

Untersuchungen zur Chemotherapie-Resistenz des malignen testikulären Keimzelltumors

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Diplom-Biochemiker Thomas Müller
geb. am: 26.07.1970 in Halle

Gutachterin/ Gutachter:

1. Prof. E. Wahle
2. Prof. P. Albers

Halle (Saale), den 21.12. 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009724

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009724>]

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Der maligne testikuläre Keimzelltumor (TKZT)	1
1.2 Keimzelltumoren und Embryogenese – die Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4	4
1.3 Die Cisplatin-haltige Chemotherapie von metastasierten TKZT – das Problem der Chemotherapie-Resistenz	7
1.4 Die Wirkungsweise von Cisplatin – Determinanten der Sensitivität und Resistenz gegenüber Cisplatin.....	9
1.5 Der programmierte Zelltod Apoptose und die Aktivierung von Caspasen	18
1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	25
2 Material.....	27
2.1 Zelllinien	27
2.2 Medien, Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	28
2.3 Antikörper	32
2.4 Geräte und Verbrauchsmittel.....	34
3 Methoden.....	35
3.1 Zellkultivierung	35
3.2 SRB-Zytotoxizitäts-Assay und Bestimmung des IC90-Wertes von Cisplatin.....	35
3.2.1 SRB-Zytotoxizitäts-Assay	35
3.2.2 Bestimmung des Zelllinien-spezifischen IC90-Wertes von Cisplatin.....	36
3.2.3 Ermittlung der Zelllinien-spezifischen Wachstumskinetik	37
3.3 Behandlung mit Cisplatin	37
3.4 Apoptoseanalyse.....	37
3.4.1 Aktivierung der Caspase-3	38
3.4.2 DNA-Leiter-Assay	38
3.4.3 Trypanblau-Ausschluss-Test	39
3.5 Messung der DNA-Platinierung mittels ELISA.....	39
3.6 Zellzyklusanalyse	39
3.7 Messung der Proteinkonzentration	40
3.8 Analyse der Proteinexpression mittels Western-Blotting	40
3.9 Analyse der Proteinexpression mittels Immunzytochemie	41

3.10	Herstellung zytosolischer Fraktionen	41
3.11	Analyse von Protein-Protein Interaktionen mittels Immunpräzipitation.....	42
3.12	Etablierung von Tumor-Xenograften in Nacktmäusen und Behandlung mit Cisplatin	43
3.13	Gewinnung von Tumor-Xenograften aus Nacktmäusen und immunhistochemische Analyse	43
3.14	Caspase-Assay und Inhibierung von Caspasen	44
3.15	Transfektion von siRNA und Expressionsvektoren	45
3.16	Zell-Klonierung	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Zelllinien-spezifische Wachstumskinetiken und Zellzahlen	47
4.2	Charakterisierung der TKZT-Zelllinien hinsichtlich der Cisplatin-Sensitivität.....	48
4.3	Analyse des Cisplatin-induzierten Zelltodes	50
4.4	Analyse der Cisplatin-Wirkung <i>in vivo</i>	52
4.5	Zellzyklusanalyse und Untersuchungen zur DNA-Platinierung	53
4.6	Expression von p53, Proteinen des MMR und der Bcl2-Familie.....	57
4.7	Analyse zur Funktion von p53	59
4.8	Spaltung und Aktivierung von Caspasen nach Cisplatin-Behandlung.....	61
4.9	Untersuchungen zur Aktivierung und Funktion von Caspase-9.....	64
4.10	Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4	69
4.11	Untersuchung zur Funktion von Oct-3/4.....	72
4.12	Assoziation zwischen Oct-3/4-Status, p53-Expression und Caspasen-Aktivierung	79
5	Diskussion	82
5.1	Die Cisplatin-induzierte Apoptose in TKZT-Zellen und mögliche Mechanismen der zellulären Cisplatin-Resistenz	82
5.2	Charakterisierung des Cisplatin-resistenten TKZT-Zelltyps – die Bedeutung der Oct-3/4-Expression.....	90
5.3	Die Tumorstammzell-Hypothese und mögliche Mechanismen der Cisplatin-Resistenz beim metastasierten TKZT	96
6	Zusammenfassung und Ausblick	104
7	Literaturverzeichnis.....	108
8	Anhang	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AFP	Alpha-Fetoprotein
AK	Antikörper
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Kälberserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
CC	Chorionkarzinom
CDDP	<i>cis</i> -Diamin(dichloro)platin (II), Cisplatin
CIS	carcinoma in situ
cm ³	Kubikzentimeter
C-terminal	Carboxylterminus eines Proteins
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Embryonales Karzinom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ES	Embryonale Stammzellen
FKS	fetales Kälberserum
h	Stunde
HCG	humanes Choriongonadotropin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSP	Hitzeschockprotein
IAP	Inhibitoren der Apoptose
ICM	innere Zellmasse der Blastozyste
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm

mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMR	Mismatch repair
MSI	Mikrosatelliten-DNA-Instabilitäten
MW	Mittelwert
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NER	Nucleotide excision repair
nm	Nanometer
N-terminal	Aminoterminus eines Proteins
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PBST	phosphatgepufferte Saline + Tween20
PCD	Programmierter Zelltod
PGC	primordiale Keimzellen
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SRB	Sulforhodamin B
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TE	Teratom
TIN	testikuläre intratubuläre Neoplasie
TKZT	Testikulärer Keimzelltumor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan

U/ min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
YST	Dottersacktumor
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Der maligne testikuläre Keimzelltumor

Keimzelltumoren beim Menschen umfassen eine heterogene Gruppe von Tumoren und können an unterschiedlichen Stellen im Körper vorkommen (Looijenga and Oosterhuis, 2002). Neben der vorrangigen Lokalisation in den weiblichen und männlichen Gonaden, Ovarien und Testes, können sie an verschiedenen Stellen entlang der Mittellinie des Körpers auftreten, d.h. im Retroperitoneum, Mediastinum oder der Hypothalamus-Region. Diese Verteilung ist wahrscheinlich auf die ursprüngliche Migrationsroute der primordialen Keimzellen (PGC) vom Dottersack zur Genitalleiste und in die spätere Genitalanlage während der Embryonalentwicklung zurückzuführen (Wylie, 1999). Es wird angenommen, dass Keimzelltumoren von PGC ausgehen. Keimzelltumoren gehören zu den Tumorerkrankungen, die im jungen Alter auftreten.

Der maligne testikuläre Keimzelltumor (TKZT) ist die häufigste Tumorerkrankung des jugendlichen bzw. jungen Mannes. In dieser Zeit ist das Lebenszeitrisiko für einen TKZT hoch mit 1:500 (Schmoll, 1999). Vor Einführung der modernen Cisplatin-haltigen Kombinationschemotherapie war der TKZT zugleich auch die häufigste Krebstodesursache des Mannes in dieser Altersgruppe (Schmoll, 1999). Die Inzidenz beträgt zur Zeit 7-8/100000/ Jahr und variiert geographisch sowie zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Während die Inzidenz bei der schwarzen Bevölkerung Afrikas und der USA ebenso wie bei der asiatischen Bevölkerung gering ist, so ist sie in Nordeuropa und in der weißen Bevölkerung der USA besonders hoch (Schmoll, 1999). In den letzten Jahrzehnten hat die Inzidenz von TKZT in der westlichen Welt ständig zugenommen (Bergstrom et al., 1996; Zheng et al., 1996). Alle 20 Jahre verdoppelt sich die jährliche Neuerkrankungsrate in den betroffenen Ländern. Der maligne TKZT stellt damit den Tumor mit der am schnellsten steigenden Inzidenz dar (Schmoll, 1999). Die genauen Ursachen zur Entwicklung eines TKZT sind nicht geklärt, jedoch konnten verschiedene Risikofaktoren identifiziert werden. Besondere Risikogruppen sind junge Männer mit der Vorgeschichte einer Dysgenese im Bereich der Leisten und der Testes, Atrophie eines oder beider Testes, Kryptorchismus, Klinefelter's Syndrom und eine familiäre Vorbelastung (Group, 1994; Schmoll, 1999). Letzteres deutet auf eine genetische Prädisposition hin, jedoch konnten bisher keine direkten Assoziationen identifiziert werden (Consortium, 1998). Auffällig erscheint die höhere

Inzidenz für Keimzelltumoren bei Angehörigen der besser ausgebildeten Schicht, bei Bewohnern auf dem Lande im Vergleich zur Stadtbevölkerung sowie bei Arbeitern in der Metall- und Ölindustrie (Schmoll, 1999). Ein sehr relevanter Faktor ist offensichtlich die Atrophie der Testes, bedingt durch chemische Agenzien, möglicherweise auch durch Viren oder Traumen. Epidemiologische Daten zeigen eine sehr enge Korrelation zwischen dem Anstieg der TKZT und der Zunahme einer reduzierten Spermatogenese bzw. Infertilität in der männlichen Bevölkerung (Schmoll, 1999).

Histologische und zytogenetische Analysen von TKZT haben in den letzten Jahren wichtige Daten zum Mechanismus der Genese dieser Tumoren geliefert. Es ist generell akzeptiert, dass alle TKZT von einer gemeinsamen Präkursorläsion ausgehen, dem Carcinoma in situ (CIS), auch bezeichnet als „intratubuläre Keimzellneoplasie unklassifiziert“ (ITGCNU) oder „testikuläre intratubuläre Neoplasie“ (TIN) (Honecker et al., 2004; Skakkebaek et al., 1987; Ulbright, 1993). Im Falle der selten vorkommenden primär extragonadalen Keimzelltumoren liegen diesbezüglich keine gesicherten Erkenntnisse vor. Die sogenannten CIS-Zellen liegen innerhalb der Tubuli seminiferi an der Basalmembran neben normal erscheinenden Sertoli-Zellen. Man geht davon aus, dass CIS die prä-maligne Variante von embryonalen Keimzellen repräsentiert, wahrscheinlich der PGC oder Gonozyten. Diese Annahme wird durch die Identifikation gemeinsamer morphologischer und immunhistologischer Charakteristika beider Zelltypen bekräftigt. CIS-Zellen exprimieren z.B. den Stammzellfaktor c-Kit sowie den embryonalen Transkriptionsfaktor Oct-3/4 und zeigen „loss of genomic imprinting“ (Looijenga et al., 2003a; Rajpert-De Meyts and Skakkebaek, 1994; van Gurp et al., 1994). Oct-3/4 und c-Kit eignen sich zum Screening von Tubuli seminiferi auf CIS-Zellen, da beide Faktoren in gesunden Tubuli während der normalen Spermatogenese nicht vorkommen. CIS-Zellen können bei den meisten bereits invasiven TKZT im benachbarten Parenchym identifiziert werden (Oosterhuis et al., 2003). Sie beinhalten bereits typische Chromosomenaberrationen, welche auch in den invasiven Tumoren vorliegen (Looijenga et al., 2000). Neueste Untersuchungen zeigen, dass der Zugewinn des kurzen Arms von Chromosom 12 (12p) mit der malignen Progression der prä-invasiven CIS-Zelle zum invasiven Tumor assoziiert ist (Ottesen et al., 2003; Rosenberg et al., 2000; Summersgill et al., 2001). Die Überpräsentierung von 12p, meistens in Form von einem oder mehreren Isochromosomen (i (12p)) ist eine konsistente und die typischste chromosomale Anomalie in TKZT einschließlich der extragonadalen Tumoren (Looijenga et al., 2003b). Diese chromosomale Veränderung wurde in CIS-Zellen kaum beobachtet. CIS-Zellen mit

zusätzlichem 12p konnten lediglich in Assoziation mit bereits invasiven Tumoren identifiziert werden, welches die Vorstellung bekräftigt, dass der Zugewinn von 12p ein späteres Ereignis im Zuge der malignen Transformation darstellt und für den Beginn des invasiven Wachstums verantwortlich ist (Ottesen et al., 2003).

TKZT werden unter histologischen und klinischen Gesichtspunkten in Seminome und Nichtseminome unterteilt (Bosl and Motzer, 1997; Chaganti and Houldsworth, 2000; Honecker et al., 2004; Ulbright, 1993). Seminome bestehen aus Zellen, die morphologisch den CIS-Zellen und PGC ähnlich sind. Sie zeigen eine Hypersensitivität gegenüber Strahlen- und Chemotherapie. Nichtseminome können mehrere verschiedene histologische Elemente enthalten, wie Embryonales Karzinom (EC), Teratom (TE), Dottersacktumor (YST) und Chorionkarzinom (CC). Als Gruppe betrachtet zeigen die Nichtseminome eine hohe Sensitivität gegenüber Chemotherapie, sind jedoch wenig sensitiv gegenüber Strahlentherapie. Die Entwicklung der Nichtseminome zeigt Ähnlichkeiten mit den Vorgängen, die während der normalen Embryogenese ablaufen. Die EC-Zellen des nichtseminomatösen TKZT besitzen die Eigenschaften von pluripotenten Stammzellen und können sich zu somatischen Gewebetypen aller drei Keimblätter (TE) sowie extraembryonalen Derivaten (YST, CC) differenzieren (Andrews, 1998; Pera et al., 1989). Reife Teratome besitzen benignen Charakter, können jedoch erneut maligne transformieren und einen sekundären Tumor anderer Entität hervorbringen. Eine Besonderheit stellt das Polyembryom dar, in dem EC- und YST- Komponenten sogenannte „embryoid bodies“ formen, welche einem etwa 10 Tage alten Embryo ähnlich sind (Mostofi and Sesterhenn, 1985; Ulbright, 1993). Auf Grund der Stammzeleigenschaften von EC-Zellen treten nichtseminomatöse TKZT meistens als Mischtumoren auf, bestehend aus undifferenzierten und differenzierten Anteilen.

Etwa 50% der TKZT sind Seminome, die Nichtseminome umfassen 40%. Die restlichen 10% sind sogenannte kombinierte Keimzelltumoren, die sowohl Seminom- als auch Nichtseminom-Komponenten enthalten. Eine schematische Darstellung zur Histogenese von TKZT ist in Abbildung 1-1 gegeben.

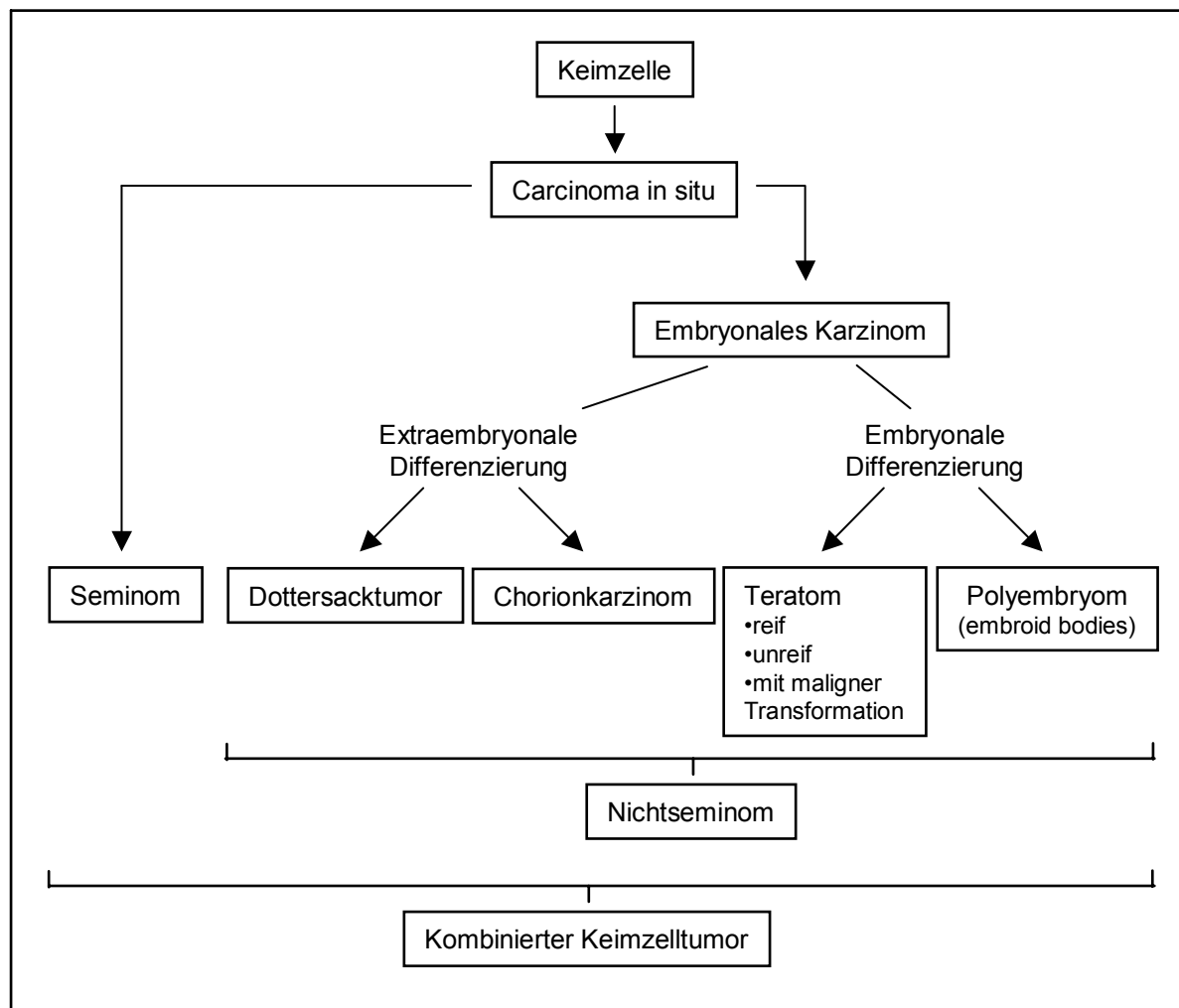


Abb. 1-1: Entwicklung verschiedener Typen von Keimzelltumoren.

1.2 Keimzelltumoren und Embryogenese – die Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4

Auf Grund ähnlich ablaufender Differenzierungsvorgänge in nichtseminomatösen TKZT und in der normalen Embryogenese sind diese Tumoren nicht nur unter tumorbiologischen, sondern auch unter stammzellbiologischen und entwicklungsbiologischen Aspekten von Interesse. Die Embryogenese in Säugetieren stellt einen komplexen Prozess dar. Embryonale und extraembryonale Differenzierungsprogramme im sich entwickelnden Embryo müssen exakt ablaufen und eine koordinierte zelluläre Proliferation und Determination garantieren. TKZT bieten speziell im Hinblick auf die menschliche Embryogenese eine Möglichkeit, um

embryonale *versus* extraembryonale Pathways der Differenzierung sowie die Entwicklung somatischer Linien zu untersuchen. Das Auftreten von „embryoid bodies“, zusammen mit spezifischen Genexpressionsmustern und einer beobachteten Inaktivierung von X-Chromosomen verdeutlichen die Gemeinsamkeiten im Entwicklungsmuster von Nichtseminomen und Embryos (Andrews et al., 1996; Looijenga et al., 1997). Mit den von nichtseminomatösen TKZT abgeleiteten und *in vitro* etablierten EC-Zelllinien steht ein zelluläres Forschungsobjekt zur Verfügung, um molekulare Ereignisse einer frühen Embryogenese zu studieren, sowie Untersuchungen zur Biologie des Keimzelltumors durchzuführen (Andrews, 1998; Roach et al., 1993). EC-Zelllinien können spontan oder durch eine Behandlung mit Morphogenen differenzieren. Einige EC-Zelllinien zeigen eine Differenzierung entlang somatischer und extraembryonal endodermaler Linien, wodurch diese den Zellen der inneren Zellmasse (ICM) der Blastozyste entsprechen (Andrews et al., 1990; Roach et al., 1994). Andere EC-Zelllinien besitzen zusätzlich die Fähigkeit zur Differenzierung in trophoblastische Zellen und entsprechen daher einem noch früheren Stadium, d.h. vor Anlegung des Trophoektoderms (Damjanov et al., 1993; Suzuki et al., 1999). Die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse einer *cDNA-microarray*-Analyse bekräftigten die bestehende Hypothese, dass EC-Zellen transformierten Äquivalenten der Zellen der ICM oder des primitiven Ektoderms entsprechen, und Seminomzellen transformierten Äquivalenten der PGC (Sperger et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass die Expressionsmuster von EC-Zellen und embryonalen Stammzellen (ES) vorrangig nur in der Überexpression von Genen des Chromosoms 12 in EC-Zellen differieren. Der Zugewinn von Material des Chromosoms 12p ist mit der Progression der prä-malignen Läsion (CIS) zum invasiven Keimzelltumor assoziiert (siehe Kapitel 1.1). Der entscheidende Unterschied zwischen einem malignen Teratokarzinom (EC+TE) und einem benignen Teratom ist eine persistierende Population von undifferenzierten EC-Zellen im Teratokarzinom (Sperger et al., 2003). Humane ES-Zellen, die in immunsupprimierte Mäuse injiziert werden bilden Teratome, in denen jedoch keine undifferenzierten ES-Zellen persistieren (Sperger et al., 2003). Das lässt den Schluss zu, dass EC-Zellen im nichtseminomatösen TKZT nicht nur für die Ausbildung verschiedener Gewebetypen verantwortlich sind, sondern auch das maligne Tumorwachstum aufrecht erhalten.

