgehend fehlenden Auslösung von Zellzyklusstörungen durch die Verbindung sollte im Weiteren eine Beeinflussung der Expression des Tumorsuppressorproteins p53 im Vergleich mit CDDP erfasst werden. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* exponiert und 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn untersucht (Abb. 33).

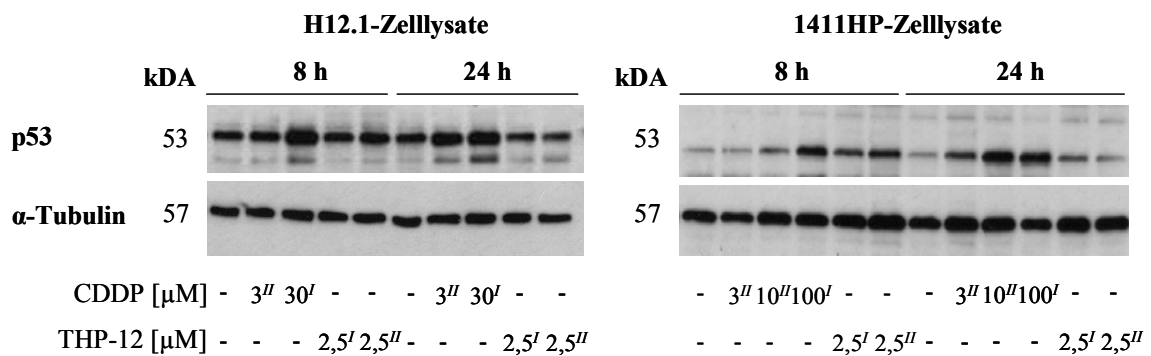


Abb. 33: Expression von p53 in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II*; Analyse 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentatives Beispiel von 4 Versuchen;  $\alpha$ -Tubulin diene als Ladekontrolle.

Eine Behandlung beider Zelllinien mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* führte bereits 8 h und auch 24 h nach Behandlungsbeginn zu einer ausgeprägten Akkumulation von p53. 24 h nach Behandlungsbeginn wurde ebenso in den Zellen der H12.1 und der 1411HP, die mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema II* exponiert wurden, eine p53-Akkumulation sichtbar. Eine zusätzliche Behandlung der 1411HP-Zellen mit der IC<sub>90</sub> von CDDP in der sensitiven Zelllinie H12.1 gemäß dem *Behandlungsschema II*, die in diesen Zellen nahezu keine Apoptose initiierte, bewirkte ebenfalls 24 h nach Behandlungsbeginn eine moderate Akkumulation von p53. Nach einer Exposition beider Zelllinien mit THP-12 gemäß den *Behandlungsschemata I und II* wurde im Gegensatz zu CDDP sowohl 8 h als auch 24 h nach Behandlungsbeginn keine bzw. eine nur marginale Anreicherung von p53 verzeichnet. Diese Daten korrelieren mit der geringen DNA-Bindung von THP-12 und der fehlenden Zellzyklusbeeinflussung durch die Substanz und lassen die Vermutung zu, dass THP-12 im Gegensatz zu CDDP einen weitgehend DNA-unabhängigen Wirkmechanismus initiiert.

### 3.5.3 Analyse verschiedener proapoptotischer und antiapoptotischer Proteine

Für eine weitere Charakterisierung von THP-12 wurden die Apoptose-relevanten Proteine BAX, BAK, BCL-2 und BCL-X<sub>L</sub> sowie APAF-1 bezüglich ihrer Expression und Cytochrom c und SMAC/DIABLO bezüglich ihrer Freisetzung aus den Mitochondrien untersucht. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit THP-12 oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* exponiert und 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn analysiert (*Abb. 34 bis Abb. 36*).

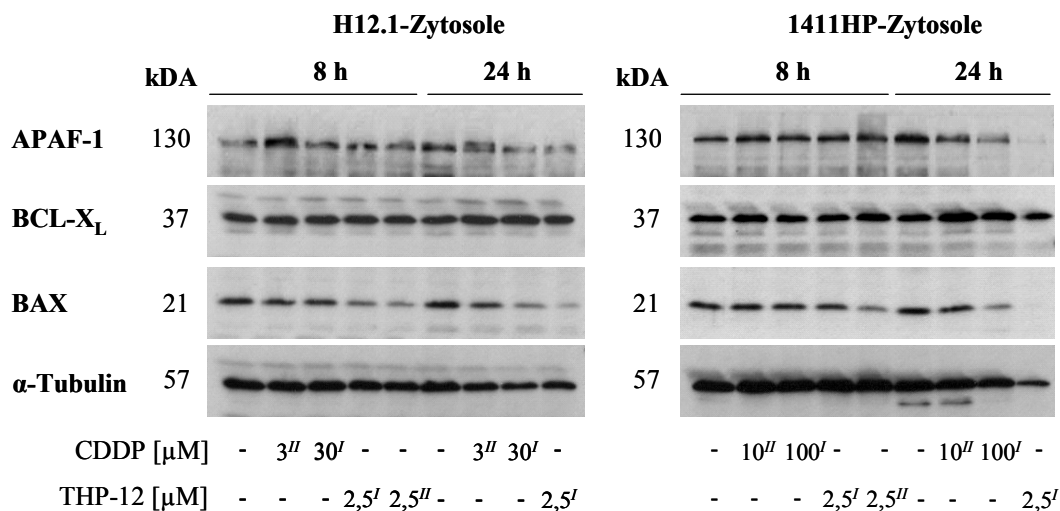


Abb. 34: Expression von APAF-1, BCL-X<sub>L</sub> und BAX in H12.1- und 1411HP-Zytosolen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II*; Analyse 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentatives Beispiel von  $\geq 2$  Versuchen;  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Eine Exposition beider Zelllinien mit beiden Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* rief keine relevante Beeinflussung von APAF-1 hervor (*Abb. 34*). Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die verminderten Banden von APAF-1 und von  $\alpha$ -Tubulin in den 1411HP-Zellen, die 24 h nach Behandlungsbeginn mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema I* gewonnen wurden, auf den fortgeschrittenen Verlauf der Apoptose und die einsetzende Degradierung der Zellen zurückzuführen sind. Aus diesem Grund war auch eine Isolierung von zytosolischen Fraktionen 24 h nach Behandlungsbeginn mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema II* nicht möglich. Für das antiapoptotische Protein BCL-X<sub>L</sub> wurde ebenfalls weder unter THP-12 noch unter CDDP eine Veränderung in der Expression beobachtet (*Abb. 34*). Eine Exposition beider Zelllinien mit THP-12 führte jedoch zu einer Abnahme des proapoptotischen Proteins BAX im Zytosol, die bereits 8 h nach Behandlungsbeginn mit THP-12 gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* in H12.1-Zellen sowie nach einer Exposition mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema II* in 1411HP-Zellen sichtbar wurde (*Abb. 34*). Dieser Effekt trat unter CDDP erst 24 h nach Behandlungsbeginn

mit dem *Behandlungsschema I* auf und könnte auf eine Translokation des Proteins aus dem Zytosol zu den Mitochondrien oder dem ER hindeuten. Für das antiapoptotische Protein BCL-2 wurde zudem nachgewiesen, dass es in H12.1- und 1411HP-Zellen nicht exprimiert wird (*Abb. 35*). Das proapoptotische Protein BAK blieb nach einer Behandlung beider Zelllinien mit THP-12 oder mit CDDP ferner weitgehend unbeeinflusst (*Abb. 35*).

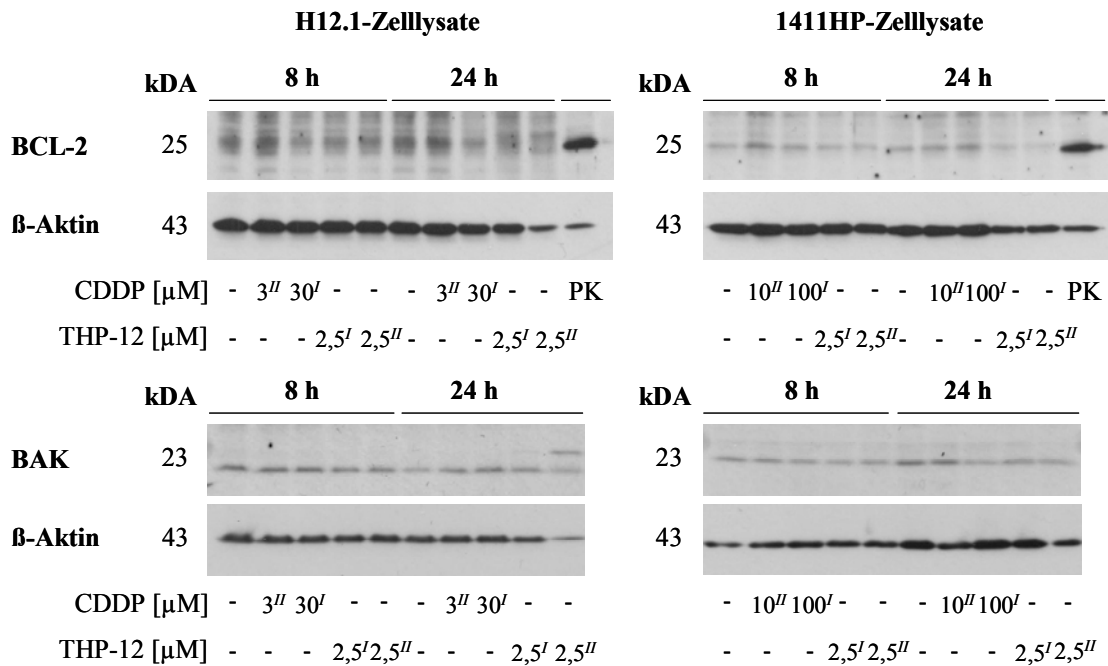


Abb. 35: Expression von BCL-2 und BAK in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II*; Analyse 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentatives Beispiel von 2 Versuchen; PK - Positivkontrolle; β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Eine Exposition der 1411HP-Zellen mit THP-12 gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* führte im Weiteren zu einer Zunahme von Cytochrom c und von SMAC/DIABLO im Zytosol, wobei diese Effekte erneut bereits 8 h nach Behandlungsbeginn auftraten (*Abb. 36*). In H12.1-Zellen wurde eine zytosolische Anreicherung von SMAC/DIABLO unter THP-12 ebenfalls 8 h nach Behandlungsbeginn sichtbar. Die Exposition beider Zelllinien mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* rief hingegen erst 24 h nach Behandlungsbeginn eine deutliche Zunahme von Cytochrom c und von SMAC/DIABLO im Zytosol hervor. Diese Daten zeigen, dass THP-12 eine schnellere mitochondriale Freisetzung von proapoptotischen Proteinen und eine frühzeitigere zytosolische Abnahme von BAX im Vergleich mit CDDP initiiert. Dies korreliert mit der bereits 8 h nach Behandlungsbeginn auftretenden Bildung von flotierenden Zellen der H12.1 und 1411HP unter einer Exposition mit THP-12 im Gegensatz zu einer CDDP-Behandlung (*siehe auch Abb. 16 S. 53; Abb. 30 S. 65 und Abb. 31 siehe Anhang S. X*).

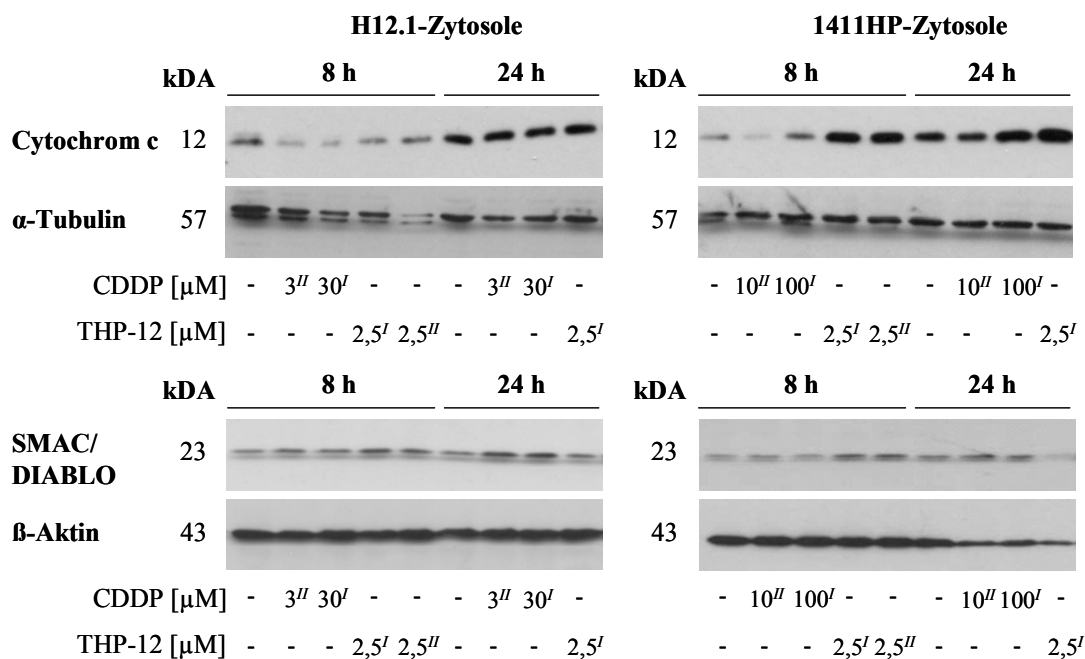


Abb. 36: Expression von Cytochrom c und SMAC/DIABLO in H12.1- und 1411HP-Zytoplasten nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II*; Analyse 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentatives Beispiel von  $\geq 2$  Versuchen;  $\alpha$ -Tubulin und  $\beta$ -Aktin dienten als Ladekontrolle.

### 3.5.4 Spaltung von Caspase 3 und von PARP

Im Weiteren wurde eine Aktivierung der zentralen Effektorcaspase 3 und eine durch die Caspase vermittelte Inaktivierung von PARP untersucht. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* exponiert und 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn analysiert (Abb. 37). In H12.1- und 1411HP-Zellen, die mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* exponiert wurden, wurde 24 h nach Behandlungsbeginn ein Auftreten der aktiven Spaltungsfragmente p-17/p-20 von Caspase 3 und des inaktiven Spaltungsfragmentes p-85 von PARP sichtbar. Nach einer Behandlung der 1411HP-Zellen mit der  $IC_{90}$  von CDDP in der sensitiven H12.1 gemäß dem *Behandlungsschema II*, die in diesen Zellen nahezu keine Apoptose initiierte, wurden demgegenüber keine aktiven Spaltungsfragmente von Caspase 3 und keine inaktiven Fragmente von PARP detektiert. In H12.1- und 1411HP-Zellen, die mit THP-12 gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* behandelt wurden, ließen sich im Gegensatz zu CDDP erneut bereits 8 h nach Behandlungsbeginn die Spaltungsfragmente von Caspase 3 und von PARP nachweisen. Die frühzeitige Aktivierung der Caspase 3 und die Inaktivierung von PARP bestätigen wiederholt die rasche Auslösung von Apoptose durch THP-12 im Vergleich mit CDDP.

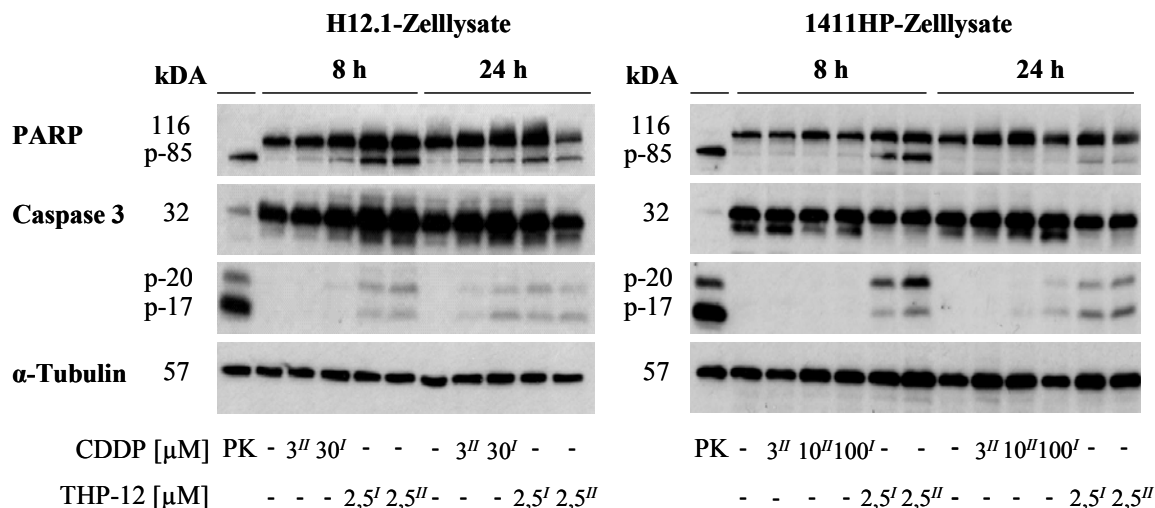


Abb. 37: Spaltung von Caspase 3 und PARP in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II*; Analyse 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentatives Beispiel von  $\geq 4$  Versuchen; PK - Positivkontrolle;  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

### 3.5.5 Aktivierung und Relevanz von Apoptose-assoziierten Caspasen

Basierend auf der differentiellen Aktivierung der Caspase 3 unter THP-12 und unter CDDP wurden die Caspasen 2, 3, 8 und 9 nachfolgend näher charakterisiert. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit den  $IC_{50}$ ,  $IC_{70}$  und  $IC_{90}$  von THP-12 oder den  $IC_{90}$  von CDDP gemäß eines 24 h-Behandlungsschemas exponiert und 24 h nach Behandlungsbeginn untersucht (*Abb. 38*).

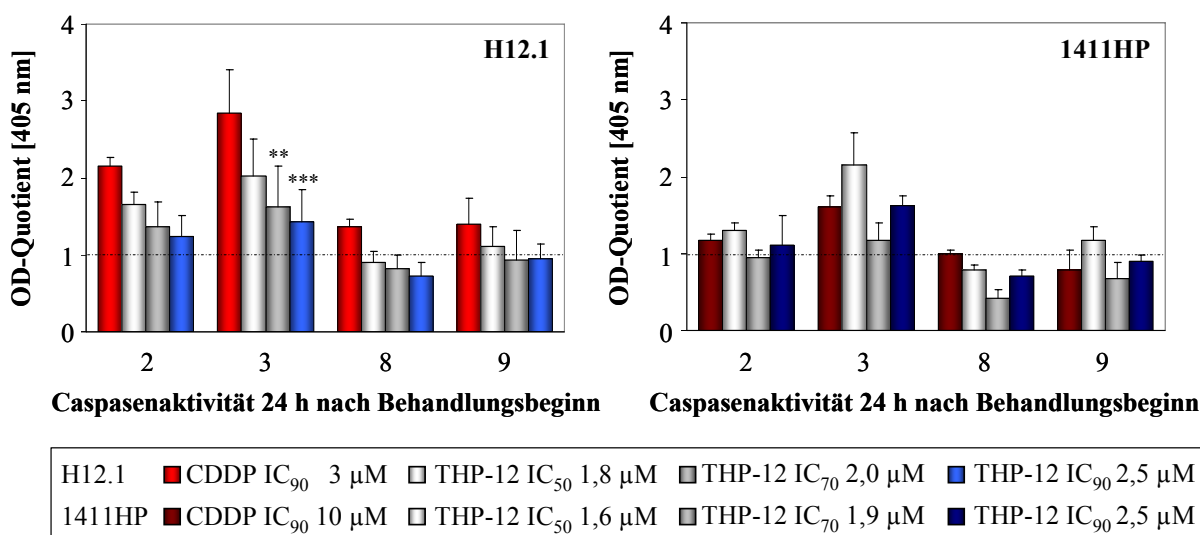


Abb. 38: Aktivitäten der Caspasen 2, 3, 8 und 9 in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit den  $IC_{50}$ ,  $IC_{70}$  und  $IC_{90}$  von THP-12 oder den  $IC_{90}$  von CDDP gemäß eines 24 h-Behandlungsschemas; Analyse 24 h nach Behandlungsbeginn; dargestellt anhand der mittels Caspasenaktivitäts-Assay erfassten OD-Quotienten der behandelten/unbehandelten Zellen;  $x \pm SD$ ;  $n = 3$ ; \*\*\* signif. zu CDDP-behandelten Zellen  $\alpha < 0,001$ ; \*\* signif. zu CDDP-behandelten Zellen  $\alpha < 0,01$ .

Für die Analyse wurden nur die adhärennten Zellen verwendet, um den frühzeitig initiierten Apoptosemechanismus von THP-12 im Vergleich mit CDDP aufzuklären. Eine Exposition der H12.1-Zellen mit der  $IC_{90}$  von CDDP resultierte 24 h nach Behandlungsbeginn in einer starken Aktivierung der Caspasen 2 ( $2,2 \pm 0,1$ ) und 3 ( $2,9 \pm 0,6$ ) sowie in einer moderaten Aktivierung der Caspasen 8 ( $1,4 \pm 0,1$ ) und 9 ( $1,4 \pm 0,3$ ). In 1411HP-Zellen ließ sich 24 h nach Behandlungsbeginn mit der  $IC_{90}$  von CDDP hingegen nur eine gemäßigte Aktivität für Caspase 3 ( $1,6 \pm 0,2$ ) zeigen. Die verminderte Aktivierung der Caspase 3 in den resistenten 1411HP-Zellen korrelierte mit dem schwachen Auftreten des aktiven Fragmentes p-17/-p20 der Effektorcaspase (*siehe auch Abb. 37 S. 71*). H12.1-Zellen, die mit den  $IC_{50}$ ,  $IC_{70}$  und  $IC_{90}$  von THP-12 exponiert wurden, wiesen 24 h nach Behandlungsbeginn für alle Caspasen geringere Aktivitäten gegenüber der Behandlung mit CDDP auf (Caspase 3  $IC_{70}$  1,8-fach,  $\alpha < 0,01$ ;  $IC_{90}$  2,0-fach,  $\alpha < 0,001$ ). Zudem wurde eine Abnahme der Aktivitäten aller Caspasen mit höheren IC sichtbar. In 1411HP-Zellen wurden 24 h nach Behandlungsbeginn mit den  $IC_{50}$ ,  $IC_{70}$  und  $IC_{90}$  von THP-12 mit Ausnahme von Caspase 3 vergleichbare Aktivitäten für alle Caspasen wie unter einer Exposition mit CDDP bestimmt.

Für eine Aufklärung der 24h nach einem Behandlungsbeginn mit THP-12 erfassten geringen Caspasenaktivitäten wurde im Folgenden die Aktivierung der Caspasen 2, 3, 8 und 9 im zeitlichen Verlauf analysiert. Basierend auf den ermittelten Daten (*siehe Abb. 38 S. 71*) wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I und II*, mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema II* und repräsentativ Zellen der H12.1 mit einer Überkonzentration CDDP von  $200\mu\text{M}$  für eine Simulierung der THP-12-initiierten Effekte exponiert. *Abb. 39* veranschaulicht die zeitliche Aktivierung der Caspase 3, die Aktivitätsverläufe der Caspasen 2, 8 und 9 sind in *Abb. 40 siehe Anhang S. XIV* zu finden. Es wurden erneut die adhärennten Zellen analysiert, um den frühzeitigen Wirkmechanismus von THP-12 im Vergleich mit CDDP aufzuklären. Eine Exposition beider Zelllinien mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema II* führte zu einer moderaten Aktivierung der Caspase 3 über die Zeit, wohingegen eine Zugabe von CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* eine zeitlich früher einsetzende und in 1411HP-Zellen eine stärkere Caspase 3-Aktivierung hervorrief (*Abb. 39*). Die Exposition von H12.1-Zellen mit THP-12 bewirkte eine schnelle und starke Aktivierung der Caspase 3, deren maximale Aktivität bereits 8 h nach Behandlungsbeginn messbar war. In 1411HP-Zellen wurde die maximale Aktivität der Caspase 3 unter THP-12 ca. 10 h nach Behandlungsbeginn bestimmt, wobei das Ausmaß der Aktivierung unter der einer Exposition mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* blieb. Durch eine Behandlung



der H12.1-Zellen mit 200  $\mu\text{M}$  CDDP ließ sich die ausgeprägte und kurzzeitige Aktivierung der Caspase 3 wie nach einer Behandlung mit THP-12 reproduzieren. Diese Daten bestätigen und erklären die verminderte Aktivierung der Caspasen unter THP-12 im Vergleich mit CDDP 24 h nach Behandlungsbeginn (siehe Abb. 38 S. 71) und korrelieren mit der zeitlichen Bildung von flotierenden Zellen und den ermittelten SubG<sub>1</sub>-Daten (siehe auch Abb. 30 S. 65 und Abb. 31 und Abb. 32 siehe Anhang S. X und S. XIII).

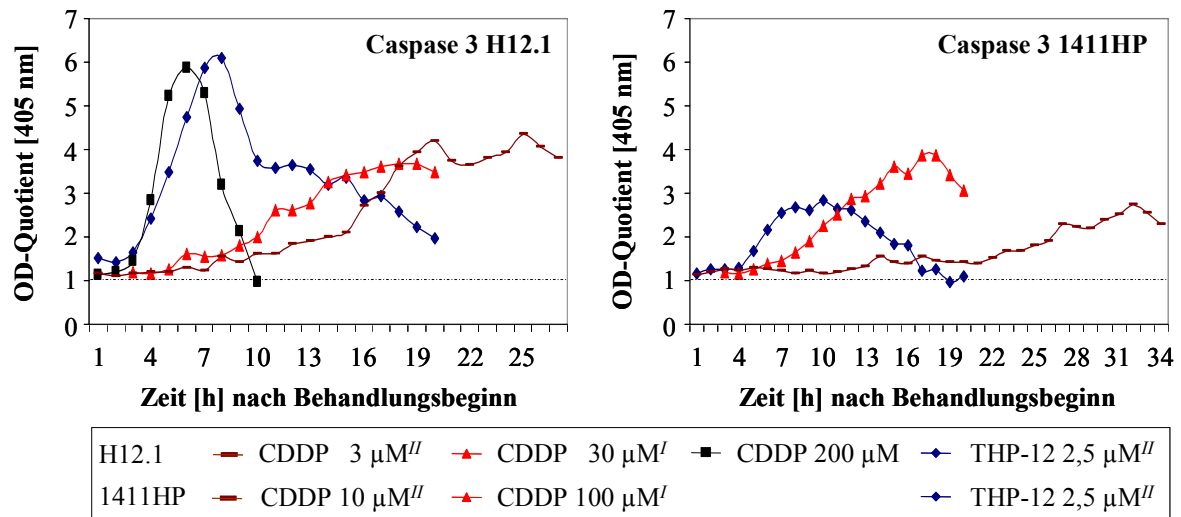


Abb. 39: Aktivitäten der Caspase 3 in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema II* oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II*; Analyse bis 34 h nach Behandlungsbeginn; dargestellt anhand der mittels Caspasenaktivitäts-Assay erfassten OD-Quotienten der behandelten/unbehandelten Zellen; x; n  $\geq$  3.

Wie *Abb. 40 im Anhang S. XIV* zeigt, wurde in H12.1-Zellen nach einer Exposition mit beiden Substanzen eine der Caspase 3 zeitlich ähnliche Aktivierung der Caspase 2 bestimmt. Die Initiatorcaspasen 8 und 9 wurden durch beide Substanzen nur moderat aktiviert. In 1411HP-Zellen wurde unter einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP eine geringere Aktivierung der Caspase 2 sowie eine nur marginale Aktivierung der Caspasen 8 und 9 nachgewiesen.

Basierend auf der differenziellen Aktivierung der Caspasen unter THP-12 und unter CDDP wurde ihre Bedeutung für die ausgelöste Apoptose genauer untersucht. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors (60  $\mu\text{M}$ ) exponiert und die Fähigkeit des Inhibitors zur vollständigen Hemmung der Caspasenaktivierung zum Zeitpunkt einer durch THP-12 induzierten, hohen Caspase 3-Aktivität 8 h nach Behandlungsbeginn analysiert (*Abb. 41; siehe auch Abb. 39*). In den adhären Zellen beider Zelllinien wurde eine vollständige Hemmung der unter THP-12

oder unter CDDP aktivierten Caspase 2 (H12.1 CDDP 2,0-fach; THP-12 3,2-fach,  $\alpha < 0,001$ ; 1411HP CDDP 1,2-fach; THP-12 2,0-fach,  $\alpha < 0,001$ ) und Caspase 3 (H12.1 CDDP 2,2-fach; THP-12 5,2-fach,  $\alpha < 0,001$ ; 1411HP CDDP 1,2-fach; THP-12 2,9-fach,  $\alpha < 0,001$ ) bestätigt. Zudem wurde die moderate Aktivierung der Caspasen 8 und 9 in den Zellen der H12.1 durch eine Zugabe des PAN-Caspaseninhibitors unterbunden. Es gilt anzumerken, dass der Inhibitor für alle Untersuchungen für eine vollständige Hemmung der Caspasenaktivierung auch nach der Exposition mit THP-12 oder mit CDDP dem Zytostatika-freien Medium zugesetzt wurde.

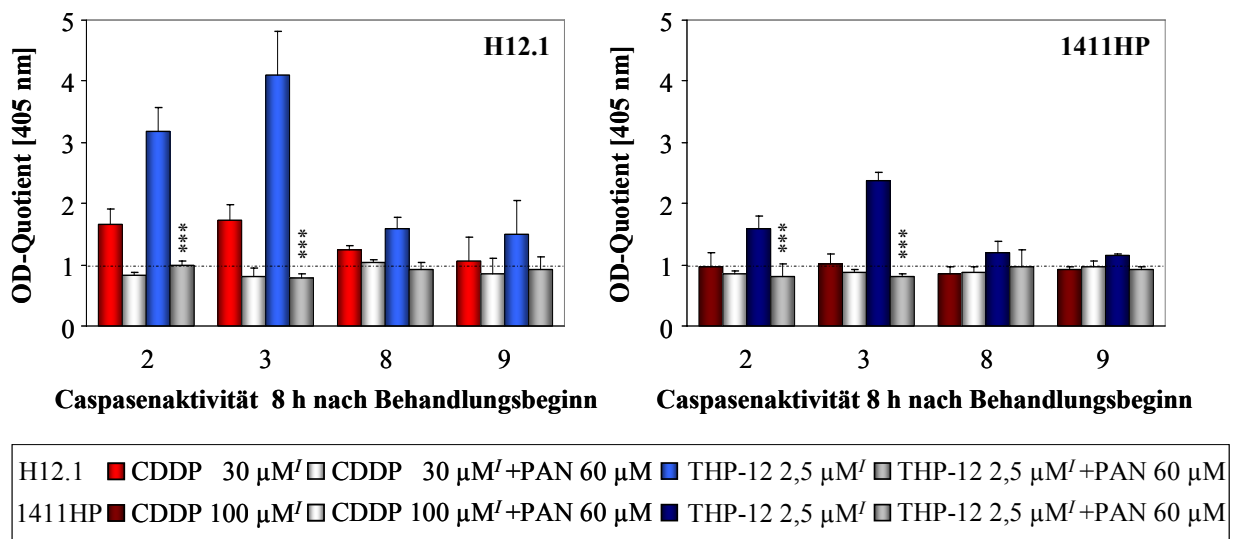


Abb. 41: Aktivitäten der Caspasen 2, 3, 8 und 9 in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema 1* in An- und Abwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors; Analyse 8 h nach Behandlungsbeginn; dargestellt anhand der mittels Caspasenaktivitäts-Assay erfassten OD-Quotienten der behandelten/unbehandelten Zellen;  $x \pm SD$ ;  $n = 3$ ; \*\*\* signif. zu THP-12-behandelten Zellen  $\alpha < 0,001$ .

Die Bedeutung der Caspasen für die THP-12- und CDDP-induzierte Apoptose wurde ferner anhand der Spaltung von Caspase 3 und PARP in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors untersucht (*Abb. 42 S. 75 und Abb. 43 siehe Anhang S. XV*). Eine Exposition von H12.1- und 1411HP-Zellen mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema 1* führte in Anwesenheit des Inhibitors zu einer Hemmung der Bildung der Fragmente p-17/p-20 von Caspase 3 (*Abb. 42*). Das auftretende Fragment höherer molekularer Masse kann hierbei auf eine unspezifische oder über eine andere Protease initiierte Spaltung und Bildung eines inaktiven Fragmentes zurückgeführt werden. Zudem wurde eine Hemmung der Bildung des Fragmentes p-85 von PARP unter Zugabe des Inhibitors sichtbar. Dies war jedoch mit einer fehlenden Bildung von flotierenden Zellen unter CDDP assoziiert, wohingegen unter THP-12 in Anwesenheit des Inhibitors eine Entstehung von flotierenden Zellen nicht verhindert wurde.

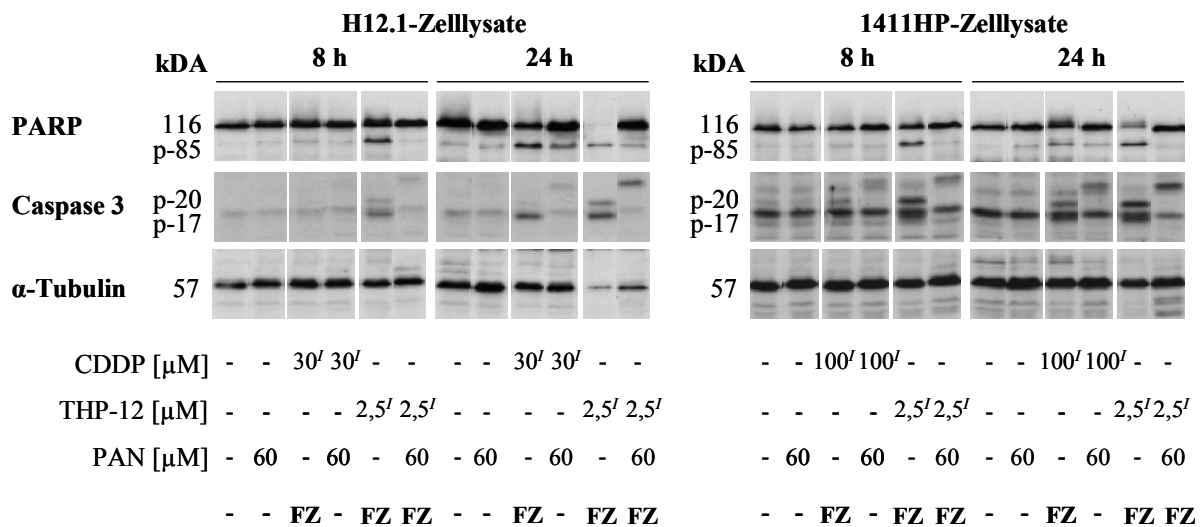


Abb. 42: Spaltung von Caspase 3 und PARP in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* in An- und Abwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors; Analyse 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentatives Beispiel von 2 Versuchen; FZ - Bildung von flotierenden Zellen;  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Bei einer Exposition beider Zelllinien mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema II* konnte eine Hemmung der Spaltung von Caspase 3 in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors reproduziert werden (*Abb. 43 siehe Anhang S. XV*). In beiden Zelllinien wurde unter THP-12 trotz einer Anwesenheit des Inhibitors erneut eine Bildung von flotierenden Zellen im Gegensatz zu CDDP ausgelöst. Die geringen  $\alpha$ -Tubulin-Banden der THP-12-exponierten Zellen sind wiederholt auf den fortgeschrittenen Zelltod zurückzuführen.