Eine interessante Gemeinsamkeit in der Entwicklung von TKZT und der Embryogenese besteht hinsichtlich der Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4. Oct-3/4 gehört zu der Gruppe der Oktamer-bindenden POU-Transkriptionsfaktoren. Umfangreiche

Studien am Mausmodell haben gezeigt, dass Oct-3/4 in die Regulation der zellulären Pluripotenz involviert ist (Pesce et al., 1998; Pesce and Scholer, 2001). Während der Embryogenese wird Oct-3/4 in den Zellen der Morula stark exprimiert. Nach der Kavitation beschränkt sich die Oct-3/4-Expression auf die Zellen der ICM der Blastozyste und fehlt in den trophoektodermalen Zellen. Im Zuge der Gastrulation wird die Oct-3/4-Expression in den somatischen Zellen vollständig herabreguliert und bleibt ausschließlich in den primordialen PGC erhalten. Nach der Migration der PGC vom Dottersack in die Genitalleiste und spätere Genitalanlage wird die Oct-3/4-Expression während der Differenzierung dieser Zellen schließlich herabreguliert. Es wird angenommen, dass Oct-3/4 einen wichtigen Regulator im sogenannten „totipotent cycle“ darstellt, und an der Determination und Separation von „germ“ und „soma“ während der Gastrulation beteiligt ist (Pesce et al., 1998). Auf Grund der Erhaltung der Oct-3/4-Expression in den PGC wird vermutet, dass Oct-3/4 ein somatisches „commitment“ des „germ“ im sich entwickelnden „soma“ verhindert. Das gezielte Ausblocken von Oct-3/4 hat eine frühe Letalität des Embryos zur Folge, da im Stadium der Blastozyste keine ICM angelegt wird (Nichols et al., 1998). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine bestimmte quantitative Expression von Oct-3/4 für die Aufrechterhaltung der zellulären Pluripotenz und der Fähigkeit zur Selbsterneuerung notwendig ist (Niwa et al., 2000). Neueste Untersuchungen lassen schließen, dass Oct-3/4 die gleiche Funktion in der menschlichen Embryogenese besitzt (Hay et al., 2004; Rajpert-De Meyts et al., 2004).

Nach derzeitigem Wissensstand wird Oct-3/4 im adulten Organismus nicht exprimiert. Eine Ausnahme bilden Keimzelltumoren, welche die einzigen pluripotenten Tumoren darstellen und als einzige Tumorentität Oct-3/4 exprimieren (Looijenga et al., 2003a). Das Expressionsmuster von Oct-3/4 im TKZT entspricht dem während der normalen Embryogenese. Oct-3/4 wird in CIS- und Seminomzellen (Äquivalente zu embryonalen Keimzellen) sowie in EC-Zellen (Äquivalente zur ICM) exprimiert und fehlt in den somatisch (TE) und extraembryonal (YST, CC) differenzierten Komponenten der nichtseminomatösen TKZT. Die Expression von Oct-3/4 in CIS-Zellen spricht für die vermutete embryonale Initiation der Pathogenese von TKZT (Looijenga et al., 2003a; Rajpert-De Meyts et al., 2004). Möglicherweise ist Oct-3/4 selbst als ein entscheidender Faktor in die Pathogenese von Keimzelltumoren involviert (Gidekel et al., 2003).

1.3 Die Cisplatin-haltige Chemotherapie von metastasierten TKZT – das Problem der Chemotherapie-Resistenz

Im Falle eines diagnostizierten malignen Tumors ist für die Therapieentscheidung und für die Prognose u.a. das Ausmaß der Erkrankung ausschlaggebend. Beschränkt sich der maligne Tumor auf die Ursprungslokalisation, kann durch Chirurgie und Strahlentherapie eine kurative Behandlung mit guten Aussichten auf eine Heilung durchgeführt werden. In einigen Fällen wird durch eine adjuvante Chemotherapie das Risiko der Entstehung eines Rezidivtumors verringert. Liegt bereits eine fortgeschrittene, metastasierte Tumorerkrankung vor, sind die Chancen für eine Heilung gering. In diesem Stadium ist die Therapie der Wahl die systemische Chemotherapie. Durch die moderne Chemotherapie sind metastasierte Tumorerkrankungen behandelbar geworden und es kann eine Verlängerung des Überlebens erreicht werden, in einigen Fällen sehr deutlich. Jedoch verbleiben die Prognosen für ein Langzeitüberleben im Falle metastasierter Tumorerkrankungen insgesamt schlecht. Oftmals wird zunächst ein Ansprechen auf die Chemotherapie beobachtet und es können teilweise vollständige Remissionen erzielt werden. Jedoch kommt es in den meisten Fällen zum Rezidivfall, bei dem die Tumoren ein schlechteres Ansprechen bzw. eine Resistenz gegenüber der Chemotherapie zeigen. Die meisten Patienten mit einem bereits metastasierten Tumor bei Erstdiagnose erliegen schließlich ihrer Erkrankung. In Tabelle 1-1 sind häufige Tumorarten und die entsprechenden 5-Jahresüberlebensraten aufgelistet.

Tab. 1-1: Gesamtüberleben nach 5 Jahren bei verschiedenen metastasierten Tumorerkrankungen (aus: (Masters and Koberle, 2003))

Metastasierte Tumorerkrankung (primäre Lokalisation)	5-Jahresüberlebensrate
Pankreas	1,6%
Lunge	1,7%
Blase	5,9%
Darm	6,9%
Zervix	8,6%
Nieren	9,2%
Brust	19,8%
Ovarien	23,3%
Endometrium	26,1%
Prostata	29,8%

Eine der wenigen Ausnahmen stellen die TKZT dar. Patienten mit einem TKZT haben die beste Prognose unter den fortgeschrittenen malignen Erkrankungen des Erwachsenen. Bei minimaler Metastasierung mit guten Prognosekriterien (betrifft 60%) beträgt die 5-Jahresüberlebensrate nach Chemotherapie 91%, bei intermediärer Prognose 79% (betrifft 26%) und bei massiv fortgeschrittener Tumorerkrankung mit schlechten Prognosekriterien 48% (betrifft 14%, alles Nichtseminome) (siehe IGCCCG-Klassifikation, (IGCCCG, 1997)). Patienten mit Seminomen gehören entweder der Kategorie mit guter oder mit intermediärer Prognose an und haben immer eine Überlebenschance von 80-90% trotz weit fortgeschrittener Stadien.

Die außerordentlich gute Therapierbarkeit von metastasierten TKZT ist letztendlich das Ergebnis jahrelanger klinischer und präklinischer Forschung. Der entscheidende Durchbruch kam jedoch Mitte der 1970er mit Einführung der Substanz Cisplatin in das Therapieregime. Cisplatin (Cis-Diamindichlorplatin) stellte die erste Schwermetallverbindung dar, welche als chemotherapeutische Substanz evaluiert wurde. Eine derartige Anwendung der Substanz resultierte ursprünglich aus der zufälligen Entdeckung, dass es die Zellteilung bei *Escherichia coli* hemmt (Rosenberg et al., 1965; Rosenberg et al., 1969). Vor Einführung der Cisplatin-haltigen Kombinationschemotherapie bestand die Standardchemotherapie beim metastasierten TKZT aus der Behandlung mit der Substanz Dactinomycin, entweder als Einzelsubstanz oder in Kombination mit den Substanzen Methotrexat und Chlorambucil. Es wurde gezeigt, dass diese Tumoren prinzipiell chemo-sensitiv sind. Ein 50%iges Ansprechen inklusive 10-20% vollständige Remissionen wurde erreicht, jedoch war die Überlebensrate nur 5-10% (Li et al., 1960). In einer weiteren Studie zur Chemotherapie von metastasierten TKZT konnte durch die Behandlung mit den Substanzen Vinblastin und Bleomycin ein Langzeitüberleben von 25% erreicht werden (Samuels et al., 1976). Beide Substanzen hatten in präklinischen Untersuchungen eine synergistische Wirkung gezeigt. Cisplatin wurde erstmalig in einer Phase I Studie eingesetzt, in der auch Patienten mit metastasierten TKZT behandelt wurden, welche refraktär gegenüber der Standardtherapie waren (Higby et al., 1974). Auf Grund der beobachteten effektiven Wirkung von Cisplatin, wurde die Substanz in das Therapieregime von metastasierten TKZT aufgenommen. In einer anschließenden Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass fortgeschrittene TKZT durch eine Cisplatin-haltige Kombinationschemotherapie potentiell heilbar sind (Einhorn and Donohue, 1977). Die Chemotherapie, bestehend aus Cisplatin, Vinblastin und Bleomycin resultierte in einem 100%igen Ansprechen mit über 70% vollständigen Remissionen. Durch das chirurgische

Entfernen von Residualtumoren, in einigen Fällen von partiellen Remissionen, konnte ein längerfristiger, krankheitsfreier Status bei 85% der Patienten erreicht werden. Über 50% der Patienten wurden schließlich geheilt (Einhorn, 2002). In den darauffolgenden Jahren wurde die Chemotherapie von TKZT schrittweise weiter optimiert. Die Substanz Vinblastin wurde durch die Substanz Etoposid ersetzt. Etoposid hatte Einzelaktivität in einer klinischen Studie mit refraktären TKZT gezeigt und darüber hinaus konnte in präklinischen Studien eine synergistische Wirkung in Kombination mit Cisplatin beobachtet werden (Fitzharris et al., 1980; Schabel et al., 1979). Die Chemotherapie bestehend aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin resultierte in einer weiteren Steigerung des Langzeitüberlebens und setzte sich schließlich als Standardtherapie beim metastasierten TKZT durch (Williams et al., 1987). Durch die moderne Cisplatin-haltige Chemotherapie in Kombination mit der Chirurgie beim Auftreten von Residuen werden derzeit insgesamt etwa 80% der Patienten mit metastasierten TKZT geheilt. Die Heilungsrate entspricht der höchsten bei einem Malignom im Erwachsenenalter. Der TKZT ist damit der chemotherapieempfindlichste solide Tumor überhaupt.

Trotz des Erfolgs kommt es in etwa 20% der Fälle zur Entwicklung einer Chemotherapie-Resistenz bzw. liegt diese in seltenen Fällen bereits vor. Patienten mit refraktären Tumoren gegenüber der auf Cisplatin basierenden Chemotherapie haben eine sehr schlechte Prognose. Zahlreiche neue Substanzen wurden bereits innerhalb von Studien getestet, wobei einige teilweise Aktivität zeigten. Jedoch verbleibt die Prognose weiterhin sehr schlecht und die meisten Patienten mit einem Cisplatin-refraktären TKZT können nicht geheilt werden (Kollmannsberger et al., 2001). Die Ursachen für eine Chemotherapieresistenz beim TKZT sind unklar.

1.4 Die Wirkungsweise von Cisplatin – Determinanten der Sensitivität und Resistenz gegenüber Cisplatin

Durch den TKZT liegt das Modell einer durch Chemotherapie heilbaren fortgeschrittenen Tumorerkrankung vor. Cisplatin spielt in diesem Kontext die entscheidende Rolle. Einen Schwerpunkt derzeitiger Untersuchungen zum TKZT stellt die Cisplatin-Resistenz dar. Cisplatin ist darüber hinaus Bestandteil von Therapieschemata zahlreicher anderer Tumorentitäten, wie Bronchialkarzinome, Ovarialkarzinome, Zervixkarzinome,

Prostatakarzinome, Endometriumkarzinome, Blasenkarzinome, Melanome, Sarkome sowie Karzinome im Kopf-Hals-Bereich (Schmoll, 1999). Anders als bei Keimzelltumoren kommt es jedoch bei diesen Tumoren in den meisten Fällen zur Resistenzentwicklung. Ein Verstehen der tumorbiologischen Mechanismen, die einerseits der generellen hohen Cisplatin-Sensitivität von TKZT zu Grunde liegen und andererseits die Resistenz verursachen, ist von besonderem Interesse. Die Identifizierung entsprechender molekularer Determinanten könnte schließlich zur Überwindung der Resistenz beim TKZT führen und darüber hinaus helfen, die Chemotherapie bei anderen Tumorentitäten effektiver zu gestalten.

Cisplatin ist ein neutrales, quadratisch-planar koordiniertes Molekül (Abb. 1-2). Es wird in physiologischer Kochsalzlösung intravenös appliziert, wobei beide Chlor-Liganden durch die vorliegende extrazelluläre Chloridkonzentration stabilisiert werden. Nach der Diffusion in die Zellen führt die geringere intrazelluläre Chloridkonzentration zur Hydrolyse. Die Chloratome werden durch Wasser- oder Hydroxyl-Gruppen ersetzt. Der Austausch produziert ein bifunktionelles, positiv geladenes Molekül, das mit Nukleophilen in der Zelle reagiert (Abb. 1-2). Der größte Teil der Substanz interagiert mit Proteinen, RNA und kleineren Thiol-assoziierten Molekülen wie Glutathion, Cystein und Methionin (Eastman, 1990). Etwa 1% reagiert mit der genomischen DNA.

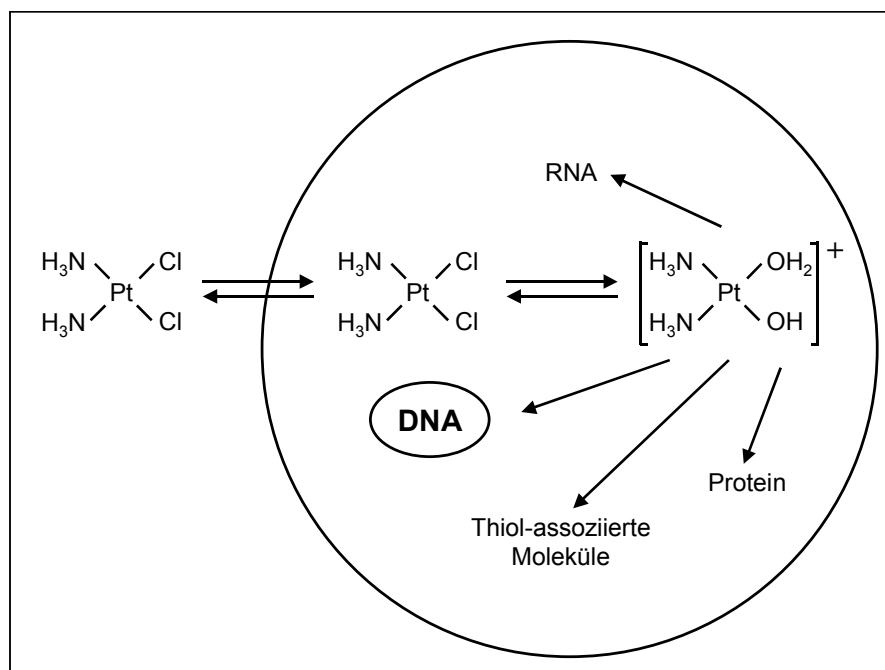


Abb. 1-2: Aktivierung von Cisplatin und Interaktionen mit intrazellulären Molekülen.

Durch zahlreiche Studien bezüglich der Wirkungsweise von Cisplatin wird generell akzeptiert, dass die zytotoxische Wirkung von Cisplatin hauptsächlich auf die Bildung von DNA-Cisplatin-Addukten und somit auf die Schädigung der DNA zurückzuführen ist (Eastman, 1990). Diese Feststellung wurde vor allem durch die Beobachtungen gestützt, dass DNA-Reparatur-defiziente Zellen eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin aufweisen (Fraval et al., 1978; Meyn et al., 1982; Sorenson and Eastman, 1988).

Mehrere verschiedene DNA-Cisplatin-Addukte können gebildet werden, darunter Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Stranges, zwischen beiden Strängen, monofunktionale Addukte und intermolekulare Verbindungen zwischen der DNA und Proteinen oder Thiol-assoziierten Molekülen (Abb. 1-3) (Eastman, 1990). Die Bindung an die DNA erfolgt über die N7-Position der Purin-Basen. Das prozentual am häufigsten gebildete Addukt ist eine Verknüpfung zweier benachbarter Guanin-Basen (etwa 65%). Ein weiteres häufig gebildetes Addukt ist die Verknüpfung zwischen benachbarten Guanin- und Adenin-Basen (etwa 25%). Die restlichen Addukte innerhalb eines DNA-Stranges stellen Verbindungen zweier Guanin-Basen dar, welche durch eine andere Base separiert sind. Weiterhin existieren Verknüpfungen zwischen beiden DNA-Strängen und zwischen der DNA und Proteinen (<1%).

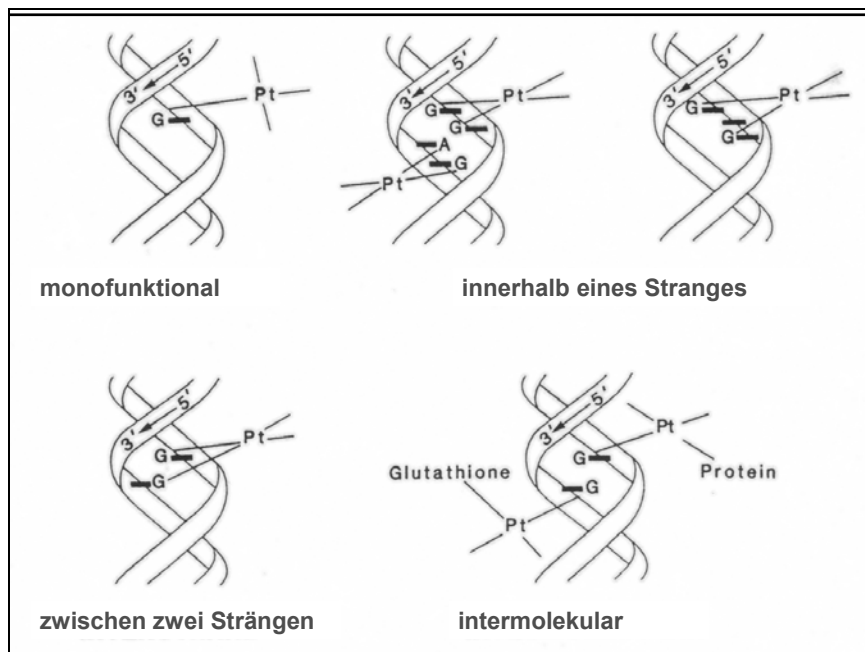


Abb. 1-3: Struktur von verschiedenen DNA-Cisplatin-Addukten (aus (Eastman, 1990), modifiziert).

Zahlreiche Studien sind der Frage nachgegangen, ob die sehr gute Therapierbarkeit von TKZT mit der hohen Chemosensitivität der Tumorzellen gegenüber Cisplatin und anderen DNA-schädigenden Substanzen, wie z.B. Etoposid, zusammenhängt. Durch Untersuchungen an kultivierten Tumorzellen verschiedenster Entitäten wurde gezeigt, dass TKZT-Zellen 2- bis 4-fach sensitiver sind als andere Tumorzelltypen (Fry et al., 1991; Oosterhuis et al., 1984; Pera et al., 1987b; Walker et al., 1987). Diese *in vitro*-Beobachtungen sprechen dafür, dass der positive chemotherapeutische Effekt beim TKZT auf die höhere Sensitivität der TKZT-Zellen per se und kaum auf wirtsspezifische Mechanismen zurückzuführen ist.

Vier generelle Prozesse können die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber chemotherapeutischen Substanzen wie Cisplatin determinieren: 1. der Transport der Substanz durch die Zellmembran (in das und aus dem Zytoplasma), 2. die Aktivierung und Inaktivierung bzw. Detoxifikation der Substanz, 3. die Bindung der Substanz an die DNA und 4. die Reaktion der Zelle auf die induzierte DNA-Schädigung. Gleichzeitig stellen die genannten Prozesse potentielle Grundlagen für Resistenzmechanismen dar. Eine verminderte Akkumulation sowie eine erhöhte Ausfuhr der Substanz können ebenso zu einer Resistenz beitragen, wie eine geringere Aktivierung oder eine verstärkte Detoxifikation der Substanz. Nach einer induzierten Schädigung der DNA kann eine fehlerhafte Erkennung der Läsionen zur Toleranz der Tumorzelle gegenüber der Schädigung führen. Ebenso kann eine verstärkte Reparatur der DNA-Schäden zu einer Resistenz beitragen. Beide Prozesse können die zelluläre Reaktion auf eine induzierte DNA-Schädigung beeinflussen, so dass daraus ein Überleben der Tumorzelle resultieren kann. Diese potentiellen Resistenzmechanismen waren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, die generelle Sensitivität von TKZT-Zellen gegenüber anderen Tumorzellen sowie die Resistenz von TKZT aufzuklären.