Eine Quantifizierung der unter THP-12 in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors gebildeten flotierenden Zellen der H12.1 und 1411HP erfolgte über eine Untersuchung der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen (*Abb. 44*). Eine Exposition der H12.1- und 1411HP-Zellen mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* führte 24 h nach Behandlungsbeginn in Anwesenheit des Inhibitors zu einer deutlichen Reduktion der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen (H12.1 20,7-fach; 1411HP 3,6-fach,  $\alpha < 0,05$ ). In CDDP-behandelten H12.1-Zellen wurde die fehlende Bildung einer SubG<sub>1</sub>-Fraktion in Anwesenheit des Inhibitors erneut von einer S-Phasen-Akkumulation der Zellen begleitet ( $\alpha < 0,01$ ). In den Zellen beider Zelllinien, die mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert wurden, wurde in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors demgegenüber lediglich eine geringe Abnahme der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen (H12.1 1,4-fach; 1411HP 1,4-fach) beobachtet. Diese Daten zeigen, dass THP-12 im Gegensatz zu CDDP auch ohne eine Aktivierung der Caspasen Apoptose auslösen kann.

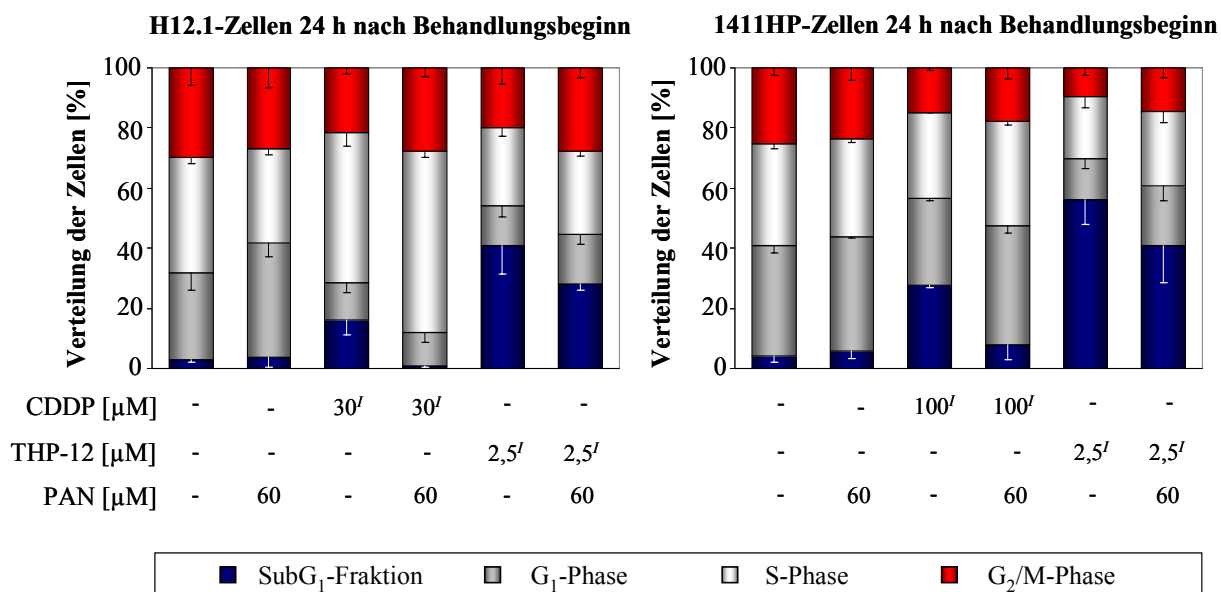


Abb. 44: Zellzyklusphasenverteilung von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* in An- und Abwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors; Analyse 24 h nach Behandlungsbeginn; x - SD; n  $\geq$  3.

Zur Identifizierung des unter THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema I* in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors induzierten Zelltodes wurden die gebildeten flotierenden H12.1- und 1411HP-Zellen einem Trypanblau-Ausschluss-Test und einem DNA-Fragmentierungs-Assay zugeführt (Abb. 45). Die flotierenden Zellen zeigten wie unter THP-12 ohne Inhibitor die Fähigkeit zum Ausschluss des Farbstoffes und das für Apoptose typische Muster der DNA-Fragmentierung (siehe auch Abb. 17 S. 54 und Abb. 18 S. 55). Diese Daten bestätigen, dass THP-12 im Gegensatz zu CDDP eine weitgehend Caspasen-unabhängige Apoptose initiiert.

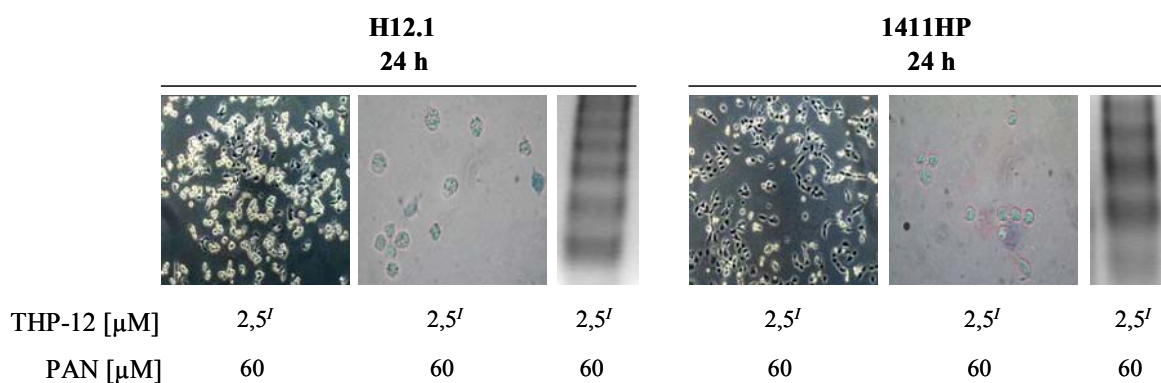


Abb. 45: Flotierende H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema I* in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors; Analyse 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentative Beispiele von 2 Versuchen; von links nach rechts Zellmorphologie, Phasenkontrast, Vergrößerung 100-fach; Ausschluss von Trypanblau, Lichtmikroskopie, Vergrößerung 400-fach; DNA-Fragmentierung.

### 3.5.6 Beeinflussung und Relevanz der intrazellulären Calcium-Homöostase

Im Hinblick auf die durch THP-12 weitgehend Caspasen-unabhängig und DNA-unabhängig ausgelöste Apoptose sollten im Folgenden Kern-unabhängige Apoptosesignalwege genauer untersucht werden. Hierfür wurde zunächst eine zytosolische Freisetzung des proapoptischen sekundären Botenstoffes Calcium unter THP-12 und unter CDDP bestimmt. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert und der Anteil an zytosolischem Calcium über einen zeitlichen Verlauf von 2 h in den adhärennten Zellen erfasst (*Abb. 46*). Eine Exposition beider Zelllinien mit THP-12 führte im Gegensatz zu CDDP zu einer schnellen und starken Anreicherung von Calcium im Zytosol über die Zeit (*Abb. 46A*). 2 h nach Behandlungsbeginn mit CDDP wurde in beiden Zelllinien im Vergleich mit unbehandelten Zellen nahezu keine zytosolische Calciumakkumulation bestimmt (H12.1  $1,02 \pm 0,01$ ; 1411HP  $1,06 \pm 0,01$ ; *Abb. 46B*). Eine Behandlung mit THP-12 bewirkte hingegen 2 h nach Behandlungsbeginn eine 1,4-fach (H12.1  $1,45 \pm 0,05$ ,  $\alpha < 0,001$ ) bzw. eine 1,3-fach (1411HP  $1,37 \pm 0,04$ ,  $\alpha < 0,001$ ) höhere zytosolische Anreicherung von Calcium im Vergleich mit CDDP (*Abb. 46B*).

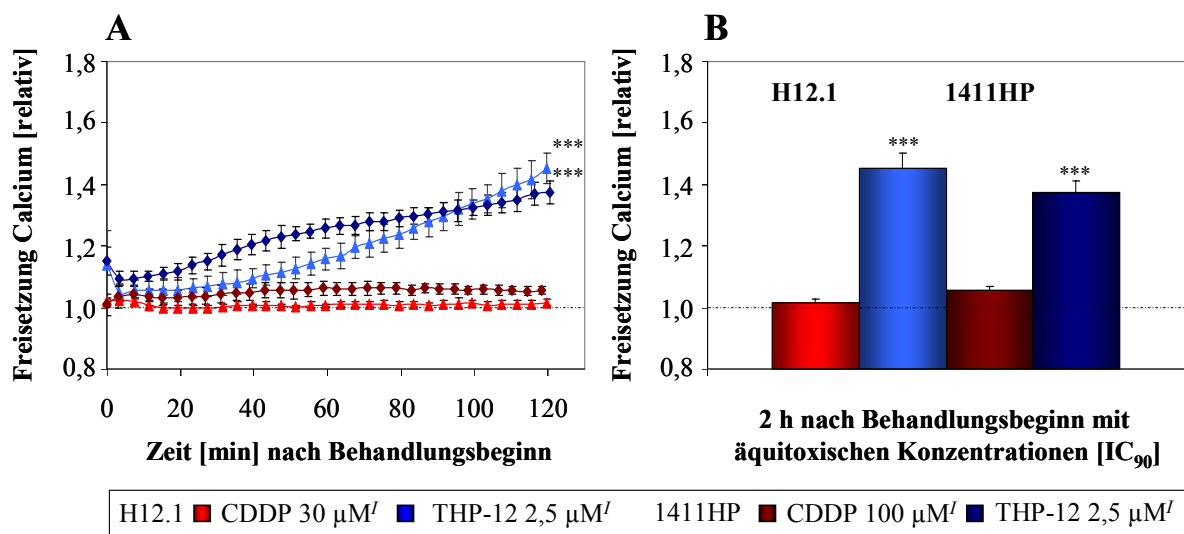


Abb. 46: Zytosolische Calciumfreisetzung in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I*; Analyse im zeitlichen Verlauf über 2 h (A) bzw. 2 h nach Behandlungsbeginn (B); relative Werte behandelte/unbehandelte Zellen;  $x \pm SD$ ;  $n \geq 3$ ; \*\*\* signif. zu CDDP-behandelten Zellen nach 2 h  $\alpha < 0,001$ .

Eine Exposition der H12.1- und 1411HP-Zellen mit den IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>70</sub> und den IC<sub>90</sub> von THP-12 gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas offenbarte ferner eine direkte Korrelation zwischen höheren IC der Substanz und einem Anstieg von Calcium im Zytosol (*Abb. 47*).

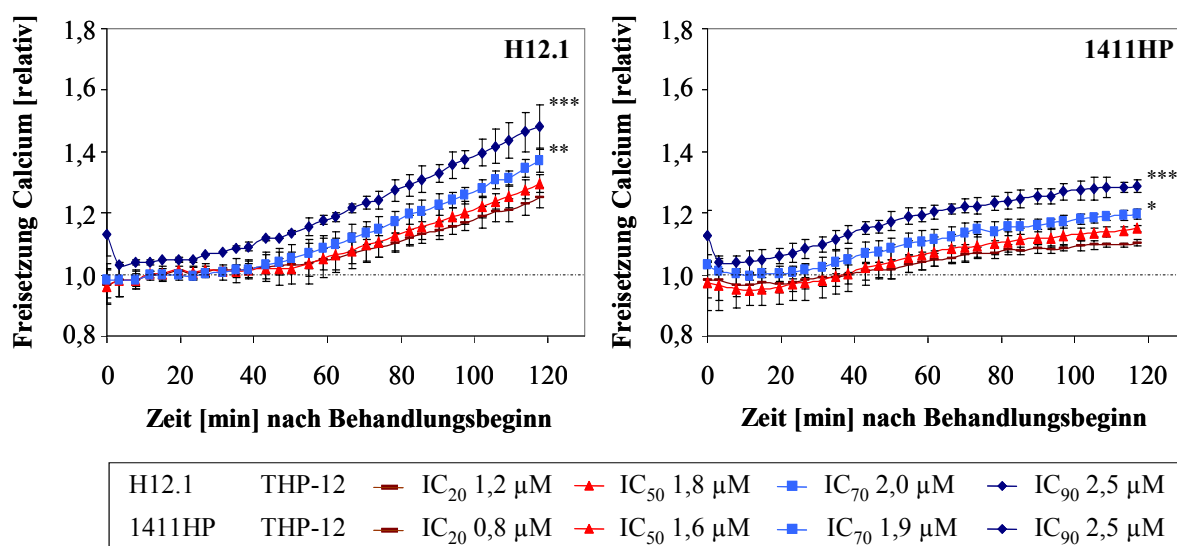


Abb. 47: Zytosolische Calciumfreisetzung in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit den IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>70</sub> und IC<sub>90</sub> von THP-12 gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas; Analyse im zeitlichen Verlauf über 2 h; relative Werte behandelte/unbehandelte Zellen;  $x \pm SD$ ;  $n = 3$ ; \*\*\* signif. zur IC<sub>20</sub> nach 2 h  $\alpha < 0,001$ ; \*\* signif. zur IC<sub>20</sub> nach 2 h  $\alpha < 0,01$ ; \* signif. zur IC<sub>20</sub> nach 2 h  $\alpha < 0,05$ .

Für eine weitere Analyse der Calciumfreisetzung unter THP-12 wurden die Untersuchungen auf die bereits zur Bestimmung der Zytotoxizität und der Platinakkumulation herangezogenen Tumormodelle des Kolon-Karzinoms (SW480 und DLD1) und des Kopf-Hals-Karzinoms (A253 und FaDu) ausgeweitet. Alle Zelllinien wurden mit einer äquimolaren Konzentration von THP-12 exponiert und der Anteil an zytosolischem Calcium über einen zeitlichen Verlauf von 2 h in den adhärennten Zellen erfasst. Um einen Vergleich der Daten mit den Zellen der H12.1 und 1411HP zu ermöglichen, wurde eine Konzentration von 2,5 µM gewählt (Abb. 48). Eine Exposition mit THP-12 bewirkte in allen Zelllinien über die Zeit erneut eine rasche und starke Anreicherung von Calcium im Zytosol (Abb. 48A). 2 h nach Behandlungsbeginn wurde in den Zellen der SW480, DLD1 und A253 ferner eine höhere zytosolische Akkumulation von Calcium im Vergleich mit den Zellen der H12.1 und 1411HP bestimmt (Abb. 48B; siehe auch Abb. 46B S. 77). Die 1,7-fach höhere zytosolische Akkumulation von Calcium unter THP-12 in SW480-Zellen ( $3,25 \pm 0,29$ ) im Vergleich mit DLD1-Zellen ( $1,96 \pm 0,19$ ,  $\alpha < 0,001$ ) korrelierte mit der höheren Sensitivität dieser Zellen für THP-12 und der stärkeren zellulären Platinakkumulation (siehe Tab. 8 S. 49 und Abb. 21 S. 57). In A253-Zellen wurde unter THP-12 2 h nach Behandlungsbeginn ebenso eine höhere Akkumulation von Calcium im Zytosol (1,6-fach,  $2,21 \pm 0,08$ ) im Vergleich mit FaDu-Zellen ( $1,35 \pm 0,04$ ,  $\alpha < 0,01$ ) bestimmt, wobei die höhere Sensitivität der A253 für THP-12 in diesem Falle nicht mit einer höheren Akkumulation der Substanz verbunden war (siehe Tab. 8 S. 49 und Abb. 21 S. 57).

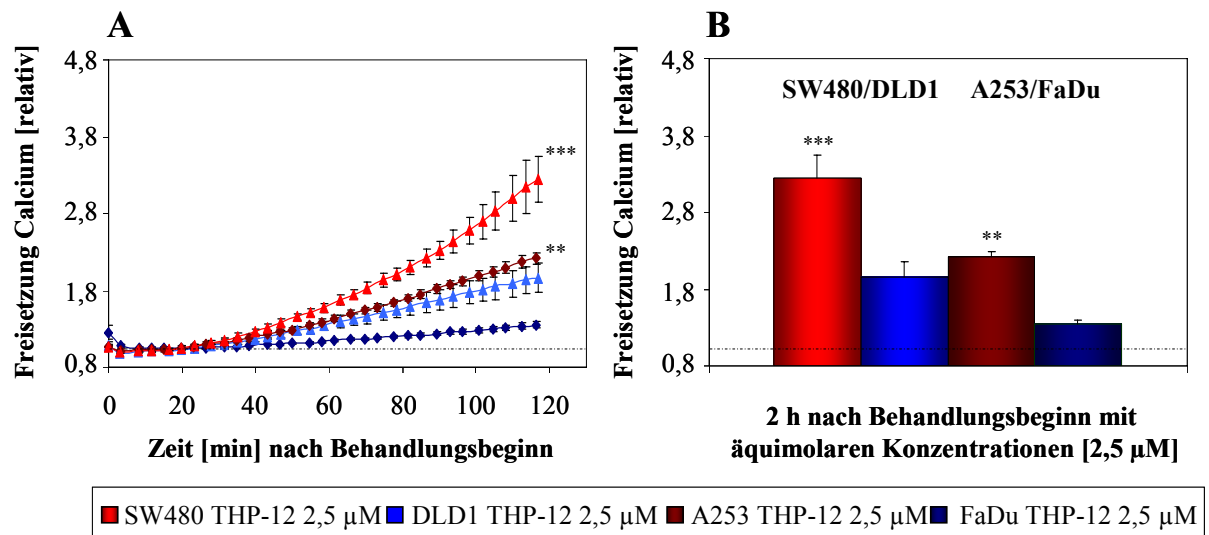


Abb. 48: Zytosolische Calciumfreisetzung in SW480-, DLD1-, A253- und FaDu-Zellen nach einer Behandlung mit 2,5 µM THP-12; Analyse im zeitlichen Verlauf über 2 h (A) bzw. 2 h nach Behandlungsbeginn (B); relative Werte behandelte/unbehandelte Zellen;  $x \pm SD$ ;  $n = 3$ ; \*\*\* signif. zur DLD1 nach 2 h  $\alpha < 0,001$ ; \*\* signif. zur FaDu nach 2 h  $\alpha < 0,01$ .

Um die Relevanz der zytosolischen Calciumfreisetzung in der THP-12-induzierten Apoptose zu prüfen, wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* in Anwesenheit des Calciumchelators BAPTA-AM (10 µM) exponiert. Die Fähigkeit des Chelators zu einer vollständigen Bindung des freigesetzten Calciums wurde direkt nach Behandlungsbeginn sowie zum Zeitpunkt einer hohen Caspase 3-Aktivität und einer Bildung erster flotierender Zellen unter THP-12 8 h nach Behandlungsbeginn über einen zeitlichen Verlauf von 2 h in den adhären Zellen analysiert (*Abb. 49 siehe Anhang S. XVI; siehe auch Abb. 39 S. 73*). Bis 2 h nach Behandlungsbeginn bewirkte BAPTA-AM eine vollständige Bindung des zytosolischen Calciums in CDDP-exponierten H12.1- und 1411HP-Zellen und in THP-12-exponierten 1411HP-Zellen (*Abb. 49A siehe Anhang*). In THP-12-behandelten Zellen der H12.1 wurde demgegenüber bereits 90 min nach Behandlungsbeginn trotz einer Anwesenheit des Chelators eine Akkumulation von Calcium im Zytosol bestimmt (*Abb. 49A siehe Anhang*). Im Analysezeitraum von 8 h bis 10 h nach Behandlungsbeginn ließ sich in beiden Zelllinien ebenso eine nur partielle Bindung des unter THP-12 freigesetzten Calciums durch BAPTA-AM nachweisen (*Abb. 49B siehe Anhang*). Die Exposition der H12.1- und 1411HP-Zellen mit CDDP rief im Vergleich mit THP-12 des Weiteren auch 8 h nach Behandlungsbeginn keine relevante zytosolische Calciumfreisetzung im zeitlichen Verlauf hervor (*Abb. 49B siehe Anhang*). Zum Zeitpunkt einer hohen Caspase 3-Aktivität unter CDDP und einer Bildung erster flotierender Zellen der H12.1 und der 1411HP 17 h nach Behandlungsbeginn gemäß dem *Behandlungsschema I* wurde in beiden Zelllinien



ebenfalls keine relevante Anreicherung von Calcium im Zytosol bestimmt (H12.1  $1,08 \pm 0,04$ ; 1411HP  $0,99 \pm 0,07$ ; relative Werte behandelte/unbehandelte Zellen;  $x \pm SD$ ;  $n = 4$ ; siehe auch Abb. 39 S. 73).

Eine Quantifizierung der unter THP-12 und unter CDDP in Anwesenheit des Calciumchelators gebildeten flotierenden H12.1- und 1411HP-Zellen erfolgte über eine Analyse der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen (Abb. 50). Die Exposition beider Zelllinien mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* führte 24 h nach Behandlungsbeginn trotz einer Anwesenheit von BAPTA-AM mit Ausnahme von CDDP-exponierten Zellen der H12.1 (1,4-fach) zu keiner Reduktion der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen. Eine endgültige Klärung der Relevanz der für THP-12 nachgewiesenen zytosolischen Calciumfreisetzung wurde durch die hohe Eigentoxizität des Calciumchelators bei längeren Inkubationszeiten oder bei Einsatz höherer Konzentrationen limitiert. So wurde nach einer Behandlung beider Zelllinien mit 10  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas lediglich ein verbliebenes Wachstum von  $76,5 \pm 6,0 \%$  der Zellen der H12.1 ( $\alpha < 0,001$ ) bzw. von  $76,8 \pm 10,9 \%$  der Zellen der 1411HP ( $\alpha < 0,001$ ) im Vergleich mit unbehandelten Zellen bestimmt (Analyse mittels SRB-Zytotoxizitäts-Assay 96 h nach Behandlungsbeginn;  $x \pm SD$ ;  $n=7$ ). Aus diesem Grund wurde BAPTA-AM für alle Versuche nur für die Dauer der THP-12- oder der CDDP-Exposition den Zellen zugesetzt.

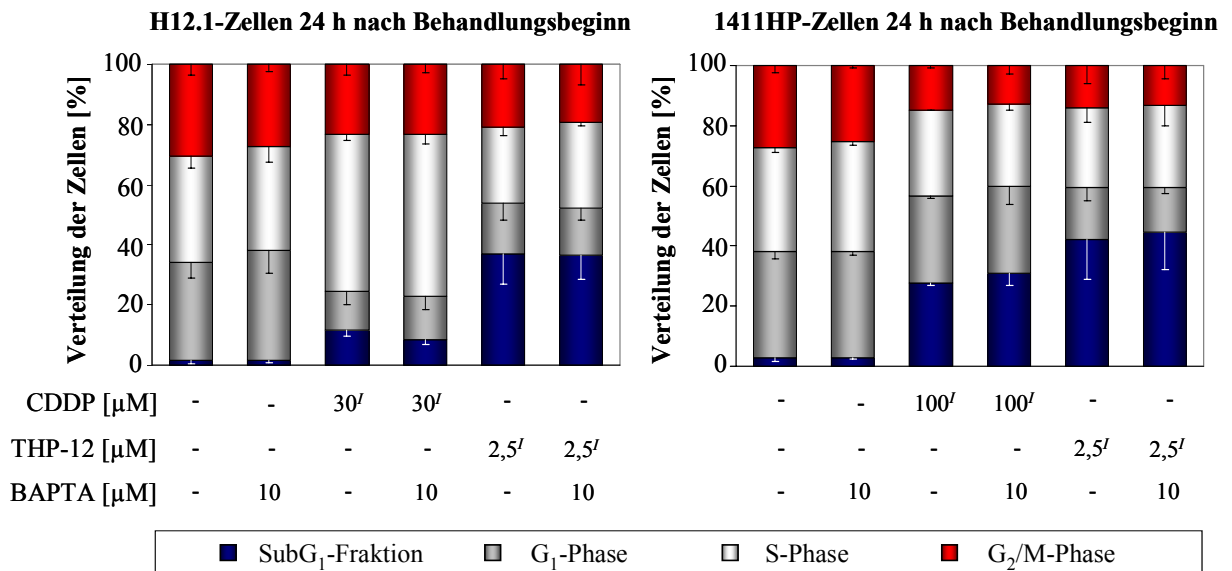


Abb. 50: Zellzyklusphasenverteilung von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* in An- und Abwesenheit von BAPTA-AM; Analyse 24 h nach Behandlungsbeginn;  $x \pm SD$ ;  $n \geq 3$ .



### 3.5.7 Beeinflussung und Relevanz der intrazellulären ROS-Homöostase

Neben dem sekundären proapoptotischen Botenstoff Calcium sollte im Folgenden eine Beteiligung der proapoptotischen ROS im THP-12-induzierten Zelltodsignalweg untersucht werden. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert und eine Bildung von ROS anhand einer Formierung von Superoxidradikalen 2 h nach Behandlungsbeginn über einen zeitlichen Verlauf von 30 min erfasst. Zur Analyse wurden erneut die adhärennten Zellen verwendet, um den initialen Wirkmechanismus von THP-12 im Vergleich mit CDDP aufzuklären. Wie *Abb. 51* darstellt, wurden 2 h nach Behandlungsbeginn höhere Konzentrationen an Superoxidradikalen in den unbehandelten Zellen der sensitiven Zelllinie H12.1 gegenüber denen der resistenten 1411HP detektiert. In H12.1-Zellen wurde ferner 2 h nach Behandlungsbeginn mit CDDP oder mit THP-12 keine Bildung von Superoxidradikalen im Vergleich mit unbehandelten Zellen im zeitlichen Verlauf nachgewiesen. In den Zellen der resistenten 1411HP konnte hingegen 2 h nach Behandlungsbeginn eine moderate Entstehung von Superoxidradikalen unter CDDP sowie eine ausgeprägte Bildung von Superoxidradikalen unter THP-12 im Vergleich mit unbehandelten Zellen im zeitlichen Verlauf beobachtet werden (ab Analysezeit 10 min  $\alpha < 0,001$ ).

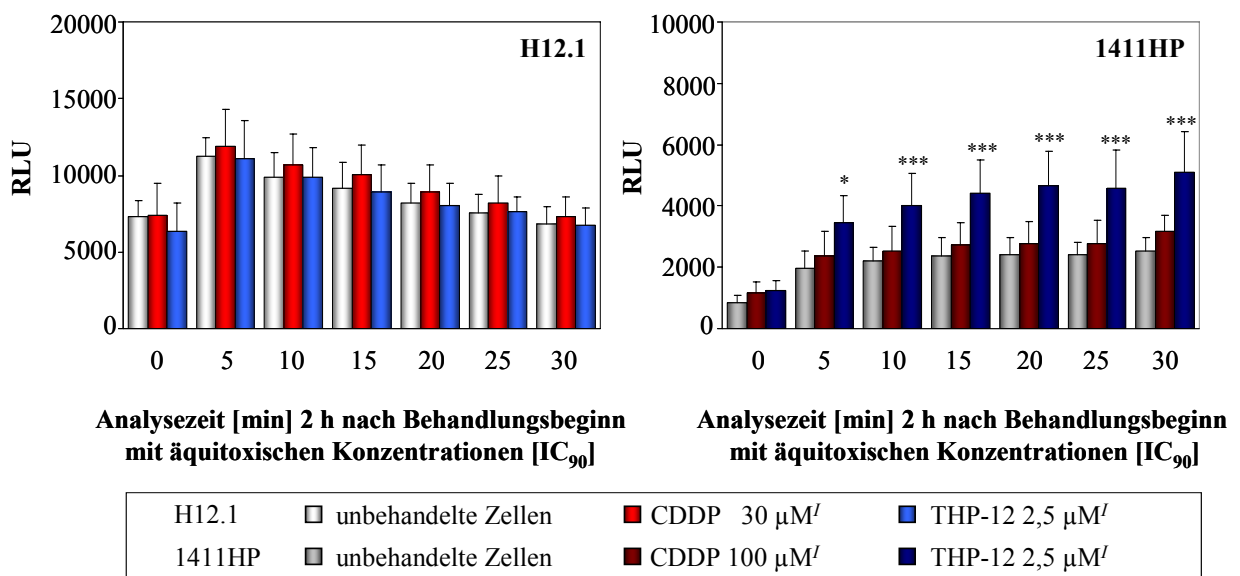


Abb. 51: Bildung von Superoxidradikalen in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I*; Analyse 2 h nach Behandlungsbeginn im zeitlichen Verlauf über 30 min; dargestellt anhand der mittels Lucigenin-Assay erfassten RLU-Werte; relative Werte behandelte/unbehandelte Zellen; x + SD; n = 3; \*\*\* signif. zu unbehandelten Zellen  $\alpha < 0,001$ ; \* signif. zu unbehandelten Zellen  $\alpha < 0,05$ .

Basierend auf der THP-12- und CDDP-vermittelten Bildung von ROS in 1411HP-Zellen sollte ihre Bedeutung für die ausgelöste Apoptose näher analysiert werden. 1411HP-Zellen und auch H12.1-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* in Anwesenheit des Antioxidans NAC (5 mM) exponiert und das Ausmaß der THP-12- und CDDP-initiierten Apoptose anhand der Spaltung von PARP beurteilt (*Abb. 52*). Die Fähigkeit von NAC zu einer vollständigen Inaktivierung von ROS wurde zuvor in Untersuchungen mit Wasserstoffperoxid bestätigt (Daten nicht gezeigt). Eine Exposition beider Zelllinien mit CDDP führte 24 h nach Behandlungsbeginn in Anwesenheit von NAC nur in 1411HP-Zellen zu einer deutlich verminderten Bildung des inaktiven Fragmentes p-85 von PARP bzw. zu einer Zunahme des ungespaltenen Proteins. Nach einer Exposition der 1411HP-Zellen mit THP-12 wurde in Anwesenheit von NAC ebenfalls eine deutliche Hemmung der PARP-Spaltung 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn beobachtet. Der Analysezeitpunkt 8 h nach Behandlungsbeginn entspricht dem Zeitpunkt einer hohen Caspase 3-Aktivität und einer Bildung erster flotierender H12.1- und 1411HP-Zellen unter THP-12. Bei einer Behandlung der H12.1-Zellen mit THP-12 wurde in Anwesenheit von NAC ebenfalls eine deutliche Hemmung der PARP-Spaltung 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn sichtbar. Diese Daten sprechen auch in H12.1-Zellen für eine THP-12-induzierte ROS-Bildung, wobei diese Entstehung im Vergleich mit 1411HP-Zellen verzögert induziert wurde.

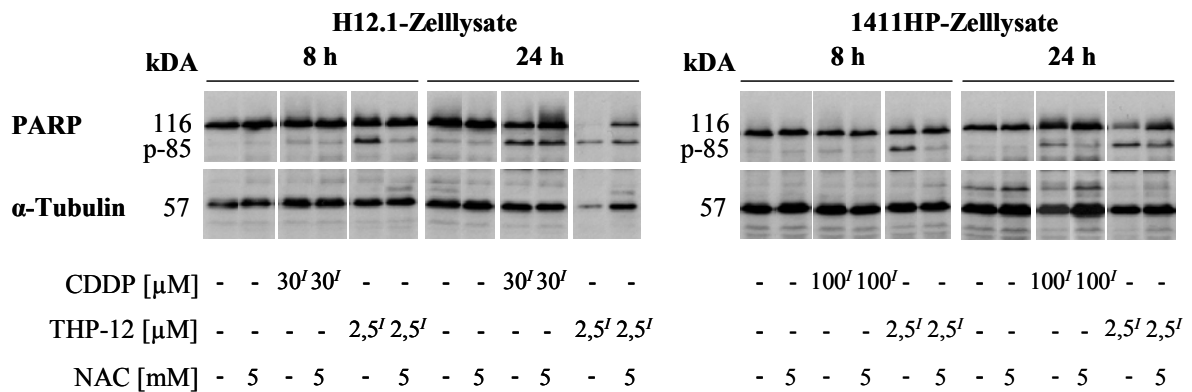


Abb. 52: Spaltung von PARP in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* in An- und Abwesenheit von NAC; Analyse 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentatives Beispiel von 2 Versuchen;  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Eine Quantifizierung der unter THP-12 in Anwesenheit von NAC gebildeten flotierenden H12.1- und 1411HP-Zellen sowie der unter CDDP in Anwesenheit von NAC gebildeten flotierenden 1411HP-Zellen erfolgte über eine Analyse der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen (*Abb. 53*). Eine

Exposition der 1411HP-Zellen mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* führte 24 h nach Behandlungsbeginn in Anwesenheit von NAC zu einer moderaten Reduktion der SubG<sub>1</sub>-Fraktion (2,3-fach,  $\alpha < 0,01$ ). In CDDP-behandelten H12.1-Zellen wurde eine nur marginale Abnahme der SubG<sub>1</sub>-Fraktion in Anwesenheit von NAC sichtbar. Nach einer Exposition beider Zelllinien mit THP-12 wurde in Anwesenheit von NAC demgegenüber eine deutliche Reduktion der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen beobachtet (H12.1 2,7-fach,  $\alpha < 0,001$ ; 1411HP 2,1-fach,  $\alpha < 0,001$ ). Diese Daten einer verminderten Bildung von flotierenden Zellen der H12.1 und der 1411HP unter THP-12 sowie von flotierenden Zellen der 1411HP unter CDDP korrelieren mit der Hemmung der PARP-Spaltung in Gegenwart von NAC in beiden Zelllinien (*siehe auch Abb. 52*). Somit wurde gezeigt, dass sowohl CDDP in 1411HP-Zellen bei Einsatz einer hohen, klinisch nicht relevanten Konzentration gemäß dem *Behandlungsschema I* als auch THP-12 in beiden Zelllinien eine ROS-induzierte Apoptose auslösen.

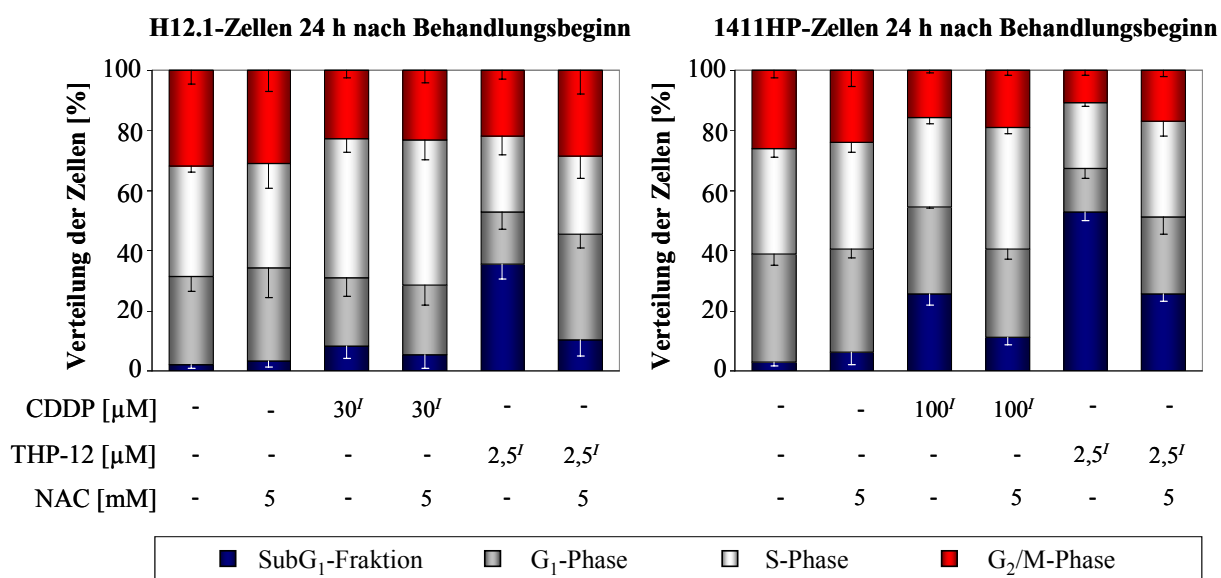


Abb. 53: Zellzyklusphasenverteilung von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* in An- und Abwesenheit von NAC; Analyse 24 h nach Behandlungsbeginn; x - SD; n  $\geq$  3.

Es gilt anzumerken, dass NAC für alle Versuche für die Dauer der Platinexposition zugesetzt wurde. Eine Eigentoxizität des Antioxidans wurde über eine Analyse der Zytotoxizität ausgeschlossen. Nach einer Behandlung mit 5 mM NAC gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas wurde ein verbliebenes Wachstum von  $95,0 \pm 4,4$  % der H12.1-Zellen bzw. von  $99,4 \pm 5,9$  % der 1411HP-Zellen im Vergleich mit unbehandelten Zellen bestimmt (Analyse mittels SRB-Zytotoxizitäts-Assay 96 h nach Behandlungsbeginn; x  $\pm$  SD; n = 7).

### 3.5.8 Beeinflussung und Relevanz der intrazellulären GSH-Homöostase

GSH kann aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität zu CDDP zu einer Inaktivierung der Substanz führen und darüber hinaus als Antioxidans fungieren. Im Hinblick auf die hohe Akkumulation von THP-12, die weitgehend DNA-unabhängig vermittelte Apoptose und die Induktion einer ROS-Bildung sollte eine Bindung von THP-12 an GSH im Vergleich mit CDDP untersucht werden. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert und eine GSH-Bindung indirekt über eine Analyse der freien GSH-Konzentrationen in den adhären Zellen erfasst. Wie *Abb. 54* zeigt, wurde 4 h nach Behandlungsbeginn in unbehandelten resistenten 1411HP-Zellen eine höhere freie GSH-Konzentration gegenüber H12.1-Zellen detektiert. Eine Exposition der H12.1-Zellen mit CDDP oder mit THP-12 führte ferner zu einer nur marginalen Verminderung von GSH gegenüber unbehandelten Zellen. In 1411HP-Zellen wurde hingegen 4 h nach Behandlungsbeginn mit beiden Substanzen eine stärkere Abnahme der freien GSH-Konzentrationen im Vergleich mit unbehandelten Zellen sichtbar (CDDP 1,3-fach; THP-12 1,6-fach,  $\alpha < 0,05$ ).

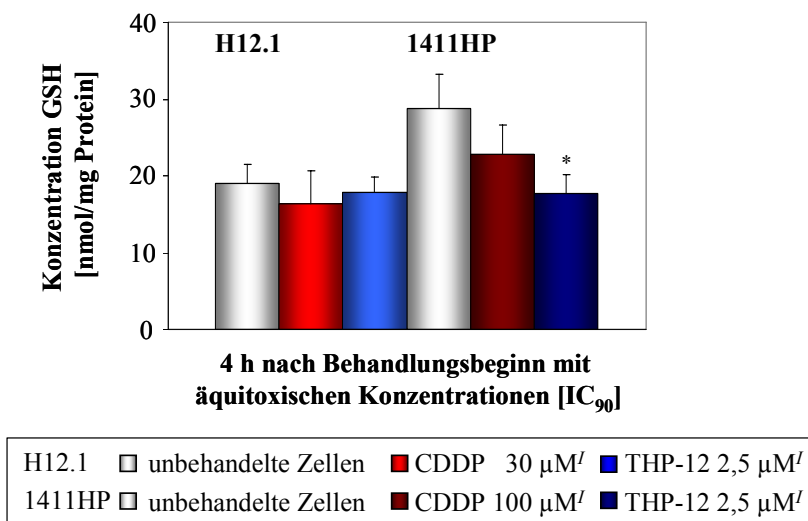


Abb. 54: Abnahme von freien GSH-Konzentrationen in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I*; Analyse 4 h nach Behandlungsbeginn,  $\bar{x} + SD$ ; n = 3; \* signif. zu unbehandelten Zellen  $\alpha < 0,05$ .

Im Weiteren wurde die Relevanz des zellulären GSH-Status für die THP-12- und die CDDP-induzierte Apoptose charakterisiert. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit 100 µM des GSH-Syntheseinhibitors BSO für 24 h vorbehandelt und nachfolgend mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert. Eine Quantifizierung der unter beiden Platin-substanzen nach einer Vorinkubation mit BSO gebildeten flotierenden H12.1- und 1411HP-

Zellen erfolgte über eine Analyse der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen (Abb. 56). Die Fähigkeit von BSO zur Inhibierung der GSH-Synthese wurde zuvor anhand einer Reduktion von freiem GSH zum Zeitpunkt der Platinzugabe, d. h. 24 h nach der Inkubation mit BSO, in beiden Zelllinien bestätigt (H12.1 6,1-fach,  $\alpha < 0,01$ ; 1411HP 6,1-fach,  $\alpha < 0,001$ ; Abb. 55 siehe Anhang S. XVII). Eine Exposition BSO-vorbehandelter H12.1-Zellen mit CDDP bewirkte 24 h nach Behandlungsbeginn eine moderate Zunahme der SubG<sub>1</sub>-Fraktion. Nach einer Exposition BSO-vorbehandelter H12.1-Zellen mit THP-12 und von 1411HP-Zellen mit CDDP oder mit THP-12 wurde ein ausgeprägter Anstieg der SubG<sub>1</sub>-Fraktionen sichtbar (H12.1 THP-12 1,6-fach,  $\alpha < 0,001$ ; 1411HP CDDP 3,2-fach,  $\alpha < 0,001$ ; 1411HP THP-12 1,7-fach,  $\alpha < 0,001$ ). Diese Daten korrelieren bezüglich der antioxidativen Wirkung von GSH mit den in Anwesenheit von NAC ermittelten SubG<sub>1</sub>-Daten (siehe auch Abb. 53 S. 83). Sie belegen ferner die Relevanz des zellulären GSH-Status sowohl für die CDDP-ausgelöste Apoptose in 1411HP-Zellen bei Einsatz einer hohen, klinisch nicht relevanten Konzentration gemäß dem *Behandlungsschema I* als auch für die THP-12-initiierte Apoptose in beiden Zelllinien.

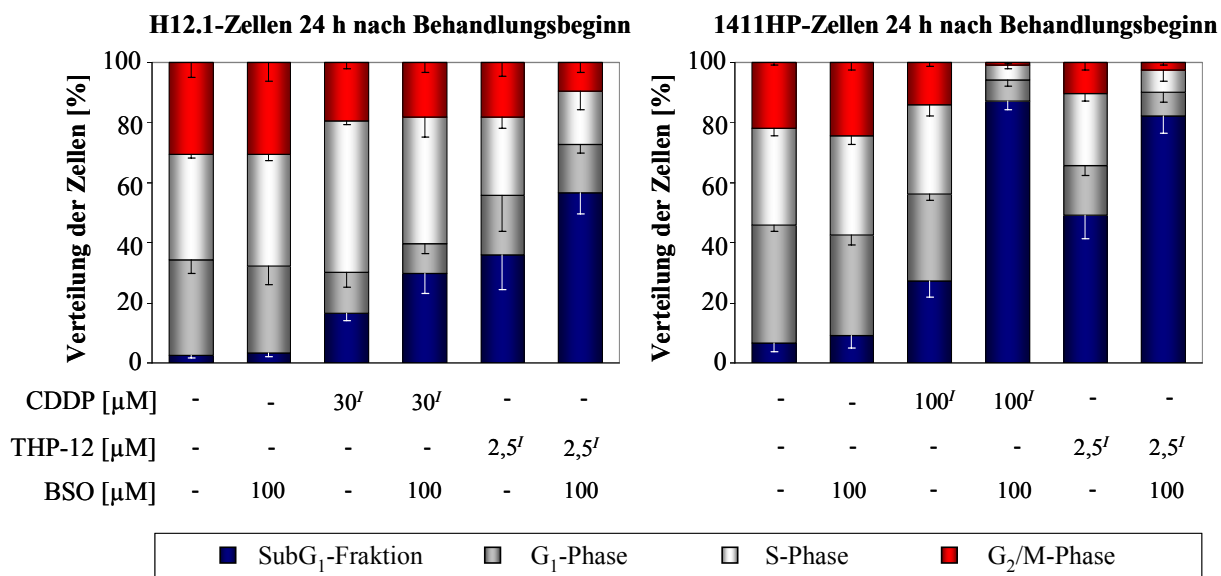


Abb. 56: Zellzyklusphasenverteilung von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Vorinkubation mit BSO für 24 h und einer nachfolgenden Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I*; Analyse 24 h nach Behandlungsbeginn; x - SD; n  $\geq$  3.

Eine Eigentoxizität von BSO wurde ausgeschlossen. Nach einer Behandlung mit 100  $\mu$ M BSO gemäß eines 24 h-Behandlungsschemas wurde ein verbliebenes Wachstum von  $83,4 \pm 12,0$  % der H12.1-Zellen bzw. von  $94,5 \pm 0,7$  % der 1411HP-Zellen ermittelt (Analyse mittels SRB-Zytotoxizitäts-Assay 96 h nach Behandlungsbeginn; x  $\pm$  SD; n = 3).

### 3.5.9 Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials

Den Mitochondrien kommen aufgrund einer Verstärkung der proapoptotischen Signale essenzielle Funktionen in einer CDDP-vermittelten Apoptose zu. Hierbei werden der Öffnung einer mitochondrialen PTP und einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) wesentliche Bedeutungen in einer Caspasen-abhängig und in einer Caspasen-unabhängig initiierten Apoptose zugesprochen. Um die Rolle der Mitochondrien in der durch THP-12 induzierten, nahezu DNA-unabhängig und Caspasen-unabhängig ausgelösten Apoptose zu charakterisieren, wurde eine Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität der Zellen durch THP-12 im Vergleich mit CDDP untersucht. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert und eine Depolarisierung von  $\Delta\Psi_m$  mittels DePsipher-Reagenz mikroskopisch anhand einer Bildung von grün fluoreszierenden Zellen analysiert (*Abb. 57 siehe Anhang S. XVIII*). 8 h nach Behandlungsbeginn mit CDDP wurden in beiden Zelllinien keine grün fluoreszierenden,  $\Delta\Psi_m$ -geschädigten Zellen sichtbar. Eine Exposition der resistenten 1411HP-Zellen mit THP-12 führte hingegen zum Zeitpunkt einer hohen Caspase 3-Aktivität und einer Bildung erster flotierender Zellen unter THP-12 8 h nach Behandlungsbeginn zu einem verstärkten Auftreten von grün fluoreszierenden,  $\Delta\Psi_m$ -geschädigten Zellen. Zudem wurde eine vollständig grüne Fluoreszenz in den unter THP-12 gebildeten flotierenden Zellen der 1411HP sichtbar.

Basierend auf der möglichen differenziellen Schädigung der Mitochondrien durch THP-12 und durch CDDP wurde die Bedeutung eines Verlustes von  $\Delta\Psi_m$  in der initiierten Apoptose näher analysiert. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit beiden Substanzen gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert und eine Abnahme von  $\Delta\Psi_m$  anhand einer Bildung von grün fluoreszierenden Zellen 8 h nach Behandlungsbeginn mittels DePsipher-Reagenz quantifiziert. Zudem wurde eine Depolarisierung von  $\Delta\Psi_m$  durch aktive Caspasen in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors (60  $\mu\text{M}$ ) und durch gebildete ROS in Anwesenheit von NAC (5 mM) sowie eine Stabilisierung von  $\Delta\Psi_m$  in Anwesenheit des Membranporeninhibitors CSA (10  $\mu\text{M}$ ) überprüft (*Abb. 58*). Eine Exposition beider Zelllinien mit CDDP rief 8 h nach Behandlungsbeginn nahezu keinen Verlust von  $\Delta\Psi_m$  im Vergleich mit unbehandelten Zellen hervor (H12.1  $1,8 \pm 0,5$ ; 1411HP  $1,5 \pm 0,2$ ). Eine Behandlung mit THP-12 führte hingegen zu einem 3,8-fach (H12.1  $6,8 \pm 3,2$ ) bzw. zu einem 15,9-fach (1411HP  $23,9 \pm 3,7$ ,  $\alpha < 0,001$ ) stärkeren Zusammenbruch von  $\Delta\Psi_m$  im Vergleich mit CDDP (H12.1  $6,8 \pm 3,2$ ; 1411HP  $23,9 \pm 3,7$ ,  $\alpha < 0,001$ ). In Zellen, die als Positivkontrolle mitgeführt wurden, wurde 20 h nach

Behandlungsbeginn mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema II* eine ausgeprägte Depolarisierung von  $\Delta\Psi_m$  im Vergleich mit CDDP beobachtet (H12.1  $20,3 \pm 5,3$ ,  $\alpha < 0,001$ ; 1411HP  $43,4 \pm 16,5$ ,  $\alpha < 0,001$ ). In Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors wurde darüber hinaus in 1411HP-Zellen eine 3,0-fache Hemmung des THP-12-initiierten Verlustes von  $\Delta\Psi_m$  sichtbar ( $7,9 \pm 4,6$ ,  $\alpha < 0,01$ ). In Anwesenheit des Antioxidans NAC zeigte sich in 1411HP-Zellen ebenso eine 2,4-fache Abnahme des THP-12-initiierten Zusammenbruches von  $\Delta\Psi_m$  ( $10,1 \pm 3,0$ ,  $\alpha < 0,05$ ). In Anwesenheit des Poreninhibitors CSA wurde ferner eine 1,5-fache Hemmung des THP-12-initiierten Verlustes von  $\Delta\Psi_m$  in 1411HP-Zellen nachgewiesen ( $16,5 \pm 3,5$ ). Diese Daten verdeutlichen, dass THP-12 im Vergleich mit CDDP insbesondere in der resistenten Zelllinie einen frühzeitigen Verlust von  $\Delta\Psi_m$  initiiert, der zumindest partiell über die unter THP-12 aktivierten Caspasen und die gebildeten ROS und geringfügig über die Öffnung einer mitochondrialen PTP vermittelt wird.

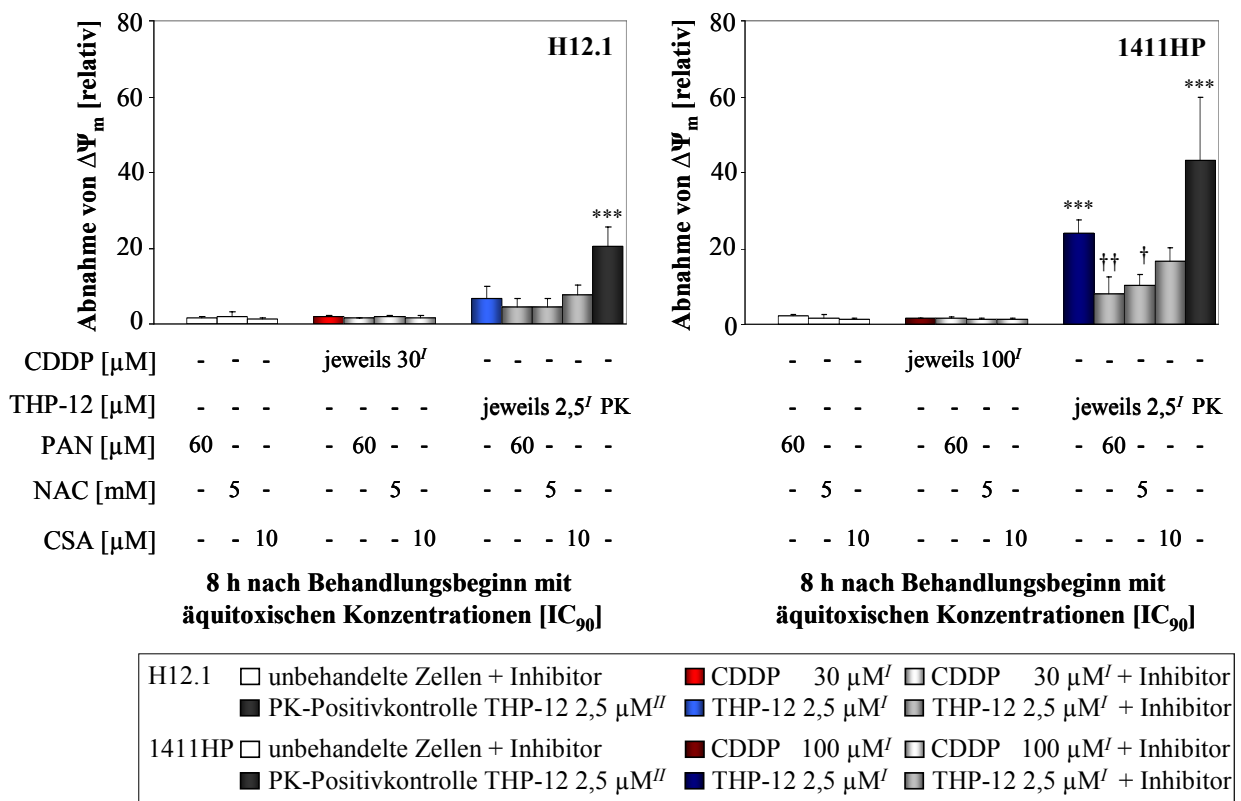


Abb. 58: Abnahme von  $\Delta\Psi_m$  in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* in An- und Abwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors, von NAC oder von CSA; Analyse 8 h nach Behandlungsbeginn; PK - Positivkontrolle nach einer Behandlung der Zellen mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema II* (Analyse 20 h nach Behandlungsbeginn); relative Werte behandelte/unbehandelte Zellen; x + SD; n = 3; \*\*\* signif. zu CDDP-behandelten Zellen  $\alpha < 0,001$ ; †† signif. zu THP-12-behandelter 1411HP  $\alpha < 0,01$ ; † signif. zu THP-12-behandelter 1411HP  $\alpha < 0,05$ .

Um zu prüfen, inwieweit die aktivierten Caspasen und die gebildeten ROS an einem initialen Verlust von  $\Delta\Psi_m$  beteiligt sind, wurden H12.1- und 1411HP-Zellen mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema I* in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors oder von NAC exponiert und 4 h nach Behandlungsbeginn untersucht (*Abb. 59*). Eine Exposition beider Zelllinien mit THP-12 führte erneut vor allem in 1411HP-Zellen zu einer frühen Abnahme von  $\Delta\Psi_m$  im Vergleich mit unbehandelten Zellen (H12.1  $1,5 \pm 0,3$ ; 1411HP  $3,3 \pm 1,1$ ). In Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors wurde in beiden Zelllinien nahezu keine Beeinflussung des THP-12-initiierten Zusammenbruches von  $\Delta\Psi_m$  beobachtet. In Anwesenheit von NAC wurde hingegen in 1411HP-Zellen eine 1,8-fache Abnahme des THP-12-vermittelten Verlustes von  $\Delta\Psi_m$  sichtbar ( $1,8 \pm 0,4$ ). Diese Daten korrelieren mit denen der zeitlichen ROS-Formierung und der Caspasenaktivierung unter THP-12 in der resistenten Zelllinie 1411HP und zeigen, dass der initiale Verlust von  $\Delta\Psi_m$  in diesen Zellen vorrangig über die gebildeten ROS und nicht über die Caspasen vermittelt wird (*siehe auch Abb. 39 S. 73 und Abb. 51 S. 81*).

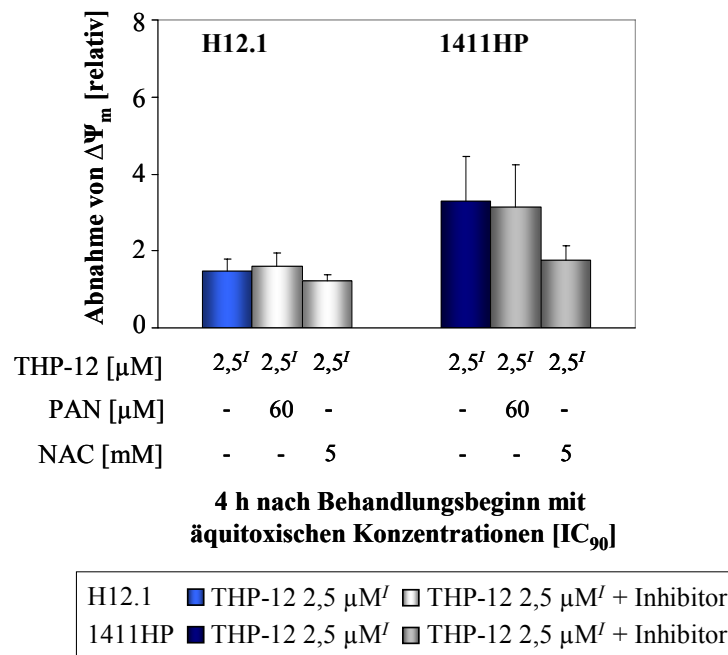


Abb. 59: Abnahme von  $\Delta\Psi_m$  in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema I* in An- und Abwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors oder von NAC; Analyse 4 h nach Behandlungsbeginn; relative Werte behandelte/unbehandelte Zellen;  $x \pm \text{SD}$ ;  $n = 3$ .

Im Weiteren wurde die Relevanz eines Verlustes von  $\Delta\Psi_m$  für die CDDP-induzierte Apoptose untersucht. H12.1- und 1411HP-Zellen wurden mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* exponiert und eine Abnahme von  $\Delta\Psi_m$  zum Zeitpunkt einer hohen Caspase 3-Aktivität und einer Bildung erster flotierender Zellen 17 h nach Behandlungsbeginn analysiert (*Abb. 60*;



siehe auch Abb. 39 S. 73). Eine CDDP-Behandlung beider Zelllinien führte zu einem nur moderaten Verlust von  $\Delta\Psi_m$  im Vergleich mit unbehandelten Zellen (H12.1  $2,2 \pm 0,7$ ; 1411HP  $5,8 \pm 1,3$ ). In Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors wurde in den Zellen der 1411HP eine 2,0-fache Hemmung des CDDP-initiierten Zusammenbruches von  $\Delta\Psi_m$  sichtbar ( $2,9 \pm 1,0$ ,  $\alpha < 0,01$ ). In Anwesenheit von NAC zeigte sich zudem eine 2,9-fache Abnahme des CDDP-vermittelten Verlustes von  $\Delta\Psi_m$  in 1411HP-Zellen ( $2,0 \pm 0,3$ ,  $\alpha < 0,001$ ). Diese Daten zeigen, dass CDDP bei Einsatz einer hohen, klinisch nicht relevanten Konzentration gemäß dem *Behandlungsschema I* an einem THP-12 äquitoxischen Zeitpunkt einen eher moderaten Verlust von  $\Delta\Psi_m$  auslöst, der jedoch in den Zellen der resistenten 1411HP ebenso partiell über die aktivierten Caspasen und die gebildeten ROS vermittelt wird.

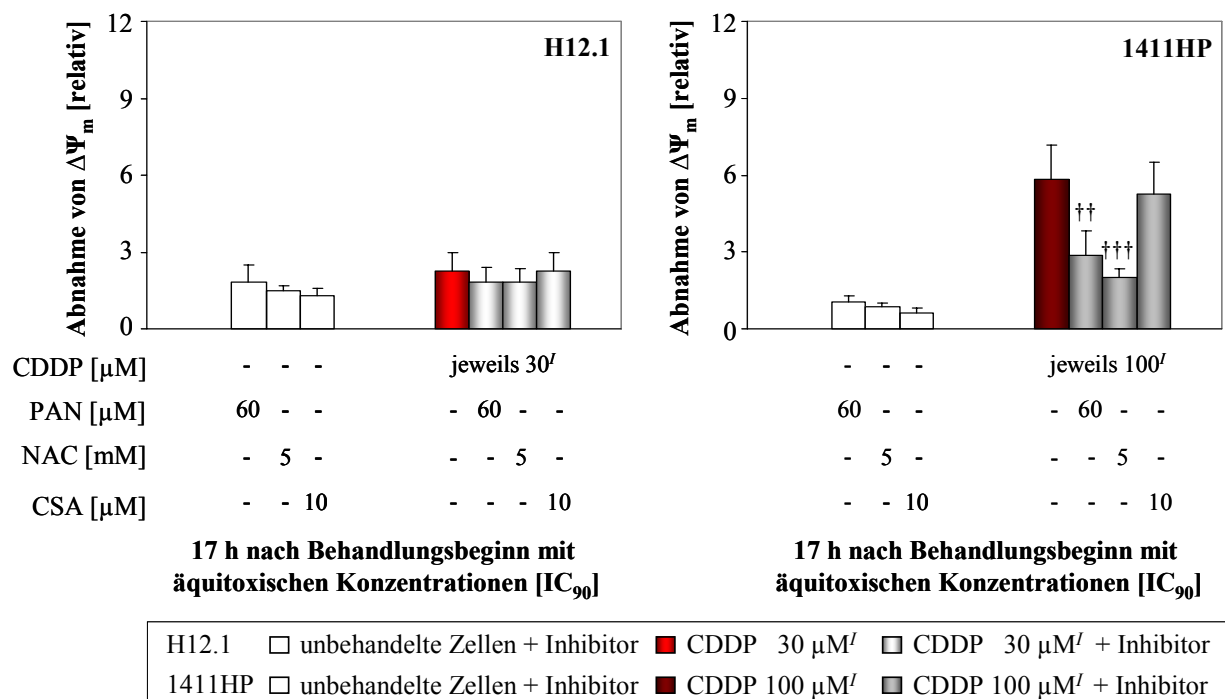


Abb. 60: Abnahme von  $\Delta\Psi_m$  in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* in An- und Abwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors, von NAC oder von CSA; Analyse 17 h nach Behandlungsbeginn; relative Werte behandelte/unbehandelte Zellen;  $x \pm \text{SD}$ ;  $n \geq 3$ ; ††† signif. zu CDDP-behandelter 1411HP  $\alpha < 0,001$ ; †† signif. zu CDDP-behandelter 1411HP  $\alpha < 0,01$ .

Eine Eigentoxizität von CSA wurde ausgeschlossen. Nach einer Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  CSA gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas wurde ein verbliebenes Wachstum von  $96,8 \pm 4,6$  % der H12.1-Zellen bzw. von  $98,4 \pm 3,5$  % der 1411HP-Zellen bestimmt (Analyse mittels SRB-Zytotoxizitäts-Assay 96 h nach Behandlungsbeginn;  $x \pm \text{SD}$ ;  $n = 7$ ).

## 4 Diskussion

Krebserkrankungen sind nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Neben einer operativen Entfernung des Tumors und einer Bestrahlung bildet die systemische Chemotherapie einen Eckpfeiler in der Behandlung solider, insbesondere fortgeschrittener Tumoren. Platinverbindungen nehmen aufgrund ihrer hohen zytotoxischen Effizienz einen zentralen Stellenwert in der Chemotherapie maligner Krebserkrankungen ein. Bis heute befinden sich fünf Substanzen in klinischer Anwendung, die in Mono- oder in Kombinationschemotherapien eingesetzt werden. Die Muttersubstanz CDDP zählt zu den potentesten Medikamenten in der antitumoralen Therapie und bildet einen wichtigen Bestandteil der Chemotherapieschemata von TKZT, Ovarial-, Endometrium-, Zervix-, Blasen-, Prostata-, Ösophagus-, klein- und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich sowie von Melanomen und von Sarkomen<sup>4</sup>. Mit der Einführung einer auf CDDP basierenden Kombinationschemotherapie sind metastasierte TKZT kurativ behandelbar geworden. So kann bei einer Behandlung mit CDDP bei einer frühzeitigen Diagnose eine Heilungsrate von über 80 % erzielt werden<sup>7</sup>. Patienten mit einem CDDP-refraktären oder mit einem rezidivierenden Tumor besitzen mit einer konventionellen CDDP-haltigen Chemotherapie jedoch meist nur geringe Überlebenschancen. Zudem ist die Mehrzahl der soliden Tumoren anderer Entitäten in einem metastasierten Stadium nur einer palliativen Therapie zugänglich. Vielfach steht einer Heilung der Tumorerkrankung eine Resistenzentwicklung der Zellen gegenüber dem Zytostatikum oder das Auftreten von UAW entgegen, die die klinische Effektivität der Substanz limitieren. Die Entwicklung und die Charakterisierung neuer Platinverbindungen mit einer fehlenden CDDP-Resistenz bildet daher eine wesentliche Aufgabe in der onkologischen Forschung und ermöglicht zudem neue Erkenntnisse zur multifaktoriellen Entstehung einer CDDP-Resistenz.

Mit Ausnahme von Picoplatin, Satraplatin, BBR3464 und Bamet-UD2, die sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt in präklinischen und klinischen Testungen befinden, gab es in den letzten 30 Jahren nur wenige Fortschritte, eine intrinsische oder erworbene CDDP-Resistenz zu überwinden. Platinverbindungen mit alternativen Mechanismen zur Auslösung eines spezifischen Zelltodes stellen daher vielversprechende neue Substanzen in der Tumorthherapie dar. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte eine molekularpharmakologische Charakterisierung des neuen Platinkomplexes THP-12 (*cis*-Dichloro(2-{11-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]undecyl}propan-1,3-diamino)platin(II))<sup>88-90</sup> hinsichtlich der zytotoxischen Aktivität und des initiierten Wirkmechanismus *in vitro* erfolgen. Alle Untersuchungen

wurden vorrangig im humanen TKZT-Modell der CDDP-sensitiven Zelllinie H12.1 und der CDDP-resistenten Zelllinie 1411HP im Vergleich mit CDDP durchgeführt. Beide Zelllinien entsprechen dem klinisch relevanten Typ eines nichtseminomatösen TKZT und stellen ein standardisiertes *In-vitro*- und *In-vivo*-Modell zur Analyse verschiedener Fragestellungen zur Tumorthherapie und zur Tumorbiologie innerhalb unserer Arbeitsgruppe dar<sup>182, 210, 211</sup>. Gegebenenfalls wurden das humane Kolonkarzinom-Modell der CDDP-resistenten Zelllinien SW480 und DLD1 und das humane Kopf-Hals-Karzinom-Modell der CDDP-sensitiven Zelllinien A253 und FaDu für die Studien herangezogen. Neben einer Beurteilung der zytotoxischen Aktivität von THP-12 sollte insbesondere die zelluläre Anreicherung der Substanz, die Reaktivität mit der genomischen DNA und die Art des THP-12-induzierten Zelltodes erfasst werden. Mit der Zielsetzung, neue Erkenntnisse über die Fähigkeit von THP-12 zu einer Überwindung der CDDP-Resistenz der TKZT-Zelllinie 1411HP zu erhalten, sollte darüber hinaus der ausgelöste Zelltodsignalweg analysiert werden.