Akkumulation, Detoxifikation und DNA-Bindung von Cisplatin

Ein Vergleich der Akkumulation von Cisplatin in TKZT-Zelllinien und primär cisplatin-resistenten Kolonkarzinomzelllinien offenbarte keinen signifikanten Unterschied (Sark et al., 1995). Das zeigt, dass der Vorgang der Akkumulation keinen entscheidenden Parameter für die Cisplatin-Sensitivität darstellt. In verschiedenen experimentellen Zellsystemen konnte gezeigt werden, dass Proteine der *multidrug resistance-associated protein* (MRP) -Familie eine Resistenz gegenüber verschiedenen chemotherapeutischen Substanzen erzeugen können, indem sie die Substanzen aktiv aus der Zelle transportieren (Borst et al., 2000). Untersuchungen an Tumorproben von Therapie-sensitiven und

-refraktären TKZT zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von 5 Exportproteinen (MRP1, MRP2, P-Glykoprotein (PGP), breast cancer resistance protein (BCRP), lung resistance protein (LRP)), welche hinsichtlich einer Cisplatin-Behandlung relevant sein könnten (Mayer et al., 2003). Lediglich in 3 von 24 bzw. in 1 von 23 refraktären Fällen wurde MRP2 bzw. LRP detektiert, während beide Exportproteine in den sensitiven Tumorproben nicht detektiert werden konnten.

Weitere Untersuchungen bezogen sich auf Änderungen in der zellulären Konzentration von Thiol-assoziierten Molekülen, welche Cisplatin binden und inaktivieren können. Im Mittelpunkt derartiger Untersuchungen standen das Schwermetall-bindende Protein Metallothionein als auch Glutathion und das assoziierte Enzym Glutathion-S-Transferase. Verschiedene Studien, in denen TKZT-Zelllinien, Kolonkarzinomzelllinien und Blasenkarzinomzelllinien diesbezüglich untersucht wurden, kamen jedoch zu kontroversen Resultaten (Koropatnick et al., 1995; Masters et al., 1996; Meijer et al., 2000; Sark et al., 1995). Eine Studie, die sowohl Zelllinien als auch Tumorproben von TKZT und Kolonkarzinomen analysierte, konnte eine inverse Korrelation zwischen der zellulären Gesamtmenge an Thiol-Gruppen und der Cisplatin-Sensitivität zeigen (Meijer et al., 2000). Darüber hinaus zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Expression von Metallothionein in Tumorproben von Therapie-sensitiven und -refraktären TKZT (Meijer et al., 2000). In einer weiteren Studie an Tumorproben von Therapie-sensitiven und -refraktären TKZT konnten keine signifikanten Differenzen hinsichtlich der Expression von Metallothionein und Glutathion-S-Transferase beobachtet werden (Mayer et al., 2003). Auf Grund dieser Daten kann weder die generelle hohe Cisplatin-Sensitivität von TKZT im Vergleich zu anderen Tumortypen, noch eine allgemeine Grundlage für die Resistenz beim TKZT durch Thiol-assoziierte Detoxifikationsmechanismen erklärt werden.

Sowohl die Prozesse der Akkumulation als auch der Detoxifikation beeinflussen letztendlich, wie viel Cisplatin an die DNA gebunden werden kann. Untersuchungen zur DNA-Platinierung in verschiedenen Tumorzellsystemen mit unterschiedlicher Cisplatin-Sensitivität zeigten jedoch keine signifikanten Differenzen zwischen TKZT-Zelllinien untereinander und im Vergleich zu anderen Tumorzelllinien (Burger et al., 1997; Koberle et al., 1997; Pera et al., 1987b; Sark et al., 1995). Diese Daten korrelieren mit dem Fehlen von Assoziationen zwischen Tumorzell-Sensitivität und der Akkumulation und Detoxifikation von Cisplatin und zeigen, dass die Ursachen für die generelle hohe Sensitivität von TKZT-Zellen und

möglicherweise auch für die Resistenz in den folgenden Prozessen nach der Etablierung der DNA-Schädigung verankert sind.

Direkt aktivierte Mechanismen in Reaktion auf eine Cisplatin-induzierte DNA-Schädigung

Eine unmittelbar gekoppelte Reaktion der Zelle auf eine DNA-Schädigung ist die Reparatur der Läsionen. Mehrere *in vitro*-Studien kamen diesbezüglich zu übereinstimmenden Resultaten und zeigten, dass TKZT-Zellen im Vergleich zu anderen Tumorzellen eine geringere Kapazität besitzen, DNA-Cisplatin-Addukte zu reparieren (Bedford et al., 1988; Hill et al., 1994; Koberle et al., 1996; Koberle et al., 1997; Koberle et al., 1999; Welsh et al., 2004). In Bezug auf eine Cisplatin-induzierte DNA-Schädigung stellt der sogenannte *Nucleotide excision repair pathway* (NER) das wichtigste Reparatursystem der Zelle dar (Reed, 1998). Aktuelle Daten zeigen, dass die defiziente Reparatur der DNA-Cisplatin-Addukte in TKZT-Zellen mit reduzierten Mengen bestimmter Proteine des NER assoziiert ist (Welsh et al., 2004). In Untersuchungen zur Cisplatin-Resistenz konnte keine erhöhte Reparatur der DNA-Cisplatin-Addukte in TKZT-Zelllinien mit erworbener Resistenz beobachtet werden (Koberle et al., 1996). Auf Grund der vorliegenden Studien wird derzeit davon ausgegangen, dass die defiziente Reparatur von DNA-Cisplatin-Addukten in TKZT-Zellen für die generelle hohe Sensitivität dieser Tumorzellen einen wichtigen Parameter darstellt. Die Ursachen für eine Cisplatin-Resistenz beim TKZT können jedoch nicht durch eine veränderte Reparatur erklärt werden.

Der *Mismatch repair pathway* (MMR) ist ein weiteres zelluläres System, das in Reaktion auf eine Cisplatin-induzierte DNA-Schädigung aktiv werden kann. An verschiedenen experimentellen Tumormodellen wurde gezeigt, dass Proteine des MMR spezifisch DNA-Cisplatin-Addukte binden und ein Verlust oder Defekt von MMR-Proteinen eine geringe Cisplatin-Resistenz und eine erhöhte Mutationsrate im Genom zur Folge haben (Aebi et al., 1996; Fink et al., 1996; Fink et al., 1998; Lage and Dietel, 1999). Eine erhöhte Mutationsrate könnte daraufhin zur Entstehung einer sekundären, höheren Cisplatin-Resistenz führen und ein aggressiveres Wachstum des Tumors und der abgeleiteten Metastasen verursachen. Defekte im MMR können zu Mikrosatelliten-DNA-Instabilitäten (MSI) führen. Deshalb kann durch MSI-Analysen auf die Kapazität des MMR geschlossen werden. Untersuchungen beim TKZT zeigten kaum MSI (Devouassoux-Shisheboran et al., 2001; Lothe et al., 1995; Mayer et al., 2002). In einer Studie, welche speziell Therapie-refraktäre TKZT selektiert hatte, konnte in 5 von 11 Fällen (45%) MSI beobachtet werden (Mayer et al., 2002). Bei 3 der 5

Proben korrelierte MSI mit einer geringeren immunhistochemischen Detektion der wichtigen MMR-Proteine MLH1 und MSH2. Es wurde daraus geschlossen, dass MSI bzw. Defekte im MMR für die Entwicklung einer Cisplatin-Resistenz beim TKZT in einigen Fällen eine Rolle spielen könnten.

Aktivierung komplexer Prozesse in Reaktion auf eine DNA-Schädigung, Schlüsselproteine

Die intrazellulären Vorgänge nach einer DNA-Schädigung sind komplex und in Abhängigkeit von der Art der Schädigung können verschiedene Pathways aktiviert werden (Bernstein et al., 2002; Zhou and Elledge, 2000). Zahlreiche Proteine in der Zelle realisieren Prozesse wie Erkennung, Weiterleitung sowie Evaluierung der Schäden und regulieren die verschiedenen Reaktionen der Zelle auf die Schädigung wie Zellzyklusarrest und Reparatur oder die Induktion des Zelltodes durch den Prozess der Apoptose. Apoptose ist der programmierte Zelltod, durch den die Zelle in einem aktiven Prozess abstirbt (siehe Kapitel 1.5). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass chemotherapeutische Substanzen wie Cisplatin in der Zelle Apoptose induzieren (Eastman, 1990). Man geht davon aus, dass auch unter *in vivo*-Bedingungen die Induktion von Apoptose in Tumorzellen den entscheidenden Faktor darstellt, durch den chemotherapeutische Substanzen ihre zytoreduktive, anti-tumorale Wirkung erzielen. Zahlreiche Beobachtungen sprechen für eine Assoziation zwischen der zellulären Empfindlichkeit Apoptose zu induzieren und dem Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie (Fisher, 1994; Kerr et al., 1994).

Verschiedene Zelltypen können hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber der Apoptose-Induktion variieren und besitzen daher eine Zelltyp-spezifische Aktivierungsschwelle zur Induktion des apoptotischen Programms (Fisher, 1994). TKZT-Zellen zeigen eine relativ hohe Empfindlichkeit zur Apoptose-Induktion in Reaktion auf verschiedene toxische Stimuli (Huddart et al., 1995). Demnach besitzen TKZT-Zellen eine allgemein niedrige Aktivierungsschwelle zur Induktion des apoptotischen Programms. Eine besonders hohe Empfindlichkeit zur Apoptose-Induktion zeigen TKZT-Zellen nach der Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen, insbesondere Cisplatin, welches mit der hohen Chemotherapie-Sensitivität der Tumore korreliert. Das kann zum Teil auf die defiziente Reparatur der DNA-Cisplatin-Addukte in TKZT-Zellen zurückgeführt werden. Jedoch stellt die Bildung und Beseitigung dieser primären Läsionen lediglich den ersten Schritt des sogenannten *Commitment* der Zelle in das apoptotische Programm dar. Die daran gekoppelten Prozesse der Weiterleitung und Schaden-Evaluierung scheinen für das Schicksal der

geschädigten Zelle von großer Bedeutung zu sein. Diesbezüglich unterscheiden sich verschiedene Zelltypen, welches auf eine unterschiedliche Ausstattung relevanter Proteine zurückgeführt werden kann.

Die Prozesse der Zellzyklusarretierung und Reparatur sowie der Apoptose sind in der Zelle miteinander verknüpft. Dabei können bestimmte Proteine eine duale Rolle spielen und je nach Ausmaß der Schädigung sowohl an Reparaturprozessen beteiligt sein, als auch zur Induktion der Apoptose beitragen (Bernstein et al., 2002). Proteine des MMR können einen Link zwischen der primären DNA-Schädigung und dem apoptotischen System bilden (Lage and Dietel, 1999). MMR-Proteine binden DNA-Cisplatin-Addukte und können pro-apoptotische Signale geben. Ein Defekt oder Verlust von MMR-Proteinen kann eine Resistenz zur Folge haben (siehe oben). Dieser Effekt wird durch eine fehlende Induktion von Apoptose bei gleichzeitiger Akkumulation von weiteren Mutationen erklärt.

Ein weiteres Schlüsselprotein mit einer dualen Funktion ist das Tumorsuppressorprotein p53, welches im NER involviert ist und Apoptose induzieren kann. Eine Inaktivierung von p53 in Tumoren durch Mutationen oder durch Interaktionen mit zellulären oder viralen Proteinen kann mit Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Substanzen assoziiert sein (Harris, 1996). Im Gegensatz zu den meisten anderen Tumorentitäten kommen Mutationen im p53-Gen beim TKZT kaum vor (Heidenreich et al., 1998; Heimdal et al., 1993; Kersemaekers et al., 2002). Das korreliert mit der generellen Chemotherapie-Sensitivität von Keimzelltumoren. Eine Studie konnte in 4 von 28 refraktären TKZT Mutationen im p53-Gen identifizieren (Houldsworth et al., 1998). Jedoch handelte es sich dabei um atypische oder differenzierte histologische Subtypen, d.h. 3 reife Teratome und ein von einem Teratom abgeleiteter, sekundärer Tumor anderen Typs (siehe Kapitel 1.1). Eine andere Studie konnte in 1 aus 17 sensitiven TKZT eine Mutation im p53-Gen identifizieren, jedoch keine innerhalb von 18 refraktären TKZT (Kersemaekers et al., 2002). Die Ursachen der Chemotherapie-Resistenz können daher nicht auf Mutationen im p53-Gen zurückgeführt werden. Andererseits deuten Untersuchungen an TKZT-Zelllinien an, dass die Induktion der Apoptose nach einer Cisplatin-Behandlung in TKZT-Zellen unabhängig von p53 ist (Burger et al., 1999). Für eine Klärung der genauen Rolle von p53 beim TKZT in Bezug auf die Chemotherapie-Sensitivität bedarf es deshalb weiterer Untersuchungen.

p53 kann durch die Transaktivierung des Proteins p21 einen Zellzyklusarrest an der Grenze der G1-Phase zur S-Phase induzieren und der Zelle die Reparatur der Schäden erlauben (Vogelstein et al., 2000). Die Inhibierung von Cyclin-abhängigen Kinasen durch p21 führt

dazu, dass das Retinoblastoma-Protein (Rb) nicht phosphoryliert wird und dadurch den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus blockiert. Sowohl Rb als auch p21 werden in TKZT kaum detektiert (Mayer et al., 2003). Im Zelllinienmodell wurde gezeigt, dass eine Etoposid-induzierte Akkumulation von p53 in TKZT-Zellen keinen G1/S-Zellzyklusarrest induziert, im Gegensatz zu Blasenkarzinomzellen (Chresta et al., 1996). Zusammen mit der beobachteten defizienten Reparatur der DNA-Schäden sprechen die Daten dafür, dass in TKZT-Zellen das Verhältnis von Reparatur und Apoptose zu Gunsten der Apoptose-Induktion verschoben ist.

In die Prozesse der Apoptose-Regulation sind die Proteine der Bcl2-Familie involviert. Die intrazelluläre Konstellation von pro-apoptotischen (z.B. Bax, Bak) und anti-apoptotischen (z.B. Bcl2, BclXL) Mitgliedern der Bcl2-Familie kann das Schicksal einer Zelle nach einem apoptotischen Stimulus bestimmen (Adams and Cory, 1998; Green and Reed, 1998). Das pro-apoptotische Protein Bax kann direkt durch p53 aktiviert werden und zur p53-vermittelten Apoptose beitragen (Vogelstein et al., 2000). Eine Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl2 oder ein niedriges Bax/Bcl2 Expressionsverhältnis kann eine Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Substanzen verursachen (Kassim et al., 1999; Narasimhan et al., 1998; Sartorius and Kramer, 2002; Williamson et al., 1998). Aus Untersuchungen an Zelllinien wurde geschlossen, dass die hohe Sensitivität von Keimzelltumoren gegenüber DNA-schädigenden Substanzen neben der Prävalenz von funktionalem p53 auf ein hohes Bax/Bcl2 Expressionsverhältnis zurückgeführt werden kann (Chresta et al., 1996). Eine derartige Konstellation der 3 Proteine konnte in Analysen von TKZT-Proben bestätigt werden (Heidenreich et al., 1998; Heimdal et al., 1993; Kersemaekers et al., 2002; Mayer et al., 2003; Soini and Paakko, 1996). Jedoch zeigte sich keine Korrelation mit dem klinischen Outcome (Mayer et al., 2003). Demnach könnte eine derartige Konstellation möglicherweise zur generellen Sensitivität von Keimzelltumoren beitragen. Die Entstehung einer Resistenz scheint jedoch unabhängig von diesen molekularen Parametern zu sein.

Eine Zusammenfassung der verfügbaren Daten aus den Untersuchungen an Zelllinien und Tumorproben lässt hinsichtlich der generellen hohen Sensitivität von TKZT eine Erklärung zu. Die hohe Sensitivität von TKZT-Zellen scheint die Konsequenz eines vorliegenden Spektrums von mehreren begünstigenden Faktoren auf verschiedenen Ebenen zu sein. Dazu zählen: 1. das Fehlen von Exportproteinen und Detoxifikationsmechanismen, 2. ein sensitives DNA-Schaden-Erkennungssystem, 3. eine geringe Reparaturkapazität verbunden mit dem Fehlen des Reparatur-begünstigenden G1/S-Zellzyklusarrest, 4. eine günstige Konstellation

von Faktoren des apoptotischen Systems, welches eine hohe Bereitschaft zur Apoptose-Induktion zur Folge hat. Eine allgemeingültige Erklärung hinsichtlich der Chemotherapie-Resistenz bei malignen TKZT kann derzeit nicht getroffen werden.

Eine Ausnahme bilden reife Teratome. Im Gegensatz zu den anderen histologischen Subtypen von TKZT besitzen Teratome benignen Charakter und zeigen eine komplette Chemotherapie-Resistenz. Teratome treten sehr selten als reine Tumoren auf, sind jedoch häufig eine Komponente in nichtseminomatösen TKZT (Ulbright, 1993). Nach erfolgter Chemotherapie können Teratome in Residuen persistieren und müssen chirurgisch entfernt werden, da die Gefahr eines wachsenden Teratoms oder einer sekundären malignen Transformation besteht (Logothetis et al., 1982; Oosterhuis et al., 1983; Ulbright et al., 1984). Immunhistochemische Analysen von reifen Teratomen im Vergleich zu den invasiven Komponenten von TKZT offenbaren gegensätzliche Charakteristika (Mayer et al., 2003). Teratome exprimieren die Exportproteine MRP2, PGP, BCRP und LRP sowie die in Detoxifikationsmechanismen involvierte GST. Des Weiteren zeigen Teratome eine Expression von Rb und p21 und besitzen ein niedriges Bax/Bcl2 Expressionsverhältnis. Die Chemotherapie-Resistenz von reifen Teratomen kann deshalb ähnlich wie die generelle Sensitivität von Keimzelltumoren über einen multifaktoriellen Prozess erklärt werden. Aktive Exportproteine und Detoxifikationsmechanismen, eine Reparatur-begünstigende Zellzyklus-Regulation sowie eine anti-apoptotische Konstellation von apoptotischen Mediatoren scheinen der hohen Chemotherapie-Resistenz von reifen Teratomen zu Grunde zu liegen. Zwischen invasiven Komponenten von TKZT und Teratomen konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Zytogenetik festgestellt werden (van Echten et al., 1997). Vielmehr ist der stark veränderte Phänotyp von Teratomen auf globale Veränderungen im Proteinexpressionsmuster zurückzuführen. Dieses wiederum unterliegt den Prozessen der somatischen Differenzierung und dem gleichzeitigen Verlust der embryonalen Eigenschaften. Die damit entstehende Unempfindlichkeit gegenüber chemotherapeutischen Substanzen entspricht derer von normalem, differenziertem Gewebe und kann nicht Tumor-spezifischen Resistenzmechanismen zugeordnet werden. Des Weiteren besitzen Teratome benignen Charakter und liegen deshalb nicht dem malignen Tumorwachstum zu Grunde. Die in etwa 20% der Fälle beobachtete Chemotherapie-Resistenz von malignen TKZT kann daher kaum durch den Teratom-assoziierten Resistenzmechanismus erklärt werden. Jedoch kann vermutet werden, dass an der Etablierung einer Chemotherapie-Resistenz in malignen TKZT auch Differenzierungsprozesse eine Rolle spielen.

1.5 Der programmierte Zelltod Apoptose und die Aktivierung von Caspasen

Apoptose ist ein genetisch kodierter und ubiquitärer Pathway, durch den Zellen befähigt sind, nach einem Todessignal in regulierter Form abzusterben. Dieser Prozess ist durch eine Reihe von morphologischen Charakteristika gekennzeichnet. Dazu gehört das Schrumpfen des Zytoplasmas, Membranausstülpungen, die externe Präsentation von Phosphatidylserin, die Fragmentierung des Zellkerns, die internukleosomale DNA-Fragmentierung, und schließlich die Bildung von Membran-umschlossenen *apoptotic bodies*, welche durch Makrophagen oder andere Zellen phagozytiert werden (Wyllie et al., 1980). Im Gegensatz dazu kommt es beim plötzlichen Zelltod, der Nekrose, zum Anschwellen und Zerplatzen der Zellen, wobei die freigesetzten Zellbestandteile im Gewebe eine Entzündungsreaktion auslösen. Der Prozess der Apoptose ist für verschiedene biologische Systeme von großer Bedeutung, u.a. für den normalen Zell-Turnover, für das Immunsystem, in der Embryogenese, für die Metamorphose und die hormonabhängige Atrophie sowie beim chemisch induzierten Zelltod (Arends and Wyllie, 1991; Cohen et al., 1992; Ellis et al., 1991). Apoptose stellt neben den Prozessen der Proliferation und Differenzierung einen gleichwertig wichtigen Parameter zur Entwicklung und zur Aufrechterhaltung der Homöostase in multizellulären Organismen dar. Eine fehlerhafte Regulierung der Apoptose führt vor allem in höheren Organismen zu katastrophalen Konsequenzen. Beim Menschen ist eine fehlregulierte Apoptose unter anderem in die Pathogenese von Tumoren, Alzheimer, AIDS und Autoimmunerkrankungen involviert (Nicholson, 1996; Thompson, 1995).