#### 4.1 Charakterisierung der Zytotoxizität von THP-12 im Vergleich mit CDDP

Durch Voruntersuchungen der strukturverwandten *cis*-Dichloro(m-{n-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]Alkyl<sup>1</sup>}Alkyl<sup>2</sup>-diamino)platin(II)-Derivate (THP-1 bis THP-12), die sich bezüglich der Anbindung der Platingruppe an die THP-Alkylkettenstruktur (Alkyl<sup>2</sup>) und den Längen der THP-Alkylketten (Alkyl<sup>1</sup>) unterscheiden, wurden in den TKZT-Zelllinien H12.1 und 1411HP direkte Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen den Zytotoxizitäten der Verbindungen und den Kettenlängen der THP-Alkylstrukturen nachgewiesen. *cis*-Dichloro(2-{11-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]undecyl}propan-1,3-diamino)platin(II) (THP-12) wurde im Rahmen der Testungen als wirksamste THP-Substanz identifiziert<sup>91</sup>. Erste *In-vitro*-Studien als Grundlage dieser Dissertation bestätigten die Fähigkeit von THP-12 zu einer vollständigen Überwindung der intrinsischen, gegenüber der sensitiven Zelllinie H12.1 ca. 3-fachen bis 4-fachen CDDP-Resistenz der 1411HP unabhängig von der Verwendung eines 2 h-, 24 h- oder eines 96 h-Behandlungsschemas. Zudem konnte gezeigt werden, dass THP-12 bei allen Behandlungsschemata die gleiche zytotoxische Aktivität aufwies. Eine Bewertung der Zytotoxizität von THP-12 an einem Panel weiterer humaner TKZT-Zelllinien mit unterschiedlicher CDDP-Sensitivität ergab bei einem Einsatz eines 2 h-Behandlungsschemas ferner eine dem CDDP überlegene Wirkung der Substanz in allen Zelllinien. Zudem zeigte THP-12 unabhängig von dem gewählten Behandlungsschema das Potential zur Überwindung der intrinsischen CDDP-Resistenz der Zelllinie 1777NRpmet und der intrinsischen CDDP-intermediären Resistenz der

Zelllinie 577MF. Analysen mit 14 weiteren humanen Zelllinien anderer Tumorentitäten, abgeleitet von Kopf-Hals-, Bronchial-, Schilddrüsen-, Ovarial-, Zervix-, Kolon-, Mamma- und Magenkarzinomen und von Melanomen, offenbarten bei Verwendung eines 2 h-Behandlungsschemas erneut eine stärkere Zytotoxizität von THP-12 im Vergleich mit CDDP in allen untersuchten Zelllinien. Neben der hohen zytotoxischen Aktivität von THP-12 in den TKZT-Zelllinien ließen sich insbesondere hohe Wirksamkeiten in den ebenfalls für CDDP sensitiven Zelllinien A549 (Bronchial-), A2780 (Ovarial-), A431 (Zervix-) und A253 (Kopf-Hals-Karzinom) nachweisen. Zudem führte THP-12 zu einer Überwindung der intrinsischen CDDP-Resistenz der Schilddrüsenkarzinom-, Mammakarzinom- und Melanomzelllinien und von einigen der getesteten Kolonkarzinomzelllinien. Der Ausschluss einer Zytotoxizität der Substanz in primären nichtmalignen Zellen wurde über eine Analyse in hMSC erbracht, in denen THP-12 wie CDDP bei Einsatz eines 2 h-Behandlungsschemas nahezu keine Wirkung zeigte. Die ausgeprägte zytotoxische Wirkung von THP-12 bei einer Behandlung der 21 untersuchten Zelllinien verschiedenster Tumorentitäten und CDDP-Sensitivität zeugt für das vielversprechende Potential der Platinverbindung im Vergleich mit konventionellen Zytostatika mit auftretender CDDP-Kreuzresistenz. So ist die CDDP-Resistenz der TKZT-Zelllinie 1411HP mit einer Resistenz gegenüber Oxaliplatin, 5-Fluorouracil, Gemcitabin, Topotecan, Etoposid, Paclitaxel und Vincristin assoziiert<sup>182</sup>, die THP-12 überwinden kann. Die hohe Zytotoxizität der Substanz bei Verwendung einer kurzen Behandlungszeit lässt hierbei bereits einen differenziellen Zelltodmechanismus im Vergleich mit CDDP vermuten. Langzeit-Zytotoxizitäts-Studien mit H12.1- und 1411HP-Zellen bestätigen diese Hypothese. Eine Exposition mit CDDP gemäß eines 96 h-Behandlungsschemas führte zu einer stetigen Hemmung des Zellwachstums über die Analysezeit von 14 d, während unter THP-12 in den Zellen der CDDP-sensitiven H12.1 intermittierend ein erneutes Wachstum im Bereich der IC<sub>90</sub> beobachtet wurde. CDDP scheint demnach die Ausprägung eines gegenüber THP-12 verzögert einsetzenden, aber längerfristig anhaltenden zytotoxischen Effektes zu bewirken, wohingegen THP-12 eine frühzeitige und stärkere Zytotoxizität initiiert, die von einigen Zellen der H12.1 eventuell toleriert werden kann. Diese Daten sprechen für einen Einsatz von THP-12 als Kombinationschemotherapeutikum mit anderen Zytostatika, wie mit Antimetaboliten, Topoisomeraseinhibitoren und Taxanen, für die eine synergistische Wirkung mit CDDP nachgewiesen wurde<sup>212</sup>. Analysen zur Wirksamkeit der strukturellen Bestandteile von THP-12 wiesen ferner eine Bindung der Zytotoxizität an die Gesamtstruktur des THP-12-Moleküls nach. Sowohl die CDDP-Kopfgruppe der Substanz als auch die THP(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-Alkylkettenstruktur sind somit für die zytotoxische Wirkung von THP-12 unerlässlich.

#### 4.2 Charakterisierung des THP-12-initiierten Zelltodes im Vergleich mit CDDP

Eine Initiierung von Apoptose stellt ein zentrales Ereignis der CDDP-vermittelten Zytotoxizität dar<sup>24, 26</sup>. In zahlreichen Tumormodellen wurde die Auslösung von Apoptose durch CDDP *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen<sup>182-193</sup>. Die Analyse des durch THP-12 ausgelösten Zelltodes wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation im TKZT-Modell der Zelllinien H12.1 und 1411HP im Vergleich mit CDDP durchgeführt. Basierend auf den Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden die IC<sub>90</sub> beider Substanzen gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II* verwendet. In beiden Zelllinien konnte die Auslösung eines apoptotischen Zelltodes durch CDDP und durch THP-12 anhand drei standardisierter Nachweismethoden belegt werden. Die unter beiden Platinverbindungen gebildeten flotierenden Zellen zeigten die klassischen Merkmale apoptotischer Zellen, gekennzeichnet durch ihre Fähigkeit zum Ausschluss des Farbstoffes Trypanblau aufgrund der Beibehaltung der Integrität der Zellmembranen sowie durch ihre Fähigkeit zur Ausprägung einer charakteristischen DNA-Leiterstruktur infolge der einsetzenden DNA-Fragmentierung. Ein weiterer Nachweis wurde über eine Analyse der Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP erbracht, das im Verlauf einer Apoptose durch die Effektorcaspasen 3 und 7 in das apoptotische Fragment p-85 gespalten wird<sup>111, 112</sup>. Die hohe zytotoxische Aktivität von THP-12 war jedoch mit einer gegenüber CDDP deutlich früheren Einleitung der apoptotischen Prozesse assoziiert. Bereits 8 h nach Behandlungsbeginn mit THP-12 wurde eine Bildung von flotierenden Zellen in beiden Zelllinien beobachtet, die 24 h nach Behandlungsbeginn in einem apoptotischen Zelltod von ca. 50 % bis 60 % der Zellen der H12.1 und von ca. 70 % bis 80 % der Zellen der 1411HP resultierte.

#### 4.3 Charakterisierung der zellulären Substanzakkumulation und der DNA-Platinierung von THP-12 im Vergleich mit CDDP

Eine verminderte intrazelluläre Anreicherung von CDDP infolge einer verringerten Aufnahme oder infolge eines gesteigerten Efflux zählt zu den wesentlichen Faktoren einer Resistenzbildung gegenüber dem Zytostatikum<sup>29, 35-37</sup>. Unter Berücksichtigung der ausgeprägten zytotoxischen Aktivität von THP-12 und dem Potential zur Überwindung der Resistenz der Zelllinie 1411HP bildete die Analyse der zellulären Akkumulation der Substanz einen zentralen Ausgangspunkt in der Aufklärung des initiierten Wirkmechanismus. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Akkumulationsstudien mit äquimolaren und mit äquitoxischen Konzentrationen von CDDP und von THP-12 durchgeführt. Eine Exposition der TKZT-Zelllinien H12.1 und 1411HP mit einer äquimolaren CDDP-Konzentration führte zu

einer annähernd gleichen Anreicherung der Substanz in beiden Zelllinien. Eine Behandlung der resistenten 1411HP mit einer gegenüber der sensitiven H12.1 ca. 3,3-fach höheren  $IC_{90}$  von CDDP war zudem mit einer ca. 3-fachen Zunahme der zellulären Platinanreicherung verbunden. Die Akkumulation von CDDP wird demnach im untersuchten TKZT-Modell von der Konzentration der Verbindung determiniert und kann nicht als Erklärung für die Resistenz der 1411HP-Zelllinie herangezogen werden. Diese Ergebnisse einer fehlenden Assoziation zwischen einer CDDP-Sensitivität von TKZT-Zellen und einer Akkumulation der Substanz in diesen Zellen bestätigen vorliegende Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen<sup>210, 213</sup>. Eine Exposition beider Zelllinien sowohl mit einer äquimolaren Konzentration von THP-12 als auch mit äquitoxischen  $IC_{90}$  rief im Vergleich mit CDDP signifikant schnellere und stärkere zelluläre Akkumulationen über die Zeit hervor. Diese Resultate verdeutlichen eine enge Korrelation zwischen der hohen Wirksamkeit der Substanz und ihrer zellulären Anreicherung und könnten die rasche zytotoxische Aktivität von THP-12 nach einer kurzen Behandlungszeit begründen. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass bei einer Messung der Platinkonzentrationen 2 h nach Behandlungsbeginn auch der noch membrangebundene Anteil von THP-12 erfasst werden kann. Untersuchungen mit einer Überkonzentration CDDP von 200  $\mu$ M zur Simulierung der unter THP-12 akkumulierten Platinzentren bekräftigten die enorme Anreicherung nach einer Zugabe der Substanz. Trotz Einsatz einer 80-fach höheren CDDP-Konzentration konnte eine dem THP-12 entsprechende Platinakkumulation nur in der sensitiven Zelllinie H12.1 reproduziert werden. In der resistenten Zelllinie 1411HP ließ sich die für THP-12 bestimmte hohe Platinakkumulation hingegen nicht simulieren. Weitere Analysen offenbarten ebenfalls signifikant höhere Akkumulationen von THP-12 gegenüber CDDP in den Tumormodellen der intrinsisch CDDP-resistenten Kolonkarzinomzelllinien SW480 und DLD1 und der CDDP-sensitiven Kopf-Hals-Karzinomzelllinien A253 und FaDu. Die stärkere Akkumulation von THP-12 in den Zellen der FaDu gegenüber denen der A253 korrelierte jedoch nicht mit der Zytotoxizität der Substanz in diesen Zelllinien. Die hohe Sensitivität der Tumormodelle des TKZT, des Kolon- und des Kopf-Hals-Karzinoms für THP-12 könnte somit auf die hohe Platinakkumulation zurückgeführt werden, die eine Überwindung der Apoptose-vermittelnden Aktivierungsschwelle in diesen Zellen ermöglicht. Die ausgeprägte Zytotoxizität von THP-12 wird allerdings, wie für die Zelllinien A253 und FaDu gezeigt wurde, nicht ausschließlich durch die Platinanreicherung verursacht, sondern ist nur über die Einleitung eines spezifischen Zelltodmechanismus erklärbar. Diese Hypothese wird auch durch die fehlende zytotoxische Wirkung von THP-12 in den primären nicht-malignen hMSC trotz einer hohen Akkumulation der Substanz in diesen Zellen gestützt.

Neben der generell höheren zellulären Akkumulation von THP-12 im Vergleich mit CDDP in allen getesteten Zelllinien wurde eine zeitlich raschere und signifikant stärkere Anreicherung der Substanz in der resistenten Zelllinie 1411HP im Vergleich mit der sensitiven H12.1 bestimmt. Diese selektiv stärkere Akkumulation könnte als eine mögliche Ursache für die Überwindung der CDDP-Resistenz dieser Zellen durch THP-12 angesehen werden. So wurde auch für Satraplatin und für BBR3464 eine Brechung der CDDP-Resistenz durch eine erhöhte Aufnahme der Platinderivate in verschiedene Tumorzelllinien postuliert<sup>41, 72, 78, 80</sup>. Der Mechanismus einer höheren Akkumulation von THP-12 in der resistenten Zelllinie 1411HP könnte möglicherweise auf der Fähigkeit der Substanz zu einer erleichterten Permeation der Zellmembranen dieser Zellen beruhen. Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen Veränderungen in der Fluidität der Membranstrukturen von CDDP-sensitiven und von CDDP-resistenten Zellen nach, die ebenfalls eine differenzielle Akkumulation von THP-12 in den Zelllinien H12.1 und 1411HP begründen könnte<sup>214-216</sup>. Der THP(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-Alkylkette kann darüber hinaus in der Akkumulation der Substanz eine wesentliche Bedeutung zugesprochen werden. Eine Behandlung beider Zelllinien mit einer äquimolaren Konzentration der strukturanalogen THP-Derivate THP-9, THP-10 und THP-12 führte erneut zur höchsten zellulären Platinakkumulation unter der neuen Verbindung THP-12. Dies könnte auf den lipophilen Charakter der langen THP(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-Alkylkette, verbunden mit einem verbesserten Durchtritt der Substanz durch die hydrophoben Zellmembranen, zurückgeführt werden. Diese Daten korrelieren mit denen anderer Arbeitsgruppen, die ebenso einen Zusammenhang zwischen einer verbesserten Aufnahme von lipophilen Platinverbindungen und der initiierten zytotoxischen Wirkung in verschiedenen Tumormodellen beschrieben<sup>72, 217-219</sup>.

Während für CDDP im Weiteren eine lineare Korrelation zwischen den ermittelten IC und den zellulär akkumulierten Platinzentren im untersuchten TKZT-Modell nachgewiesen wurde, wurde insbesondere in den THP-12-behandelten resistenten 1411HP-Zellen eine sprunghafte Steigerung der Platinanreicherung im Bereich der IC<sub>20</sub> bis IC<sub>30</sub> beobachtet. Die vorliegenden Daten einer konzentrationsabhängigen und nichtsättigbaren Aufnahme von CDDP bestätigen die Kenntnisse über einen vermutlich passiven Membrantransport der Verbindung<sup>17, 18</sup>. Eine Ursache für die nichtlineare Zunahme der zellulären Akkumulation von THP-12 und die der Aufnahme der Substanz zugrunde liegenden Mechanismen blieben demgegenüber weitgehend ungeklärt. Die sprunghafte Zunahme der Platinakkumulation im Bereich der IC<sub>20</sub> bis IC<sub>30</sub> von THP-12 deutet allerdings auf die Ausnutzung eines im Vergleich mit CDDP unterschiedlichen Membrantransportes hin. Hierbei könnte möglicherweise die Aktivierung eines zweiten Transportmechanismus diskutiert werden. Neben passiven Transportprozessen entlang eines

Konzentrationsgefälles könnten der humane Kupfertransporter hCTR1 zu einer erhöhten Aufnahme von THP-12 oder ein verminderter Efflux über die Kupfer-Transporter ATP7A und ATP7B zu einer verstärkten zellulären Akkumulation der Substanz beitragen<sup>19-22, 38-41</sup>. Ferner wurde dem humanen organischen Kationentransporter OCT2 eine Beteiligung an einem renalen CDDP-Transport zugeschrieben<sup>41, 220</sup>. Da makromolekulare Platinkomplexe *per se* schlecht durch Membranen diffundieren, könnte auch eine Aufnahme von THP-12 über adsorptive Endozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose oder über Flüssigphasen-Endozytose angenommen werden<sup>221, 222</sup>. Diese Annahme wird durch Untersuchungen einer dinuklearen Alkylaminplatin(II)-Verbindung gestützt, die infolge ihrer Größe und ihrer Alkylkettenstruktur strukturelle Ähnlichkeiten mit THP-12 aufweist und über Endozytose in Mammakarzinomzellen aufgenommen wird<sup>223</sup>.

CDDP bindet kovalent an die genomische DNA unter Ausbildung von Intrastrang- und Interstrang-Quervernetzungen. Obwohl nur ein relativ geringer Prozentsatz an die genomische DNA bindet, wird die DNA-Platinierung als wesentlicher Mechanismus der zytotoxischen Wirkung von CDDP angesehen<sup>23-26</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden nach einer Behandlung der TKZT-Zelllinien mit einer äquimolaren CDDP-Konzentration Wiederfindungsraten der Substanz an der nukleären DNA von 14 % in den H12.1-Zellen und von 11 % in den 1411HP-Zellen im Vergleich zur zellulären Platinanreicherung ermittelt. Die Resistenz der Zelllinie 1411HP gegenüber der H12.1 kann somit nicht auf Unterschiede in der Platinierung der DNA durch CDDP zurückgeführt werden. Diese Ergebnisse einer fehlenden Korrelation zwischen der Sensitivität von TKZT-Zelllinien gegenüber CDDP und der durch die Substanz vermittelten DNA-Platinierung bestätigen frühere Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen<sup>182, 210, 213, 224</sup>. Für THP-12 wurden trotz der signifikant vielfach höheren Akkumulation in den H12.1- und 1411HP-Zellen überraschenderweise verminderte DNA-Platinierungsraten gegenüber CDDP bestimmt. Die Wiederfindungsraten von THP-12 an der genomischen DNA betragen im Vergleich zur zellulären Anreicherung der Substanz in beiden Zelllinien lediglich ca. 0,1 %. Die geringere Bindungskapazität von THP-12 an die DNA ließ sich auch im zellfreien System durch eine Platinierung von Heringssperma-DNA im Vergleich mit CDDP signifikant reproduzieren. Das differenzielle Bindungsverhalten beider Substanzen wurde darüber hinaus in zellfreien Testungen zum Mobilitätsverhalten Platin-behandelter Plasmid-DNA nachgewiesen. Zunehmende Konzentrationen von CDDP führten zu einer Komprimierung der Plasmidstrukturen und zu einer beschleunigten Mobilität der Proben. THP-12 bewirkte demgegenüber konzentrationsunabhängig ein der unbehandelten



Probe vergleichbares Laufverhalten, das über den nahezu fehlenden Einbau des Platins in die DNA erklärt werden kann<sup>217</sup>. Die geringe Reaktivität von THP-12 mit der DNA könnte prinzipiell auf eine sterische Hinderung der Anbindung des Platinzentrums an die DNA zurückgeführt werden. Hierbei könnten die raumerfüllende THP(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-Alkylkette und die relative Molekülgröße der Substanz als Erklärung für die differenzielle DNA-Bindung von THP-12 im Vergleich mit CDDP herangezogen werden. Studien anderer Arbeitsgruppen wiesen eine gegenüber CDDP geringere Reaktivität von Oxaliplatin mit der DNA von Jurkat-Zellen nach, die mit einer sterischen Hinderung durch den Liganden begründet wurde<sup>225</sup>. Für Picoplatin wurde ebenfalls eine gegenüber CDDP verminderte DNA-Adduktbildung infolge einer sterischen Abschirmung des Platins beschrieben<sup>61</sup>. Veränderungen in der Ligandenstruktur der Platinkomplexe können zu einem veränderten DNA-Bindungsverhalten oder zu einer gezielten Akkumulation in den Tumorzellen führen und somit zur Überwindung einer CDDP-Resistenz beitragen. THP-12 stellt die erste bekannte Platinsubstanz dar, deren ausgeprägte zytotoxische Aktivität trotz einer hohen zellulärer Anreicherung nicht direkt über eine Platinierung der genomischen DNA erklärt werden kann. Die geringe Bindungsfähigkeit von THP-12 an DNA lässt die Initiierung eines im Vergleich mit CDDP anders verlaufenden Zelltodweges vermuten, der die Fähigkeit der Substanz zu einer Umgehung der Resistenz der Zelllinie 1411HP begründen könnte. Insbesondere die unter THP-12 einsetzende, frühzeitige Apoptose könnte für einen nahezu DNA-unabhängigen Wirkmechanismus der Verbindung sprechen. CDDP bewirkt im Gegensatz zu THP-12 eine verzögert einsetzende und über die Zeit zunehmende Zytotoxizität, die auf die hervorgerufenen DNA-Läsionen zurückgeführt werden kann. Allerdings wird auch für CDDP neben der bekannten DNA-Schädigung eine DNA-unabhängige Wirkung diskutiert<sup>182, 210, 213, 224</sup>. Zudem wird nur ein geringer Anteil von zellulär akkumuliertem CDDP an die genomische DNA gebunden. Einige Bestandteile des Zytoskelettes und der Zellorganellen sowie Thiol-enthaltende Moleküle stellen weitere zelluläre Zielstrukturen für CDDP dar<sup>23, 24, 28, 29</sup>. Darüber hinaus weisen die reaktiven CDDP-Aquakomplexe eine hohe Affinität zu den Phospholipidstrukturen der Zellmembranen auf<sup>226</sup>. Einer CDDP-initiierten Schädigung der mitochondrialen DNA kommt ebenso eine Relevanz in einer Kern-unabhängig ausgelösten Apoptose durch CDDP zu<sup>29</sup>. Kürzlich veröffentlichte Daten beschrieben zudem eine neue Klasse von Platin(II)-Komplexen, deren zytotoxische Wirkung in CDDP-resistenten Ovarialkarzinomzelllinien *in vitro* nicht auf eine Platinierung der DNA, sondern auf die Auslösung bisher noch unaufgeklärter Zelltodmechanismen zurückgeführt werden kann<sup>227</sup>.

#### 4.4 Aufklärung des THP-12-initiierten Zelltodmechanismus im Vergleich mit CDDP

Aus zahlreichen Literaturdaten ist bekannt, dass CDDP in verschiedenen Tumormodellen eine Hochregulation des Tumorsuppressorproteins p53 hervorruft, die mit einer Arretierung der Zellen im Zellzyklus zur Reparatur der induzierten DNA-Läsionen einhergeht<sup>17, 28, 210, 228</sup>. Die Zytotoxizität von CDDP wird hierbei vor allem mit der Auslösung eines G<sub>2</sub>/M-Phasen-Arrestes der Tumorzellen in Verbindung gebracht<sup>18, 26, 180, 181</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde nach einer CDDP-Behandlung der TKZT-Zelllinien H12.1 und 1411HP eine ausgeprägte Akkumulation des Tumorsuppressorproteins in beiden Zelllinien sichtbar, die auf die initiierten DNA-Schäden zurückgeführt werden kann. Die Anreicherung von p53 korrelierte zudem mit einer signifikanten, transienten Akkumulation der Zellen der sensitiven H12.1 in der S-Phase und mit einer nachfolgenden Induktion von Apoptose. Eine Behandlung der Zellen der resistenten 1411HP mit der IC<sub>90</sub> von CDDP in der sensitiven H12.1 rief eine geringe Akkumulation von p53 sowie eine signifikante, transiente Anreicherung der Zellen in der S-Phase hervor, an die sich ein beständiger G<sub>2</sub>/M-Phasen-Arrest der Zellen, nahezu ohne eine Induktion von Apoptose, anschloss. Höhere, klinisch nicht relevante CDDP-Konzentrationen<sup>229, 230</sup> führten demgegenüber trotz einer charakteristischen Akkumulation von p53 zu einer direkten Apoptoseauslösung, die nicht mit einer Initiierung von Zellzyklusstörungen assoziiert war. Resistente 1411HP-Zellen weisen demnach eine erhöhte apoptotische Aktivierungsschwelle auf, die erst durch Einsatz höherer CDDP-Konzentrationen und der Induktion eines nahezu Zellzyklusphasen-unabhängigen Zelltodes überwunden werden kann. Die Daten einer fehlenden Assoziation zwischen einer CDDP-getriggerten Akkumulation von p53 und einer Induktion von Apoptose in TKZT-Zelllinien werden durch Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen gefestigt<sup>210, 213, 228, 231</sup>. Eine Behandlung der H12.1- und 1411HP-Zellen mit THP-12 führte im Gegensatz zu CDDP zu einer nur marginalen Modulation von p53 sowie zu einer raschen Apoptoseinduktion ohne eine Akkumulation der Zellen in einer spezifischen Phase des Zellzyklus. Diese Daten korrelieren mit der geringen DNA-Platinierungsrate von THP-12 und sprechen für eine weitgehend DNA-, p53- und Zellzyklusphasen-unabhängig initiierte Apoptose, die auf die hohe Akkumulation der Verbindung und auf eine Aktivierung Kern-unabhängiger Zelltodsignale zurückgeführt werden kann. Für die multinukleare Verbindung BBR3464 wurde ebenfalls die Auslösung eines p53-unabhängigen Zelltodes beschrieben, der jedoch durch die gegenüber CDDP beschleunigte und veränderte DNA-Adduktbildung ohne eine Aktivierung von p53 hervorgerufen wird<sup>81</sup>. CDDP löst im Gegensatz zu THP-12 in der sensitiven Zelllinie H12.1 den klassischen Weg einer DNA-, p53- und

Zellzyklusphasen-abhängigen Apoptose aus. Die erhöhte Toleranz der resistenten Zelllinie 1411HP für die durch CDDP getriggerte Schädigung der DNA kann hingegen erst durch Einsatz einer höheren, klinisch nicht relevanten Konzentration und der Induktion eines ebenfalls Zellzyklusphasen-unabhängigen Zelltodes überwunden werden. Die nachgewiesene p53-Akkumulation lässt hierbei allerdings auf eine multifaktorielle Auslösung verschiedener DNA-abhängiger und DNA-unabhängiger apoptotischer Prozesse schließen. Diese Hypothese wird auch durch Analysen mit einer Überkonzentration CDDP von 200µM bestätigt, in denen die Initiierung eines Zellzyklusphasen-unabhängigen Zelltodes in beiden Zelllinien wie unter einer Behandlung mit THP-12 simuliert werden konnte.

Der intrinsische, mitochondrial-vermittelte Apoptosesignalweg wird als klassischer Weg des CDDP-initiierten Zelltodes in vielen Tumormodellen *in vitro* und *in vivo* angesehen<sup>182-185</sup>. Innerhalb der CDDP-vermittelten Apoptose kommen der Öffnung einer mitochondrialen PTP und einer mitochondrialen Freisetzung proapoptotischer Faktoren, wie Cytochrom c, AIF, ENDO G, SMAC/DIABLO und OMI/HTRA2, wesentliche Funktionen zu<sup>119-123</sup>. Die Freisetzung dieser Proteine wird durch die proapoptotischen und antiapoptotischen Mitglieder der BCL-2-Familie kontrolliert<sup>130-133</sup>. Untersuchungen der vorliegenden Dissertation konnten eine zytosolische Anreicherung von Cytochrom c in der resistenten TKZT-Zelllinie 1411HP bereits 8 h nach Behandlungsbeginn mit THP-12 nachweisen, während diese Prozesse unter CDDP erst 24 h nach Behandlungsbeginn beobachtet wurden. Die Expression von APAF-1, das über eine Anbindung von Cytochrom c zu einer Formierung des Apoptosoms und zu einer Aktivierung der Initiatorcaspase 9 führt und wesentlich an einer Initiierung des intrinsischen Apoptoseweges beteiligt ist, wurde durch beide Substanzen nicht beeinflusst. Demgegenüber wurde in beiden Zelllinien erneut bereits 8 h nach Behandlungsbeginn mit THP-12 eine zytosolische Anreicherung von SMAC/DIABLO und eine zytosolische Abnahme von proapoptotischem BAX beobachtet. Die Abnahme von BAX im Zytosol der THP-12-behandelten Zellen lässt eine mitochondriale Translokation des BCL-2-Proteins vermuten, das nachfolgend zu einer Öffnung der mitochondrialen PTP oder zu einer Bildung von mitochondrialen Membrankanälen beitragen kann<sup>131-133, 232</sup>. Unter CDDP wurden eine zytosolische Anreicherung von SMAC/DIABLO und eine zytosolische Abnahme von BAX in beiden Zelllinien erneut erst 24 h nach Behandlungsbeginn bestimmt. Eine mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c und eine mitochondriale Translokation von BAX wurden auch von einer anderen Arbeitsgruppe in tierischen Nierenzellen *in vitro* nach einer Behandlung mit CDDP beobachtet<sup>183</sup>. Die unter THP-12 und unter CDDP in den Zellen der H12.1 und

der 1411HP nachgewiesene zytosolische Abnahme von BAX und die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c und von SMAC/DIABLO bestätigen die Auslösung eines intrinsischen Apoptosemechanismus durch beide Platinsubstanzen, wobei THP-12 einen früheren Zelltod als CDDP einleitet. Weitere Analysen zeigten, dass die Expression des Membran-assoziierten, proapoptotischen BCL-2-Proteins BAK und des zytosolisch lokalisierten, antiapoptotischen BCL-2-Proteins BCL-X<sub>L</sub> in H12.1- und 1411HP-Zellen weder durch THP-12 noch durch CDDP beeinflusst wurde. Darüber hinaus wurde in beiden Zelllinien keine Expression des antiapoptotischen, integralen Membranproteins BCL-2 nachgewiesen. Dies könnte zu der hohen Sensitivität der Zelllinie H12.1 gegenüber einer CDDP- oder THP-12-vermittelten, mitochondrial-initiierten Apoptose und zu der hohen Empfindlichkeit der Zelllinie 1411HP gegenüber einer THP-12-getriggerten, mitochondrial-initiierten Apoptose beitragen. Diese Hypothese bestätigen auch andere Publikationen, die ein hohes BAX/BCL-2-Verhältnis als eine Ursache für die erhöhte Sensitivität von TKZT-Zellen gegenüber CDDP ansehen<sup>8, 57, 213</sup>.

Innerhalb des CDDP-initiierten apoptotischen Programms übernehmen die Caspasen zentrale regulatorische und exekutive Funktionen<sup>100-102, 115</sup>. Eine Aktivierung der Effektorcaspase 3 wird als charakteristisches Kennzeichen eines irreversiblen Überganges der Zellen in die Endphase der Apoptose angesehen. Verschiedene Literaturdaten belegen eine durch CDDP vermittelte Aktivierung der Caspase 3 und eine Degradierung ihres Zielproteins PARP *in vitro*<sup>184, 210, 231</sup>. Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten eine Auslösung gleicher apoptotischer Prozesse durch THP-12 und durch CDDP in den TKZT-Zelllinien H12.1 und 1411HP aufzeigen. THP-12 führte jedoch zu einer gegenüber CDDP frühzeitigeren Aktivierung der Caspase 3 und zu einer Inaktivierung von PARP. Bereits 8 h nach Behandlungsbeginn mit THP-12 wurden die Fragmente von Caspase 3 und von PARP und das Auftreten erster flotierender Zellen sichtbar. Die rasche Apoptoseauslösung durch THP-12 war zudem insbesondere in der sensitiven Zelllinie von einer starken und kurzzeitigen Aktivierung der Caspasen 2 und 3 gekennzeichnet, deren maximale Aktivitäten bereits 8 h nach Behandlungsbeginn bzw. in den Zellen der 1411HP 10 h nach Behandlungsbeginn bestimmt wurden. 24 h nach Behandlungsbeginn mit THP-12 wurden in beiden Zelllinien demgegenüber geringere Caspasenaktivitäten im Vergleich mit CDDP sichtbar. Die rasche Abnahme der Aktivitäten der Caspasen kann hierbei durch den frühzeitigen Übergang einiger adhärenter Zellen in die Apoptose erklärt werden, die methodisch durch die Messung nicht länger erfasst werden. Unter CDDP wurde in beiden Zelllinien konzentrationsabhängig eine

gegenüber THP-12 verzögerte Caspasenaktivierung initiiert. Zudem wurden die Fragmente von Caspase 3 und von PARP erst 24 h nach Behandlungsbeginn mit CDDP nachgewiesen. Durch Zugabe einer Überkonzentration CDDP von 200  $\mu$ M ließen sich, wie repräsentativ in H12.1-Zellen gezeigt wurde, die THP-12-vermittelten Effekte einer raschen und kurzzeitigen Caspasenaktivierung wiederholt simulieren. Ähnliche Effekte einer schnellen und temporären Aktivierung der Caspasen wurden von einer anderen Arbeitsgruppe nach einer Behandlung von Jurkat-Zellen mit Dactinomycin oder mit Doxorubicin *in vitro* beobachtet, wohingegen CDDP in diesen Zellen ebenfalls zu einer verzögerten Caspasenaktivierung führte<sup>233</sup>. Die durch THP-12 vermittelte rasche Aktivierung der Caspasen 2 und 3 bekräftigt erneut die Auslösung eines im Vergleich mit CDDP unterschiedlich initiierten Apoptosemechanismus. Die Zielmoleküle aktivierter Caspase 2 sind hierbei noch weitgehend ungeklärt. Allerdings wird Caspase 2 eine Funktion als Initiatorcaspase in einer ER-Stress-vermittelten Apoptose oder infolge einer mitochondrialen Freisetzung verschiedener proapoptotischer Faktoren zugesprochen<sup>103, 138, 234, 235</sup>. Eine Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 9 durch THP-12 oder durch CDDP konnte in den durchgeführten Analysen mittels Caspasenaktivitäts-Assay nur moderat nachgewiesen werden. Frühere Daten unserer Arbeitsgruppe belegen jedoch die Initiierung des intrinsischen, Caspase 9-vermittelten Apoptoseweges im untersuchten TKZT-Modell durch CDDP sowie eine beeinträchtigte Aktivierung der Caspase 9 in der resistenten Zelllinie 1411HP<sup>182, 210</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden für die analysierten Caspasen 2, 3, 8 und 9 ebenfalls verminderte Aktivitäten in den Zellen der resistenten 1411HP im Vergleich mit denen der sensitiven H12.1 bestimmt. Zudem wurde nur eine gemäßigte Bildung des aktiven Fragmentes der Effektorcaspase 3 in der resistenten Zelllinie beobachtet, die mit der erhöhten apoptotischen Aktivierungsschwelle dieser Zellen korrelierte. Die CDDP-Toleranz der 1411HP wurde ferner durch eine Exposition mit der IC<sub>90</sub> von CDDP in der sensitiven H12.1 bestätigt, unter der keine apoptotische Spaltung von Caspase 3 und von PARP und nahezu keine Bildung von flotierenden Zellen sichtbar wurde. Für THP-12 wurde eine frühzeitige Aktivierung der Caspase 9 in den Zellen der resistenten 1411HP bereits 8 h nach Behandlungsbeginn über ein Auftreten der aktiven Fragmente von Caspase 9 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). THP-12 könnte somit die Resistenz dieser Zelllinie durch Anschaltung eines Caspase 9-vermittelten Signalweges umgehen. Studien der vorliegenden Dissertation offenbarten jedoch einen nahezu Caspasen-unabhängig initiierten Zelltod durch die neue Platinverbindung. Eine Behandlung der TKZT-Zelllinien H12.1 und 1411HP mit THP-12 führte in Anwesenheit des Breitspektrum-PAN-Caspaseninhibitors trotz einer Hemmung der Spaltung von Caspase 3 und von PARP zu einer nur tendenziell

verzögerten Bildung von flotierenden Zellen. Der Nachweis eines apoptotisch induzierten Zelltodes dieser Zellen wurde anhand ihrer Fähigkeit zum Ausschluss des Farbstoffes Trypanblau sowie anhand des typischen Musters der DNA-Fragmentierung erbracht. Die Wirkung des Inhibitors wurde zudem zum Zeitpunkt der unter THP-12 initiierten höchsten Caspase 3-Aktivität 8 h nach Behandlungsbeginn bestätigt. Eine Exposition der H12.1- und 1411HP-Zellen mit CDDP führte demgegenüber in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors zu einer Hemmung der Spaltung von Caspase 3 und von PARP und zu einer Hemmung der Bildung von flotierenden Zellen. CDDP löst somit in beiden Zelllinien den klassischen Zelltod einer Caspasen-vermittelten Apoptose aus, wohingegen THP-12 ein weitgehend Caspasen-unabhängiges apoptotisches Programm initiiert. Der trotz einer Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors ausgelöste Zelltod zeigt, dass die Caspasen keine zwingenden Funktionen in der THP-12-vermittelten Apoptose ausüben bzw. nur partiell im initiierten Zelltod beteiligt sind. Zudem kann die mit der CDDP-Resistenz der Zelllinie 1411HP assoziierte geringere Caspase 9-Aktivierung, verbunden mit der erhöhten Aktivierungsschwelle der Zellen zur Induktion des intrinsischen Apoptosesignalweges, durch Anschaltung einer Caspasen-unabhängig induzierten Apoptose durch THP-12 überwunden werden. Einige Arbeitsgruppen konnten auch für CDDP neben einer Induktion der Caspasen-abhängigen Apoptose eine Caspasen-unabhängig initiierte Apoptose nachweisen, die sich durch eine Hemmung der Caspasen nicht unterbinden ließ<sup>189, 193, 236</sup>. Diese Form des kontrollierten Zelltodes zeigt einen „Apoptose-ähnlichen“ Verlauf unter Beibehaltung der charakteristischen Merkmale der Apoptose. Die genauen Mechanismen sind bisher nur ungenügend aufgeklärt, allerdings scheinen die Caspasen lediglich an der Ausprägung der apoptotischen Morphologie beteiligt zu sein<sup>136</sup>. Hierbei kommt einer Schädigung der Mitochondrien eine besondere Rolle zu<sup>121, 122</sup>. So können Veränderungen in der mitochondrialen Membranstruktur Caspasen-unabhängig ausgelöst werden, die zeitlich oft vor einer Caspasenaktivierung nachweisbar sind und in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors nicht aufgehalten werden<sup>155</sup>.