Die Beobachtung und Annahme, dass Zelltod einen Bestandteil in der normalen Entwicklung von Lebewesen darstellt, geht bis ins 19. Jahrhundert zurück. Jedoch blieb das Interesse auf diesem Gebiet sehr begrenzt bis zum Ende des 20. Jahrhunderts. Lockshin und Williams prägten 1965 erstmals den Begriff *programmed cell death* (PCD) (Lockshin and Williams, 1965) Sie beschrieben damit eine Beobachtung, dass während der Metamorphose von Amphibien und Insekten einige Zellen bestimmt sind abzusterben und postulierten, dass dieser Prozess durch ein intrinsisches Programm gesteuert wird. Kerr, Wyllie und Currie führten 1972 den Begriff Apoptose ein und beschrieben einen ubiquitär vorkommenden Zelltod, der durch mehrere bestimmte morphologische Charakteristika gekennzeichnet ist (Kerr et al., 1972). Für eine generelle Akzeptanz brauchte es jedoch weitere 20 Jahre. Während der Studien von Horvitz und Sulston an *Caenorhabditis elegans* kam es zu der Entdeckung, dass während der normalen Entwicklung des Wurms konstant 131 von 1090

somatische Zellen absterben. Diese Beobachtung ebnete den Weg für eine genetische Charakterisierung der wichtigen Komponenten der molekularen Maschinerie der Apoptose in *C. elegans*. Die genetischen Analysen des PCD in *C. elegans* führten zur Identifizierung der Gene, welche den zellulären Suizidmechanismus kontrollieren (Ellis and Horvitz, 1986; Hengartner et al., 1992). Die Identifizierung dieser Schlüsselgene in *C. elegans* sowie die Realisierung von existierenden Homologen in Säugetieren (Hengartner and Horvitz, 1994; Yuan et al., 1993) führte schließlich zur allgemeinen Akzeptanz der Apoptose und legte den Grundstein für weitere umfangreiche Untersuchungen.

Die zentralen Komponenten des PCD in *C. elegans* sind die drei Gene *ced-3*, *ced-4* und *ced-9*, wobei das *ced-9* Protein ein Inhibitor, das *ced-4* Protein ein pro-apoptotisches Adaptermolekül und das *ced-3* Protein eine Cysteinprotease darstellt (Hengartner et al., 1992; Yuan and Horvitz, 1992; Yuan et al., 1993). Letztere ist für die Exekution des apoptotischen Programms verantwortlich. Es zeigte sich, dass Homologe der drei *C. elegans* Gene auch in höheren Organismen in die Regulation der Apoptose involviert sind und grundlegende Mechanismen des PCD damit evolutionär konserviert wurden. Jedoch existieren gerade in Säugetieren wesentlich höher entwickelte und komplexere Mechanismen. Homologe von *ced-9* sind in Säugetieren die Mitglieder der Bcl2-Familie (Adams and Cory, 1998). Das Adapterprotein Apaf-1 entspricht dem homologen Gegenstück von *ced-4* (Zou et al., 1997). Als Homologe von *ced-3* existiert in Säugetieren eine Familie von Cysteinproteasen, die Caspasen (Alnemri et al., 1996).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind 11 humane Caspasen identifiziert worden, welche sich durch bestimmte Charakteristika kennzeichnen (siehe (Cohen, 1997; Degterev et al., 2003; Earnshaw et al., 1999). Caspasen werden als inaktive Zymogene synthetisiert und bestehen aus einer Prodomäne gefolgt von einer großen und einer kleinen Untereinheit. Die Aktivierung der Procaspasen erfolgt über Spaltungsreaktionen, wodurch zunächst die kleine von der großen Untereinheit separiert wird und schließlich die Prodomäne von der großen Untereinheit abgespalten wird (Abb.1-4). Die große und die kleine Untereinheit bilden zusammen das aktive Zentrum. An der Aktivierung sind zwei Caspasemoleküle beteiligt. Aktive Caspasen stellen ein Tetramer dar, bestehend aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten.

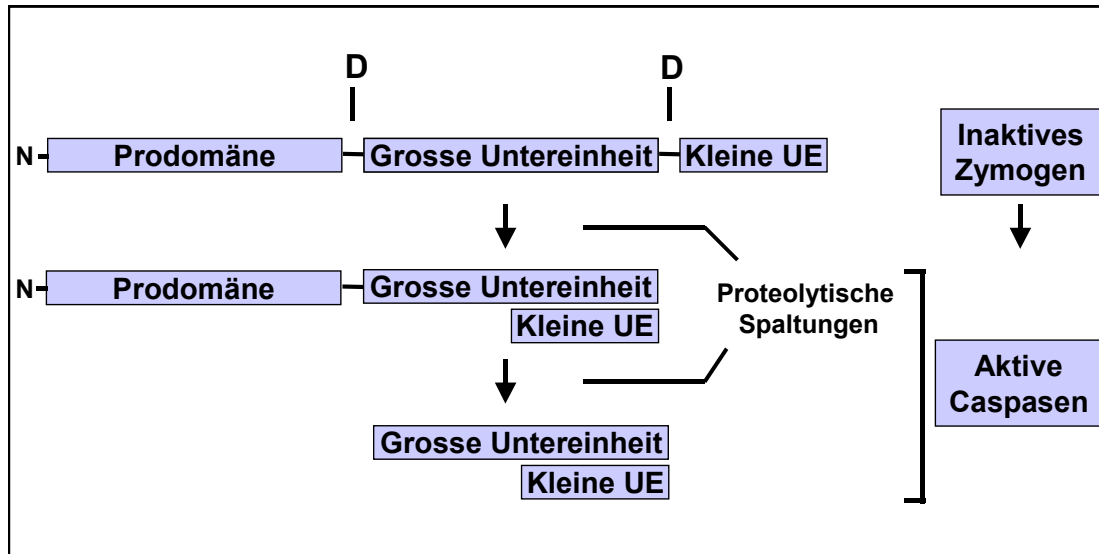


Abb. 1-4: Proteolytische Aktivierung von Caspasen. (D - Asparaginsäure)

Charakteristisch für alle Caspasen ist die Lokalisation von Cystein im aktiven Zentrum innerhalb eines spezifischen Pentapeptid-Motivs QACXG (X steht für R, Q oder G). Die Substratspezifität der Caspasen wird hauptsächlich durch vier Aminosäurereste determiniert, welche N-terminal zur Spaltungsstelle lokalisiert sind. Caspasen hydrolysieren Peptidbindungen am Carboxylterminus von Asparaginsäure. Das Vorhandensein von Aspartat in Position P1 des Substrats ist essentiell und charakteristisch für die Familie der Caspasen im Vergleich zu anderen Proteasen. Die Positionen P2 und P3 sind von geringerer Bedeutung. Für die Position P4 des Substrats existieren bei Caspasen unterschiedliche Aminosäurepräferenzen, wodurch sich die unterschiedlichen Substratspezifitäten der verschiedenen Caspasen ergeben. Sieben der elf Caspasen sind in apoptotische Prozesse involviert (Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10).

Auf Grund der unterschiedlichen Funktionen und in Bezug auf die unterschiedlichen Prodomänen und Substratspezifitäten werden Caspasen in Initiator-Caspasen und Effektor-Caspasen unterteilt. Potentielle Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) besitzen große Prodomänen, wodurch die Basis für eine Interaktion mit Adapterproteinen geschaffen wird. Dabei werden zwei Motive zur Protein-Protein Interaktion unterschieden, die *caspase-activation recruitment domain* CARD (Caspase-2 und -9) und die *death effector domain* DED (Caspase-8 und -10). In Reaktion auf pro-apoptotische Signale können Initiator-Caspasen durch die Interaktion mit Adapterproteinen in einer autokatalytischen Reaktion den

apoptotischen Prozess triggern. Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) besitzen kleine Prodomänen und werden durch Initiator-Caspasen aktiviert. Daraufhin können Effektor-Caspasen wiederum Initiator-Caspasen aktivieren und die proteolytische Kaskade amplifizieren. Durch die Effektor-Caspasen, insbesondere durch Caspase-3, werden im Laufe des apoptotischen Exekutionsprozesses schließlich in der Zelle zahlreiche Schlüsselproteine gespalten, welche für ein Überleben notwendig sind. Davon betroffen sind zum Beispiel zytosolische und nukleoläre Strukturproteine, Proteine des DNA-Metabolismus und Proteine der Signaltransduktion wie Proteinkinasen (Earnshaw et al., 1999). Die biochemischen Veränderungen innerhalb der Zelle während des apoptotischen Prozesses führen schließlich zu den typischen morphologischen Charakteristika der Apoptose.

Auf der Basis derzeitiger Erkenntnisse werden grundsätzlich zwei apoptotische Pathways zur Aktivierung von Caspasen unterschieden, welche verschiedene Todessignale verarbeiten. Diese sind der extrinsische und der intrinsische Pathway (siehe (Boatright and Salvesen, 2003; Budihardjo et al., 1999; Degterev et al., 2003)). Der extrinsische Pathway ist beispielsweise verantwortlich für die Eliminierung von überflüssigen, geschädigten oder gefährlichen Zellen im Körper durch das Immunsystem oder innerhalb des Immunsystems. Die Initiierung erfolgt von extrazellulärer Seite über die sogenannten Todesrezeptoren wie z.B. den Fas/CD-95-Rezeptor oder die Trail-Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind Transmembranproteine und besitzen eine extrazelluläre und intrazelluläre Domäne. Nach der Bindung des entsprechenden Liganden kommt es zur Bildung von Rezeptoraggregaten, wodurch in der Zelle das Molekül FADD (Fas-associated protein with death domain) an die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors rekrutiert wird. Die Bindung erfolgt durch homophile Interaktionen beider Proteine über deren jeweils C-terminal gelegenen DD-Motive (death domain). Anschließend kommt es zur Rekrutierung von Zymogenen der Caspase-8 an die N-terminale Domäne von FADD. Diese Bindung erfolgt durch homophile Interaktionen über die in beiden Proteinen jeweils N-terminal gelegenen DED-Motive. Innerhalb dieses sogenannten DISC (death inducing signaling complex) kommt es zur autokatalytischen Aktivierung der Caspase-8. Hinsichtlich der nächsten Schritte innerhalb des extrinsischen Pathways werden zwei Zelltypen unterschieden. In Typ-1-Zellen werden nach der Rezeptorvermittelten Formierung des DISC genügend Caspase-8-Moleküle und schließlich genügend Effektor-Caspasen aktiviert, so dass der Prozess der Apoptose exekutiert wird. In Typ-2-Zellen ist der extrinsische Pathway abhängig von einem Amplifikationsschritt über das Mitochondrium. Letzteres stellt die Basis des intrinsischen Pathways dar. Im Gegensatz zum

extrinsischen Pathway erfolgt die Initiierung des intrinsischen Pathways durch intrazelluläre Todessignale. Der intrinsische Pathway wird beispielsweise aktiviert in Reaktion auf Stress, Strahlung, mitochondriale Schädigung sowie durch zytotoxische Agenzien wie z.B. chemotherapeutische Substanzen. Nach einer Evaluierung entsprechender intrazellulärer Todessignale kommt es zur selektiven Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und Cytochrom c wird aus dem Intermembranraum ins Zytosol freigesetzt. Cytochrom c bindet das Adapterprotein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1), dessen Konformation dadurch geändert wird. Anschließend kommt es zur Oligomerisierung und zur Rekrutierung von Zymogenen der Caspase-9 an die N-terminalen Domänen von Apaf-1. Die Bindung erfolgt durch homophile Interaktionen über die in beiden Proteinen jeweils N-terminal gelegenen CARD-Motive. Innerhalb dieses Komplexes, welcher als Apoptosom bezeichnet wird, kommt es zur Aktivierung der Caspase-9. Bereits innerhalb des Apoptosoms ist Caspase-9 in der Lage, Effektor-Caspasen zu aktivieren, die den Prozess der Apoptose exekutieren. An der Mitochondrium-assoziierten Regulation des intrinsischen Pathways sind die pro- und anti-apoptischen Mitglieder der Bcl2-Familie beteiligt, welche durch Interaktionen untereinander und mit der Mitochondriummembran die Translokation von Cytochrom c beeinflussen können (Green and Reed, 1998). Der in Typ-2-Zellen des extrinsischen Pathways benötigte Mitochondrium-assoziierte Amplifikationsschritt (siehe oben) erfolgt über das pro-apoptische Bcl2-Familienmitglied Bid. Dieses Protein wird zuvor durch die im DISC aktivierte Caspase-8 gespalten und aktiviert. In der aktivierten Form fördert Bid die Translokation von Cytochrom c ins Zytosol und aktiviert das Apoptosom. Die Überexpression von anti-apoptischen Proteinen der Bcl2-Familie kann eine Freisetzung von Cytochrom c hemmen und dadurch die Aktivierungsschwelle zur Induktion der Apoptose erhöhen. Eine derartige intrazelluläre Konstellation kann mit Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Substanzen assoziiert sein (siehe Kapitel 1.4). Eine Übersicht zu den apoptotischen Pathways der Caspasen-Aktivierung ist in Abbildung 1-5 gegeben.

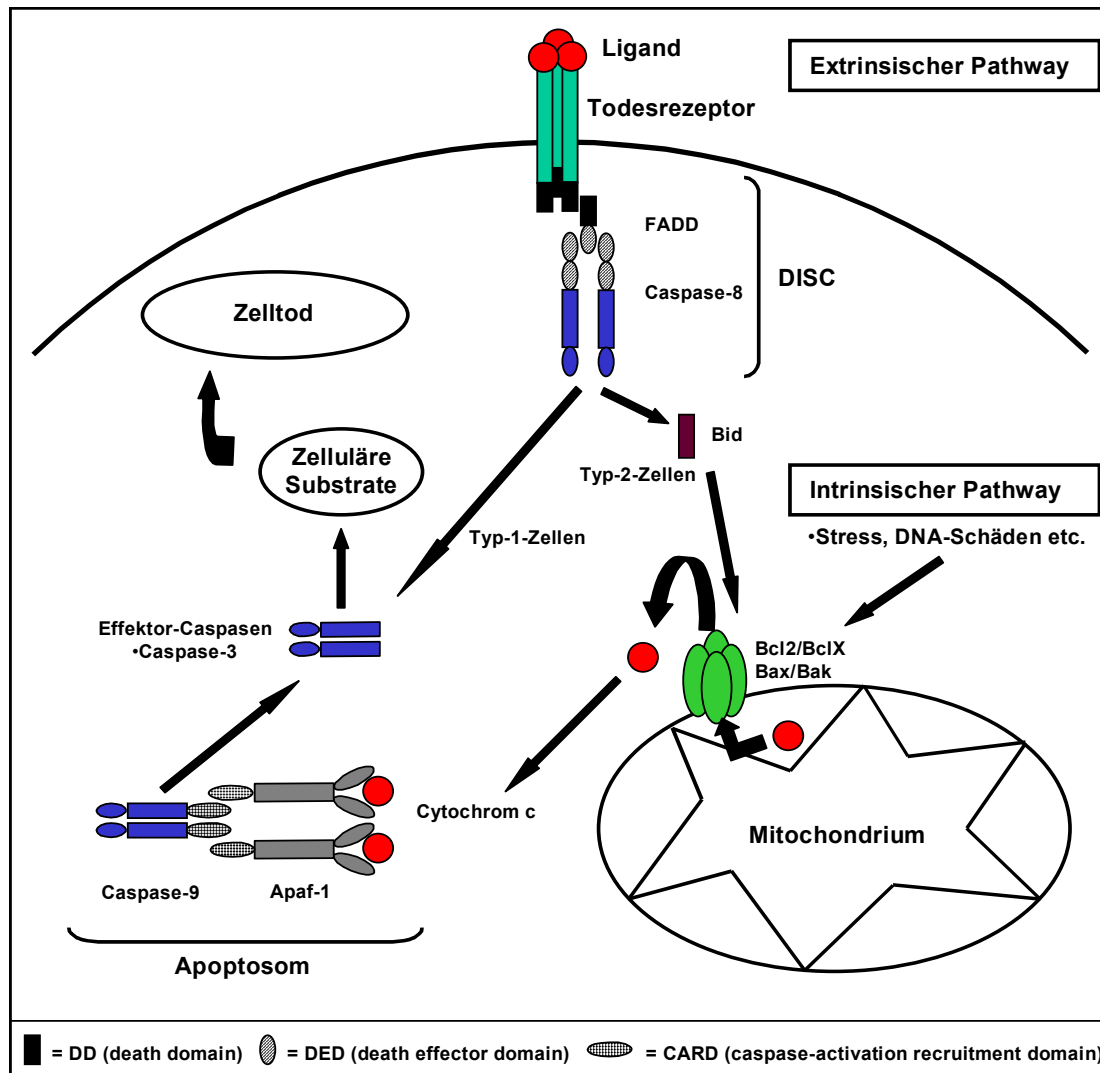


Abb. 1-5: Pathways der Aktivierung von Caspasen.

Die Klassifizierung in extrinsischen und intrinsischen Pathway basiert auf den verschiedenen Startmechanismen. Beide Pathways werden durch differentielle apoptotische Stimuli aktiviert und konvergieren auf dem Level aktivierter Effektor-Caspasen in der Exekutionsphase der Apoptose. Eine derartige Darstellung stellt jedoch eine reduzierte Beschreibung der möglichen apoptotischen Mechanismen dar. Bereits vor der Konvergenz in der Exekutionsphase können verschiedene Elemente beider Pathways ineinander greifen oder parallel ablaufen (Petak and Houghton, 2001). In Typ-2-Zellen des extrinsischen Pathways ist die Aktivierung des intrinsischen Pathways für eine Exekution der Apoptose notwendig. In Bezug auf den Todesrezeptor-induzierten und Caspase-8-vermittelten Trigger kann dieser

Mechanismus dennoch eindeutig dem extrinsischen Pathway zugeordnet werden. Wesentlich komplexere Mechanismen scheinen der durch Stress, Strahlung und chemotherapeutische Substanzen induzierten Apoptose zu Grunde zu liegen. Einige Studien zeigen, dass das Fas/CD-95-System (siehe oben) eine wichtige Rolle in der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose spielen kann (Friesen et al., 1999; Poulaki et al., 2001). Das bedeutet, dass neben der Apoptosom-vermittelten Caspase-9-Aktivierung auch die DISC-vermittelte Caspase-8-Aktivierung in diese Apoptose involviert sein kann. Des Weiteren konnte in einer Studie zur Chemotherapeutika-induzierten Apoptose Caspase-8 als Initiator-Caspase identifiziert werden (Ferreira et al., 2000). Jedoch war die Aktivierung der Caspase-8 unabhängig von einer Formation des DISC. Dagegen zeigte sich eine mitochondriale Abhängigkeit ähnlich zum Caspase-9-Pathway. Zahlreiche weitere aktuelle Studien unterstreichen die Komplexität des apoptotischen Systems und verdeutlichen vor allem, dass apoptotische Mechanismen nicht nur Stimulus-spezifisch sondern auch Zelltyp-spezifisch variieren können. Besonders in Bezug auf die Apoptose-Induktion durch zytotoxische Substanzen ist der entsprechende apoptotische Mechanismus daher im Einzelfall zu untersuchen.

1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Durch die moderne, auf Cisplatin basierende Chemotherapie werden unter den heutigen Bedingungen insgesamt etwa 80% der Patienten mit fortgeschrittenem, metastasierten TKZT geheilt. Trotz des Erfolgs kommt es in etwa 20% der Fälle zur Entwicklung einer Chemotherapie-Resistenz. Patienten mit Cisplatin-refraktären TKZT haben eine sehr schlechte Prognose und die meisten Patienten können nicht geheilt werden, was bei dem meist noch jungen Alter der Patienten schwer akzeptierbar ist. Die Ursachen für eine Chemotherapie-Resistenz beim TKZT sind unklar.

Die vorliegenden sowie weiterführende Untersuchungen dienen der Zielsetzung, auf zellulärer bzw. molekularer Ebene die Ursachen einer Cisplatin-Resistenz beim malignen TKZT aufzuklären. Entsprechend identifizierte Determinanten könnten als Marker oder als Targets für zusätzliche therapeutische Interventionen ausgenutzt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten vergleichende Analysen an nichtseminomatösen TKZT-Zelllinien mit unterschiedlicher Cisplatin-Sensitivität durchgeführt werden. Im Mittelpunkt standen dabei der Mechanismus der Cisplatin-induzierten Apoptose und die Rolle des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4. Für die Untersuchungen standen zunächst drei Zelllinien zur Verfügung, von denen eine Zelllinie in Vorversuchen eine differentielle Cisplatin-Sensitivität gezeigt hatte. Es wurde angestrebt, die Studie auf weitere Zelllinien zu erweitern, um die Aussagekraft des Modells zu verstärken. Weiterhin sollten ausgewählte Analysen an abgeleiteten Nacktmaus-Tumor-Xenograften durchgeführt werden, um die *in vivo*-Relevanz des Zelllinienmodells zu überprüfen.

Arbeitsplan:

- *Charakterisierung der TKZT-Zelllinien hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Cisplatin.* Die Sensitivität gegenüber Cisplatin sollte mittels SRB-Zytotoxizitäts-Assays analysiert werden. Als Voraussetzung zur Durchführung des Assays sollte zunächst für jede Zelllinie eine spezifische Wachstumskinetik erstellt werden.
- *Analyse des Cisplatin-induzierten Zelltodes in TKZT-Zellen.* Der Cisplatin-induzierte Zelltod sollte mittels Methoden zum Nachweis von Apoptose determiniert werden.
- *Analyse der Cisplatin-Wirkung in vivo.* Von ausgewählten TKZT-Zelllinien sollten abgeleitete Tumor-Xenograften in Nacktmäusen etabliert werden. Es war vorgesehen, die

Tumor-Xenografte während der Wirkung einer klinisch relevanten Cisplatin-Therapie auf das Vorkommen von apoptotischen Zellen zu analysieren. Eine entsprechende immunhistochemische Methode zum Nachweis von apoptotischen Zellen im Tumor-Xenograft sollte etabliert werden.

- *Untersuchung des Zelllinienmodells hinsichtlich relevanter Parameter.* Zur weiteren Charakterisierung des Zelllinienmodells sollten relevante Parameter, wie Zellzyklusarretierung, DNA-Platinierung, Expression von p53 sowie von Proteinen der Bcl2-Familie und Proteinen des *Mismatch repair pathways* analysiert werden.
- *Analyse des Mechanismus der Cisplatin-induzierten Apoptose in TKZT-Zellen.* Für eine Aufklärung des Mechanismus der Cisplatin-induzierten Apoptose sollten entsprechende Methoden zur Spaltung, Aktivierung und Inhibierung von Caspasen, zu Protein-Protein Interaktionen von Caspasen mit Adapterproteinen sowie zur subzellulären Fraktionierung etabliert werden.
- *Untersuchung zur Rolle des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4.* Zusätzlich zur Expressionsanalyse mittels Western-Blotting sollte für eine Analyse auf Einzelzell-Ebene die Immunzytochemie etabliert werden. Des Weiteren sollte ein Nachweis der Expression von Oct-3/4 im Tumor-Xenograft durch Immunhistochemie erfolgen. Darüber hinaus sollten weitere methodische Möglichkeiten zur Untersuchung der Funktion von Oct-3/4 entwickelt werden.

2 MATERIAL

2.1 Zelllinien

In der vorliegenden Studie wurden etablierte Zelllinien von nichtseminomatösen TKZT untersucht. Die Untersuchungen wurden zunächst an den drei Zelllinien H12.1, 2102EP und 1411HP durchgeführt. Im Laufe der Studie konnten weitere TKZT-Zelllinien erhalten werden, so dass die Untersuchungen auf ein größeres Zelllinien-Panel ausgedehnt werden konnten. In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten Zelllinien, deren Ursprung sowie die entsprechenden Publikationen aufgeführt. Zusätzlich sind die histologischen Eigenschaften der ursprünglichen Patiententumore sowie der von den Zelllinien abgeleiteten Tumor-Xenograften in Nacktmäusen angegeben.

Tab. 2-1: TKZT-Zelllinien, Herkunft, histologische Eigenschaften und Referenzen

Zelllinie	Lokalisation und Histologie des Patiententumors	Histologie des Tumor-Xenograftes in der Nacktmaus	Referenzen
H12.1	Testes: EC + TE + CC + S	EC + IT + STGC	(Casper et al., 1987)
H12.5	Testes: EC + T + CC + S	EC	(Casper et al., 1987)
2102EP	Testes: TC + YST	EC	(Wang et al., 1980) (Andrews et al., 1980)
1156Q	Testes: EC + CC + S	EC (im Hamster)	(Wang et al., 1980) (Andrews et al., 1980)
1411HP	Retroperitoneale Metastase: EC + TE + YST	EC + YST	(Vogelzang et al., 1985)
1777N Rpmet	Retroperitoneale Metastase: EC	EC + IT	(Bronson et al., 1983) (Bronson et al., 1984)
GCT44	Paraaortale Lymphknoten-Metastase: EC + YST	EC + YST	(Pera et al., 1987a)

Abk.: EC – Embryonales Karzinom, TE – Teratom, CC – Chorionkarzinom,

S – Seminom, IT – Unreifes Teratom, STGC – Synzytiotrophoplastische Riesenzellen,

YST – Dottersacktumor, TC – Teratokarzinom.

Die Histologien der einzelnen Patiententumore und Tumor-Xenografte wurden bezüglich der Originalpublikationen angegeben. Xenografte der Zelllinien H12.1, 1411HP und 1777NRpmet wurden in der vorliegenden Studie etabliert und erneut klassifiziert.

Die Zelllinien 2102EP, 1156Q, 1411HP und 1777NRpmet wurden freundlicherweise von Prof. Peter W. Andrews (University of Sheffield, UK) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie GCT44 konnte freundlicherweise von Prof. Martin F. Pera (Monash University, Australia) geliefert werden. Die Zelllinien H12.1 und H12.5 wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. H.-J. Schmoll etabliert.

2.2 Medien, Chemikalien, Puffer und Lösungen

Zellkultur

Kulturmedium

RPMI-1640 bzw. DMEM (beides Biochrom KG Seromed)

+ Penicillin/ Streptomycin (Gibco BRL)

+ 10% FKS (Biochrom KG Seromed)

aufbewahren bei 4°C

Spülmedium

RPMI-1640 (Biochrom KG Seromed)

aufbewahren bei 4°C

Trypsin-Lösung (Biochrom KG Seromed)

aufbewahren bei 4°C

Medium zur Induktion der Differenzierung

Kulturmedium mit 2% FKS

+ 50 µM Dexamethason (Sigma)

+ 20 mM β-Glycerolphosphat (Sigma)

+ 200 µM Ascorbinsäure (Sigma)

aufbewahren bei 4°C

SRB-Zytotoxizitäts-AssayTCA-Fixierlösung

10% Trichloressigsäure (w/v)

dest. Wasser

aufbewahren bei 4°C

SRB-Färbelösung

0,4% Sulforhodamin B (w/v) (Sigma)

1% Essigsäure (v/v)

dest. Wasser

aufbewahren bei 4°C

Tris-Pufferlösung

10 mM Tris-Base

dest. Wasser

aufbewahren bei 4°C

DNA-Leiter-AssayLysepuffer

100 mM Tris-HCl pH 8.0

20 mM EDTA

0,8% SDS

aufbewahren bei 4°C

RNase-A Lösung

500 Units/ ml RNase-A (Roche Molecular Biochemicals)

hitzeinaktiviert

aufbewahren bei -20°C

Proteinase-K Lösung

20 mg/ ml Proteinase-K (Roche Molecular Biochemicals)

aufbewahren bei -20°C

DNA-Beladungspuffer

30% Glycerol (v/v)

0,25% Bromphenolblau (w/v)

bidest. Wasser

aufbewahren bei RT

Protein-AnalysePBS pH 7,4

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na₂HPO₄

0,24 g KH₂PO₄

in 1l bidest. Wasser

aufbewahren bei 4°C

PBST

PBS + 0,1% Tween 20 (v/v)

aufbewahren bei 4°C

RIPA-Lysepuffer

50 mM Tris-HCL pH 8,0

150 mM NaCl

1% Nonidet P-40 (v/v)

0.5% Desoxycholol (w/v)

0.1% SDS (w/v)

aufbewahren bei RT

→ Vor Gebrauch 10 µl/ ml Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma) zusetzen.

SDS-Beladungspuffer (4x)

0,5 M Tris-HCL pH 6,8

10% Glycerol (v/v)

2% SDS (w/v)

1% Bromphenolblau (w/v)

5% Mercaptoethanol (v/v)

aufbewahren bei RT

PAGE Laufpuffer

25 mM Tris-HCL pH 8,3

192 mM Glycin

0,1% SDS (w/v)

aufbewahren bei RT

Transfer-Puffer

PAGE Laufpuffer + 20% Methanol (v/v)

aufbewahren bei RT

Caspase-AssayLysepuffer

50 mM Hepes pH 7,4

1% Triton X-100 (v/v)

aufbewahren bei 4°C

Reaktionspuffer

50 mM Hepes pH 7,4

5 mM EGTA

0,1% CHAPS

5% Glycerol

aufbewahren bei 4°C

→ Vor Gebrauch DTT in einer Endkonzentration von 10 mM hinzufügen.

Substrate

Caspase-2: Ac-VDVAD-pNA (BioSource)

Caspase-3: Ac-DEVD-pNA (BioSource)

Caspase-9: Ac-LEHD-pNA (BioSource)

→ alle 4 mM in DMSO

aufbewahren bei -20°C

Cisplatin-Stammlösung

20 mM Cisplatin (Sigma) in DMF

aufbewahren bei 4°C

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Alexis Biochemicals)

500 µg/ ml

aufbewahren bei -80°C

Weitere Chemikalien, Puffer und Lösungen werden direkt im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode unter Punkt 3 beschrieben.

2.3 Antikörper

In der folgenden Tabelle sind alle im Rahmen der Studie verwendeten Antikörper sowie deren Hersteller und Anwendung aufgeführt.

Tab. 2-2: Antikörper, Hersteller und Applikation

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller	Applikation	Eingesetzte Konzentration
Apaf-1	Klon 24	BD Transduction Laboratories	WB	2 µg/ ml
Bak	G-23	Santa Cruz Biotechnology	WB	1 µg/ ml
Bax	-	DAKO	WB	1 µg/ ml

Bcl 2	Klon 124	DAKO	WB	2 µg/ ml
Bcl X	S-18	Santa Cruz Biotechnology	WB	1 µg/ ml
Caspase-2	Klon 35	BD Transduction Laboratories	WB	0,5 µg/ ml
Caspase-3	C 33	MBL	WB	0,5 µg/ ml
Caspase-3	-	BD PharMingen	WB	1:2000
Caspase-3	-	BD PharMingen	IHC	1 µg/ ml
Caspase-7	Ab-1	Oncogene Research Products	WB	1 µg/ ml
Caspase-8	Klon 12F5	BioSource	WB	0,5 µg/ ml
Caspase-9	Klon 5B4	MBL	WB	0,5 µg/ ml
Caspase-9	-	Alexis Biochemicals	IP	1:200
Cytochrom c	-	MBL	WB	0,5 µg/ ml
Oct-3/4	C-10	Santa Cruz Biotechnology	WB ICC	0,5 µg/ ml 2 µg/ ml
Oct-3/4	H-134	Santa Cruz Biotechnology	IHC	1 µg/ ml
P53	Do-1	Santa Cruz Biotechnology	WB	0,1 µg/ ml
SSEA-4	MC-813-70	Chemicon	ICC	2 µg/ ml
anti-Maus IgG-HRP		Santa Cruz Biotechnology	WB	1: 2000
anti- Kaninchen IgG-HRP		Santa Cruz Biotechnology	WB IHC	1.2000 1:500
anti-Maus IgG-FITC		BD Biosciences	ICC	1:40

Abk.: WB – Western-Blotting, IP – Immunpräzipitation, ICC – Immunzytochemie,
IHC – Immunhistochemie.

2.4 Geräte und Verbrauchsmittel

Spezielle Methoden-bezogene Geräte, Verbrauchsmittel und Kits werden unter Punkt 3 im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode aufgeführt. Weitere eingesetzte Geräte und Verbrauchsmittel entsprechen den üblichen Laborstandards und werden nicht aufgeführt.

3 METHODEN

Zur Erarbeitung und Durchführung der Methoden wurden Standard-Laborlehrbücher (Harlow and Lane, 1988; Sambrook et al., 1989; Spector et al., 1998) sowie Originalpublikationen verwendet (siehe entsprechende Methode).

3.1 Zellkultivierung

Die verwendeten humanen TKZT-Zelllinien (adherent wachsend) wurden unter Standardbedingungen kultiviert (37°C, 5% CO₂, feuchte Atmosphäre). Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zelllinien passagiert. Dazu wurden die Zellen mit Spülmedium gewaschen und durch Behandlung mit Trypsin-Lösung abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Kulturmedium suspendiert und ein Teil (1/2 oder 1/3) in neue Zellkulturflaschen gesetzt. Bei Erfordernis einer großen Zellmasse wurden die Zelllinien in entsprechend größere Zellkulturflaschen gesetzt und kultiviert. Zur Bestimmung der genauen Zellzahl wurden die Zellen in Suspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Danach konnte die genaue Zellzahl pro ml ermittelt werden.

3.2 SRB-Zytotoxizitäts-Assay und Bestimmung des IC₉₀-Wertes von Cisplatin

3.2.1 SRB-Zytotoxizitäts-Assay

Zur Untersuchung der Sensitivität der TKZT-Zelllinien gegenüber Cisplatin wurde der SRB-Zytotoxizitäts-Assay angewendet (Skehan et al., 1990). Das Prinzip des Assays beruht auf der stabilen Bindung des Farbstoffes Sulforhodamin B (SRB) an zelluläres Protein bei saurem pH-Wert, dem Auswaschen von ungebundenen Farbstoff unter sauren Bedingungen und der Freisetzung des gebundenen Farbstoffes bei basischem pH-Wert. Die Menge des freigesetzten Farbstoffes in Lösung korreliert linear mit der Zellzahl und wird photometrisch erfasst.

Vorgang:

- Bestücken von 96-Loch-Mikrotiterplatten mit der jeweils für jede Zelllinie spezifischen Zellzahl pro Loch (siehe 3.2.3) und ÜN für 24h kultivieren,

- Behandeln mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin in Kulturmedium (0,01 - 100 μ M) für 2h oder 24h (eine Reihe mit 8 Löchern für eine Konzentration),
- Entfernen des Cisplatin-haltigen Mediums durch Ausschlagen der Platte, 1x waschen mit Spülmedium und mit Kulturmedium auffüllen,
- Entfernen des Kulturmediums 96h nach Beginn der jeweiligen Behandlung (120h nach dem Setzen der Zellen) und fixieren der Zellen mit TCA-Fixierlösung (100 μ l/ Loch) für mindestens 2h bei 4°C,
- 5x waschen mit dest. Wasser (Plate washer, Rainbow, Tecan), alle nicht adhärenen Zellen werden abgesaugt,
- Färben der Zellen mit SRB-Färbelösung (100 μ l/ Loch) für mindestens 30 min,
- 5x waschen mit 1%iger Essigsäure (Plate washer, Rainbow, Tecan) und trocknen lassen,
- Extrahieren des gebundenen Farbstoffes mit Tris-Pufferlösung (100 μ l/ Loch),
- Messung der OD bei 570nm (Plate reader, Rainbow, Tecan),
- Berechnen der Mittelwerte der jeweils 8 Messwerte pro Reihe (Excel-Software, Microsoft),
- Umrechnen der Mittelwerte in Prozentwerte relativ zur 100% entsprechenden unbehandelten Kontrolle (Excel-Software, Microsoft),
- Darstellung der Prozentwerte in Abhängigkeit von der Konzentration an Cisplatin im Diagramm (Excel-Software, Microsoft).

3.2.2 Bestimmung des Zelllinien-spezifischen IC90-Wertes von Cisplatin

Zur Bestimmung der individuellen Sensitivität gegenüber Cisplatin wurde für jede Zelllinie der IC90-Wert ermittelt. Dies entspricht einer Cisplatinkonzentration (in μ M), bei der eine 90%ige Inhibierung des Zellwachstums im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle erreicht wird. Der IC90-Wert wurde jeweils im Diagramm abgelesen.

3.2.3 Ermittlung der Zelllinien-spezifischen Wachstumskinetik

Beim Erstellen einer Dosis-Wirkungs Beziehung mittels SRB-Assay ist es notwendig, dass die Zellen in der 96-Loch-Mikrotiterplatte über die gesamte Zeitspanne des Versuches exponentiell wachsen können. Das ist besonders wichtig für die unbehandelte Kontrollreihe, da diese den Bezugspunkt für die spätere Berechnung darstellt. Die TKZT-Zelllinien weisen unterschiedliche Wachstumseigenschaften auf. Deshalb wurde für jede Zelllinie die spezifische Zellzahl ermittelt, welche zu Beginn des Versuches in die 96-Loch-Mikrotiterplatte gesetzt werden muss. Dazu wurden von jeder Zelllinie fünf 96-Loch-Mikrotiterplatten mit jeweils 9 unterschiedlichen Zellzahlen pro Reihe (15000-925 Zellen) angesetzt. Nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h wurde jeweils eine Platte mit TCA-Fixierlösung fixiert. Anschließend wurde wie unter Punkt 3.2.1 weiter verfahren. Schließlich wurden die OD-Werte in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Es wurde die jeweilige Zellzahl pro Zelllinie ermittelt, bei der ein exponentielles Wachstum über den gesamten Zeitraum des Versuches beobachtet wurde.

3.3 Behandlung mit Cisplatin

Für funktionelle Assays wurden die TKZT-Zelllinien in entsprechender Menge angesetzt und ÜN kultiviert. Dann wurden die Zellen mit der entsprechenden IC90-Dosis von Cisplatin für 2h oder 24h behandelt, mit Spülmedium gewaschen und nach den angegebenen Zeiten zusammen mit den unbehandelten Kontrollen durch Trypsinieren gewonnen. Beim Einsatz von Petrischalen wurden die Zellen mit Hilfe eines Spatels gewonnen. Die durch eine Cisplatin-Behandlung entstehenden abgelösten Zellen wurden entweder zusammen mit dem Kulturmedium verworfen oder gewonnen und separat analysiert.

3.4 Apoptoseanalyse

Apoptose bezeichnet die aktive Form des Zelltodes, der mit charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen in der Zelle einhergeht (siehe Kapitel 1.5). Durch den Nachweis dieser spezifischen Veränderungen kann ein apoptotischer Zelltod

determiniert werden. Dabei sollten wenigstens 3 Assays durchgeführt werden, die unterschiedliche Merkmale analysieren.

3.4.1 Aktivierung der Caspase-3

Caspase-3 ist die wichtigste Effektor-Caspase, die wesentlich am Abbau der Zelle während der Apoptose beteiligt ist. Die Spaltung/ Aktivierung der Caspase-3 wurde mittels Western-Blotting analysiert (siehe Kapitel 3.8).

3.4.2 DNA-Leiter-Assay

Während der Apoptose wird die DNA der Zellen internukleosomal durch Endonukleasen gespalten. Dadurch entstehen DNA-Fragmente mit charakteristischer Länge (das jeweils Vielfache von 180-200bp). Nach Auftrennung der DNA im Agarosegel entsteht das sogenannte *DNA-Leiter* Muster.

Vorgang:

- zu analysierende Zellproben (1 Mio Zellen jeweils) mit PBS waschen und in 40µl Lysepuffer (DNA –Leiter-Assay) lysieren, 20 min bei RT,
- 10µl RNase-A Lösung zugeben und für 2h bei 37°C inkubieren,
- 10µl Proteinase-K Lösung zugeben und ÜN bei 50°C inkubieren,
- Lysate mit 10µl DNA-Beladungspuffer mixen und 2%iges Agarosegel bestücken,
- Gelelektrophorese bei 60V, bis der Bromphenolblau-Marker zwei Drittel des Gels durchlaufen hat,
- Färben des Gels mit Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ ml) für 30min,
- Spülen des Gels mit dest. Wasser für 1 - 2h
- Dokumentation unter UV Licht (GeneGenius, Syngene).

3.4.3 Trypanblau-Ausschluss-Test

Während des apoptotischen Zelltodes bleibt die Membranintegrität erhalten. Deshalb sind diese Zellen in der Lage, die Farbe Trypanblau aktiv auszuschließen. Die durch die Cisplatin-Behandlung bereits vom Zellmonolayer abgelösten Zellen wurden durch Abgießen des Kulturmediums gewonnen. Ein Teil dieser Zellsuspension wurde 1:1 mit Trypanblau-Lösung (Sigma) gemischt. Nach 2 min bis spätestens 5 min wurden die Zellen mikroskopisch analysiert.