Die bisher diskutierten Ergebnisse zum Wirkmechanismus von THP-12 im Vergleich mit CDDP lassen unterschiedliche initiale Ereignisse in der durch beide Substanzen ausgelösten apoptotischen Signalkaskade vermuten. Die Daten einer weitgehend DNA-unabhängig und einer nahezu Caspasen-unabhängig induzierten Apoptose bekräftigen eine durch THP-12 vermittelte Schädigung der Zellorganellen und der Membranstrukturen der Tumorzellen. Mitochondrien und dem ER werden wichtige Schlüsselrollen in einer Kern-unabhängig ausgelösten Apoptose zugesprochen<sup>159</sup>. Viele Literaturdaten weisen zudem Calcium und

ROS zentrale Funktionen als sekundäre Botenstoffe in der apoptotischen Signaltransduktion zu<sup>141, 146</sup>. Sowohl das ER als auch die Mitochondrien verfügen über effektive Calciumtransportmechanismen, die den Organellen-internen und den zytosolischen Calciumstatus kontrollieren. Eine Freisetzung von Calcium aus dem ER oder aus den Mitochondrien in das Zytosol stellt somit ein wichtiges Ereignis in der Aktivierung verschiedener zytotoxischer Prozesse dar<sup>141, 144</sup>. Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation offenbarten nahezu keine Anreicherung von Calcium im Zytosol der TKZT-Zelllinien H12.1 und 1411HP unter CDDP, wohingegen THP-12 zu einem raschen und ausgeprägten zytosolischen Anstieg von Calcium führte. Darüber hinaus konnte eine direkte Korrelation zwischen einer zytosolischen Akkumulation von Calcium und den IC von THP-12 nachgewiesen werden. Während zum Zeitpunkt der Bildung erster flotierender Zellen unter THP-12 8 h nach Behandlungsbeginn hohe und nahezu konstante Calciumkonzentrationen im Zytosol der Zellen messbar waren, wurden zu einem für CDDP äquitoxischen Zeitpunkt 17 h nach Behandlungsbeginn ferner keine relevanten zytosolischen Calciumkonzentrationen bestimmt. Die ausgeprägte zytosolische Anreicherung von Calcium unter THP-12 ließ sich ebenfalls in den Kolonkarzinomzelllinien SW480 und DLD1 und in den Kopf-Hals-Karzinomzelllinien A253 und FaDu bestätigen, wobei die Sensitivität dieser Zellen gegenüber THP-12 direkt mit der Calciumfreisetzung durch die Substanz korrelierte. Der starke Anstieg von Calcium im Zytosol der THP-12-behandelten Zellen lässt die Initiierung einer ER-Stress-vermittelten Apoptose oder eines mitochondrial ausgelösten Zelltodes vermuten. Da eine Freisetzung von Calcium aus den ER-Speichern einer Kontrolle der Proteine der BCL-2-Familie unterliegt, könnte die nach einer Exposition mit THP-12 beobachtete Abnahme von proapoptotischem BAX in den Zytosolen der H12.1- und 1411HP-Zellen auch auf eine Translokation des Proteins zu den Membranen des ER zurückgeführt werden. Zudem könnte die fehlende Expression von antiapoptotischem BCL-2, für das ein Vorkommen im ER und in den Mitochondrien beschrieben wurde<sup>237</sup>, die Zellen gegenüber einer THP-12-vermittelten Organellschädigung sensitivieren. Die Relevanz der zytosolischen Calciumfreisetzung für den THP-12-induzierten Wirkmechanismus ließ sich allerdings aufgrund der hohen Eigen-toxizität des Calciumchelators BAPTA-AM im untersuchten TKZT-Modell nicht endgültig aufklären. Die Toxizität von BAPTA-AM wurde ebenso bei Analysen in den Tumormodellen des Kolon- und des Kopf-Hals-Karzinoms beobachtet (Daten nicht gezeigt). Aktuelle Publikationen konnten allerdings eine ebenfalls frühzeitige Anreicherung von Calcium unter CDDP in nukleierten Zytosolen humaner Melanom- und Kolonkarzinomzelllinien *in vitro* nachweisen. Hierbei wurde eine Calcium-induzierte Aktivierung der Proteasenfamilie der

Calpaine und der ER-Membran-assoziierten und ER-Stress-spezifischen Caspase 12 beschrieben<sup>188, 191</sup>. Im Weiteren wurde auch in Pankreaskarzinomzellen *in vitro* eine erhöhte zytosolische Zunahme von Calcium und die Auslösung einer ER-Stress-getriggerten Apoptose unter einer hohen CDDP-Konzentration bestimmt<sup>192</sup>. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte darüber hinaus eine Initiierung ER-spezifischer zytotoxischer Prozesse durch CDDP in enukleierten tierischen Nierenzellen *in vitro* aufzeigen<sup>238</sup>. Diese Ergebnisse einer Kern-unabhängig ausgelösten Apoptose durch CDDP korrelieren direkt mit den unter THP-12 beobachteten zellulären Prozessen und sprechen gegen die Hypothese, dass die ausgeprägte zytosolische Calciumanreicherung unter THP-12 lediglich ein Epiphänomen der Schädigung des ER und der Mitochondrien darstellt. Der Nachweis einer THP-12- oder CDDP-vermittelten Aktivierung der Caspase 12, der Calpaine oder der ER-Stress-getriggerten Serinprotease OMI/HTRA2 konnte jedoch im Rahmen der vorliegenden Dissertation in den Zellen der H12.1 und 1411HP nicht erbracht werden (Daten nicht gezeigt).

Mitochondrien agieren durch eine Aufnahme des aus dem ER freigesetzten Calciums als eine Sicherheitseinheit gegenüber einer zytosolischen Calciumüberladung. Eine Überschreitung der mitochondrialen Speicherkapazitäten resultiert in der Öffnung der mitochondrialen PTP und in einer Freisetzung verschiedener Faktoren, die die Apoptose vorantreiben<sup>141, 144</sup>. Neben Calcium stellen die im ER und in den Mitochondrien gebildeten ROS starke Induktoren zur Initiierung einer mitochondrialen Dysfunktion und einer Öffnung der mitochondrialen PTP dar<sup>146, 164</sup>. Zudem können ROS die Calciumtransportsysteme der Mitochondrien und des ER angreifen und eine zytosolische Calciumfreisetzung bedingen<sup>239</sup>. Im Hinblick auf eine THP-12-vermittelte Organellschädigung und die hohe Calciumfreisetzung wurde daher eine Beeinflussung des zellulären ROS-Haushaltes durch die Substanz untersucht. Analysen der vorliegenden Dissertation zeigten, dass THP-12 bereits 2 h nach Behandlungsbeginn eine signifikante ROS-Bildung in den Zellen der resistenten 1411HP hervorrief, wohingegen CDDP eine nur moderate ROS-Entstehung auslöste. Die Relevanz der unter THP-12 generierten ROS für die initiierte Apoptose ließ sich durch eine Behandlung der Zellen in Anwesenheit des Antioxidans NAC beweisen. Sowohl zum Zeitpunkt einer Bildung erster flotierender Zellen der 1411HP unter THP-12 8 h nach Behandlungsbeginn als auch 24h nach Behandlungsbeginn wurde eine Entstehung von flotierenden Zellen und eine Spaltung von PARP durch NAC inhibiert. Darüber hinaus wurde eine zeitlich verzögerte Generierung von ROS durch THP-12 in den Zellen der sensitiven H12.1 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn indirekt über eine Zugabe von NAC anhand einer Hemmung der PARP-Spaltung und einer



Blockade der Apoptoseinduktion nachgewiesen. Für CDDP wurde ebenso eine Bildung von ROS in der resistenten Zelllinie 1411HP 24 h nach Behandlungsbeginn indirekt durch eine Zugabe von NAC und eine Hemmung der Apoptose und der Spaltung von PARP bestätigt. In den Zellen der H12.1 wurde demgegenüber nahezu keine Inhibierung der Apoptose durch CDDP 24h nach Behandlungsbeginn in Anwesenheit von NAC beobachtet. Diese Daten verdeutlichen die Auslösung eines ROS-induzierten Zelltodes durch THP-12 im untersuchten TKZT-Modell. Sie belegen weiterhin eine Bildung von ROS in der resistenten Zelllinie 1411HP bei Einsatz einer hohen, klinisch nicht relevanten CDDP-Konzentration, die eine Überwindung der apoptotischen Aktivierungsschwelle dieser Zellen ermöglicht. Eine ROS-vermittelte Apoptoseauslösung unter CDDP wurde in verschiedenen Publikationen beschrieben<sup>240-243</sup>. Zudem werden die unter CDDP auftretenden Nephro- und Ototoxizitäten mit einer durch die Substanz induzierten Bildung von ROS in Verbindung gebracht, die durch Einsatz des Radikalfängers NAC abgeschwächt werden konnten<sup>244-246</sup>. Eine drastische ROS-vermittelte Schädigung der Mitochondrien kann ferner eine Öffnung der mitochondrialen PTP und die Auslösung eines mitoptotischen Zelltodes induzieren<sup>161</sup>. Aktuelle Studien diskutieren eine Kern-unabhängige zytotoxische Wirkung von CDDP, die mit einer Generierung von ROS und einer Einleitung oxidativer Stressprozesse einhergeht. So wurde eine ROS-induzierte frühzeitige Apoptose in enukleierten Kolonkarzinom- und Melanomzelllinien unter Verwendung hoher CDDP-Konzentrationen nachgewiesen, die in Anwesenheit von NAC inhibiert werden konnte. Geringe CDDP-Konzentrationen lösten demgegenüber in diesen Zellen eine verzögerte Apoptose infolge der induzierten DNA-Schädigung aus<sup>247</sup>. Eine Apoptose von Tumorzellen durch oxidativen Stress stellt einen neuen Ansatzpunkt zur Überwindung einer CDDP-Resistenz dar. Das aggressive Wachstum von Tumorzellen resultiert in einem erhöhten Energiebedarf und in einem Sauerstoffmangel, der von einer gesteigerten ROS-Produktion begleitet wird. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde die Hypothese postuliert, Tumorzellen durch ein Herabsetzen der antioxidativen Abwehr selektiv in den Zelltod zu treiben<sup>248</sup>. Die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation bestätigen, dass die unter THP-12 in den Zellen der H12.1 und der 1411HP gebildeten ROS direkt am apoptotischen Wirkmechanismus der Substanz beteiligt sind. Hierbei kann eine ROS-induzierte Schädigung der DNA und der zellulären Protein- und Lipidstrukturen in Betracht gezogen werden, die zu einer Destabilisierung der Organellen und der Plasmamembranen führen und die Zellen für die Apoptose sensitivieren. Eine Schädigung zellulärer Strukturen stellt daher ein mögliches initiales Ereignis in der THP-12-vermittelten Apoptose dar. Den Mitochondrien kommt eine zentrale Rolle als Quelle und als Target für oxidativen

Stress zu. So kann eine mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c eine Produktion von ROS durch eine Unterbrechung der Elektronenübertragung in der Atmungskette bedingen<sup>125</sup>. Zudem kann Caspase 3 eine mitochondriale ROS-Bildung stimulieren<sup>249</sup>. Ferner wurde für Caspase 2 eine Beteiligung in oxidativ ausgelösten Zelltodprozessen beschrieben<sup>235</sup>. Darüber hinaus wurde eine Korrelation zwischen einer ROS-Entstehung und einer Aktivierung lysosomaler Cathepsine nachgewiesen<sup>170</sup>. Eine Relevanz dieser Proteasen im THP-12-vermittelten Zelltod wurde im Rahmen der Dissertation jedoch nicht untersucht.

Basierend auf der hohen zellulären Platinakkumulation von THP-12, der weitgehend DNA-unabhängigen Wirkung, der initiierten ROS-Bildung und der postulierten Schädigung zellulärer Strukturen, wurde eine Reaktivität von THP-12 mit GSH erfasst. GSH stellt das zellulär vorherrschende Thiol dar und besitzt eine höhere Affinität zu CDDP als die DNA-Nukleobasen<sup>25</sup>. Im Weiteren fungiert GSH als endogenes Antioxidans und ist als Substrat der GSH-Peroxidase an einem Abbau von ROS beteiligt<sup>44, 47</sup>. Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten eine höhere Konzentration an freiem GSH in der TKZT-Zelllinie 1411HP im Vergleich mit der Zelllinie H12.1 aufzeigen, die zur Resistenz dieser Zellen beitragen könnte. Einige Literaturdaten belegen allerdings eine fehlende Korrelation zwischen zellulären GSH-Konzentrationen und dem Auftreten einer CDDP-Resistenz<sup>250</sup>. Eine Behandlung der 1411HP-Zellen mit THP-12 führte zu einer verstärkten Reduktion von freiem GSH, wohingegen CDDP eine nur moderate Abnahme von freiem GSH initiierte. In den Zellen der H12.1 wurden die freien GSH-Konzentrationen durch THP-12 und durch CDDP nur marginal vermindert. Die insbesondere in der sensitiven Zelllinie H12.1 relativ geringe Beeinflussung des zellulären GSH-Status durch THP-12 steht im Widerspruch zur hohen zellulären Platinanreicherung der Substanz. Hierbei müssen jedoch die rasche Bestimmung von GSH 4 h nach Behandlungsbeginn und ein zu diesem Zeitpunkt möglicherweise noch membrangebundener Anteil von THP-12 bedacht werden. Zudem könnte ein Angriff der Substanz an GSH durch die raumerfüllende THP(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-Alkylkette erschwert werden. Für Picoplatin und einen weiteren neuen Platinkomplex wurden ebenfalls verminderte Detoxifikationen durch GSH infolge einer sterischen Abschirmung der Platinzentren beschrieben<sup>61, 251</sup>. Die Relevanz der zellulären GSH-Konzentrationen für die THP-12- oder CDDP-vermittelte Zytotoxizität ließ sich jedoch indirekt in Anwesenheit des GSH-Syntheseinhibitors BSO bestätigen. Die Wirkung des Inhibitors wurde zuvor über eine signifikante Abnahme der freien GSH-Konzentrationen in beiden Zelllinien nachgewiesen. Eine Vorbehandlung beider Zelllinien mit BSO rief 24 h nach Behandlungsbeginn mit

THP-12 eine signifikante und ausgeprägte Steigerung der vermittelten Zytotoxizität hervor. Für CDDP wurde ebenfalls in der resistenten Zelllinie 1411HP eine starke Zunahme der zytotoxischen Wirkung nach einer Vorbehandlung mit BSO sichtbar. Diese Daten korrelieren mit der ROS-Bildung unter beiden Platinsubstanzen und bestätigen die Bedeutung des zellulären GSH-Status sowohl für die durch THP-12 initiierte Apoptose in beiden Zelllinien als auch für den durch CDDP ausgelösten Zelltod in den resistenten 1411HP-Zellen bei Einsatz einer hohen, klinisch nicht relevanten Konzentration. Eine Steigerung der zytotoxischen Wirkung von CDDP durch BSO wurde auch von anderen Arbeitsgruppen in verschiedenen Tumormodellen nachgewiesen<sup>51, 252, 253</sup>. Zudem wurde eine Zunahme der CDDP-vermittelten Zytotoxizität in BSO-vorbehandelten Kopf-Hals-Karzinomzellen *in vitro* beschrieben, die auf einen Verlust des antioxidativen Schutzes der Zellen gegenüber einer ROS-Bildung zurückgeführt wurde<sup>254</sup>. In einer aktuellen Studie wurde eine Kern-unabhängige Zytotoxizität von CDDP über eine Bindung an GSH diskutiert, die zu einer Veränderung des Redoxstatus der Zellen führt<sup>255</sup>. Die Relevanz des GSH-Status der H12.1- und 1411HP-Zellen kann somit neben einer Bindung von THP-12 und von CDDP insbesondere auf die antioxidative Wirkung des Thiols gegenüber der induzierten ROS-Bildung zurückgeführt werden.

Die erhöhte Proliferationsneigung und der gesteigerte Energiebedarf von Tumorzellen bietet eine Möglichkeit, diese selektiv über eine Schädigung ihrer Mitochondrien anzugreifen<sup>119</sup>. Innerhalb des intrinsischen, mitochondrial-vermittelten Apoptoseweges kommen der Öffnung einer mitochondrialen PTP und einer Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) zentrale Bedeutungen zu, wobei diese Prozesse durch Calcium, ROS und aktivierte Caspasen begünstigt werden<sup>134-136, 161, 249</sup>. Aktuelle Literaturdaten weisen sowohl einer Aktivierung der Caspasen als auch einem Verlust von  $\Delta\Psi_m$  den zellulär irreversiblen Punkt zur Exekution einer Apoptose zu<sup>119, 134, 136</sup>. Eine Depolarisierung von  $\Delta\Psi_m$  wird jedoch zeitlich oft vor einer Caspasenaktivierung ausgelöst und kann indirekt zu einer Stimulierung der Caspasenkaskade führen. Darüber hinaus kann ein Zusammenbruch von  $\Delta\Psi_m$  als Konsequenz nach einer Caspasenaktivierung hervorgerufen werden oder Caspasen-unabhängig initiiert werden. Im Hinblick auf die vermutete Schädigung der Organellenstrukturen durch THP-12 und die nahezu Caspasen-unabhängig induzierte Apoptose sollte eine Beeinflussung von  $\Delta\Psi_m$  durch die Substanz im TKZT-Modell der H12.1 und 1411HP analysiert werden. Untersuchungen der vorliegenden Dissertation zeigten bereits 8 h nach Behandlungsbeginn mit THP-12 insbesondere in den Zellen der resistenten 1411HP eine

deutliche Schädigung von  $\Delta\Psi_m$ . CDDP führte zu diesem Zeitpunkt in beiden Zelllinien zu nahezu keiner Beeinflussung von  $\Delta\Psi_m$ . Der THP-12-vermittelte frühzeitige Zusammenbruch von  $\Delta\Psi_m$  konnte zudem in 1411HP-Zellen in Anwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors und des Radikalfängers NAC inhibiert werden. Die unter THP-12 aktivierten Caspasen und die gebildeten ROS sind somit wesentlich an einer Schädigung der Mitochondrien in diesen Zellen beteiligt. Der rasche Verlust von  $\Delta\Psi_m$  in der resistenten Zelllinie 1411HP 4 h nach Behandlungsbeginn mit THP-12 konnte im Weiteren vorwiegend auf eine Wirkung der ROS zurückgeführt werden. Diese Daten belegen einen frühzeitig initiierten Zusammenbruch von  $\Delta\Psi_m$  durch THP-12, der in den Zellen der 1411HP initial Caspasen-unabhängig abläuft, jedoch im zeitlichen Verlauf durch die aktivierten Caspasen gefördert wird. Ferner wurde eine THP-12-induzierte Öffnung einer mitochondrialen PTP in der Zelllinie 1411HP, die ebenfalls zu einer Schädigung von  $\Delta\Psi_m$  führen kann, indirekt durch eine Zugabe des Membranporeninhibitors CSA bestätigt. Eine Beeinflussung von  $\Delta\Psi_m$  durch das nach einer Behandlung mit THP-12 zytosolisch freigesetzte Calcium wurde aufgrund der hohen Toxizität des Calciumchelators BAPTA-AM nicht untersucht. Die schnelle Depolarisierung von  $\Delta\Psi_m$  durch THP-12 in den Zellen der resistenten 1411HP könnte auf eine Bindung des Platinzentrums der Substanz an die Cystein- und Methionin-haltigen Bindungsstellen von ANT in der inneren Mitochondrienmembran und von VDAC in der äußeren Mitochondrienmembran hinweisen. So wurde von einer anderen Arbeitsgruppe eine selektive Anreicherung von CDDP in den Mitochondrien humaner Kopf-Hals-Karzinomzellen und eine hohe Bindung an VDAC gezeigt, die zur Zytotoxizität der Substanz ohne Schädigung der DNA beitragen könnte<sup>256</sup>. Eine aktuelle Publikation wies zudem eine CDDP-vermittelte frühzeitige ROS-Bildung in einer Kopf-Hals-Karzinomzelllinie nach, die eine Öffnung der mitochondrialen PTP, einen Verlust von  $\Delta\Psi_m$  und eine Caspasen-unabhängige Apoptose initiierte<sup>193</sup>. Für CDDP wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation an einem THP-12 äquitoxischen Zeitpunkt 17 h nach Behandlungsbeginn ein eher moderater Verlust von  $\Delta\Psi_m$  in beiden Zelllinien sichtbar, der jedoch wie unter einer Exposition mit THP-12 in den Zellen der resistenten 1411HP über aktivierte Caspasen und gebildete ROS vermittelt wurde. Die gewonnenen Daten dieser Dissertation zeigen, dass der neue Platinkomplex THP-12 Schädigungen der Mitochondrien und des ER und möglicherweise anderer zellulärer Strukturen im untersuchten TKZT-Modell der H12.1 und 1411HP auslöst, die einen im Vergleich mit CDDP raschen und weitgehend DNA-, p53-, Zellzyklusphasen- und Caspasen-unabhängigen Apoptosemechanismus aktivieren und eine Überwindung der CDDP-Resistenz der Zelllinie 1411HP ermöglichen.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Arbeiten der vorliegenden Dissertation dienen der Zielsetzung, das neue CDDP-Derivat THP-12 (*cis*-Dichloro(2- $\{11-[(\text{tetrahydro-}2H\text{-pyran-}2\text{-yl)oxy]undecyl\}$ propan-1,3-diamino)-platin(II) bezüglich der zytotoxischen Aktivität und des initiierten Zelltodes im Vergleich mit CDDP *in vitro* zu charakterisieren und die Bedeutung als innovativen Platinkomplex unter Beweis zu stellen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen die Grundlage für weiterführende Testungen zur zytotoxischen Wirksamkeit der Platinverbindung *in vivo* bilden. Es wurden vergleichende Analysen von THP-12 und von CDDP in einem humanen etablierten TKZT-Modell und gegebenenfalls in humanen etablierten Zelllinien anderer solider Tumoren durchgeführt. Die Schwerpunkte der Untersuchungen bildeten neben einer Beurteilung der Zytotoxizität der Substanz eine Erfassung der zellulären Anreicherung, der Reaktivität mit der genomischen DNA sowie der induzierten zellbiologischen Effekte.

Die neue Platinsubstanz THP-12 offenbarte eine dem CDDP überlegene Zytotoxizität in 21 humanen Zelllinien verschiedener Tumorentitäten und CDDP-Sensitivität. Eine besonders hohe Wirkung wurde im untersuchten TKZT-Modell der CDDP-sensitiven Zelllinie H12.1 und der CDDP-resistenten Zelllinie 1411HP, in weiteren TKZT-Zelllinien und in den CDDP-sensitiven Bronchial-, Ovarial-, Zervix- und Kopf-Hals-Karzinomzelllinien nachgewiesen. Darüber hinaus konnte eine Überwindung der intrinsischen CDDP-Resistenz der getesteten Schilddrüsenkarzinom-, Mammakarzinom- und Melanomzelllinien, einiger Kolonkarzinomzelllinien und zwei weiterer TKZT-Zelllinien durch THP-12 gezeigt werden. Zudem ließ sich eine Bindung der Zytotoxizität der Substanz an die Gesamtstruktur des THP-12-Moleküls sowie die Auslösung eines apoptotischen Zelltodes anhand drei etablierter Nachweismethoden belegen. Die überragende zytotoxische Aktivität von THP-12 ging mit einer gegenüber CDDP schnelleren und stärkeren zellulären Akkumulation der Verbindung unter Ausnutzung eines vermutlich alternativen Transportweges einher. Hierbei scheint der THP(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-Alkylkette der Substanz eine Relevanz zuzukommen. THP-12 zeigte im Weiteren eine selektiv stärkere Platinakkumulation in der CDDP-resistenten Zelllinie 1411HP im Vergleich mit der CDDP-sensitiven Zelllinie H12.1, die zu einer Überwindung der Platintoleranz dieser Zellen beitragen könnte. Die Einleitung eines spezifischen Zelltodmechanismus in den untersuchten Tumorzelllinien wurde über eine Analyse in primären nichtmalignen hMSC bestätigt, in denen THP-12 trotz einer hohen zellulären Anreicherung nahezu keine zytotoxische Wirkung zeigte. Im Vergleich mit CDDP rief THP-12 im getesteten TKZT-Modell eine rasche Aktivierung der apoptotischen Signalkaskade hervor, die von einer frühzeitigen Translokation

von BAX, einer raschen mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom c und SMAC/DIABLO und von einer schnellen PARP-Spaltung gekennzeichnet war. Die frühe Bildung apoptotischer Zellen wurde insbesondere in der sensitiven Zelllinie H12.1 von einer starken und kurzzeitigen Aktivierung der Caspasen 2 und 3 begleitet. Untersuchungen zur Relevanz der unter THP-12 aktivierten Caspasen offenbarten allerdings eine nahezu Caspasen-unabhängig vermittelte Apoptose durch die Substanz. Der unter THP-12 frühzeitig einsetzende Zelltod der H12.1- und 1411HP-Zellen war zudem mit einer gegenüber CDDP verminderten DNA-Platinierung und der Initiierung eines weitgehend DNA-unabhängigen Wirkmechanismus assoziiert. Die geringe DNA-Bindungskapazität von THP-12 korrelierte mit einer nahezu fehlenden Modulation des Tumorsuppressorproteins p53 und der Aktivierung eines Zellzyklusphasen-unabhängigen Zelltodes. Im Gegensatz zu THP-12 löste CDDP im TKZT-Modell bei Einsatz klinisch relevanterer Konzentrationen den klassischen Weg einer verzögert einsetzenden, DNA-, p53-, Zellzyklusphasen- und Caspasen-abhängigen Apoptose aus, die auf die induzierten DNA-Läsionen zurückgeführt werden kann. Darüber hinaus wurde eine Unabhängigkeit der CDDP-Resistenz der Zelllinie 1411HP von einer Aufnahme der Substanz, einer Platinierung der DNA und einer Expression von p53, APAF-1 und den Proteinen der BCL-2-Familie im Vergleich zur sensitiven H12.1 nachgewiesen. Die unter THP-12 zellulär akkumulierten Platinzentren sowie die ausgelösten Effekte einer raschen und starken Caspasenaktivierung und einer Zellzyklusphasen-unabhängig initiierten Apoptose ließen sich durch eine Überkonzentration CDDP reproduzieren, die eine Überwindung der CDDP-Resistenz der Zelllinie 1411HP durch Triggerung dem THP-12 ähnlicher, zellbiologischer Effekte ermöglichte. Es wurde postuliert, dass die zellulären Strukturen, die eine Sensitivität gegenüber THP-12 determinieren, außerhalb des nukleären Kompartiments liegen und beiden Platinsubstanzen unterschiedliche initiale Ereignisse zur Apoptoseinitiierung vorangehen. Die unter THP-12 im Gegensatz zu CDDP zu beobachtende rasche und starke zytosolische Calciumfreisetzung, die direkt mit den IC der Substanz und der Sensitivität der analysierten Tumormodelle korrelierte, sprechen für die Auslösung einer ER-Stress-induzierten Apoptose oder eines mitochondrial-initiierten Zelltodes. Zudem wurde in beiden Zelllinien eine Produktion von ROS nachgewiesen, deren Relevanz für den induzierten Zelltod bestätigt werden konnte. Neben einer postulierten Schädigung von Protein- und Lipidstrukturen der Tumorzellen tragen die unter THP-12 gebildeten ROS initial zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\Psi_m$  in diesen Zellen bei. Zudem wird eine Depolarisierung von  $\Delta\Psi_m$  durch die unter THP-12 aktivierten Caspasen gefördert. Hohe, klinisch nicht relevante CDDP-Konzentrationen riefen an einem äquitoxischen

Zeitpunkt in der resistenten Zelllinie 1411HP ähnliche Prozesse einer ROS-Bildung und eines moderaten  $\Delta\Psi_m$ -Verlustes hervor. Im Weiteren wurde in der resistenten Zelllinie 1411HP eine höhere freie GSH-Konzentration gegenüber der sensitiven Zelllinie H12.1 nachgewiesen, der in der antioxidativen Abwehr der durch beide Platinverbindungen generierten ROS eine zusätzliche Bedeutung zukommt.

Zusammenfassend stellt die neue Platinverbindung THP-12 ein neues CDDP-Derivat mit einer vielversprechenden Grundlage für weitere klinische Testungen dar. Eine Apoptose von Tumorzellen durch oxidativen Stress, verbunden mit einer Schädigung Kern-unabhängiger Strukturen, bietet einen neuen Ansatz zur Überwindung einer CDDP-Resistenz. Die Aufklärung alternativer Zelltodsignalwege eröffnet zudem neue Perspektiven für eine Therapie von Tumoren und für eine Umgehung der Resistenzmechanismen der Tumorzellen. Die Fähigkeit von THP-12 zu einer Überwindung der Resistenz der TKZT-Zelllinie 1411HP zeugt für das hohe zytotoxische Potential der Substanz. Des Weiteren weist THP-12 eine hohe Aktivität bei Einsatz geringer Platinkonzentrationen auf, die eine verminderte Beeinflussung gesunder Gewebe erhoffen lassen. Die hohe Lipophilie von THP-12 könnte eine orale Applizierbarkeit gemäß den neuen Platinkomplexen Picoplatin, Satraplatin und Bamet-UD2 zulassen. Die Induktion einer frühzeitigen Apoptose, verbunden mit einer möglicherweise eher moderaten Langzeitwirkung der Substanz, prädestinieren THP-12 ferner für eine Anwendung als Kombinationschemotherapeutikum mit konventionellen, DNA-schädigenden Zytostatika.

In Bezug auf den präzisen Apoptosemechanismus von THP-12 bleiben weitere Fragen offen. So könnten neben dem ER und den Mitochondrien der Golgi-Apparat, Lysosomen und die zelluläre Plasmamembran potentielle Targetstrukturen für THP-12 darstellen, die infolge einer Schädigung die apoptotische Signalkaskade aktivieren könnten. Zudem ließ sich eine Relevanz der Proteasen der Calpaine und der Cathepsine im THP-12-initiierten Zelltod nicht aufklären. Darüber hinaus werden den mitochondrialen Proteinen AIF, ENDO G und der Serinprotease OMI/HTRA2 Funktionen in einer Caspasen-unabhängigen und in einer ROS-initiierten Apoptose zugesprochen, deren Bedeutung ebenfalls nicht aufgeklärt wurde. Eine Beeinflussung von  $\Delta\Psi_m$  in hMSC könnte als Nachweis für eine selektiv erhöhte Zytotoxizität von THP-12 in Tumorzellen im Vergleich mit nichtmalignen Zellen dienen. Aktuell wird eine Verkapselung von THP-12 in Liposomen untersucht, um eine Bewertung der Zytotoxizität der Verbindung *in vivo* zu ermöglichen und eine spezifische Anreicherung in Tumorzellen zu erzielen. Erste Daten belegten eine Wirkung der THP-12-Liposomen-Mischung im getesteten TKZT-Modell *in vitro* sowie ein Ausbleiben von UAW im Nacktmausmodell *in vivo*, die weitere Analysen der Substanz rechtfertigen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. www.rki.de Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie/Dachdokumentation Krebs. **16.09.2009**.
2. www.krebsinformationsdienst.de Themen/Behandlung/Chemotherapie/Stellenwert. **16.09.2009**.
3. Rosenberg, B.; van Camp, L.; Krigas, T., Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **1965**, 205, 698 - 699.
4. Schmoll, H.-J.; Höffken, K.; Possinger, K., Kompendium Internistische Onkologie. *Springer Verlag* **1999**, 3. Auflage, Band 1, 667 - 678.
5. Bokemeyer, C., Current trends in chemotherapy for metastatic nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Oncology* **1998**, 55, (3), 177 - 188.
6. Einhorn, L. H., Curing metastatic testicular cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, 99, (7), 4592 - 4595.
7. Schmoll, H.-J.; Höffken, K.; Possinger, K., Kompendium Internistische Onkologie. *Springer Verlag* **1999**, 3. Auflage, Band 2, 1660 - 1732.
8. Masters, J. R.; Köberle, B., Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* **2003**, 3, (7), 517 - 525.
9. Spierings, D. C.; de Vries, E. G.; Vellenga, E.; de Jong, S., The attractive achilles heel of germ cell tumours: an inherent sensitivity to apoptosis-inducing stimuli. *J Pathol* **2003**, 200, (2), 137 - 148.
10. Bokemeyer, C.; Kollmannsberger, C.; Harstrick, A.; Beyer, J.; Gerl, A.; Casper, J.; Metzner, B.; Hartmann, J. T.; Schmoll, H.-J.; Kanz, L., Treatment of patients with cisplatin-refractory testicular germ-cell cancer. German Testicular Cancer Study Group (GTCSG). *Int J Cancer* **1999**, 83, (6), 848 - 851.
11. Kollmannsberger, C.; Nichols, C.; Bokemeyer, C., Recent advances in management of patients with platinum-refractory testicular germ cell tumors. *Cancer* **2006**, 106, (6), 1217 - 1226.
12. Bischoff, A., Aktuelle Chemotherapie bei Keimzell-, Blasen- und Prostatatumoren. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie. *Onkologie* **2005**, 1, 6 - 9.
13. Schmoll, H.-J.; Höffken, K.; Possinger, K., Kompendium Internistische Onkologie. *Springer Verlag* **1999**, 3. Auflage, Band 3, 519 - 541.