3.5 Messung der DNA-Platinierung mittels ELISA

Die Gesamt-Platinierung der DNA wurde durch einen kompetitiven ELISA gemessen, der zuvor von Tilby et al. entwickelt und beschrieben wurde (Tilby et al., 1987; Tilby et al., 1991). Der Assay wurde durch Frau Diplom-Chemikerin Angelika Frühauf und Dr. Wieland Voigt in Zusammenarbeit mit Dr. Ulrich Warnke (Freie Universität Berlin) und Dr. Michael J. Tilby (Newcastle, United Kingdom) in unserem Labor etabliert. Die zu analysierenden Zellproben wurden mit PBS gewaschen und die DNA mit Hilfe des QIAamp Blood Kit (QIAGEN) extrahiert. Die Durchführung des Assays wurde freundlicherweise durch Frau Frühauf vorgenommen.

3.6 Zellzyklusanalyse

Für die Zellzyklusanalyse wurden DNA-Histogramme erstellt. Die zu analysierenden Zellproben wurden mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Krishan-Puffer (0,1% Natriumzitat, 0,02 mg/ml RNase A, 0,37% NP-40, 50 µg/ml Propidiumjodid) inkubiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert und erneut in 1 ml Krishan-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden durchflusszytometrisch analysiert (FACScalibur, BD Biosciences). Zur Erstellung der DNA-Histogramme wurde Mod-Fit LT Software (Verity Software House) verwendet. Die DNA-Histogramme wurden freundlicherweise von Herrn Andre Bulankin erstellt.

3.7 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Zell-Lysaten wurde mittels *Bio-Rad protein assay* (BioRad, Germany) ermittelt. Der Assay basiert auf der Methode nach Bradford. Zur genauen Durchführung siehe Angaben des Herstellers. Die Messung wurde am Spektrophotometer *BioSpec-1601E* (SHIMADZU) durchgeführt.

3.8 Analyse der Proteinexpression mittels Western-Blotting

Vorgang:

- zu analysierende Zellproben mit PBS waschen und mit RIPA-Lysepuffer aufschließen (100µl RIPA pro 1 Mio Zellen), alle Arbeitsschritte auf Eis,
- Scheren der DNA durch mehrmaliges Passieren des Lysates durch eine 25G Kanüle und für 20 min inkubieren,
- 15 min bei 13000 U/ min zentrifugieren (*Biofuge fresco*),
- Überstand in neues Tube überführen,
- Proteinkonzentrationen ermitteln,
- Proteinkonzentrationen zu vergleichender Proben durch Verdünnen mit RIPA-Lysepuffer aufeinander angleichen,
- Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli: 60µg Protein in SDS-Beladungspuffer aufnehmen, für 5 min bei 95°C erhitzen und auf Eis stellen,
- Gel beladen, Elektrophorese bei 200V, bis der Bromphenolblau-Marker das Gel durchlaufen hat,
- Gel 15 min in Transfer-Puffer equilibrieren,
- Elektrotransfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran (BioRad) mittels Trans-Blot SD System (BioRad),
- Transfer und Bahnbeladung durch Anfärben der Membran mit Ponceau S (Sigma) überprüfen,
- Blocken der Membran mit PBST + 5% Milchpulver für 1h bei RT,
- Inkubieren der Membran mit primären AK in PBST + 5% Milchpulver für 2h bei RT,
- 3 x 5 min und 3 x 10 min in PBST waschen,

- Inkubieren mit sekundären AK in PBST + 1% Milchpulver für 1h bei RT,
- 3 x 5 min und 3x 10 min in PBST waschen,
- Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion durch Chemilumineszenz mit dem ECL System (Amersham Pharmacia Biotech), Röntgenfilm 30 sec bis zu 30 min bei RT exponieren,
- Film entwickeln (Hyperprocessor, Amersham Pharmacia Biotech).

3.9 Analyse der Proteinexpression mittels Immunzytochemie

Die Expression von Proteinen auf Einzelzellebene wurde immunzytochemisch analysiert.

Vorgang:

- zu analysierende Zellen (adherent) mit PBS waschen und 20 min bei RT mit PBS + 2% Formalin fixieren,
- 3 x 5 min mit PBS waschen,
- nur bei intrazellulären Proteinen: Permeabilisieren mit PBS + 0.5% Triton X-100 + 0.5% BSA für 5 min auf Eis,
- 3 x 10 min waschen/ blocken mit PBS + 1% BSA,
- Inkubieren mit primären AK in PBS + 1% BSA bei 4°C ÜN,
- 3 x 10 min waschen mit PBS + 1% BSA,
- Inkubieren mit sekundären AK in PBS für 1h bei RT,
- 3 x 10 min waschen mit PBS,
- licht- und fluoreszenz-mikroskopisch analysieren und dokumentieren (Axiolab, AxioCam; Zeiss).

3.10 Herstellung zytosolischer Fraktionen

Im Zusammenhang mit dem apoptotischen Zelltod können mitochondriale Proteine ins Zytosol freigesetzt werden. Das wurde durch eine vereinfachte subzelluläre Fraktionierung untersucht. Die zu analysierenden Zellen wurden durch Trypsinieren gewonnen, mit PBS

gewaschen und in Zytosol-Puffer (BioVision Research Products) resuspendiert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach einer Inkubation von 10 min wurden die Zellen durch 50 Stöße in einem *Dounce* Homogenisator aufgebrochen, in neue Tubes überführt und 10 min bei 2000 U/ min zentrifugiert (Biofuge *fresco*). Die Überstände wurden jeweils in neue Tubes überführt und für 30 min bei 13000 U/ min zentrifugiert (Biofuge *fresco*). Die resultierenden Überstände entsprechen einer zytosolischen Fraktion, die nahezu frei von Mitochondrien ist. Die zytosolischen Fraktionen wurden auf eine gemeinsame Proteinkonzentration angeglichen und mittels Western-Blotting (siehe 3.8) auf Anwesenheit von mitochondrialen Proteinen analysiert.

3.11 Analyse von Protein-Protein Interaktionen mittels Immunpräzipitation

Zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen innerhalb der Zelle wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei wurden die zytosolische Fraktionen von Zellproben untersucht (siehe Kapitel 3.10).

Vorgang:

- zu analysierende Zellen bzw. zytosolische Fraktionen auf gemeinsamen Proteingehalt angleichen,
- Volumina der Lysate auf 1ml angleichen,
- *Preclearing* der Lysate mit 30µl Protein-A-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) für 30 min bei 4°C,
- 1min bei 13000 U/ min zentrifugieren (Biofuge *fresco*),
- Überstände in neue Tubes überführen,
- Inkubation mit primären AK bei 4°C 1h,
- 30µl Protein-A-Agarose zugeben und für 1h bei 4°C inkubieren,
- 1min bei 13000 U/ min zentrifugieren (Biofuge *fresco*),
- Überstände in neue Tubes überführen und als IP-Überstände sammeln,
- Präzipitate in 1ml Zytosol-Puffer resuspendieren und 10min waschen,
- 1min bei 13000 U/ min zentrifugieren (Biofuge *fresco*),
- Überstände verwerfen,

- die letzten 3 Arbeitsschritte 4x wiederholen,
- Präzipitate in SDS-Beladungspuffer resuspendieren und 10min bei 95°C erhitzen,
- 1min bei 13000 U/ min zentrifugieren (Biofuge *fresco*),
- Überstände in neue Tubes überführen,
- Analysieren der Proben mittels Western-Blotting (siehe 3.8).

3.12 Etablierung von Tumor-Xenograften in Nacktmäusen und Behandlung mit Cisplatin

Zur Erstellung eines *in vivo* Tumormodells wurden Nacktmäuse (NMRI nu/nu, Harlan Winkelmann GmbH) verwendet, welche genetisch bedingt einen Defekt in der zellvermittelten Immunantwort aufweisen. Dazu wurde die entsprechende Zelllinie trypsiniert, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und jeweils 10 Mio Zellen in 200µl sterilem PBS suspendiert. Die Suspension wurde mit Hilfe einer Insulinspritze der Nacktmaus subkutan in die Flanke injiziert. Bei Erfolg entstand nach 3 - 4 Wochen ein sicht- und tastbarer Tumor unter der Haut. Bei Erreichen einer Tumorgröße von etwa 1 cm³ wurden die Nacktmäuse jeweils mit Cisplatin behandelt. Dazu wurden über 5 Tage, täglich 2 mg Cisplatin/ kg Körpergewicht in 0,5 ml Saline intraperitoneal appliziert. Als Kontrolle wurden Mäuse innerhalb desselben Behandlungsschemas mit Saline behandelt. Zum Nachweis von Apoptose im Tumor wurden entsprechende Mäuse am Tag 6 nach dem Start der Behandlung getötet und die Tumore entnommen.

3.13 Gewinnung von Tumor-Xenograften aus Nacktmäusen und immunhistochemische Analyse

Zur Gewinnung der Tumor-Xenograften wurden die entsprechenden Mäuse durch Inhalation von Halothan getötet. Anschließend wurden die Tumore entnommen und in einer 4% igen Formalin/ PBS Lösung für einen Zeitraum von wenigstens 24h fixiert. Dann wurden die Tumore dehydriert und in Paraffin eingebettet. Beide Arbeitsschritte wurden im Institut für Pathologie (MLU Halle) automatisiert durchgeführt. Von den Tumorblöcken wurden am

Mikrotom 5 μm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger fixiert. Die Tumorgewebeschnitte wurden immunhistochemisch analysiert.

Vorgang:

- Deparaffinisieren der Tumorgewebeschnitte: 2x 10 min in Xylol,
- Rehydrieren durch absteigende Alkoholreihe: jeweils 5 min in 96-, 80-, 65-, 50%-igen Ethanol, anschließend 5 min in dest. Wasser, danach in PBS aufnehmen,
- Schnitte auf Objektträger mit Paraffinstift einkreisen,
- Schnitte mit H_2O_2 Blockierungslösung (Dako) bedecken und 20 min bei RT inkubieren,
- Proteinblockierung mit 3% BSA in PBS für 30 min bei RT,
- Inkubieren der Tumorschnitte mit primären AK in PBS + 1% BSA bei 4°C ÜN,
- 3 x 10 min waschen in PBS,
- Inkubieren der Tumorschnitte mit sekundären AK in PBS bei RT für 1h,
- 3 x 10 min waschen in PBS,
- Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion durch DAB System (Dako), - Braunfärbung
- Gegenfärben mit Hämatoxylin (Dako) für 1 min und spülen in Leitungswasser,
- Eindecken der Tumorschnitte mit Depex (Serva),
- licht-mikroskopisch analysieren und dokumentieren (Axiolab, AxioCam; Zeiss).

3.14 Caspase-Assay und Inhibierung von Caspasen

Die Aktivierung der Caspasen -2, -3 und -9 wurde über die Spaltung des jeweils spezifischen Peptid-Substrates photometrisch analysiert. Der Assay wurde in 96-Loch Mikrotiterplatten durchgeführt. Ein geeigneter Lysepuffer sowie Reaktionspuffer wurde zunächst ausgetestet (siehe (Talanian et al., 1997; Thornberry et al., 1997)).

Vorgang:

- zu analysierende Zellproben mit PBS waschen und in Lysepuffer (Casp. Assay) lysieren (100 μl Puffer pro 1 Mio Zellen), 10 min inkubieren, alle Arbeitsschritte auf Eis,
- 1 min bei 13000 U/ min zentrifugieren (Biofuge *fresco*),
- Überstand in neues Tube überführen,

- Proteinkonzentration ermitteln,
- Proteinkonzentrationen der Proben auf 2µg/ µl mit Lysepuffer angleichen,
- 96-Loch Mikrotiterplatte mit jeweils 50µl Zell-Lysat bestücken,
- 50µl Reaktionspuffer zugeben,
- 5µl Caspase-Substrat hinzufügen und ÜN bei 37°C inkubieren,
- Messung der OD bei 405nm (Plate reader, Rainbow, Tecan),
- Bestimmung der relativen Caspase-Aktivität durch Bildung des Quotienten der OD 405 von jeweils behandelter und unbehandelte Probe.

Zur Inhibierung der Caspasen wurden die Zellen vor und während der Cisplatin-Behandlung mit 50 µM Caspase-9-Inhibitor (Z-LEHD-Fmk) oder Pan-Caspase-Inhibitor (Z-VAD-Fmk) (beide Calbiochem) inkubiert.

3.15 Transfektion von siRNA und Expressionsvektoren

Die Transfektion erfolgte durch eine Kombination von Elektroporation und Lipofektion im Nucleofector®-System (Amaxa Biosystem). Dazu wurden maximal 2 Mio Zellen in 100µl Transfektionspuffer (Amaxa Biosystem) suspendiert, mit siRNA bzw. Expressionsvektor-DNA kombiniert und in eine Küvette überführt. Nach erfolgter Reaktion im Nucleofector®-System wurden die Zellen zusammen mit Kulturmedium in 6-Loch Platten gegeben und für die entsprechenden Zeiten inkubiert. Die Expression des zu untersuchenden Proteins wurde mittels Western-Blotting analysiert. Eine optimale Konzentration der siRNA bzw. des Expressionsvektors sowie ein optimales Programm im Nucleofector®-System und der entsprechende Transfektionspuffer wurden zunächst ausgetestet.

Für einen gezielten *knock-down* von Proteinen wurden die Zellen mit 1µg Gen-spezifischer siRNA (p53, Oct-3/4) bzw. Kontroll-siRNA (beides Santa Cruz Biotechnology) transfiziert. Zur Expression des Proteins Oct-3/4 wurde das Expressionsvektorsystem pIRES2-EGFP (BD Clontech), in das die cDNA von Oct-3/4 eingebaut wurde, verwendet. Das Vektor-Konstrukt pIRES2-EGFP-Oct-3/4 wurde freundlicherweise von Frau Diplom-Biochemikerin Jana Lützkendorf zur Verfügung gestellt. Die Transfektion erfolgte jeweils mit 2µg Vektor-DNA.

3.16 Zell-Klonierung

Zur Etablierung von Zelllinien mit stabiler Vektor-Expression wurden nach erfolgter Transfektion durch die Behandlung mit G418 (Roche Molecular Biochemicals) die Vektor-positiven Zellen selektioniert. Jeweils G418-resistente Zellen wurden in 96-Loch Mikrotiterplatten mit einem Verdünnungsverhältnis von einer Zelle pro Loch gesetzt. Die Mikrotiterplatten wurden nach 7 Tagen auf das Vorhandensein von Einzelkolonien analysiert und markiert. Nach 3 Wochen wurden grün fluoreszierende Klone trypsiniert und in jeweils größeren Zellkulturgefäßen expandiert. Zellklone mit stabiler Expression des Vektor-Konstrukts pIRES2-EGFP-Oct-3/4 wurden hinsichtlich der Stärke der Oct-3/4-Expression mittels Western-Blotting analysiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Zelllinien-spezifische Wachstumskinetiken und Zellzahlen

Zur Durchführung des SRB-Zytotoxizitäts-Assays war es notwendig für jede TKZT-Zelllinie die spezifische Zellzahl zu ermitteln, welche zu Beginn des Assays in die 96-Loch-Mikrotiterplatten gesetzt werden muss. Die spezifischen Zellzahlen wurden durch Erstellen von Wachstumskinetiken ermittelt. Als Beispiel ist in Abbildung 4-1 eine Wachstumskinetik der Zelllinie 1156Q gezeigt. Für diese Zelllinie wurde die Zellzahl auf 7000 festgelegt, um ein exponentielles Zellwachstum über den gesamten Zeitraum des Versuches zu gewährleisten. Die spezifischen Zellzahlen aller verwendeter Zelllinien sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

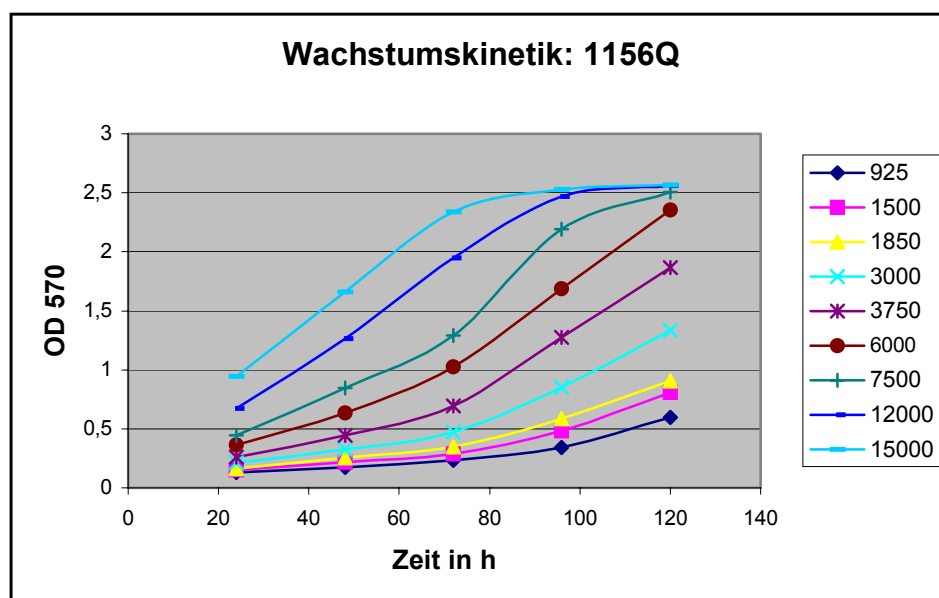


Abb. 4-1: Wachstumskinetik der Zelllinie 1156Q.

Tab. 4-1: Zelllinien-spezifische Zellzahlen zur Anwendung im SRB-Assay

Zelllinie	H12.1	H12.5	2102EP	1156Q	1411HP	1777NRpmet	GCT44
Zellzahl	3000	1500	3000	7000	8000	1500	8000

4.2 Charakterisierung der TKZT-Zelllinien hinsichtlich der Cisplatin-Sensitivität

Zur Bestimmung der Zelllinien-spezifischen Sensitivität gegenüber Cisplatin wurden SRB-Assays durchgeführt und für jede Zelllinie der IC90-Wert ermittelt. Dabei wurden eine zweistündige sowie eine vierundzwanzigstündige Behandlung angewendet. Diese Untersuchungen und weitere Analysen wurden zunächst an den drei Zelllinien 2102EP, H12.1 und 1411HP durchgeführt. Die Zelllinie 1411HP erwies sich gegenüber den beiden Zelllinien 2102EP und H12.1 als 3,3-fach Cisplatin-resistent. Diese Resistenz war unabhängig vom verwendeten Behandlungsschema (Abb. 4-2, Tab. 4-2).