14. May, M.; Peter, N.; Gunia, S.; Steinhauer, H. B.; Hoschke, B., Eigene Erfahrungen zur Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation bei fortgeschrittenen testikulären Keimzelltumoren mit schlechter Prognose. *Brandenburgisches Ärzteblatt* **2006**, 3, (16), 84 - 87.
15. www.hodenkrebs.de Studien. **16.09.2009**.
16. Voigt, W.; Dietrich, A.; Schmoll, H.-J., Overview of development status and clinical action. Cisplatin and its analogues. *Pharm Unserer Zeit* **2006**, 35, (2), 134 - 143.
17. Wang, D.; Lippard, S. J., Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, 4, (4), 307 - 320.
18. Chu, G., Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem* **1994**, 269, (2), 787 - 790.
19. Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I., Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, 99, (22), 14298 - 14302.
20. Nitiss, J. L., A copper connection to the uptake of platinum anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, 99, (22), 13963 - 13965.
21. Safaei, R.; Howell, S. B., Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Crit Rev Oncol Hematol* **2005**, 53, (1), 13 - 23.
22. Safaei, R., Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett* **2006**, 234, (1), 34 - 39.
23. Jamieson, E. R.; Lippard, S. J., Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA-adducts. *Chem Rev* **1999**, 99, (9), 2467 - 2498.
24. Bose, R. N., Biomolecular targets for platinum antitumour drugs. *Mini Rev Med Chem* **2002**, 2, (2), 103 - 111.
25. Ott, I.; Gust, R., Special qualities of inorganic cytostatics. Medicinal chemistry of platinum complexes. *Pharm Unserer Zeit* **2006**, 35, (2), 124 - 133.
26. Eastman, A., Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* **1990**, 2, (8 - 9), 275 - 280.
27. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Korting, M., Mutschler - Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage **2001**, 873 - 884.
28. Gonzalez, V. M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Perez, J. M., Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* **2001**, 59, (4), 657 - 663.

29. Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Perez, J. M., Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* **2003**, 103, (3), 645 - 662.
30. Kollmannsberger, C.; Kuzcyk, M.; Mayer, F.; Hartmann, J. T.; Kanz, L.; Bokemeyer, C., Late toxicity following curative treatment of testicular cancer. *Semin Surg Oncol* **1999**, 17, (4), 275 - 281.
31. Rabik, C. A.; Dolan, M. E., Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* **2007**, 33, (1), 9 - 23.
32. Schmoll, H.-J.; Höffken, K.; Possinger, K., Kompendium Internistische Onkologie. 3. Auflage, Band 1 **1999**, 1591 - 1597.
33. Hess, V.; Biedermann, B.; Herrmann, R., Prinzipien der Chemotherapie. Chemotherapie-Nebenwirkungen und deren Behandlung. *Schweiz Med Forum* **2001**, 43, 1081 - 1085.
34. [www.journalonko.de](http://www.journalonko.de) Fosaprepitant. **16.09.2009**.
35. Perez, R. P., Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer* **1998**, 34, (10), 1535 - 1542.
36. Stewart, D. J., Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol* **2007**, 63, (1), 12 - 31.
37. Siddik, Z. H., Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **2003**, 22, (47), 7265 - 7279.
38. Katano, K.; Kondo, A.; Safaei, R.; Holzer, A.; Samimi, G.; Mishima, M.; Kuo, Y. M.; Rochdi, M.; Howell, S. B., Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res* **2002**, 62, (22), 6559 - 6565.
39. Kalayda, G. V.; Wagner, C. H.; Buss, I.; Reddijk, J.; Jaehde, U., Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer* **2008**, 8, 175.
40. Zisowsky, J.; Koegel, S.; Leyers, S.; Devarakonda, K.; Kassack, M. U.; Osmak, M.; Jaehde, U., Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol* **2007**, 73, (2), 298 - 307.
41. Hall, M. D.; Okabe, M.; Shen, D. W.; Liang, X. J.; Gottesman, M. M., The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2008**, 48, 495 - 535.

42. Moran, L. K.; Gutteridge, J. M.; Quinlan, G. J., Thiols in cellular redox signalling and control. *Curr Med Chem* **2001**, 8, (7), 763 - 772.
43. Tedeschi, M.; Bohm, S.; Di Re, F.; Oriana, S.; Spatti, G. B.; Tognella, S.; Zunino, F., Glutathione and detoxification. *Cancer Treat Rev* **1990**, 17, (2 - 3), 203 - 208.
44. Hammond, C. L.; Lee, T. K.; Ballatori, N., Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol* **2001**, 34, (6), 946 - 954.
45. Borst, P.; Evers, R.; Kool, M.; Wijnholds, J., A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **2000**, 92, (16), 1295 - 1302.
46. Ishikawa, T.; Wright, C. D.; Isizuka, H., GS-X pump is functionally overexpressed in cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation. *J Biol Chem* **1994**, 269, (46), 29085 - 29093.
47. Gosslau, A.; Rensing, L., Oxidative stress, age-dependent cell damage and antioxidative mechanisms. *Z Gerontol Geriatr* **2002**, 35, (2), 139 - 150.
48. Higuchi, Y., Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J Cell Mol Med* **2004**, 8, (4), 455 - 464.
49. Masters, J. R.; Thomas, R.; Hall, A. G.; Hogarth, L.; Matheson, E. C.; Cattan, A. R.; Lohrer, H., Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. *Eur J Cancer* **1996**, 32A, (7), 1248 - 1253.
50. Koropatnick, J.; Kloth, D. M.; Kadhim, S.; Chin, J. L.; Cherian, M. G., Metallothionein expression and resistance to cisplatin in a human germ cell tumor cell line. *J Pharmacol Exp Ther* **1995**, 275, (3), 1681 - 1687.
51. Yang, Z.; Faustino, P. J.; Andrews, P. A.; Monastra, R.; Rasmussen, A. A.; Ellison, C. D.; Cullen, K. J., Decreased cisplatin/DNA adduct formation is associated with cisplatin resistance in human head and neck cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **2000**, 46, (4), 255 - 262.
52. Köberle, B.; Masters, J. R.; Hartley, J. A.; Wood, R. D., Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol* **1999**, 9, (5), 273 - 276.
53. Martin, L. P.; Hamilton, T. C.; Schilder, R. J., Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* **2008**, 14, (5), 1291 - 1295.

54. Fink, D.; Zheng, H.; Nebel, S.; Norris, P. S.; Aebi, S.; Lin, T. P.; Nehme, A.; Christen, R. D.; Haas, M.; MacLeod, C. L.; Howell, S. B., In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res* **1997**, 57, (10), 1841 - 1850.
55. Mayer, F.; Gillis, A. J.; Dinjens, W.; Oosterhuis, J. W.; Bokemeyer, C.; Loojenga, L. H., Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* **2002**, 62, (10), 2758 - 2760.
56. Wunderlich, V.; Böttger, M., High-mobility-group proteins and cancer-an emerging link. *J Cancer Re Clin Oncol* **1997**, 123, (3), 133 - 140.
57. Mayer, F.; Honecker, F.; Looijenga, L. H.; Bokemeyer, C., Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors. *Ann Oncol* **2003**, 14, (6), 825 - 832.
58. Ho, Y. P.; Au-Yeung, S. C.; To, K. K., Platinum-based anticancer drugs: innovative design strategies and biological perspectives. *Med Res Rev* **2003**, 23, (5), 633 - 655.
59. Pasetto, L. M.; D'Andrea, M. R.; Brandes, A. A.; Rossi, E.; Monfardini, S., The development of platinum compounds and their possible combination. *Crit Rev Oncol Hematol* **2006**, 60, (1), 59 - 75.
60. Lebwohl, D.; Canetta, R., Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* **1998**, 34, (10), 1522 - 1534.
61. Wong, E.; Giandomenico, C. M., Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* **1999**, 99, (9), 2451 - 2466.
62. Desoize, B.; Madoulet, C., Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* **2002**, 42, (3), 317 - 325.
63. Welink, J.; Boven, E.; Vermorken, J. B.; Gall, H. E.; van der Vijgh, W. J., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lobaplatin (D-19466) in patients with advanced solid tumors, including patients with impaired renal or liver function. *Clin Cancer Res* **1999**, 5, (9), 2349 - 2358.
64. Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Keppler, B. K., Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **2003**, 146, 1 - 54.
65. Kostova, I., Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **2006**, 1, (1), 1 - 22.

66. Kelland, L., The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **2007**, 7, (8), 573 - 584.
67. Arienti, C.; Tesei, A.; Ravaioli, A.; Ratta, M.; Carloni, S.; Mangianti, S.; Ulivi, P.; Nicoletti, S.; Amadori, D.; Zoli, W., Activity of lipoplatin in tumor and in normal cells in vitro. *Anticancer Drugs* **2008**, 19, (10), 983 - 990.
68. Schiller, J. H., Small cell lung cancer: defining a role for emerging platinum drugs. *Oncology* **2002**, 63, (2), 105 - 114.
69. Holford, J.; Beale, P. J.; Boxall, F. E.; Sharp, S. Y.; Kelland, L. R., Mechanisms of drug resistance to the platinum complex ZD0473 in ovarian cancer cell lines. *Eur J Cancer* **2000**, 36, (15), 1984 - 1990.
70. Eckardt, J. R.; Bentsion, D. L.; Lipatov, O. N.; Polyakov, I. S.; Mackintosh, F. R.; Karlin, D. A.; Baker, G. S.; Breitz, H. B., Phase II study of picoplatin as second-line therapy for patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **2009**, 27, (12), 2046 - 2051.
71. [www.oncoed.com/conferencecoverage.aspx?id=40140](http://www.oncoed.com/conferencecoverage.aspx?id=40140). **16.09.2009**.
72. Kelland, L. R.; Abel, G.; McKeage, M. J.; Jones, M.; Goddard, P. M.; Valenti, M.; Murrer, B. A.; Harrap, K. R., Preclinical antitumor evaluation of bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexylamine platinum(IV): an orally active platinum drug. *Cancer Res* **1993**, 53, (11), 2581 - 2586.
73. Choy, H.; Park, C.; Yao, M., Current status and future prospects for satraplatin, an oral platinum analogue. *Clin Cancer Res* **2008**, 14, (6), 1633 - 1638.
74. Sternberg, C. N.; Whelan, P.; Hetherington, J.; Paluchowska, B.; Slee, P. H.; Veke-mans, K.; Van Erps, P.; Theodore, C.; Koriakine, O.; Oliver, T.; Lebwohl, D.; Debois, M.; Zurlo, A.; Collette, L.; EORTC, G. T. G., Phase III trial of satraplatin, an oral platinum plus prednisolone vs. prednisolone alone in patients with hormone-refractory prostata cancer. *Oncology* **2005**, 68, (1), 2 - 9.
75. Satraplatin: BMS 182751, BMY 45594, JM 216. *Drugs R D* **2007**, 8, (2), 125 - 132.
76. [www.gpc-biotech.com/Anticancer\\_Programs/Satraplatin](http://www.gpc-biotech.com/Anticancer_Programs/Satraplatin). **16.09.2009**.
77. Kasparikova, J.; Zehnulova, J.; Farrell, N.; Brabec, V., DNA interstrand cross-links of the novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464. *J Biol Chem* **2002**, 277, (50), 48076 - 48086.

78. Perego, P.; Gatti, L.; Caserini, C.; Supino, R.; Colangelo, D.; Leone, R.; Spinelli, S.; Farrell, N.; Zunino, F., The cellular basis of the efficacy of the trinuclear platinum complex BBR3464 against cisplatin-resistant cells. *J Inorg Biochem* **1999**, *77*, (1 - 2), 59 - 64.
79. Manzotti, C.; Pratesi, G.; Menta, E.; Di Domenico, R.; Cavaletti, E.; Fiebig, H. H.; Kelland, L. R.; Farrell, N.; Polizzi, D.; Supino, R.; Pezzoni, G.; Zunino, F., BBR3464: a novel triplatinum complex, exhibiting a preclinical profile of antitumor efficacy different from cisplatin. *Clin Cancer Res* **2000**, *6*, (7), 2626 - 2634.
80. Servidei, T.; Ferlini, C.; Riccardi, A.; Meco, D.; Scambia, G.; Segni, G.; Manzotti, C.; Riccardi, R., The novel trinuclear platinum complexes BBR3464 induces a cellular response different from cisplatin. *Eur J Cancer* **2001**, *37*, (7), 930 - 938.
81. Pratesi, G.; Perego, P.; Polizzi, D.; Righetti, S. C.; Supino, R.; Caserini, C.; Manzotti, C.; Giuliani, F. C.; Pezzoni, G.; Tognella, S.; Spinelli, S.; Farrell, N.; Zunino, F., A novel charged trinuclear platinum complex effective against cisplatin-resistant tumours: hypersensitivity of p53-mutant human tumour xenografts. *Br J Cancer* **1999**, *80*, (12), 1912 - 1919.
82. Jodrell, D. I.; Evans, T. R.; Steward, W.; Cameron, D.; Prendiville, J.; Aschele, C.; Noberasco, C.; Lind, M.; Carmichael, J.; Dobbs, N.; Camboni, G.; Gatti, B.; De Braud, F., Phase II studies of BBR3464, a novel trinuclear platinum complex, in patients with gastric or gastro-oesophageal adenocarcinoma. *Eur J Cancer* **2004**, *40*, (12), 1872 - 1877.
83. Hensing, T. A.; Hanna, N. H.; Gillenwater, H. H.; Gabriella Camboni, M.; Allievi, C.; Socinski, M. A., Phase II study of BBR3464 as treatment in patients with sensitive or refractory small cell lung cancer. *Anticancer Drugs* **2006**, *17*, (6), 697 - 704.
84. Dominguez, M. F.; Macias, R. I.; Izco-Basurko, I.; de La Fuente, A.; Pascual, M. J.; Criado, J. M.; Monte, M. J.; Yajeya, J.; Marin, J. J., Low in vivo toxicity of a novel cisplatin-ursodeoxycholic derivative (Bamet-UD2) with enhanced cytostatic activity versus liver tumors. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *297*, (3), 1106 - 1112.
85. Criado, J. J.; Herrera, M. C.; Palomero, M. F.; Medarde, M.; Rodriguez, E.; Marin, J. J., Synthesis and characterization of a new bile acid and platinum(II) complex with cytostatic activity. *J Lipid Res* **1997**, *38*, (5), 1022 - 1032.
86. Marin, J. J.; Macias, R. I.; Criado, J. J.; Bueno, A.; Monte, M. J.; Serrano, M. A., DNA interaction and cytostatic activity of the new liver organotropic complex of cisplatin with glycocholic acid: Bamet-R2 *Int J Cancer* **1998**, *78*, (3), 346 - 352.

87. Paschke, R.; Paetz, C.; Mueller, T.; Schmoll, H.-J.; Mueller, H.; Sorkau, E.; Sinn, E., Biomolecules linked to transition metal complexes-new chances for chemotherapy. *Curr Med Chem* **2003**, 10, (1), 1241 - 1253.
88. Paschke, R.; Kalbitz, J.; Paetz, C., Novel spacer linked bile acid-cisplatin compounds as a model for specific drug delivery, synthesis and characterization. *Inorg Chim Acta* **2000**, 304, 241 - 249.
89. Paschke, R.; Kalbitz, J.; Paetz, C.; Luckner, M.; Mueller, T.; Schmoll, H.-J.; Mueller, H.; Sorkau, E.; Sinn, E., Cholic acid-carboplatin compounds (CarboChAPt) as models for specific drug delivery: synthesis of novel carboplatin analogous derivatives and comparison of the cytotoxic properties with corresponding cisplatin compounds. *J Inorg Biochem* **2003**, 94, (4), 335 - 342.
90. Paschke, R.; Voigt, W.; Mueller, T.; Kalbitz, J.; Maeder, K.; Dietrich, A., Platinum(II) compounds from 2-substituted propane-1,3-diamines for use as antitumor chemotherapeutic drugs. *German Patent* **2007**, DE 102005047308 A1 20070405 AN 385077.
91. Dietrich, A.; Mueller, T.; Paschke, R.; Kalinowski, B.; Behlendorf, T.; Reipsch, F.; Fuehauf, A.; Schmoll, H.-J.; Kloft, C.; Voigt, W., 2-(4-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl-oxy)-undecyl)propane-1,3-diamminedichloroplatinum(II): a novel platinum compound that overcomes cisplatin resistance and induces apoptosis by mechanisms different from that of cisplatin. *J Med Chem* **2008**, 51, (17), 5413 - 5422.
92. Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **1972**, 26, (4), 239 - 257.
93. Thompson, C. B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **1995**, 267, (5203), 1456 - 1462.
94. Jeremias, I.; Reinhardt, D.; Debatin, K. M., Impaired apoptosis regulation as cause for illness. *HNO* **2001**, 49, (8), 673 - 682.
95. Kerr, J. F.; Winterford, C. M.; Harmon, B. V., Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **1994**, 73, (8), 2013 - 2026.
96. McConkey, D. J., Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* **1998**, 99, (3), 157 - 168.
97. Ziegler, U.; Groscurth, P., Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* **2004**, 19, 124 - 128.
98. Dingermann, T.; Hänsel, R.; Zündorf, I., Pharmazeutische Biologie: Molekulare Grundlagen und klinische Anwendung. **2002**, 411 - 422.

99. Reed, J. C., Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med* **2001**, 7, (7), 314 - 319.
100. Degtarev, A.; Boyce, M.; Yuan, J., A decade of caspases. *Oncogene* **2003**, 22, (53), 8543 - 8567.
101. Slee, E. A.; Adrain, C.; Martin, S. J., Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* **1999**, 6, (11), 1067 - 1074.
102. Philchenkov, A., Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* **2004**, 8, (4), 432 - 444.
103. Zhivotovsky, B.; Orrenius, S., Caspase -2 function in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 331, (3), 859 - 867.
104. Tinel, A.; Tschopp, J., The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase -2 in response to genotoxic stress. *Science* **2004**, 304, (5672), 843 - 846.
105. Lamkanfi, M.; Kalai, M.; Vandenabeele, P., Caspase -12: an overview. *Cell Death Differ* **2004**, 11, (4), 365 - 368.
106. Sanges, D.; Marigo, V., Cross-talk between two apoptotic pathways activated by endoplasmic reticulum stress: differential contribution of caspase -12 and AIF. *Apoptosis* **2006**, 11, (9), 1629 - 1641.
107. Cryns, V.; Yuan, J., Proteases to die for. *Genes Dev* **1998**, 12, (11), 1551 - 1570.
108. Boatright, K M.; Salvesen, G. S., Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **2003**, 15, (6), 725 - 731.
109. Shi, Y., Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* **2004**, 13, (8), 1979 - 1987.
110. Shi, Y., Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* **2004**, 117, (7), 855 - 858.
111. Pieper, A. A.; Verma, A.; Zhang, J.; Snyder, S. H., Poly(ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* **1999**, 20, (4), 171 - 181.
112. Germain, M.; Affar, E. B.; D'Amours, D.; Dixit, V. M.; Salvesen, G. S.; Poirier, G. G., Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. *J Biol Chem* **1999**, 274, (40), 28379 - 28384.
113. Cohen, G. M., Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **1997**, 326, (Pt 1), 1 - 16.
114. Soldani, C.; Scovassi, A. I., Poly(ADP-ribose)polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* **2002**, 7, (4), 321 - 328.



115. Fan, T. J.; Han, L. H.; Cong, R. S.; Liang, J., Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2005**, 37, (11), 719 - 727.
116. Budihardjo, I.; Oliver, H.; Lutter, M.; Luo, X.; Wang, X., Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **1999**, 15, 269 - 290.
117. Zimmermann, K. C.; Bonzon, C.; Green, D. R., The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* **2001**, 92, (1), 57 - 70.
118. Petak, I.; Houghton, J. A., Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathol Oncol Res* **2001**, 7, (2), 95 - 106.
119. Don, A. S.; Hogg, P. J., Mitochondria as cancer drug targets. *Trends Mol Med* **2004**, 10, (8), 372 - 378.
120. Chipuk, J. E.; Bouchier-Hayes, L.; Green, D. R., Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* **2006**, 13, (8), 1396 - 1402.
121. van Gurp, M.; Festjens, N.; van Loo, G.; Saelens, X.; Vandenabeele, P., Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, 304, (3), 487 - 497.
122. Saelens, X.; Festjens, N.; Vande Walle, L.; van Gurp, M.; Van Loo, G.; Vandenabeele, P., Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **2004**, 23, (16), 2861 - 2874.
123. Festjens, N.; Van Gurp, M.; Van Loo, G.; Saelens, X.; Vandenabeele, P., Bcl-2 family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial intermembrane space proteins in apoptotic cell death. *Acta Haematol* **2004**, 111, (1 - 2), 7 - 27.
124. Slee, E. A.; Harte, M. T.; Kluck, R. M.; Wolf, B. B.; Casiano, C. A.; Newmeyer, D. D.; Wang, H. G.; Reed, J. C.; Nicholson, D. W.; Alnemri, E. S.; Green, D. R.; Martin, S. J., Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases -2, -3, -6, -7, -8 and -10 in a caspase -9-dependent manner. *J Cell Biol* **1999**, 144, (2), 281 - 292.
125. Wang, X., The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **2001**, 15, (22), 2922 - 2933.
126. Riedl, S. J.; Shi, Y., Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, 5, (11), 897 - 907.
127. Deveraux, Q. L.; Reed, J. C., IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **1999**, 13, (3), 239 - 253.

128. Shiozaki, E. N.; Shi, Y., Caspases, IAPs and SMAC/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci* **2004**, 29, (9), 486 - 494.
129. van Loo, G.; van Gurp, M.; Depuydt, B.; Srinivasula, S. M.; Rodriguez, I.; Alnemri, E. S.; Gevaert, K.; Vandekerckhove, J.; Declercq, W.; Vandenabeele, P., The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* **2002**, 9, (1), 20 - 26.
130. Kuwana, T.; Newmeyer, D. D., Bcl-2 family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **2003**, 15, (6), 691 - 699.
131. Breckenridge, D. G.; Xue, D., Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr Opin Cell Biol* **2004**, 16, (6), 647 - 652.
132. Sharpe, J. C.; Arnoult, D.; Youle, R. J., Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* **2004**, 1644, (2-3), 107 - 113.
133. Donovan, M.; Cotter, T. G., Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* **2004**, 1644, (2 - 3), 133 - 147.
134. Ly, J. D.; Grubb, D. R.; Lawen, A., The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **2003**, 8, (2), 115 - 128.
135. Desagher, S.; Martinou, J. C., Mitochondria as the central point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **2000**, 10, (9), 369 - 377.
136. Green, D.; Kroemer, G., The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* **1998**, 8, (7), 267 - 271.
137. Preston, T. J.; Abadi, A.; Wilson, L.; Singh, G., Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, 49, (1 - 2), 45 - 61.
138. Breckenridge, D. G.; Germain, M.; Mathai, J. P.; Nguyen, M.; Shore, G. C., Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* **2003**, 22, (53), 8608 - 8618.
139. Rao, R. V.; Ellerby, H. M.; Bredesen, D. E., Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* **2004**, 11, (4), 372 - 380.
140. Groenendyk, J.; Lynch, J.; Michalak, M., Calreticulin,  $Ca^{2+}$ , and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum. *Mol Cells* **2004**, 17, (3), 383 - 389.

141. Orrenius, S.; Zhivotovsky, B.; Nicotera, P., Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**, 4, (7), 552 - 565.
142. Walter, L.; Hajnóczky, G., Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* **2005**, 37, (3), 191 - 206.
143. Kim, R.; Emi, M.; Tanabe, K., Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* **2006**, 57, (5), 545 - 553.
144. Smaili, S. S.; Hsu, Y.-T.; Youle, R. J.; Russell, J. T., Mitochondria in Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* **2000**, 32, (1), 35 - 46.
145. McConkey, D. J.; Orrenius, S., The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, 239, (2), 357 - 366.
146. Chakraborti, T.; Das, S.; Mondal, M.; Roychoudhury, S.; Chakraborti, S., Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* **1999**, 11, (2), 77 - 85.
147. Vandenabeele, P.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B., Serine proteases and calpains fulfill important roles in the apoptotic tragedy of the cellular opera. *Cell Death Differ* **2005**, 12, (9), 1219 - 1224.
148. Franco, S. J.; Huttenlocher, A., Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* **2005**, 118, (Pt 17), 3829 - 3838.
149. Saez, M. E.; Ramirez-Lorca, R.; Moron, F. J.; Ruiz, A., The therapeutic potential of the calpain family: new aspects. *Drug Discov Today* **2006**, 11, (19-20), 917 - 923.
150. Morishima, N.; Nakanishi, K.; Takenouchi, H.; Shibata, T.; Yasuhiko, Y., An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. *J Biol Chem* **2002**, 277, (37), 34287 - 34294.
151. Kitamura, Y.; Miyamura, A.; Takata, K.; Inden, M.; Tsuchiya, D.; Nakamura, K.; Taniguchi, T., Possible involvement of both endoplasmic reticulum- and mitochondria-dependent pathways in thapsigargin-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Sci* **2003**, 92, (3), 228 - 236.
152. Assunção Guimarães, C.; Linden, R., Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* **2004**, 271, (9), 1638 - 1650.
153. Bröker, L. E.; Kruyt, F. A. E.; Giaccone, G., Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* **2005**, 11, (9), 3155 - 3162.
154. Leist, M.; Jäätelä, M., Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, 2, (8), 589 - 598.
155. Kroemer, G.; Martin, S. J., Caspase-independent cell death. *Nat Med* **2005**, 11, (7), 725 - 730.

156. Abraham, M. C.; Shaham, S., Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* **2004**, 14, (4), 184 - 193.
157. Mathiasen, I. S.; Jäätelä, M., Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends Mol Med* **2002**, 8, (5), 212 - 220.
158. Kim, R., Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* **2005**, 103, (8), 1551 - 1560.
159. Ferri, K. F.; Kroemer, G., Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **2001**, 3, (11), E255 - 263.
160. Séqui, B.; Andrieu-Abadie, N.; Jaffrézou, J. P.; Benoist, H.; Levade, T., Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1758, (12), 2104 - 2120.
161. Skulachev, V. P., Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* **2006**, 11, (4), 473 - 485.
162. Susnow, N.; Zeng, L.; Marqineantu, D.; Hockenbery, D. M., Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Semin Cancer Biol* **2009**, 19, (1), 42 - 49.
163. Raha, S.; Robinson, B. H., Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet* **2001**, 106, (1), 62 - 70.
164. Brookes, P. S.; Yoon, Y.; Robotham, J. L.; Anders, M. W.; Sheu, S. S., Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* **2004**, 287, (4), C817 - 833.
165. Temple, M. D.; Perrone, G. G.; Dawes, I. W., Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* **2005**, 15, (6), 319 - 326.
166. Lorenzo, H. K.; Susin, S. A., Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Lett* **2004**, 557, (1 - 3), 14 - 20.
167. Cregan, S. P.; Dawson, V. L.; Slack, R. S., Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* **2004**, 23, (16), 2785 - 2796.
168. Yu, S. W.; Wang, H.; Poitras, M. F.; Coombs, C.; Bowers, W. J.; Federoff, H. J.; Poirier, G. G.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L., Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **2002**, 297, (5579), 259 - 263.
169. Hong, S. J.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L., Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* **2004**, 25, (5), 259 - 264.

170. Chwieralski, C. E.; Welte, T.; Bühling, F., Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* **2006**, 11, (2), 143 - 149.
171. Siskind, L. J., Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* **2005**, 37, (3), 143 - 153.
172. Bellamy, C. O. C.; Malcomson, R.; Wyllie, A. H., The roles of p53 in apoptosis and cancer. *Apoptosis and Cancer* **1997**, 117 - 135.
173. Steele, R. J. C.; Thompson, A. M.; Hall, P. A.; Lane, D. P., The p53 tumour suppressor gene. *Br J Surg* **1998**, 85, (11), 1460 - 1467.
174. Bourdon, J. C.; Laurenzi, V. D.; Melino, G.; Lane, D., p53: 25 years of research and more questions to answer. *Cell Death Differ* **2003**, 10, (4), 397 - 399.
175. El-Deiry, W. S., Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* **1998**, 8, (5), 345 - 357.
176. Schuler, M.; Green, D. R., Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* **2001**, 29, (Pt 6), 684 - 688.
177. Janus, F.; Albrechtsen, N.; Dornreiter, I.; Wiesmüller, L.; Grosse, F.; Deppert, W., The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci* **1999**, 55, (1), 12 - 27.
178. Schafer, K. A., The cell cycle: a review. *Vet Pathol* **1998**, 35, (6), 461 - 478.
179. Lundberg, A. S.; Weinberg, R. A., Control of cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* **1999**, 35, (14), 1886 - 1894.
180. Sorenson, C. M.; Eastman, A., Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* **1988**, 48, (16), 4484 - 4488.
181. Vaisman, A.; Varchenko, M.; Said, I.; Chaney, S. G., Cell cycle changes associated with formation of Pt-DNA adducts in human ovarian carcinoma cells with different cisplatin sensitivity. *Cytometry* **1997**, 27, (1), 54 - 64.
182. Mueller, T.; Voigt, W.; Simon, H.; Fruehauf, A.; Bulankin, A.; Grothey, A.; Schmoll, H.-J., Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. *Cancer Res* **2003**, 63, (2), 513 - 521.
183. Park, M. S.; De Leon, M.; Devarajan, P., Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol* **2002**, 13, (4), 858 - 865.

184. Del Bello, B.; Valentini, M. A.; Mangiavacchi, P.; Comporti, M.; Maellaro, E., Role of caspases -3 and -7 in Apaf-1 proteolytic cleavage and degradation events during cisplatin-induced apoptosis in melanoma cells. *Exp Cell Res* **2004**, 293, (2), 302 - 310.
185. Wang, P.; Song, H. J.; Song, D. K.; Zhang, J.; Hao, C., Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. *Cell Signal* **2006**, 18, (9), 1528 - 1535.
186. Spierings, D. C.; de Vries, E. G.; Vellenga, E.; de Jong, S., Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ* **2003**, 10, (7), 808 - 822.
187. Schneiderman, D.; Kim, J. M.; Senterman, M.; Tsang, B. K., Sustained suppression of Fas ligand expression in cisplatin-resistant human ovarian surface epithelial cancer cells. *Apoptosis* **1999**, 4, (4), 271 - 281.
188. Mandic, A.; Hansson, J.; Linder, S.; Shoshan, M. C., Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem* **2003**, 278, (11), 9100 - 9106.
189. Henkels, K. M.; Turchi, J. J., Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* **1999**, 59, (13), 3077 - 3083.
190. Liu, H.; Baliga, R., Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* **2005**, 16, (7), 1985 - 1992.
191. Mandic, A.; Viktorsson, K.; Strandberg, L.; Heiden, T.; Hansson, J.; Linder, S.; Shoshan, M. C., Calpain-mediated bid cleavage and calpain-independent bax-modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **2002**, 22, (9), 3003 - 3013.
192. Nawrocki, S. T.; Carew, J. S.; Pino, M. S.; Highshaw, R. A.; Dunner, K. J.; Huang, P.; Abbruzzese, J. L.; McConkey, D. J., Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res* **2005**, 65, (24), 11658 - 11666.
193. Kim, J. S.; Lee, J. H.; Jeong, W. W.; Choi, D. H.; Cha, H. J.; Kim do, H.; Kwon, J. K.; Park, S. E.; Park, J. H.; Cho, H. R.; Lee, S. H.; Park, S. K.; Lee, B. J.; Min, Y. J.; Park, J. W., Reactive oxygen species-dependent EndoG release mediates cisplatin-induced caspase-independent apoptosis in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* **2008**, 122, (3), 672 - 680.

194. Casper, J.; Schmoll, H.-J.; Schnaidt, U.; Fonatsch, C., Cell lines of human germinal cancer. *Int J Androl* **1987**, 10, (1), 105 - 113.
195. Bronson, D. L.; Andrews, P. W.; Solter, D.; Cervenka, J.; Lange, P. H.; Fraley, E. E., Cell line derived from a metastasis of a human testicular germ cell tumor. *Cancer Res* **1980**, 40 (7), 2500 - 2506.
196. Wang, N.; Trend, B.; Bronson, D. L.; Fraley, E. E., Nonrandom abnormalities in chromosome 1 in human testicular cancers. *Cancer Res* **1980**, 40, (3), 796 - 802.
197. Bronson, D. L.; Andrews, P. W.; Vessella, R. L.; Fraley, E. E., In vitro differentiation of human embryonal carcinoma cells. In: *Teratocarcinoma Stem Cells*, Silver L. M., Martin, G. R., Strickland, S. (eds) **1983**, 10th Edition, 597 - 605.
198. Vogelzang, N. J.; Bronson, D.; Savino, D.; Vessella, R. L.; Fraley, E. F., A human embryonal-yolk sac carcinoma model system in athymic mice. *Cancer* **1985**, 55, (11), 2584 - 2593.
199. van Elsas, A.; Aarnoudse, C.; van der Minne, C. E.; van der Spek, C. W.; Brouwenstijn, N.; Osanto, S.; Schrier, P. I., Transfection of IL-2 augments CTL response to human melanoma cells in vitro: immunological characterization of a melanoma vaccine. *J Immunother* **1997**, 20, (5), 343 - 353.
200. Ito, T.; Seyama, T.; Iwamoto, K. S.; Hayashi, T.; Mizuno, T.; Tsuyama, N.; Dohi, K.; Nakamura, N.; Akiyama, M., In vitro irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement. *Cancer Res* **1993**, 53, (13), 2940 - 2943.
201. Heldin, N. E.; Westermark, B., The molecular biology of the human anaplastic thyroid carcinoma cell. *Thyroidology* **1991**, 3, (3), 127 - 131.
202. Harstrick, A.; Bokemeyer, C.; Scharnoffske, M.; Hapke, G.; Reile, D.; Schmoll, H.-J., Preclinical activity of a new platinum analogue, lobaplatin, in cisplatin-sensitive and -resistant human testicular, ovarian and gastric carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **1993**, 33, (1), 43 - 47.
203. Mueller, L. P.; Luetzkendorf, J.; Mueller, T.; Reichelt, K.; Simon, H.; Schmoll, H.-J., Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells* **2006**, 24, (12), 2753 - 2765.
204. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* **1990**, 82, (13), 1107 - 1112.

205. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, 72, 248 - 254.
206. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, (5259), 680 - 685.
207. Tarpey, M. M.; White, C. R.; Suarez, E.; Richardson, G.; Radi, R.; Freeman, B. A., Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res* **1999**, 84, (10), 1203 - 1211.
208. Tietze, F., Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **1969**, 27, (3), 502 - 522.
209. Allen, S.; Shea, J. M.; Felmet, T.; Gadra, J.; Dehn, P. F., A kinetic microassay for glutathione in cells plated on 96-well microtiter plates. *Methods Cell Sci* **2000**, 22, (4), 305 - 312.
210. Mueller, T., Untersuchungen zur Chemotherapie-Resistenz des malignen testikulären Keimzelltumors. *Dissertation MLU Halle-Wittenberg* **2005**.
211. Mueller, T.; Mueller, L. P.; Luetzkendorf, J.; Voigt, W.; Simon, H.; Schmoll, H.-J., Loss of Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells is associated with induction of cisplatin resistance. *Tumour Biol* **2006**, 27, (2), 71 - 83.
212. Crul, M.; van Waardenburg, R. C.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H., DNA-based drug interactions of cisplatin. *Cancer Treat Rev* **2002**, 28, (6), 291 - 303.
213. Burger, H.; Nooter, K.; Boersma, A. W.; Kortland, C. J.; Stoter, G., Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer* **1997**, 73, (4), 592 - 599.
214. Huang, Z.; Tong, Y.; Wang, J.; Huang, Y., NMR studies of the relationship between the changes of membrane lipids and the cisplatin-resistance of A549/DDP cells. *Cancer Cell Int* **2003**, 3, (1), 5.
215. Liang, X. J.; Yin, J. J.; Zhou, J. W.; Wang, P. C.; Taylor, B.; Cardarelli, C.; Kozar, M.; Forte, R.; Aszalos, A.; Gottesman, M. M., Changes in biophysical parameters of plasma membranes influence cisplatin resistance of sensitive and resistant epidermal carcinoma cells. *Exp Cell Res* **2004**, 293, (2), 283 - 291.