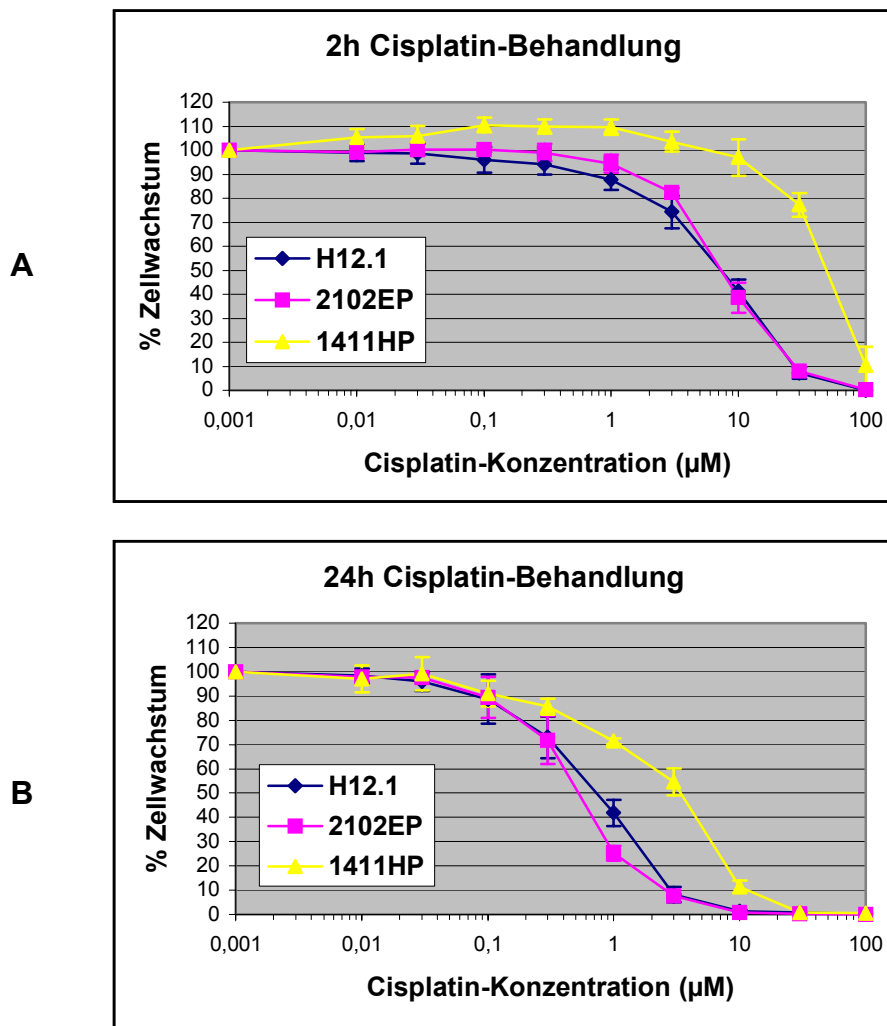


Abb. 4-2: SRB-Zytotoxizitäts-Assay mit einer Cisplatin-Behandlung über 2h (**A**) und 24h (**B**). Die Zelllinie 1411HP zeigte unabhängig vom Behandlungsschema eine Cisplatin-Resistenz gegenüber den beiden Zelllinien H12.1 und 2102EP. (n = 3, MW ± STABW)

Tab. 4-2: IC90-Werte (μM) und relative Cisplatin-Resistenz der Zelllinie 1411HP

	H12.1	2102EP	1411HP	Rel. Resistenz
IC90 (2h)	30	30	100	3,3
IC90 (24h)	3	3	10	3,3

Die im Laufe der Studie später erworbenen TKZT-Zelllinien wurden zunächst hinsichtlich der Cisplatin-Sensitivität analysiert. Dabei wurde das 24h-Behandlungsschema bevorzugt. Die Zelllinien H12.5 und 1156Q erwiesen sich als Cisplatin-sensitiv wohingegen die Zelllinien 1777NRpmet und GCT44 Cisplatin-Resistenz zeigten. Die Zelllinien wurden in spätere Untersuchungen mit einbezogen. In Tabelle 4-3 sind die IC90-Werte aller verwendeter Zelllinien zusammengefasst.

Tab. 4-3: IC90 Werte (μM) der TKZT Zelllinien nach einer 24h Cisplatin-Behandlung

Zelllinie	H12.1	H12.5	2102EP	1156Q	1411HP	1777NRpmet	GCT44
IC90	3	3	3	2	10	16	18
	Cisplatin-sensitiv				Cisplatin-resistent		

Die IC90-Werte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit einer Standardabweichung kleiner als 15%.

4.3 Analyse des Cisplatin-induzierten Zelltodes

Zur Untersuchung des Cisplatin-induzierten Zelltodes wurden die sensitiven Zelllinien H12.1, 2102EP und die resistente Zelllinie 1411HP mit der jeweiligen IC90-Dosis behandelt. Nach 24h konnten bereits zahlreiche abgelöste (floatierende) Zellen beobachtet werden (Abb. 4-3A). Der Trend zur Entstehung von floatierenden Zellen setzte sich fort, so dass nach 4 Tagen kaum noch adherente Zellen vorhanden waren. Diese Wirkung konnte bei beiden verwendeten Behandlungsschemata (2h/ 24h) beobachtet werden. Die resistente Zelllinie 1411HP wurde zusätzlich mit der IC90-Dosis der sensitiven Zelllinien (30 μ M bei 2h / 3 μ M bei 24h) behandelt (Abb. 4-3A). Diese Cisplatin-Konzentration führte auch nach 4 Tagen zu keiner Behandlungs-assoziierten Entstehung von floatierenden Zellen. Jeweils unbehandelte und behandelte Zellpopulationen wurden hinsichtlich der Spaltung/ Aktivierung der Caspase-3 mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 4-3B). Außerdem wurden frisch entstandene floatierende Zellen auf die Fähigkeit Trypanblau auszuschließen überprüft (Abb. 4-3C) und die DNA hinsichtlich der typischen Fragmentierung analysiert (Abb. 4-3D). Wie in Abbildung 4-3 gezeigt, korrelierte die Entstehung von floatierenden Zellen (A) mit der Aktivierung der Caspase-3 (B). Die floatierenden Zellen zeigten zunächst intakte Membranen und waren in der Lage für einige Zeit Trypanblau auszuschließen (C). Deren DNA zeigte das typische Muster der Fragmentierung (D). Das verdeutlichte, dass in allen drei Zelllinien eine Cisplatin-Behandlung mit der jeweiligen IC90-Dosis (equitoxische Dosis) den apoptotischen Zelltod auslöst. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass eine Cisplatin-Dosis (equimolare Dosis), welche bei den sensitiven Zelllinien Apoptose induziert, von der resistenten Zelllinie toleriert wird. Eine derartige Cisplatin-Behandlung führte in der resistenten Zelllinie nicht zur Aktivierung der Caspase-3 und zur Entstehung von floatierenden Zellen (A, B). Die resistente Zelllinie 1411HP benötigte eine 3,3-fach höhere Cisplatin-Dosis, um Apoptose im gleichem Maße zu induzieren (equitoxische Dosis). Die Cisplatin-Resistenz der Zelllinie 1411HP ist somit durch eine verminderte Induktion des apoptotischen Zelltodes begründet.

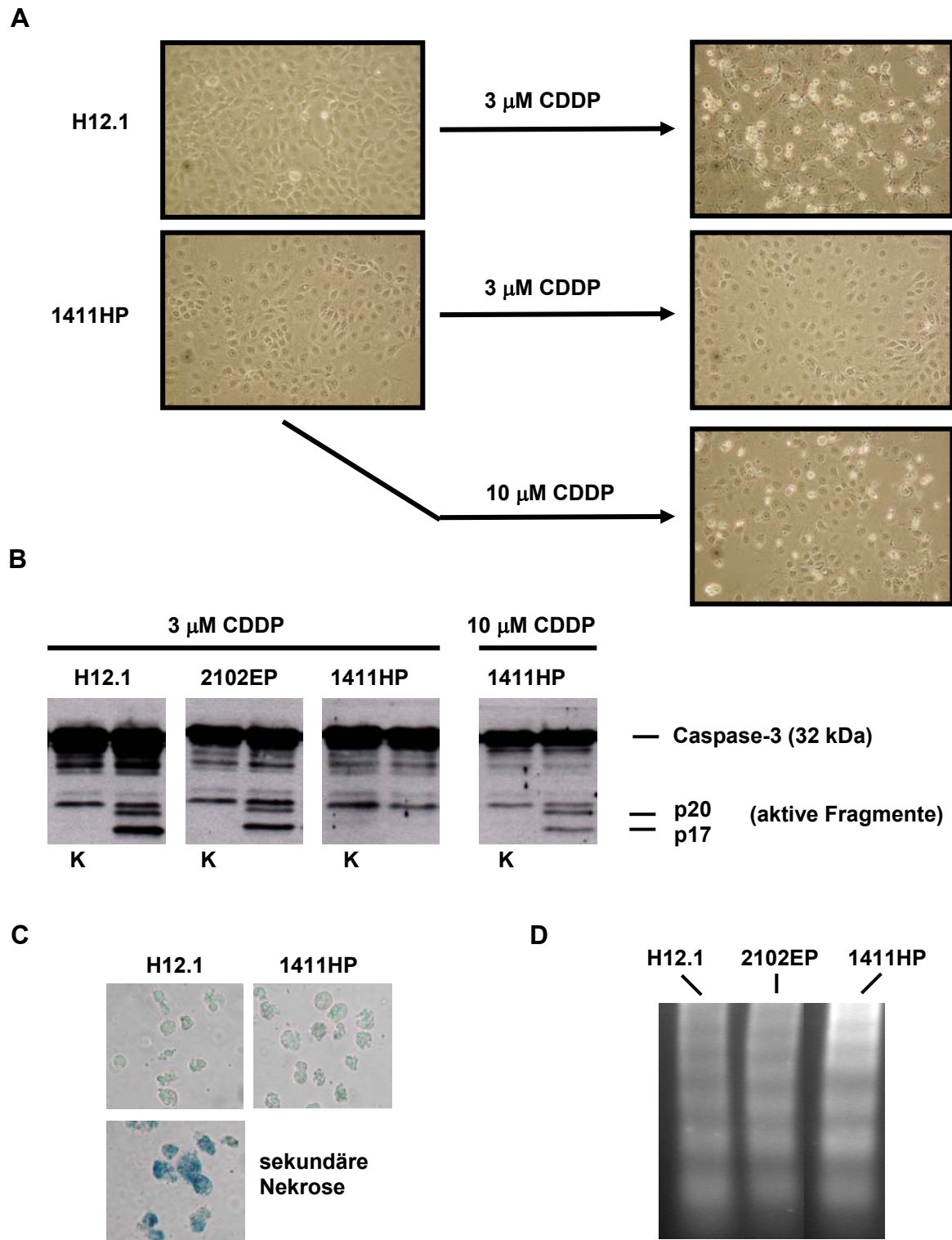


Abb. 4-3: Analyse der Cisplatin-induzierten Apoptose. Die Zelllinien wurden mit der entsprechenden IC90-Dosis von Cisplatin behandelt (24h-Behandlungsschema) und nach 24h analysiert. Zusätzlich wurde die resistente Zelllinie 1411HP mit der IC90-Dosis der sensitiven Zelllinien behandelt. Die Zelllinie 2102EP wird in (A) und (C) nicht gezeigt. **(A):** Entstehung von floatierenden Zellen (hell schimmernd) durch Behandlung mit Cisplatin. **(B):** Nachweis der aktiven Fragmente (p20/ p17) der Caspase-3 mittels Western-Blot-Analyse (K- unbehandelte Kontrolle). **(C):** Nachweis der Membranintegrität von floatierenden Zellen durch Trypanblau-Ausschlusstest. (Floatierende Zellen werden sekundär nekrotisch und nehmen Trypanblau auf.) **(D):** Analyse der typischen DNA-Fragmentierung durch Agarosegelelektrophorese.

4.4 Analyse der Cisplatin-Wirkung *in vivo*

Die Determinierung der Sensitivität bzw. Resistenz von Tumorzellen gegenüber chemotherapeutischen Substanzen *in vitro* ist zunächst relativ und die klinische Relevanz dadurch unklar. Durch unsere Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die sensitive Zelllinie H12.1 und die resistente Zelllinie 1411HP ihre *in vitro* - Eigenschaften hinsichtlich der Cisplatin-Sensitivität auch *in vivo* als Tumor-Xenografte in Nacktmäusen beibehalten. Klinisch relevante Cisplatin-Behandlungen über 5 Tage konnten bei H12.1-Tumoren vollständige Remissionen erzeugen, wohingegen bei 1411HP-Tumoren nur transiente Wachstumsinhibierungen beobachtet wurden (Rie et al., 2000). Ausgehend von den *in vitro*-Beobachtungen zur Apoptose-Induktion (siehe Abb. 4-3) wurden H12.1-Tumoren und 1411HP-Tumoren auf das Vorkommen von apoptotischen Zellen analysiert. Dazu wurden Tumor-tragende Nacktmäuse mit Cisplatin oder Saline (als Kontrolle) behandelt und die Tumore am Tag 6 nach dem Start der Behandlung entnommen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die H12.1-Tumore der Cisplatin-behandelten Nacktmäuse bereits in Regression. Die Tumoren wurden immunhistochemisch auf die aktivierte Form der Caspase-3 untersucht, da die Aktivierung der Caspase-3 mit der Induktion von Apoptose assoziiert ist (siehe Abb. 4-3). Zwischen den Kontrolltumoren beider Typen konnten hinsichtlich des Vorkommens apoptotischer Zellen im Tumorgewebe keine auffälligen Unterschiede beobachtet werden. Die sensitiven H12.1-Tumore und die resistenten 1411HP-Tumore zeigten jedoch sehr deutliche Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen nach der Cisplatin-Behandlung. Wie in Abbildung 4-4 gezeigt, konnten zahlreiche Zellen mit aktivierter Caspase-3 in H12.1-Tumoren detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten die behandelten 1411HP-Tumore keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltumoren. Das legt nahe, dass die massive Induktion von Apoptose im H12.1-Tumor die Hauptursache für die Regression darstellt. Gleichzeitig wird deutlich, dass klinisch relevante Cisplatin-Konzentrationen, die *in vivo* erreicht werden, nicht ausreichen, um Apoptose in den 1411HP-Tumorzellen zu induzieren und folglich keine Tumor-Regression ausgelöst wird. Die *in vivo* bestätigte Relation von Sensitivität und Resistenz gegenüber Cisplatin sowie die beobachtete Korrelation zwischen Apoptose-Induktion und Tumor-Regression zeigen, dass das Modell der TKZT-Zelllinien zur Untersuchung von Mechanismen der Cisplatin-Resistenz geeignet ist.

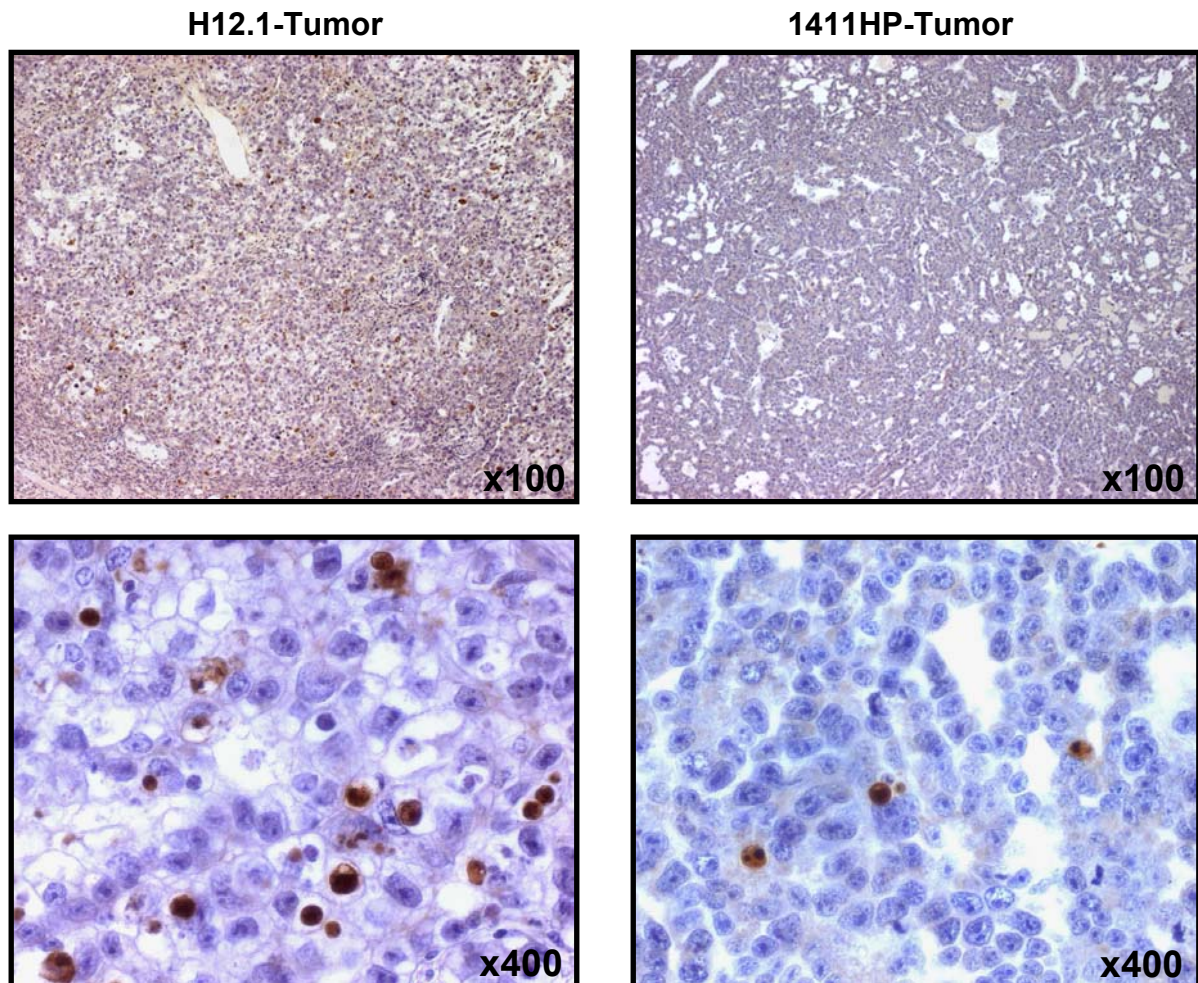


Abb. 4-4: Detektierung von apoptotischen Zellen in Tumor-Xenograften nach Cisplatin-Behandlung. Zur immunhistochemischen Identifizierung der apoptotischen Zellen wurde ein Antikörper verwendet, der nur aktive Caspase-3 detektiert. Die beiden oberen Aufnahmen mit einer 100-fachen Vergrößerung zeigen den sehr deutlichen Unterschied im Vorkommen von apoptotischen (braun gefärbten) Zellen zwischen dem sensitiven H12.1-Tumor und dem resistenten 1411HP-Tumor. Die unteren Aufnahmen mit einer 400-fachen Vergrößerung verdeutlichen die Spezifität des Antikörpers und zeigen unterschiedlich stark geschrumpfte apoptotische Zellen, die positiv für aktivierte Caspase-3 sind. Teilweise sind innerhalb dieser Zellen die ebenfalls geschrumpften oder fragmentierten Kerne zu erkennen. (Diaminobenzidin / Hämatoxylin)

4.5 Zellzyklusanalyse und Untersuchungen zur DNA-Platinierung

Nach dem derzeitigen Wissensstand ist die zytotoxische Wirkung vom Cisplatin hauptsächlich auf die Bildung von DNA-Cisplatin-Addukten und somit Schädigung der DNA zurückzuführen. Dieser Vorgang kann von der Zelle durch entsprechende Resistenzmechanismen beeinflusst werden. Eine geringere Aufnahme oder ein erhöhter Export von Cisplatin sowie Thiol-assoziierte Detoxifikationsmechanismen und eine erhöhte

Reparatur der DNA-Cisplatin-Addukte, verbunden mit begünstigenden Zellzyklusarresten, können letztendlich zur Verminderung dieser primär toxischen Läsionen führen (siehe Kapitel 1.4). Dadurch ist es möglich, dass eine bestimmte Aktivierungsschwelle zur Induktion der Apoptose nicht überschritten wird, und die Zelle die Behandlung tolerieren kann.

Eine Cisplatin-Behandlung der Tumor-tragenden Nacktmäuse führte lediglich bei sensitiven H12.1-Tumoren zu Apoptose-assoziierten Regressionen. Die resistenten 1411HP-Tumoren zeigten dagegen lediglich eine transiente Retardierung im Wachstum. Da die Vorgänge von Zellzyklusarretierungen, DNA-Reparatur und Apoptose-Induktion in der Zelle eng miteinander gekoppelt sein können (siehe Kapitel 1.4), wurde die Wirkung von Cisplatin auf Veränderungen im Zellzyklus sowie die Bildung und Reparatur von DNA-Cisplatin-Addukten in sensitiven und resistenten TKZT-Zellen analysiert.

Die sensitive Zelllinie H12.1 und die resistente Zelllinie 1411HP wurden mit einer equimolaren Cisplatin-Dosis von $30\mu\text{M}$ für 2h behandelt, einer Konzentration, die in den H12.1-Zellen Apoptose auslöst (IC90-Dosis), jedoch nicht in der resistenten Zelllinie 1411HP (siehe Kapitel 4.3). Von jeweils unbehandelten und Cisplatin-behandelten Zellpopulationen wurden DNA-Histogramme angefertigt. Wie Abbildung 4-5 zeigt, konnten keine entscheidenden Unterschiede hinsichtlich der Verteilung in den Zellzyklusphasen zwischen den sensitiven und resistenten Zellen beobachtet werden. In beiden Zelltypen erzeugte eine Cisplatin-Behandlung mit equimolarer Dosis einen ähnlichen Zellzyklusarrest in der S-Phase und in der G2/M-Phase. Der entscheidende Unterschied bestand in der Entstehung von floatierenden, apoptotischen Zellen in der sensitiven Zelllinie H12.1 (siehe Kapitel 4.3), welches im DNA-Histogramm durch den sogenannten SubG1-Peak dargestellt wird (Abb. 4 - 5). Das verdeutlicht, dass eine Cisplatin-Behandlung in den sensitiven und resistenten Zellen zu ähnlichen Zellzyklusarretierungen führt, dieses jedoch nur in den sensitiven Zellen mit der Induktion von Apoptose assoziiert ist. Die Analysen bestätigen die Annahme, dass TKZT-Zellen keinen DNA-Reparatur-begünstigenden G1/S-Zellzyklusarrest induzieren (siehe Kapitel 1.4) und zeigen darüber hinaus, dass in Cisplatin-resistenten Zellen diese Eigenschaft bestehen bleibt.