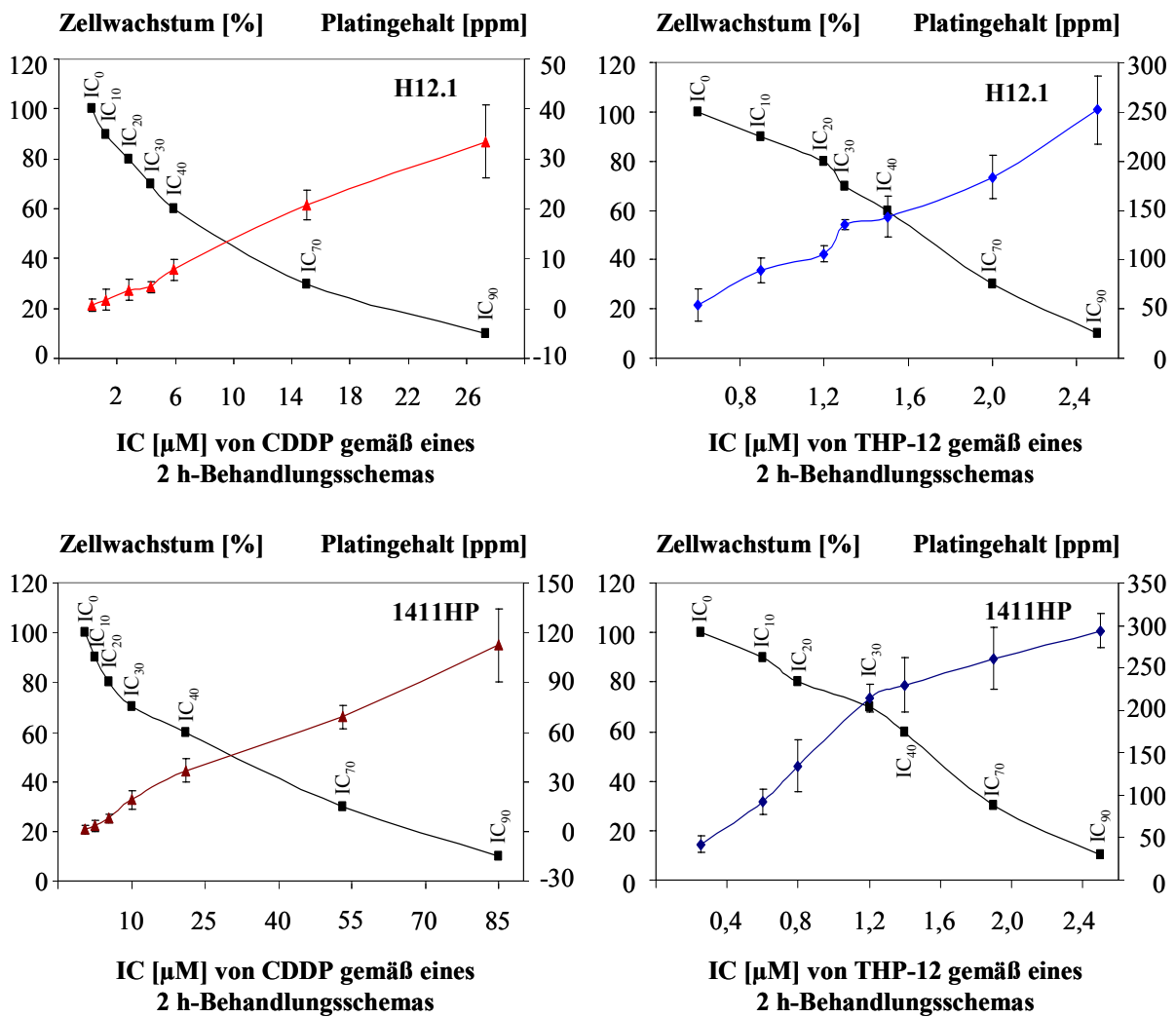
216. Liu, Q.; Qu, Y.; Van Antwerpen, R.; Farrell, N., Mechanism of the membrane interaction of polynuclear platinum anticancer agents. Implication for cellular uptake. *Biochemistry* **2006**, 45, (13), 4248 - 4256.
217. Wild, S., Strukturelle und funktionelle Eigenschaften neuer cis-Platin-Chelatkomplexe und ihrer DNA-Addukte: Relevanz für die cytotoxische Wirkung. *Dissertation LMU München* **2001**.
218. Ang, W. H.; Pilet, S.; Scopelliti, R.; Bussy, F.; Jiullerat-Jeanneret, L.; Dyson, P. J., Synthesis and characterization of platinum(IV) anticancer drugs with functionalized aromatic carboxylate ligands: influence of the ligands on drug efficacies and uptake. *J Med Chem* **2005**, 48, (25), 8060 - 8069.
219. Kozubik, A.; Vaculova, A.; Soucek, K.; Vondracek, J.; Turanek, J.; Hofmanova, J., Novel anticancer platinum(IV) complexes with adamantylamine: their efficiency and innovative chemotherapy strategies modifying lipid metabolism. *Met Based Drugs* **2008**, 2008, 417897.
220. Ciarimboli, G.; Ludwig, T.; Lang, D.; Pavenstädt, H.; Koepsell, H.; Piechota, H. J.; Haier, J.; Jaehde, U.; Zisowsky, J.; Schlatter, E., Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* **2005**, 167, (6), 1477 - 1484.
221. Haag, R.; Kratz, F., Polymere Therapeutika: Konzepte und Anwendungen. *Angew Chem* **2006**, 118, (8), 1218 - 1237.
222. Garmann, D.; Warnecke, A.; Kalayda, G. V.; Kratz, F.; Jaehde, U., Cellular accumulation and cytotoxicity of macromolecular platinum complexes in cisplatin-resistant tumor cells. *J Control Release* **2008**, 131, (2), 100 - 106.
223. Kapp, T.; Mueller, S.; Gust, R., Dinuclear alkylamine platinum(II) complexes of [1,2-bis(4-fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II): influence of endocytosis and copper and organic cation transport systems on cellular uptake. *ChemMedChem* **2006**, 1, (5), 560 - 564.
224. Köberle, B.; Grimaldi, K. A.; Sunters, A.; Hartley, J. A.; Kelland, L. R.; Masters, J. R., DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer* **1997**, 70, (5), 551 - 555.
225. Goodisman, J.; Hagrman, D.; Tacka, K. A.; Souid, A.-K., Analysis of cytotoxicities of platinum compounds. *Cancer Chemother Pharmacol* **2006**, 57, (2), 257 - 267.

226. Speelmans, G.; Staffhorst, R. W.; Versluis, K.; Reddijk, J.; de Kruijff, B., Cisplatin complexes with phosphatidylserine in membranes. *Biochemistry* **1997**, 36, (34), 10545 - 10550.
227. Bose, R. N.; Maurmann, L.; Mishur, R. J.; Yasui, L.; Gupta, S.; Grayburn, W. S.; Hofstetter, H.; Salley, T., Non-DNA binding platinum anticancer agents: Cytotoxic activities of platinum-phosphato complexes towards human ovarian cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**, 105, (47), 18314 - 18319.
228. Zamble, D. B.; Jacks, T.; Lippard, S. J., p53-dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**, 95, (11), 6163 - 6168.
229. Nagai, N.; Ogata, H.; Wada, Y.; Tsujino, D.; Someya, K.; Ohno, T.; Masuhara, K.; Tanaka, Y.; Takahashi, H.; Nagai, H.; Kato, K.; Koshiba, Y.; Igarashi, T.; Yokoyama, A.; Kinameri, K.; Kato, T.; Kurita, Y., Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisplatin in patients with cancer: analysis with the NONMEM program. *J Clin Pharmacol* **1998**, 38, (11), 1025 - 1034.
230. Hanada, K.; Nishijima, K.; Ogata, H.; Atagi, S.; Kawahara, M., Population pharmacokinetic analysis of cisplatin and its metabolites in cancer patients: possible misinterpretation of covariates for pharmacokinetic parameters calculated from the concentrations of unchanged cisplatin, ultrafiltered platinum and total platinum. *Jpn J Clin Oncol* **2001**, 31, (5), 179 - 184.
231. Burger, H.; Nooter, K.; Boersma, A. W. M.; Van Wingerden, K. E.; Looijenga, L. H. J.; Jochemsen, A. G.; Stoter, G., Distinct p53-independent apoptotic cell death signaling pathways in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer* **1999**, 81, 620 - 628.
232. Hsu, Y. T.; Wolter, K. G.; Youle, R. J., Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**, 94, (8), 3668 - 3672.
233. Tao, Z.; Goodisman, J.; Penefsky, H. S.; Souid, A.-K., Caspase activation by anti-cancer drugs: the caspase storm. *Mol Pharm* **2007**, 4, (4), 583 - 595.
234. Troy, C. M.; Shelanski, M. L., Caspase -2 redux. *Cell Death Differ* **2003**, 10, (1), 101 - 107.
235. Krumschnabel, G.; Sohm, B.; Bock, F.; Manzl, C.; Villunger, A., The enigma of caspase -2: the laymen`s view. *Cell Death Differ* **2009**, 16, (2), 195 - 207.
236. Cummings, B. S.; Schnellmann, R. G., Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **2002**, 302, (1), 8 - 17.

237. Thomenius, M. J.; Distelhorst, C. W., Bcl-2 on the endoplasmic reticulum: protecting the mitochondria from a distance. *J Cell Sci* **2003**, 116, (Pt 22), 4493 - 4499.
238. Yu, F.; Megyesi, J.; Price, P. M., Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* **2008**, 295, (1), F44 - 52.
239. Ermak, G.; Davies, K. J., Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol* **2002**, 38, (10), 713 - 721.
240. Sasada, T.; Iwata, S.; Sato, N.; Kitaoka, Y.; Hirota, K.; Nakamura, K.; Nishiyama, A.; Taniguchi, Y.; Takabayashi, A.; Yodoi, J., Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* **1996**, 97, (10), 2268 - 2276.
241. Salganik, R. I., The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J Am Coll Nutr* **2001**, 20, (5), 464S - 472S.
242. Kawai, Y.; Nakao, T.; Kunimura, N.; Kohda, Y.; Gemba, M., Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci* **2006**, 100, (1), 65 - 72.
243. Martins, N. M.; Santos, N. A.; Curti, C.; Bianchi, M. L.; Santos, A. C., Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J Appl Toxicol* **2008**, 28, (3), 337 - 344.
244. Luo, J.; Tsuji, T.; Yasuda, H.; Sun, Y.; Fujigaki, Y.; Hishida, A., The molecular mechanisms of the attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by N-acetylcysteine in rats. *Nephrol Dial Transplant* **2008**, 23, (7), 2198 - 2205.
245. Wu, Y. J.; Muldoon, L. L.; Neuwelt, E. A., The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, 312, (2), 424 - 431.
246. Miyajima, A.; Nakashima, J.; Tachibana, M.; Nakamura, K.; Hayakawa, M.; Murai, M., N-acetylcysteine modifies cis-dichlorodiammineplatinum-induced effects in bladder cancer cells. *Jpn J Cancer Res* **1999**, 90, (5), 565 - 570.
247. Berndtsson, M.; Hägg, M.; Panaretakis, T.; Havelka, A. M.; Shoshan, M. C.; Linder, S., Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *Int J Cancer* **2006**, 120, (1), 175 - 180.
248. [www.idw-online.de/pages/de/news281558](http://www.idw-online.de/pages/de/news281558). **16.09.2009**.

249. Ricci, J. E.; Gottlieb, R. A.; Green, D. R., Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol* **2003**, 160, (1), 65 - 75.
250. Bracht, K.; Boubakari; Grünert, R.; Bednarski, P. J., Correlations between the activities of 19 anti-tumor agents and the intracellular glutathione concentrations in a panel of 14 human cancer cell lines: comparisons with the national cancer institute data. *Anticancer Drugs* **2006**, 17, (1), 41 - 51.
251. Fan, D.; Yang, X.; Wang, X.; Zhang, S.; Mao, J.; Ding, J.; Lin, L.; Guo, Z., A dinuclear monofunctional platinum(II) complex with an aromatic linker shows low reactivity towards glutathione but high DNA binding ability and antitumor activity. *J Biol Inorg Chem* **2007**, 12, (5), 655 - 665.
252. Pendyala, L.; Perez, R.; Weinstein, A.; Zdanowicz, J.; Creaven, P. J., Effect of glutathione depletion on the cytotoxicity of cisplatin and iproplatin in a human melanoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* **1997**, 40, (1), 38 - 44.
253. Muldoon, L. L.; Walker-Rosenfeld, S. L.; Hale, C.; Purcell, S. E.; Bennett, L. C.; Neuwelt, E. A., Rescue from enhanced alkylator-induced cell death with low molecular weight sulfur-containing chemoprotectants. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, 296, (3), 797 - 805.
254. Cullen, K. J.; Yang, Z.; Schumaker, L.; Guo, Z., Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr* **2007**, 39, (1), 43 - 50.
255. Sheikh-Hamad, D., Cisplatin-induced cytotoxicity: Is the nucleus relevant? *Am J Physiol Renal Physiol* **2008**, 295, (1), F42 - 43.
256. Yang, Z.; Schumaker, L. M.; Egorin, M. J.; Zuhowski, E. G.; Guo, Z.; Cullen, K. J., Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res* **2006**, 12, (19), 5817 - 5825.

### **III Anhang**



H12.1		
■ Zellwachstum	▲ Akkumulation von CDDP	◆ Akkumulation von THP-12
CDDP IC <sub>0</sub> 0,3 μM IC <sub>10</sub> 1,2 μM IC <sub>20</sub> 2,8 μM IC <sub>30</sub> 4,3 μM IC <sub>40</sub> 5,9 μM IC <sub>70</sub> 15,0 μM IC <sub>90</sub> 27,3 μM		
THP-12 IC <sub>0</sub> 0,6 μM IC <sub>10</sub> 0,9 μM IC <sub>20</sub> 1,2 μM IC <sub>30</sub> 1,3 μM IC <sub>40</sub> 1,5 μM IC <sub>70</sub> 2,0 μM IC <sub>90</sub> 2,5 μM		
1411HP		
■ Zellwachstum	▲ Akkumulation von CDDP	◆ Akkumulation von THP-12
CDDP IC <sub>0</sub> 0,5 μM IC <sub>10</sub> 2,5 μM IC <sub>20</sub> 5,3 μM IC <sub>30</sub> 10,0 μM IC <sub>40</sub> 21,0 μM IC <sub>70</sub> 53,0 μM IC <sub>90</sub> 85,0 μM		
THP-12 IC <sub>0</sub> 0,3 μM IC <sub>10</sub> 0,6 μM IC <sub>20</sub> 0,8 μM IC <sub>30</sub> 1,2 μM IC <sub>40</sub> 1,4 μM IC <sub>70</sub> 1,9 μM IC <sub>90</sub> 2,5 μM		

Abb. 26: Zellwachstum von H12.1- und 1411HP-Zellen im Vergleich zur zellulären Platinakkumulation nach einer Behandlung mit den IC<sub>0</sub>, IC<sub>10</sub>, IC<sub>20</sub>, IC<sub>30</sub>, IC<sub>40</sub>, IC<sub>70</sub> und den IC<sub>90</sub> von THP-12 oder von CDDP gemäß eines 2 h-Behandlungsschemas; Analyse 2 h nach Behandlungsbeginn; x ± SD; n ≥ 3.

<i>H12.1 CDDP 30 <math>\mu\text{M}^I</math></i>	<i>SubG<sub>1</sub>-Fraktion</i>	<i>G<sub>1</sub></i>	<i>S</i>	<i>G<sub>2</sub>/M</i>
unbehandelte Zellen 8 h	2,8 ± 1,9	<b>18,4 ± 2,6</b>	43,8 ± 2,0	<b>33,7 ± 4,3</b>
CDDP 30 $\mu\text{M}^I$ 8 h	3,0 ± 2,1	<b>28,2 ± 1,7</b>	44,8 ± 2,2	<b>22,6 ± 5,3</b>
unbehandelte Zellen 24 h	<b>2,9 ± 1,9</b>	29,7 ± 3,0	<b>38,2 ± 3,2</b>	27,5 ± 2,1
CDDP 30 $\mu\text{M}^I$ 24 h	9,5 ± 4,0	16,0 ± 6,8	<b>51,1 ± 5,0</b> ( $\alpha < 0,01$ )	22,4 ± 2,0
CDDP 30 $\mu\text{M}^I$ 48 h	<b>37,1 ± 12,6</b> ( $\alpha < 0,001$ )	6,0 ± 1,6	27,8 ± 9,4	22,8 ± 5,5
CDDP 30 $\mu\text{M}^I$ 72 h	<b>44,8 ± 2,7</b> ( $\alpha < 0,001$ )	10,2 ± 2,8	25,9 ± 2,0	15,4 ± 4,4

<i>1411HP CDDP 100 <math>\mu\text{M}^I</math></i>	<i>SubG<sub>1</sub>-Fraktion</i>	<i>G<sub>1</sub></i>	<i>S</i>	<i>G<sub>2</sub>/M</i>
unbehandelte Zellen 8 h	3,4 ± 0,9	<b>33,6 ± 7,6</b>	38,9 ± 4,2	<b>22,1 ± 2,9</b>
CDDP 100 $\mu\text{M}^I$ 8 h	4,0 ± 1,9	<b>37,9 ± 7,5</b>	37,8 ± 2,9	<b>18,4 ± 4,6</b>
unbehandelte Zellen 24 h	<b>4,2 ± 0,6</b>	38,0 ± 6,4	33,6 ± 3,1	21,3 ± 3,8
CDDP 100 $\mu\text{M}^I$ 24 h	<b>26,3 ± 6,5</b> ( $\alpha < 0,05$ )	27,6 ± 5,2	31,7 ± 5,2	12,9 ± 6,2
CDDP 100 $\mu\text{M}^I$ 48 h	<b>45,7 ± 15,2</b> ( $\alpha < 0,001$ )	9,9 ± 1,1	32,1 ± 10,4	9,5 ± 3,5
CDDP 100 $\mu\text{M}^I$ 72 h	<b>56,3 ± 17,0</b> ( $\alpha < 0,001$ )	10,9 ± 0,5	22,3 ± 10,6	8,2 ± 5,9

<i>H12.1 THP-12 2,5 <math>\mu\text{M}^I</math></i>	<i>SubG<sub>1</sub>-Fraktion</i>	<i>G<sub>1</sub></i>	<i>S</i>	<i>G<sub>2</sub>/M</i>
unbehandelte Zellen 8 h	<b>2,8 ± 1,9</b>	18,4 ± 2,6	43,8 ± 2,0	33,7 ± 4,3
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^I$ 8 h	<b>8,8 ± 4,3</b>	14,2 ± 3,7	43,8 ± 1,6	29,3 ± 3,4
unbehandelte Zellen 24 h	<b>2,9 ± 1,9</b>	29,7 ± 3,0	38,2 ± 3,2	27,5 ± 2,1
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^I$ 24 h	<b>41,4 ± 9,2</b> ( $\alpha < 0,001$ )	10,1 ± 1,4	32,3 ± 5,5	12,1 ± 2,4
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^I$ 48 h	<b>57,9 ± 4,6</b> ( $\alpha < 0,001$ )	11,2 ± 1,8	24,4 ± 3,3	5,3 ± 0,7
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^I$ 72 h	<b>52,2 ± 5,2</b> ( $\alpha < 0,001$ )	11,2 ± 1,9	27,9 ± 2,4	7,2 ± 3,4

<i>1411HP THP-12 2,5 <math>\mu\text{M}^I</math></i>	<i>SubG<sub>1</sub>-Fraktion</i>	<i>G<sub>1</sub></i>	<i>S</i>	<i>G<sub>2</sub>/M</i>
unbehandelte Zellen 8 h	<b>3,4 ± 0,9</b>	33,6 ± 7,6	38,9 ± 4,2	22,1 ± 2,9
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^I$ 8 h	<b>16,6 ± 4,1</b> ( $\alpha < 0,001$ )	29,9 ± 5,1	33,1 ± 6,6	18,7 ± 3,6
unbehandelte Zellen 24 h	<b>4,2 ± 0,6</b>	38,0 ± 6,4	33,6 ± 3,1	21,3 ± 3,8
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^I$ 24 h	<b>75,4 ± 5,8</b> ( $\alpha < 0,001$ )	7,7 ± 1,3	12,9 ± 2,7	4,3 ± 1,8
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^I$ 48 h	<b>81,0 ± 1,7</b> ( $\alpha < 0,001$ )	8,3 ± 0,4	9,4 ± 1,2	1,4 ± 0,2
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^I$ 72 h	<b>83,3 ± 2,5</b> ( $\alpha < 0,001$ )	7,2 ± 0,9	8,4 ± 1,5	1,3 ± 0,4

Tab. 11: Zellzyklusphasenverteilung von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I*; Analyse 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn;  $x \pm \text{SD}$ ;  $n \geq 3$ ;  $\alpha$  Bezug auf entsprechende unbehandelte Zellen bei 8 h oder 24 h.

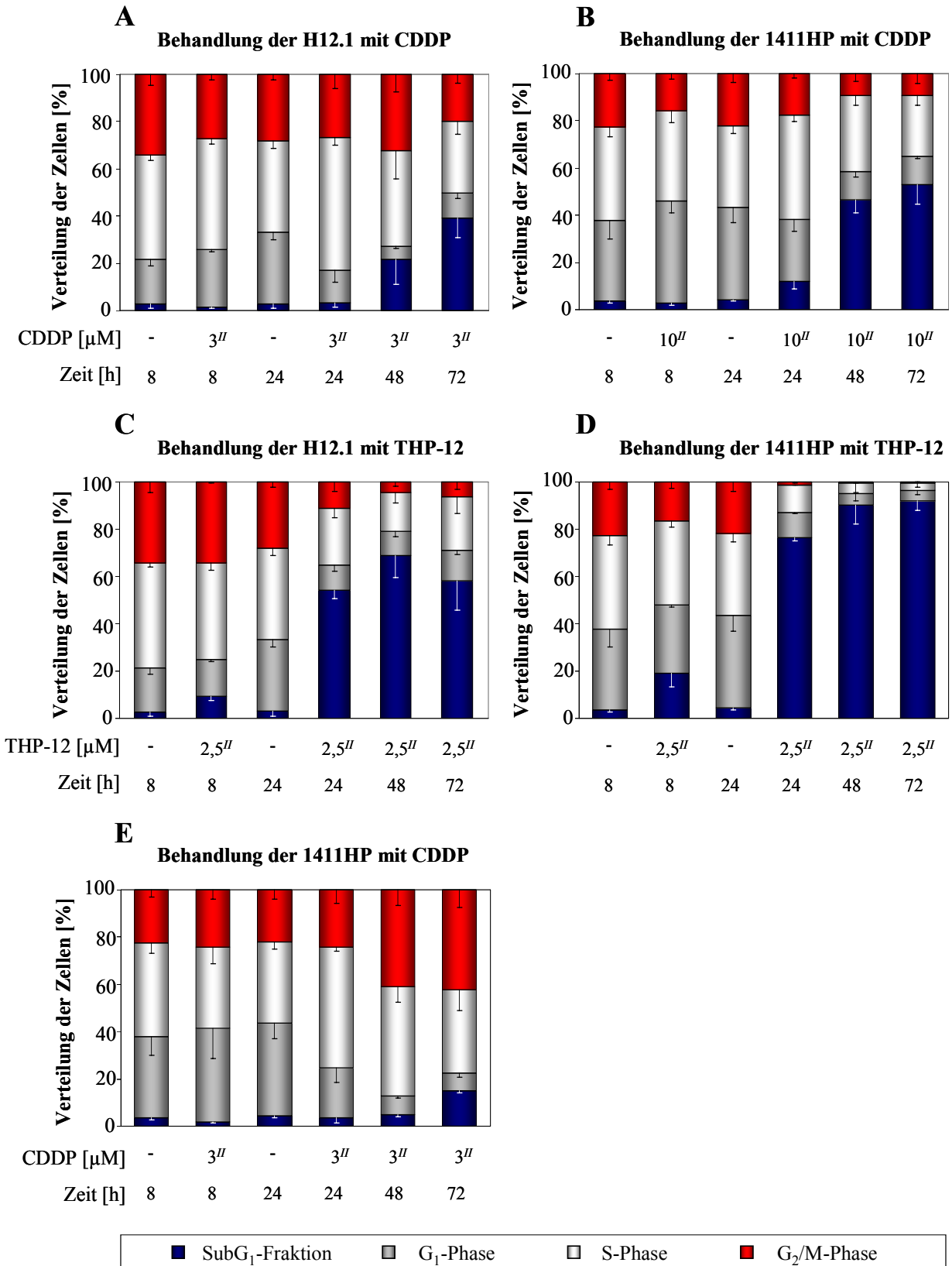


Abb. 31: Störungen im Zellzyklusablauf von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema II*; Analyse 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn;  $\bar{x}$  - SD;  $n \geq 3$ .



<i>H12.1 CDDP 3 <math>\mu\text{M}^{\text{II}}</math></i>	<i>SubG<sub>1</sub>-Fraktion</i>	<i>G<sub>1</sub></i>	<i>S</i>	<i>G<sub>2</sub>/M</i>
unbehandelte Zellen 8 h	2,8 ± 1,9	<b>18,4 ± 2,6</b>	43,8 ± 2,0	<b>33,7 ± 4,3</b>
CDDP 3 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 8 h	1,3 ± 0,4	<b>24,3 ± 1,3</b>	46,1 ± 2,2	<b>26,6 ± 2,1</b>
unbehandelte Zellen 24 h	<b>2,9 ± 1,9</b>	29,7 ± 3,0	<b>38,2 ± 3,2</b>	27,5 ± 2,1
CDDP 3 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 24 h	3,1 ± 1,8	14,0 ± 5,0	<b>56,4 ± 3,2</b> ( $\alpha < 0,001$ )	26,8 ± 6,0
CDDP 3 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 48 h	<b>20,7 ± 10,4</b> ( $\alpha < 0,001$ )	5,1 ± 1,1	38,0 ± 11,2	30,6 ± 7,0
CDDP 3 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 72 h	<b>38,4 ± 8,1</b> ( $\alpha < 0,001$ )	10,2 ± 2,1	29,7 ± 5,4	19,6 ± 3,8

<i>1411HP CDDP 10 <math>\mu\text{M}^{\text{II}}</math></i>	<i>SubG<sub>1</sub>-Fraktion</i>	<i>G<sub>1</sub></i>	<i>S</i>	<i>G<sub>2</sub>/M</i>
unbehandelte Zellen 8 h	3,4 ± 0,9	<b>33,6 ± 7,6</b>	38,9 ± 4,2	<b>22,1 ± 2,9</b>
CDDP 10 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 8 h	2,9 ± 0,9	<b>42,6 ± 5,2</b>	37,6 ± 5,1	<b>15,4 ± 2,1</b>
unbehandelte Zellen 24 h	<b>4,2 ± 0,6</b>	38,0 ± 6,4	<b>33,6 ± 3,1</b>	21,3 ± 3,8
CDDP 10 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 24 h	<b>11,6 ± 3,1</b>	26,1 ± 5,2	<b>43,4 ± 3,0</b>	17,1 ± 1,8
CDDP 10 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 48 h	<b>45,3 ± 5,4</b> ( $\alpha < 0,001$ )	12,0 ± 2,5	31,2 ± 3,8	9,1 ± 3,0
CDDP 10 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 72 h	<b>51,7 ± 8,3</b> ( $\alpha < 0,001$ )	11,5 ± 0,9	25,1 ± 4,1	9,1 ± 4,3

<i>H12.1 THP-12 2,5 <math>\mu\text{M}^{\text{II}}</math></i>	<i>SubG<sub>1</sub>-Fraktion</i>	<i>G<sub>1</sub></i>	<i>S</i>	<i>G<sub>2</sub>/M</i>
unbehandelte Zellen 8 h	<b>2,8 ± 1,9</b>	18,4 ± 2,6	43,8 ± 2,0	33,7 ± 4,3
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 8 h	<b>9,1 ± 1,6</b>	15,1 ± 1,0	39,9 ± 3,0	33,1 ± 0,6
unbehandelte Zellen 24 h	<b>2,9 ± 1,9</b>	29,7 ± 3,0	38,2 ± 3,2	27,5 ± 2,1
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 24 h	<b>53,4 ± 3,7</b> ( $\alpha < 0,001$ )	10,2 ± 2,4	23,6 ± 3,8	11,0 ± 3,9
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 48 h	<b>67,5 ± 9,0</b> ( $\alpha < 0,001$ )	10,3 ± 2,3	16,1 ± 4,2	4,4 ± 1,8
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 72 h	<b>57,3 ± 12,3</b> ( $\alpha < 0,001$ )	12,5 ± 1,8	22,3 ± 7,0	6,1 ± 2,9

<i>1411HP THP-12 2,5 <math>\mu\text{M}^{\text{II}}</math></i>	<i>SubG<sub>1</sub>-Fraktion</i>	<i>G<sub>1</sub></i>	<i>S</i>	<i>G<sub>2</sub>/M</i>
unbehandelte Zellen 8 h	<b>3,4 ± 0,9</b>	33,6 ± 7,6	38,9 ± 4,2	22,1 ± 2,9
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 8 h	<b>18,7 ± 5,5</b> ( $\alpha < 0,01$ )	28,3 ± 1,0	34,5 ± 2,3	16,2 ± 2,4
unbehandelte Zellen 24 h	<b>4,2 ± 0,6</b>	38,0 ± 6,4	33,6 ± 3,1	21,3 ± 3,8
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 24 h	<b>75,7 ± 1,5</b> ( $\alpha < 0,001$ )	10,7 ± 0,6	11,2 ± 0,2	1,4 ± 0,3
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 48 h	<b>89,3 ± 7,8</b> ( $\alpha < 0,001$ )	5,0 ± 2,9	4,5 ± 3,8	0,4 ± 0,4
THP-12 2,5 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 72 h	<b>91,4 ± 3,9</b> ( $\alpha < 0,001$ )	4,6 ± 1,7	3,2 ± 1,8	0,4 ± 0,2

Tab. 12: Zellzyklusphasenverteilung von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema II*; Analyse 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn;  $x \pm \text{SD}$ ;  $n \geq 3$ ;  $\alpha$  Bezug auf entsprechende unbehandelte Zellen bei 8 h oder 24 h.

<i>1411HP CDDP 3 <math>\mu\text{M}^{\text{II}}</math></i>	<i>SubG<sub>1</sub>-Fraktion</i>	<i>G<sub>1</sub></i>	<i>S</i>	<i>G<sub>2</sub>/M</i>
unbehandelte Zellen 8 h	3,4 ± 0,9	33,6 ± 7,6	38,9 ± 4,2	22,1 ± 2,9
CDDP 3 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 8 h	1,6 ± 0,3	38,9 ± 12,3	34,0 ± 7,1	23,6 ± 3,9
unbehandelte Zellen 24 h	<b>4,2 ± 0,6</b>	38,0 ± 6,4	<b>33,6 ± 3,1</b>	<b>21,3 ± 3,8</b>
CDDP 3 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 24 h	3,3 ± 2,0	20,7 ± 6,2	<b>49,8 ± 1,8</b> ( $\alpha < 0,001$ )	23,5 ± 5,5
CDDP 3 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 48 h	4,8 ± 1,0	7,7 ± 0,7	<b>45,0 ± 6,1</b> ( $\alpha < 0,05$ )	<b>40,3 ± 6,3</b> ( $\alpha < 0,001$ )
CDDP 3 $\mu\text{M}^{\text{II}}$ 72 h	<b>14,3 ± 0,5</b>	7,5 ± 1,6	34,1 ± 8,6	<b>40,8 ± 7,4</b> ( $\alpha < 0,001$ )

Tab. 13: Zellzyklusphasenverteilung von 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit der IC<sub>90</sub> von CDDP in der sensitiven Zelllinie H12.1 gemäß dem *Behandlungsschema II*; Analyse 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn;  $\bar{x} \pm \text{SD}$ ;  $n \geq 3$ ;  $\alpha$  Bezug auf entsprechende unbehandelte Zellen bei 24 h.

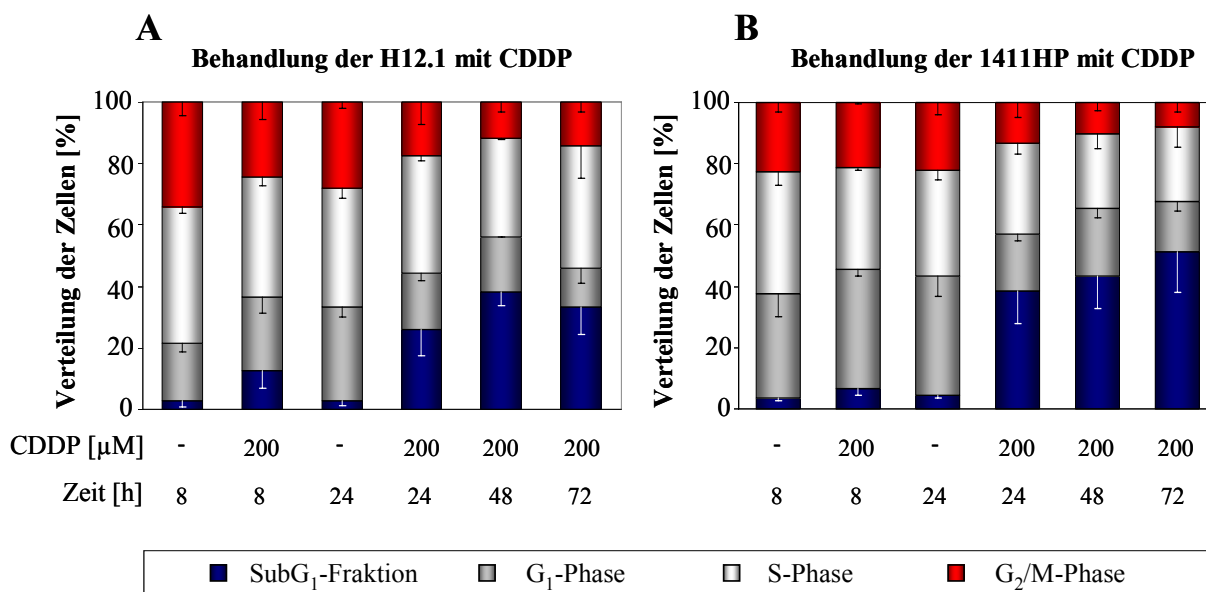


Abb. 32: Störungen im Zellzyklusablauf von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit einer Überkonzentration CDDP von 200  $\mu\text{M}$ ; Analyse 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn; x - SD; n  $\geq$  3.

<i>H12.1 CDDP 200 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>SubG<sub>1</sub>-Fraktion</i>	<i>G<sub>1</sub></i>	<i>S</i>	<i>G<sub>2</sub>/M</i>
unbehandelte Zellen 8 h	<b>2,8 <math>\pm</math> 1,9</b>	18,4 $\pm$ 2,6	43,8 $\pm$ 2,0	33,7 $\pm$ 4,3
CDDP 200 $\mu\text{M}$ 8 h	<b>12,4 <math>\pm</math> 5,7</b>	23,3 $\pm$ 5,3	38,0 $\pm$ 2,9	23,7 $\pm$ 5,4
unbehandelte Zellen 24 h	<b>2,9 <math>\pm</math> 1,9</b>	29,7 $\pm$ 3,0	38,2 $\pm$ 3,2	27,5 $\pm$ 2,1
CDDP 200 $\mu\text{M}$ 24 h	<b>25,4 <math>\pm</math> 8,5 (<math>\alpha &lt; 0,001</math>)</b>	18,0 $\pm$ 2,6	37,4 $\pm$ 1,6	17,0 $\pm$ 7,0
CDDP 200 $\mu\text{M}$ 48 h	<b>37,4 <math>\pm</math> 4,3 (<math>\alpha &lt; 0,001</math>)</b>	17,7 $\pm$ 0,2	31,6 $\pm$ 0,5	11,5 $\pm$ 3,1
CDDP 200 $\mu\text{M}$ 72 h	<b>32,6 <math>\pm</math> 8,8 (<math>\alpha &lt; 0,001</math>)</b>	12,5 $\pm$ 4,9	38,8 $\pm$ 10,5	14,0 $\pm$ 3,4

<i>1411HP CDDP 200 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>SubG<sub>1</sub>-Fraktion</i>	<i>G<sub>1</sub></i>	<i>S</i>	<i>G<sub>2</sub>/M</i>
unbehandelte Zellen 8 h	<b>3,4 <math>\pm</math> 0,9</b>	33,6 $\pm$ 7,6	38,9 $\pm$ 4,2	22,1 $\pm$ 2,9
CDDP 200 $\mu\text{M}$ 8 h	<b>6,6 <math>\pm</math> 2,3</b>	37,7 $\pm$ 2,1	32,2 $\pm$ 0,5	20,8 $\pm$ 0,3
unbehandelte Zellen 24 h	<b>4,2 <math>\pm</math> 0,6</b>	38,0 $\pm$ 6,4	33,6 $\pm$ 3,1	21,3 $\pm$ 3,8
CDDP 200 $\mu\text{M}$ 24 h	<b>38,7 <math>\pm</math> 10,9 (<math>\alpha &lt; 0,001</math>)</b>	18,9 $\pm$ 2,7	29,7 $\pm$ 3,7	13,2 $\pm$ 4,8
CDDP 200 $\mu\text{M}$ 48 h	<b>43,5 <math>\pm</math> 10,4 (<math>\alpha &lt; 0,001</math>)</b>	22,2 $\pm$ 2,8	24,7 $\pm$ 5,2	10,1 $\pm$ 2,6
CDDP 200 $\mu\text{M}$ 72 h	<b>51,4 <math>\pm</math> 13,2 (<math>\alpha &lt; 0,001</math>)</b>	16,7 $\pm$ 3,3	24,3 $\pm$ 6,9	8,0 $\pm$ 3,1

Tab. 14: Zellzyklusphasenverteilung von H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit einer Überkonzentration CDDP von 200  $\mu\text{M}$ ; Analyse 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn; x  $\pm$  SD; n  $\geq$  3;  $\alpha$  Bezug auf entsprechende unbehandelte Zellen bei 24 h.

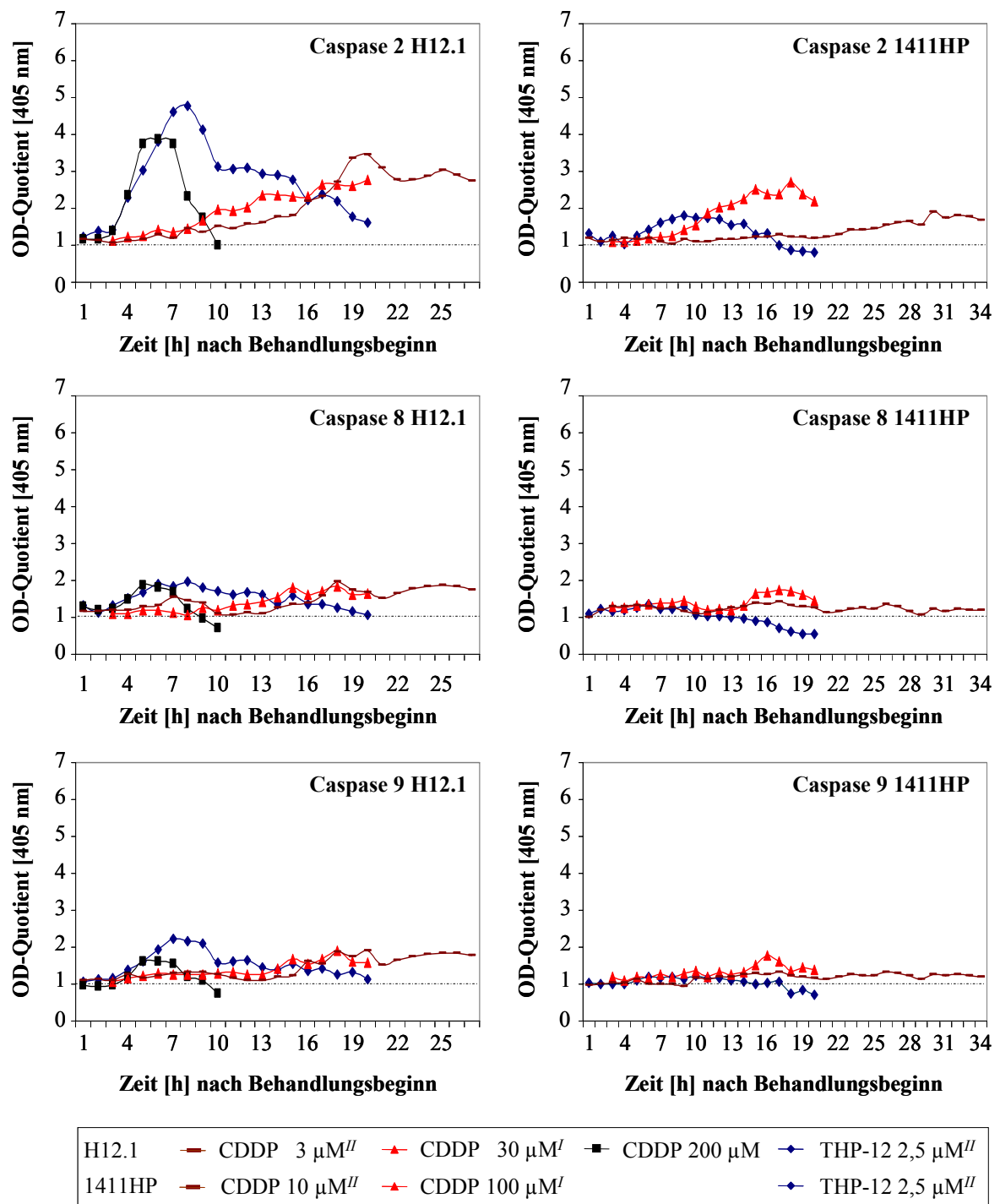


Abb. 40: Aktivitäten der Caspasen 2, 8 und 9 in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 gemäß dem *Behandlungsschema II* oder mit CDDP gemäß den *Behandlungsschemata I* und *II*, Analyse bis 34 h nach Behandlungsbeginn; dargestellt anhand der mittels Caspasenaktivitäts-Assay erfassten OD-Quotienten der behandelten/unbehandelten Zellen; x; n ≥ 3.

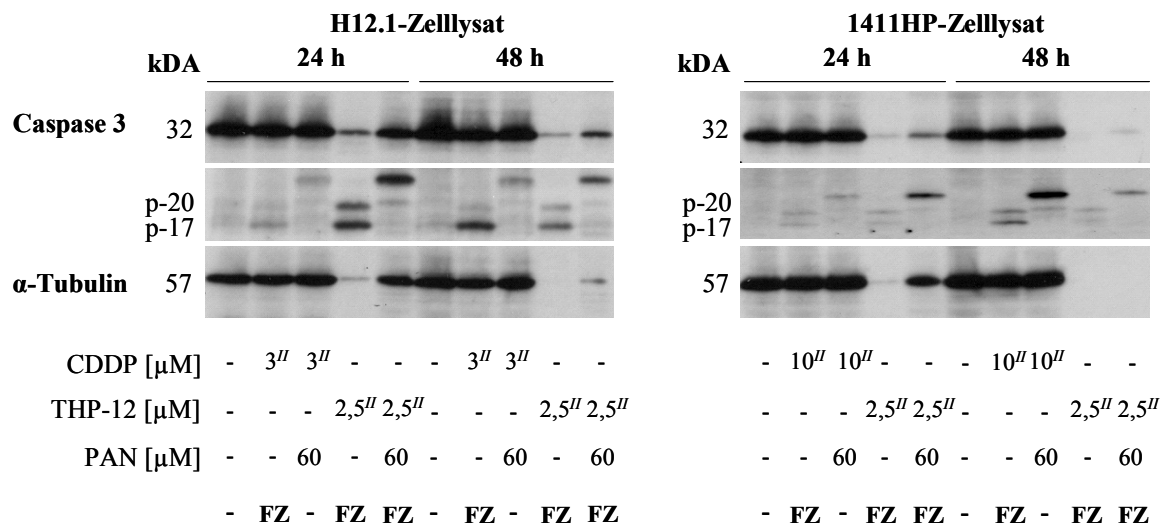


Abb. 43: Spaltung von Caspase 3 in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema II* in An- und Abwesenheit des PAN-Caspaseninhibitors; Analyse 8 h und 24 h nach Behandlungsbeginn; repräsentatives Beispiel von 2 Versuchen; FZ - Bildung von flotierenden Zellen; α-Tubulin diente als Ladekontrolle.

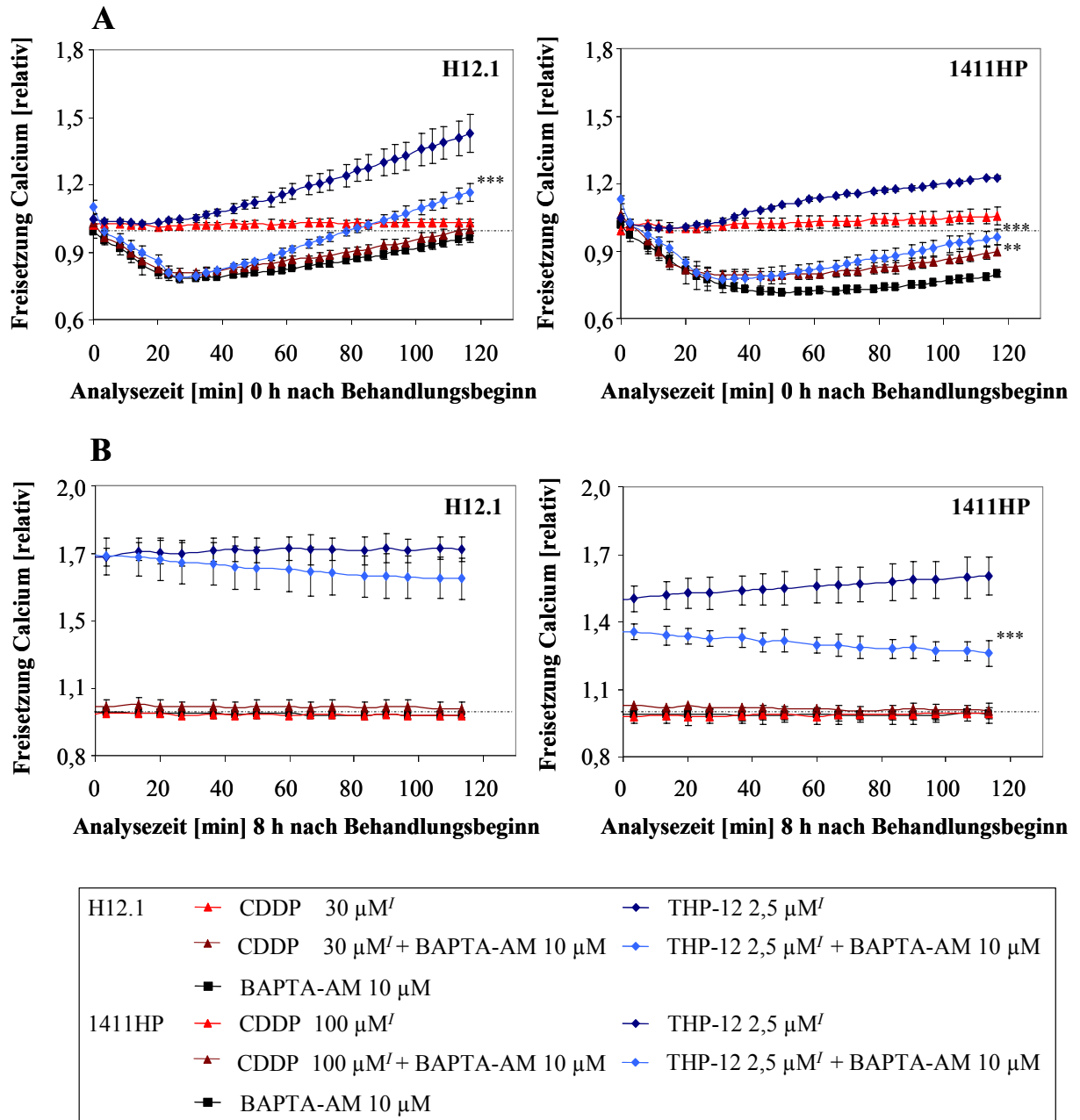


Abb. 49: Zytosolische Calciumfreisetzung in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* in An- und Abwesenheit von BAPTA-AM; Analyse im zeitlichen Verlauf über 2 h direkt nach Behandlungsbeginn (A) und 8 h nach Behandlungsbeginn (B); relative Werte behandelte/unbehandelte Zellen;  $x \pm \text{SD}$ ;  $n = 3$ ; \*\*\* signif. zu THP-12-behandelten Zellen nach 2 h bzw. 8 h  $\alpha < 0,001$ ; \*\* signif. zu CDDP-behandelten Zellen nach 2 h  $\alpha < 0,01$ .

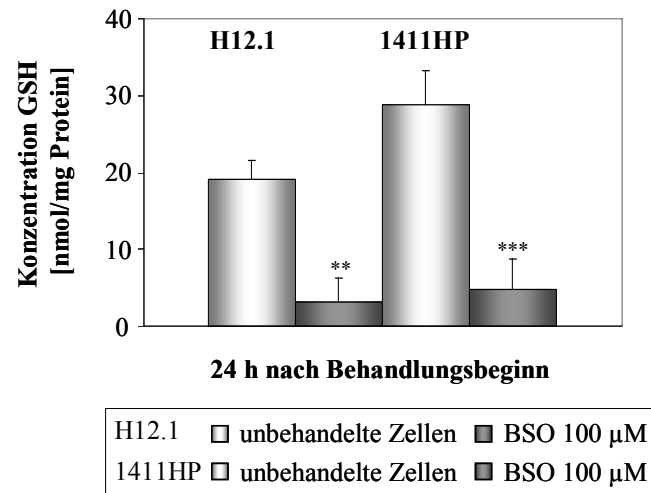


Abb. 55: Abnahme von freien GSH-Konzentrationen in H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit 100 μM BSO; Analyse 24 h nach Behandlungsbeginn;  $\bar{x} + SD$ ;  $n = 3$ ; \*\*\* signif. zu unbehandelten Zellen  $\alpha < 0,001$ ; \*\* signif. zu unbehandelten Zellen  $\alpha < 0,01$ .

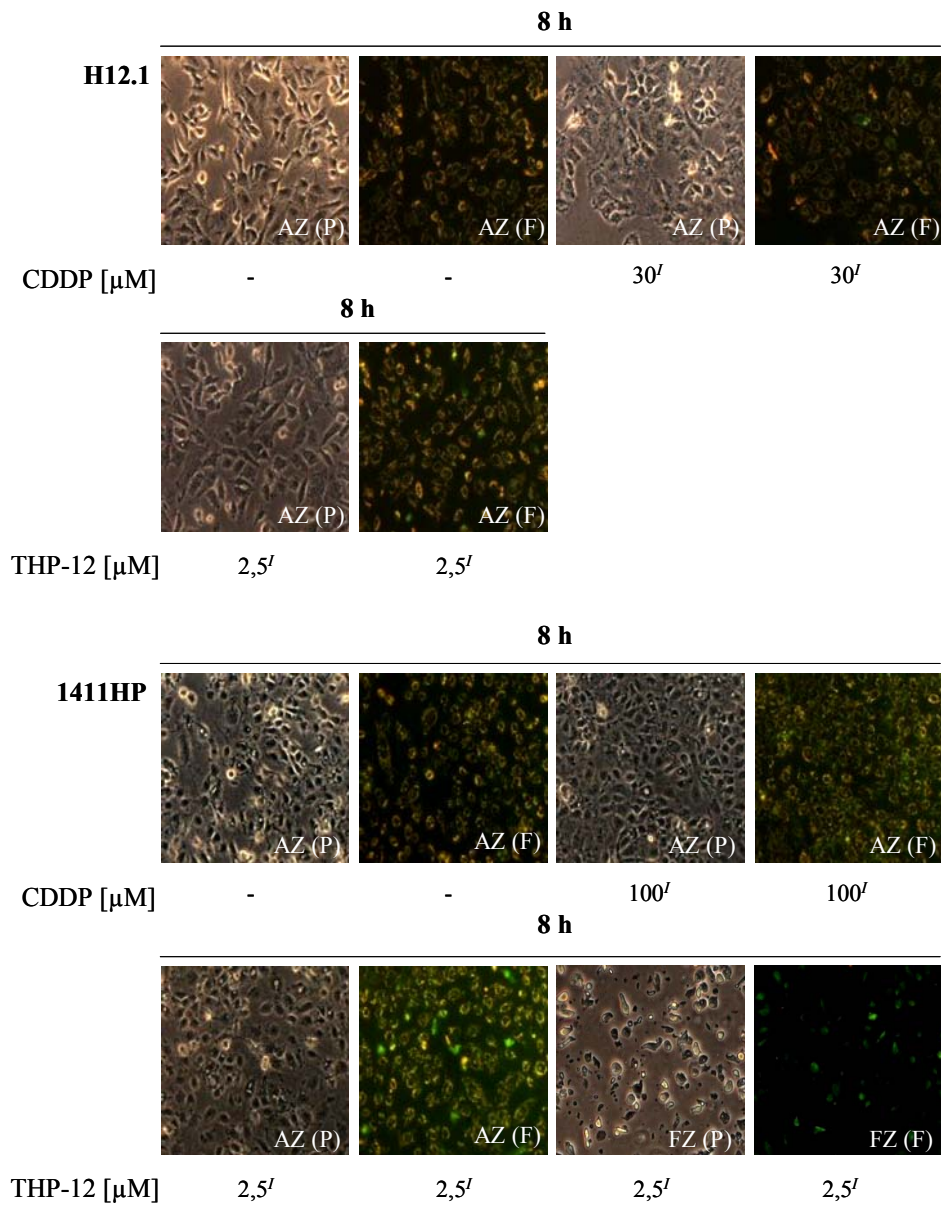


Abb. 57: Nachweis von orangerot fluoreszierenden und grün fluoreszierenden H12.1- und 1411HP-Zellen nach einer Behandlung mit THP-12 oder mit CDDP gemäß dem *Behandlungsschema I* in Anwesenheit von DePsipher-Reagenz; orangerote Fluoreszenz der Zellen mit intaktem  $\Delta\Psi_m$ ; grüne Fluoreszenz der Zellen bei Zusammenbruch von  $\Delta\Psi_m$ ; Analyse 8 h nach Behandlungsbeginn; repräsentative Beispiele von 2 Versuchen; AZ - adhärenente Zellen; FZ - flotierende Zellen; P - Phasenkontrast; F - Fluoreszenz; Vergrößerung 200-fach.



## **Erklärung**

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden in den Jahren 2004 bis 2008 an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Hämatologisch-Onkologischen Forschungslabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Bereich Präklinische Substanzforschung, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll durchgeführt.

Teile der vorliegenden Arbeit sind in Publikationen und in Präsentationen eingegangen.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ich versichere weiterhin, dass die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche aufgeführt.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland vorgelegt habe.

Halle (Saale), den 10.02.2010

Andrea Dietrich

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation unterstützt und zu ihrer Entstehung beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Kloft, Abteilung Klinische Pharmazie, Institut für Pharmazie, Naturwissenschaftliche Fakultät I der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg, für die Bereitschaft zur Übernahme meiner Betreuung am Institut für Pharmazie. Ein sehr herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Medizinische Fakultät der MLU Halle-Wittenberg, für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Ermöglichung einer naturwissenschaftlichen Promotion im Rahmen seines Forschungsgebietes.

Herrn Dr. med. Wieland Voigt, Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor KIM IV Halle, danke ich für das rege Interesse am Fortgang der Dissertation, die gewährte Freiheit zur eigenen wissenschaftlichen Bearbeitung des Themas und die hilfreichen Anregungen, die zum Gelingen der Arbeit beitrugen. Ein besonderes Dankeschön gebührt Herrn Dr. rer. nat. Thomas Müller, Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor KIM IV Halle, der mir mit seiner fortwährenden Unterstützung, seiner steten Diskussionsbereitschaft und den konstruktiven Ratschlägen und Kritiken betreuend zur Seite stand. Dank gilt ihm auch für sein immer offenes Ohr und die vielen fachlichen und motivierenden Gespräche. Ein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Lutz P. Müller, Frau Jana Lützkendorf und Frau Katrin Nерger, Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor KIM IV Halle, für die liebevolle und freundliche Arbeitsatmosphäre, den fachlichen Austausch und ihre permanente Hilfsbereitschaft. Herrn Dr. med. Lutz P. Müller danke ich ferner für die Bereitstellung der hMSC. Insbesondere Frau Franziska Reipsch, Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor KIM IV Halle, danke ich für ihre Mithilfe und die unentbehrliche Unterstützung bei allen experimentellen Tätigkeiten im Rahmen der Zellkultur und im Laboralltag. Frau Angelika Frühauf, Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor KIM IV Halle, danke ich für ihre hilfreiche Zusammenarbeit bei der Durchführung der Methoden zur Bestimmung der intrazellulären Calcium- und GSH-Konzentrationen und des mitochondrialen Membranpotentials.

Herrn PD Dr. rer. nat. Reinhard Paschke, Medizinisch-Pharmazeutische Chemie der MLU Halle-Wittenberg, danke ich für die Bereitstellung der Platinsubstanzen und die kompetente Beratung bei allen analytisch-chemischen Fragen. Herrn Dr. rer. nat. Bernd Kalinowski, ehemals Medizinisch-Pharmazeutische Chemie der MLU Halle-Wittenberg und Herrn Dr. rer. nat. Goran Kaluderović, Medizinisch-Pharmazeutische Chemie der MLU Halle-Wittenberg, danke ich für die Durchführung der Platinaufnahmeuntersuchungen mittels AAS. Analytik AG Jena danke ich für die Quantifizierung der DNA-Platinierungsproben. Herzlich danken möchte ich Frau Urte Hinkelmann, ehemals Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, Institut für Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg, für die Bereitstellung des Luminometers und für ihre Unterstützung bei der Bestimmung der ROS.

Ein sehr herzlicher Dank gilt nicht zuletzt all den Menschen, die mich im Zusammenhang mit dieser Arbeit moralisch unterstützt, inspiriert und weitergebracht haben, insbesondere meiner Familie für ihre Geduld, ihr Vertrauen und die vielen kleinen und großen Hilfeleistungen, sowie Karin, Urte, Anne und Baris für ihren starken Rückhalt.

Diese Arbeit wurde vom Kultusministerium Sachsen-Anhalt PA3573B/0604T gefördert.

## Lebenslauf

### *Persönliche Angaben*

Name	Andrea Dietrich (Dipl. Pharm.)
Geburtsdatum	28.08.1978
Geburtsort	Zeitz
Wohnort	Robert-Blum-Strasse 6, 06114 Halle (Saale)
Familienstand	ledig, keine Kinder

### *Schulbildung*

09/1985 - 07/1991	Polytechnische Oberschule „Alexander Matrossow“ in Theißen
09/1991 - 07/1997	Gymnasium „Geschwister-Scholl“ in Zeitz
05.07.1997	Allgemeine Hochschulreife (Note 1,6)

### *Berufsausbildung*

09/1997 - 07/1998	Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin (PTA) an der Berufsfachschule Leipzig (nicht abgeschlossen)
-------------------	---

### *Hochschulbildung*

10/1998 - 10/2002	Studium der Pharmazie an der MLU Halle-Wittenberg
25.08.2000	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Note 1,25)
23.09.2002	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Note 1,5)
11/2002 - 04/2003	Praktische Ausbildung im Rahmen des Dritten Studienabschnittes in der Reil-Apotheke in Halle (Saale)
24.02.2004	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Note 1,0) Abschluss des Studiums mit Gesamtnote 1,28
08.03.2004	Approbation als Apothekerin

### *Postgraduale Ausbildung*

05/2003 - 10/2003	Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Dipl. Pharm. Abteilung für Biochemische Pharmazie, Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg
-------------------	--

- „Untersuchungen zur Biotransformation in der Haut am Beispiel der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT“ (02.11.2005 Note 1,0)
- 01.04.2004 - 31.03.2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der BioService Halle GmbH (An-Institut der MLU), Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Landeszentrum für Zell- und Gentherapie (LZG), MLU Halle-Wittenberg; Beginn Promotionsstudium
- „Präklinische Ansätze zur Überwindung einer Cisplatin-Resistenz: Evaluierung der neuen Platinverbindung THP-12 in Cisplatin-sensitiven und in Cisplatin-resistenten Tumorzelllinien“
- 01.04.2007 - 30.04.2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der MLU Halle-Wittenberg, Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, LZG, MLU Halle-Wittenberg
- 01.05.2007 - 31.07.2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der BioSolutions Halle GmbH (ehemals BioService Halle GmbH, s. o.)
- 01.08.2007 - 31.12.2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der MLU Halle-Wittenberg (s. o.)  
seit 01.01.2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der BioSolutions Halle GmbH (s. o.)

*Weitere berufliche Tätigkeiten und Qualifikationen*

- 21.04.2005 Sachkundenachweis „Tierschutz/Versuchstierkunde“  
seit 01.05.2007 Nebentätigkeit als Apothekerin in der Sankt-Georg-Apotheke in Halle (Saale)
- 27.05.2008 Fortbildungszertifikat der Apothekerkammer Sachsen-Anhalt

## Publikationsverzeichnis

### *Veröffentlichungen*

**Dietrich, A.**, Voigt, W., Meyer, C., Kloft, C., Schmoll, H.-J., Mueller, T., Zoledronic acid sensitizes multiresistant germ cell tumor cells to CDDP. *Publikation in Vorbereitung*

**Dietrich, A.**, Mueller, T., Behlendorf, T., Schmoll, H.-J., Voigt, W., Targeting mTOR - a new treatment option for thyroid cancer? *Publikation in Vorbereitung*

Schobert, R., Biersack, B., Zoldakova, M., Fruehauf, A., **Dietrich, A.**, Mueller, T., Multi-targeted Pt(II) and Ru(II) complexes of combretastatin analogous chalcones. *Publikation in Vorbereitung*

Schobert, R., Biersack, B., **Dietrich, A.**, Knauer, S., Zoldakova, M., Fruehauf, A., Mueller, T., Pt(II) complexes of a combretastatin A-4 analogous chalcone: effects of conjugation on cytotoxicity, tumor specificity and long-term tumor growth suppression. *J Med Chem* **2009**, 52, (2), 241 - 246.

**Dietrich, A.**, Mueller, T., Paschke, R., Kalinowski, B., Behlendorf, T., Reipsch, F., Fruehauf, A., Schmoll, H.-J., Kloft, C., Voigt, W., 2-(4-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-undecyl)-propane-1,3-diamminedichloroplatinum(II): a novel platinum compound that overcomes CDDP resistance and induces apoptosis by mechanisms different from that of CDDP. *J Med Chem* **2008**, 51, (17), 5413 - 5422.

Kelly, M., **Dietrich, A.**, Gomez-Ruiz, S., Kalinowski, B., Kaluderović, G. N., Mueller, T., Paschke, R., Schmidt, J., Steinborn, D., Wagner, C., Schmidt, H., Platinum(IV) metallacrown ethers: synthesis, structures, host properties and anticancer evaluation. *Organometallics* **2008**, 27, (19), 4917 - 4927.

Kaluderović, G. N., Schmidt, H., Schwieger, S., Wagner, C., Paschke, R., **Dietrich, A.**, Mueller, T., Steinborn, D., Platinum(IV) complexes with ethylenediamine-*N,N'*-diacetate diester (R<sub>2</sub>edda) ligands: synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral activity. *Inorg Chim Acta* **2008**, 361, 1395 - 1404.

Schobert, R., Biersack, B., **Dietrich, A.**, Grotemeier, A., Mueller, T., Kalinowski, B., Knauer, S., Voigt, W., Paschke, R., Monoterpenes as drug shuttles: cytotoxic (6-aminomethyl-nicotinate)dichloridoplatinum(II) complexes with potential to overcome CDDP resistance. *J Med Chem* **2007**, 50, (6), 1288 - 1293.

Kaluderović, G. N., Schmidt, H., Paschke, R., Kalinowski, B., **Dietrich, A.**, Mueller, T., Steinborn, D., Platinum(II) complexes with I-methionylglycine and I-methionyl-l-leucine ligands: synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral activity. *J Inorg Biochem* **2007**, 101, (3), 543 - 549.

Voigt, W., **Dietrich, A.**, Schmoll, H.-J., Molekulare Tumorthherapie - Neue Zytostatika mit spezifischen Wirkmechanismen. *Klinikerarzt* **2006**, 35, (3), 99 - 104.

Voigt, W., **Dietrich, A.**, Schmoll, H.-J., CDDP und seine Analoga. Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz. *Pharm Unserer Zeit* **2006**, 35, (2), 134 - 143.

#### *Patente*

Paschke, R., Voigt, W., Mueller, T., Kalbitz, J., Maeder, K., **Dietrich, A.**, Platinum(II) compounds from 2-substituted propane-1,3-diamines for use as antitumor chemotherapeutic drugs. *Ger. Offen. 9pp.* GWXXBX DE 102005047308 A1 20070405 AN **2007**: 385077.

#### *Abstracts und Poster*

**Dietrich, A.**, Mueller, T., Paschke, R., Reipsch, F., Fruehauf, A., Schmoll, H.-J., Voigt, W., The new platinum compound THP-12 overcomes CDDP resistance and induces a DNA-independent and caspase-independent apoptotic cell death. Academic Drug Development in Oncology, AIO – Symposium, 2009, Abstract. *Poster in Vorbereitung*

Kaluderović, G. N., **Dietrich, A.**, Kommera, H., Kuntsche, J., Maeder, K., Voigt, W., Mueller, T., Paschke, R., Liposomes as vehicle for THP-12 that overcome CDDP resistance. Academic Drug Development in Oncology, AIO – Symposium, 2009, Abstract. *Poster in Vorbereitung*

**Dietrich, A.**, Mueller, T., Behlendorf, T., Jordan, K., Arnold, D., Schmoll, H.-J., Voigt, W., Targeting mTOR - a new treatment option for thyroid cancer? Gemeinsame Jahrestagung der DGHO 2009, #P-749, Abstract und Poster.

**Dietrich, A.**, Mueller, T., Reipsch, F., Kalinowski, B., Paschke, R., Voigt, W. Schmoll, H.-J., The novel platinum compound THPC<sub>11</sub>PtCl<sub>2</sub> overcomes CDDP resistance and induces apoptosis by a mechanism distinct of that of CDDP. *Onkologie* **2007**, 30, (S3), 216, #P-787, Abstract und Poster.

Meyer, C., **Dietrich, A.**, Voigt, W., Reipsch, F., Reichelt, K., Bruhne, C., Schmoll, H.-J., Mueller, T., Zoledronic acid sensitizes multiresistant germ cell tumor cells to CDDP. *Onkologie* **2007**, 30, (S3), 99, #P-416, Abstract und Poster.

Schobert, R., Biersack, B., Filova, M., Grotemeier, A., Knauer, S., **Dietrich, A.**, Mueller, T., Kalinowski, B., Paschke, R., Hammond, G. L., Bernhardt, G., Isoprenoids as platinum drug shuttles. *J Biol Inorg Chem* **2007**, 12 (S1), 46, #P-080, Abstract und Poster.

**Dietrich, A.**, Mueller, T., Voigt, W., Paschke, R., Kalinowski, B. and Schmoll, H.-J., THPC<sub>11</sub>PtCl<sub>2</sub>: a novel platinum compound that overcomes CDDP resistance by inducing a different mechanism of apoptosis. *18th EORTC NCI AACR* **2006**, #P-186, Abstract und Poster.

**Dietrich, A.**, Mueller, T., Voigt, W., Paschke, R., Kalinowski, B., Schmoll, H.-J., A tetrahydropyran platinum compound with potential to overcome CDDP drug resistance. *Onkologie* **2005**, 28, (S3), 47, #P-127, Abstract und Poster.

#### *Vorträge*

**Dietrich, A.**, Zoledronsäure (Zometa<sup>®</sup>) als Modulator der Cisplatin-Sensitivität. Novartis Forschungsgruppen-Meeting, Leipzig, **09.05.2008**.

**Dietrich, A.**, THP-12: Update über neueste Entwicklungen und weitere Entwicklungsstrategien. Novartis Forschungsgruppen-Meeting, Halle **15.05.2007**.