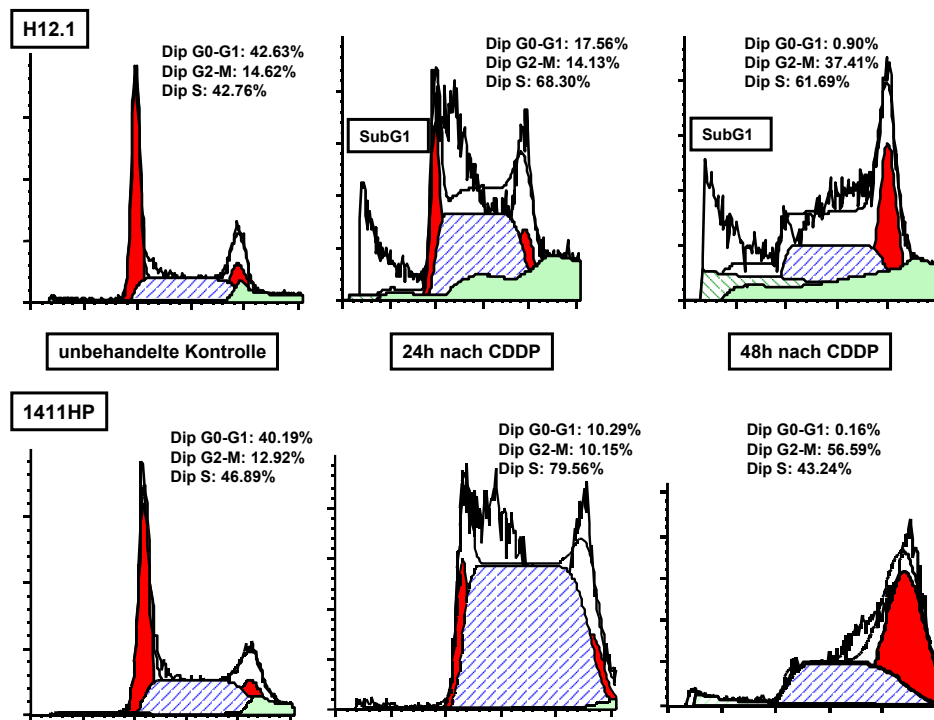


Abb. 4-5: Zellzyklusanalyse nach Cisplatin-Behandlung mit equimolarer Dosis. Die Zelllinien wurden mit 30 μ M Cisplatin für 2h behandelt, mit Spülmedium gewaschen und nach den angegebenen Inkubationszeiten gewonnen und analysiert. Die Cisplatin-Behandlung resultierte sowohl in der sensitiven Zelllinie H12.1 als auch in der resistenten Zelllinie 1411HP zu ähnlichen Zellzyklusarretierungen in der S-Phase und G2/M-Phase. In der sensitiven Zelllinie führte das gleichzeitig zur Induktion von Apoptose (SubG1-Peak).

Zur Analyse der Bildung und Reparatur von DNA-Cisplatin-Addukten wurde von allen drei Zelllinien die DNA-Platinierung im zeitlichen Verlauf nach einer Cisplatin-Behandlung von 2h gemessen. Die Zelllinien wurden mit 30 μ M Cisplatin behandelt, einer Konzentration, die in den beiden sensitiven Zelllinien H12.1 und 2102EP Apoptose auslöst (IC₉₀-Dosis), jedoch nicht in der resistenten Zelllinie 1411HP. Die DNA-Platinierung wurde unmittelbar sowie 1h, 7h und 24h nach der Cisplatin-Behandlung analysiert. Es konnte weder eine verminderte Bildung noch eine erhöhte Reparatur der DNA-Cisplatin-Addukte in der resistenten Zelllinie 1411HP beobachtet werden (Abb. 4-6). Das ähnliche Ausmaß an DNA-Cisplatin-Addukten in sensitiven und resistenten Zellen korrelierte mit der ähnlich erzielten Wirkung von Cisplatin auf den Ablauf des Zellzyklus in beiden Zelltypen (Abb. 4-5). Darüber hinaus wurde deutlich, dass dasselbe Ausmaß an DNA-Cisplatin-Addukten, welches in den sensitiven Zelllinien massiv zur Induktion von Apoptose führt, von der resistenten Zelllinie toleriert wird. Das zeigt, dass die Wirkung von Cisplatin in sensitiven und resistenten TKZT-Zellen hinsichtlich der DNA-Cisplatin-Wechselwirkung und den induzierten Zellzyklusarretierungen sehr

ähnlich ist. Die resistenten 1411HP-Zellen besitzen jedoch eine geringere Empfindlichkeit zur Induktion von Apoptose. Die Cisplatin-Resistenz der Zelllinie 1411HP ist daher nicht durch Veränderungen in derartigen Prozessen begründet, die mit dem Transport, der Aktivierung bzw. Detoxifikation sowie der DNA-Bindung/-Reparatur von Cisplatin oder mit Zellzyklus-Checkpunkten assoziiert sind. Eine Behandlung der Zelllinie 1411HP mit der entsprechenden Apoptose-induzierenden IC₉₀ Dosis von 100µM resultierte in einer etwa 10-fach erhöhten DNA-Platinierung (Abb. 4-6). Das lässt schließen, dass in den resistenten Zellen eine höhere Aktivierungsschwelle zur Induktion des apoptotischen Programms existiert und mehr zytotoxische DNA-Cisplatin-Addukte notwendig sind, um diese Schwelle zu überwinden.

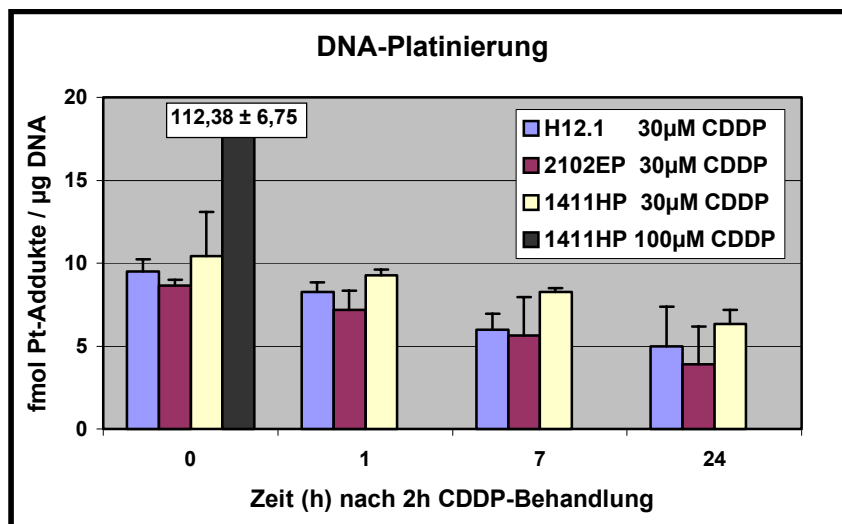


Abb. 4-6: Messung der DNA-Cisplatin-Addukte. Die Zelllinien wurden für 2h mit den angegebenen Cisplatin-Konzentrationen behandelt, mit Spülmedium gewaschen und nach den angegebenen Inkubationszeiten gewonnen. Die DNA wurde extrahiert und die Platinierung mittels kompetitiven ELISA gemessen. Die resistente Zelllinie 1411HP zeigte keine verminderte Bildung oder eine erhöhte Reparatur der DNA-Cisplatin-Addukte. (n = 3, MW ± STABW)

4.6 Expression von p53, Proteinen des MMR und der Bcl2-Familie

Auf Grund der fehlenden Unterschiede hinsichtlich der Bildung und Reparatur von DNA-Cisplatin-Addukten in sensitiven und resistenten TKZT-Zellen, wurde die Expression von Proteinen analysiert, welche für die Erkennung, Weiterleitung und Evaluierung der DNA-Schäden relevant sein können (siehe Kapitel 1.4). Dazu wurden von den Zelllinien jeweils unbehandelte und mit Cisplatin behandelte Proben auf die Expression von p53, den MMR-Proteinen MSH2 und MLH1 sowie den anti-apoptotischen Proteinen der Bcl2-Familie Bcl2 und BclXL und der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak analysiert. Wie Abbildung 4-7A zeigt, konnten diesbezüglich keine Unterschiede zwischen den beiden sensitiven Zelllinien H12.1 und 2102EP und der resistenten Zelllinie 1411HP beobachtet werden. In allen drei Zelllinien wurde p53 nach der Behandlung mit der entsprechenden IC90-Dosis von Cisplatin akkumuliert und korrelierte daher mit der Induktion von Apoptose. Die Expression der Proteine des MMR und der Bcl2-Familie wurden durch die Cisplatin-Behandlung nicht beeinflusst. Bcl2 konnte nicht detektiert werden. Die Daten bestätigten das Vorhandensein eines hohen Bax/Bcl2 Expressionsverhältnisses in TKZT-Zellen (siehe Kapitel 1.4) und zeigten, dass dieses Verhältnis auch in Cisplatin-resistenten Zellen vorliegt (Abb. 4-7A).

In einer weiteren Analyse wurde die resistente Zelllinie 1411HP zusätzlich mit der IC90-Cisplatin-Dosis der sensitiven Zelllinien behandelt. Eine derartige Cisplatin-Behandlung resultierte lediglich in einer marginalen Akkumulation von p53 (Abb. 4-7B). In Bezug auf die vorangegangenen Analysen zur Apoptose, DNA-Platinierung und zum Zellzyklus ergibt sich der folgende Zusammenhang: Die Cisplatin-Behandlung mit einer equimolaren Dosis (IC90-Dosis der sensitiven Zelllinien) führt sowohl in sensitiven als auch in resistenten TKZT-Zellen zu einer gleichwertigen DNA-Platinierung, gefolgt von einer gleichartigen Zellzyklusarretierung. Diese DNA-Platinierung führt jedoch nur in den sensitiven Zelllinien zur deutlichen p53-Akkumulation und Apoptose-Induktion, wohingegen in der resistenten Zelllinie p53 kaum akkumuliert wird und es zu keiner Apoptose-Induktion kommt. Die Behandlung der resistenten Zelllinie mit der equitoxischen IC90-Cisplatin-Dosis führt schließlich zur deutlichen p53-Akkumulation und Apoptose-Induktion (Abb. 4-7A und B). Das lässt schließen, dass die Cisplatin-induzierten Arretierungen im Zellzyklus der TKZT-Zellen von p53 unabhängig sind bzw. eine geringe p53-Akkumulation ausreicht, jedoch für die Induktion der Apoptose eine deutliche Akkumulation von p53 erforderlich zu sein scheint.

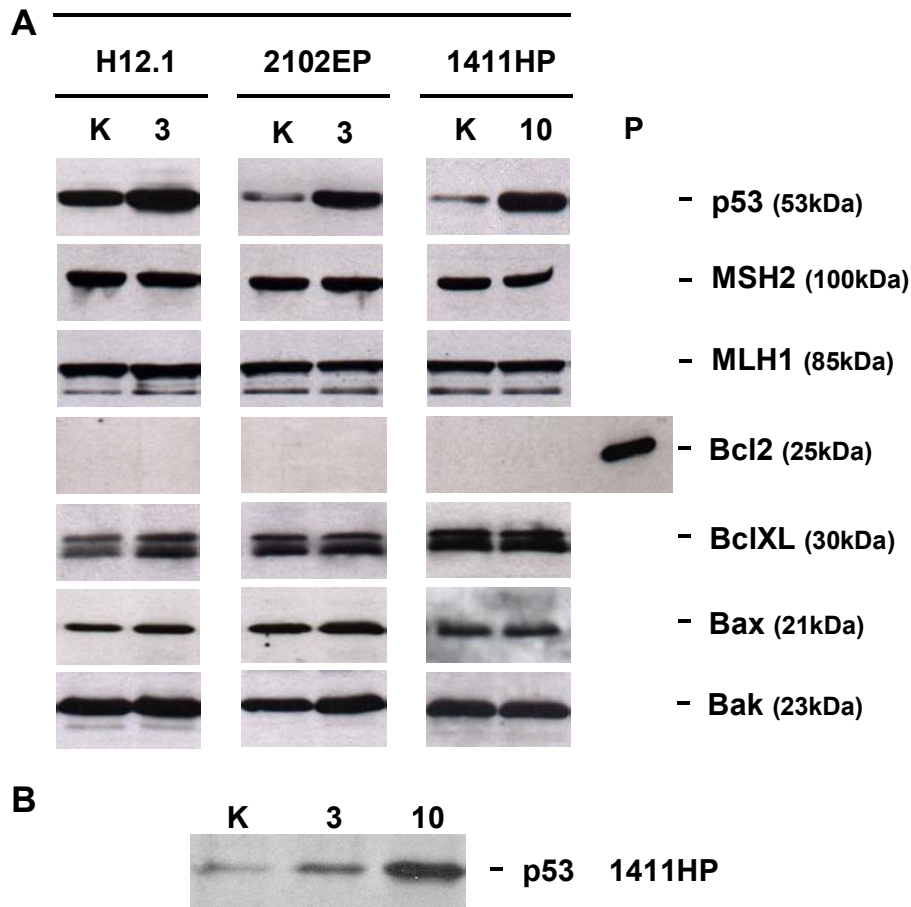


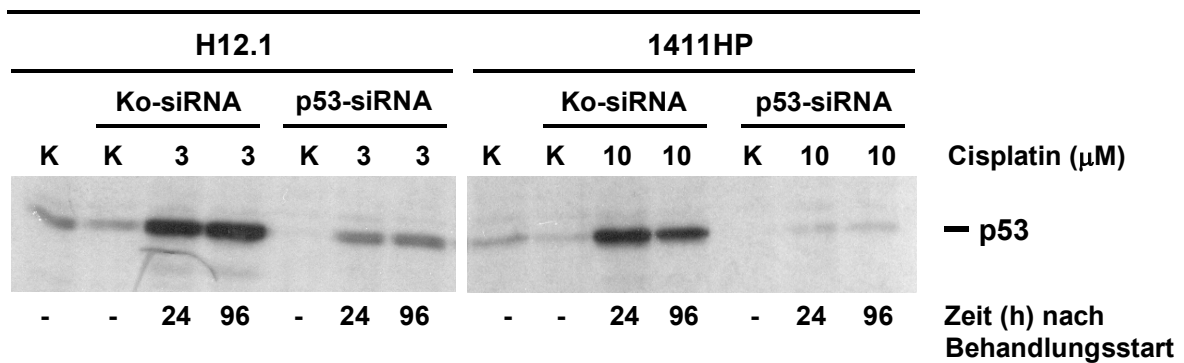
Abb. 4-7: Einfluss von Cisplatin auf die Expression von p53, MSH2, MLH1, Bcl2, BclXL, Bax und Bak. **(A):** Die Zelllinien wurden mit der entsprechenden IC90-Dosis von Cisplatin behandelt (H12.1/ 2102EP - 3 μ M, 1411HP - 10 μ M) und zusammen mit unbehandelten Kontrollen (K) nach 24h gewonnen. Die Expression der Proteine wurde mittels Western-Blotting analysiert. (P – Positivkontrolle für Bcl2) **(B):** Zusätzlich wurde die resistente Zelllinie 1411HP mit der IC90-Dosis der sensitiven Zelllinien behandelt und analysiert. Eine Cisplatin-Behandlung mit der equitoxischen IC90-Dosis führte in den sensitiven Zelllinien H12.1 und 2102EP sowie in der resistenten Zelllinie 1411HP zu einer deutlichen Akkumulation von p53 (A). Die Expression der Proteine MSH2, MLH1, Bcl2, BclXL, Bax und Bak wurde durch die Cisplatin-Behandlung nicht beeinflusst (A). Die Cisplatin-Behandlung der resistenten Zelllinie 1411HP mit der IC90-Dosis der sensitiven Zelllinien resultierte in einer marginalen p53-Akkumulation im Gegensatz zur Behandlung mit der entsprechenden equitoxischen IC90-Dosis (B). Eine deutliche Akkumulation von p53 ist daher mit der Induktion von Apoptose assoziiert.

4.7 Analyse zur Funktion von p53

Die allgemein anerkannte wichtige Rolle von p53 hinsichtlich der Reaktion von Zellen auf genotoxischen Stress sowie die noch uneindeutige Rolle von p53 für die Cisplatin-Sensitivität von TKZT in Verbindung mit den Beobachtungen in Abbildung 4-7 waren der Anlass für eine genaue Analyse der Funktion von p53 in TKZT-Zellen. Zu diesem Zweck wurde die siRNA-Technik etabliert. Die Versuchsbedingungen wurden in mehreren Schritten dahingehend optimiert, dass für die gesamte Dauer eines SRB-Zytotoxizitäts-Assays die Cisplatin-induzierte p53-Akkumulation verhindert wird. Die Optimierung erfolgte auf der Grundlage der jeweiligen IC90-Dosis von Cisplatin. Eine Cisplatin-Behandlung mit der IC90-Dosis resultiert in einer deutlichen Akkumulation von p53 (Abb. 4-7), welches mit der Induktion von Apoptose assoziiert ist und schließlich zu der 90%igen Reduktion des Zellwachstums führt (siehe Kapitel 4.2/ 4.3). Die sensitive Zelllinie H12.1 und die resistente Zelllinie 1411HP wurden mit p53-spezifischer- bzw Kontroll-siRNA transfiziert und ein Teil der Zellen nach 24h gewonnen. Des Weiteren wurden transfizierte Zellpopulationen mit der jeweiligen IC90-Dosis von Cisplatin behandelt und 24h und 96h nach Behandlungsstart gewonnen. Die Expression und Cisplatin-induzierte Akkumulation von p53 wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Wie Abbildung 4-8A zeigt, konnte durch einen siRNA-vermittelten *Knock-down* von p53 die Cisplatin-induzierte p53-Akkumulation für vier Tage blockiert und die p53-Proteinmenge auf dem Level der unbehandelten Kontrolle gehalten werden. Unter diesen Bedingungen wurden SRB-Assays durchgeführt. Sowohl in sensitiven als auch in resistenten TKZT-Zellen hatte eine fehlende p53-Akkumulation keinen modulierenden Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von Cisplatin (Abb. 4-8B). Weder im unteren Kurvenbereich der Apoptose-induzierenden IC90-Dosis noch bei geringeren Cisplatin-Konzentrationen, welche vorrangig Wachstumsinhibierungen erzeugen, konnten signifikante Unterschiede beobachtet werden. Das verdeutlicht, dass sowohl die zytostatischen als auch die zytoreduktiven Effekte von Cisplatin in TKZT-Zellen p53-unabhängig sind. Darüber hinaus zeigen die Daten, dass eine fehlende Akkumulation von p53 keine Cisplatin-Resistenz induziert.

Die Untersuchungen zur DNA-Platinierung, der Expression von MMR-Proteinen sowie der p53-Akkumulation lassen schließen, dass die Mechanismen, die eine Sensitivität bzw. Resistenz von TKZT-Zellen gegenüber Cisplatin determinieren, außerhalb des nukleären Kompartiments ablaufen.

A



B

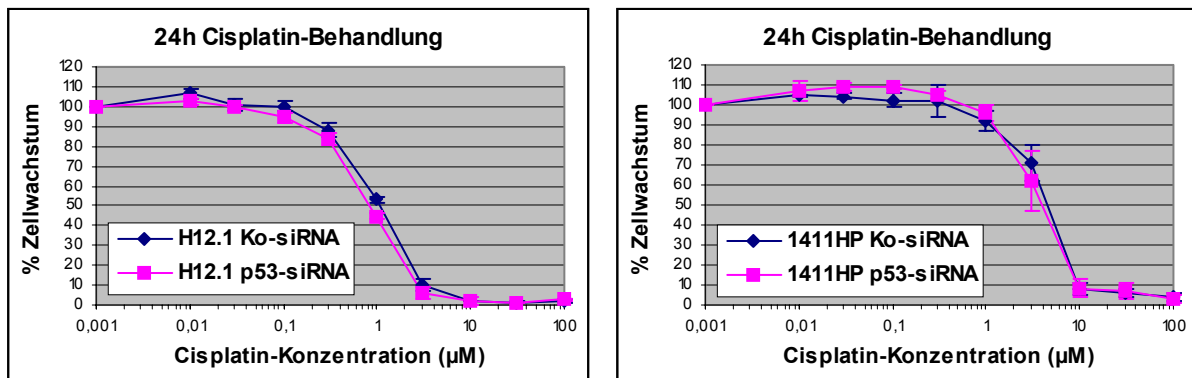


Abb. 4-8: Einfluss des siRNA-vermittelten *Knock-down* von p53 auf die Cisplatin-Sensitivität. Die Cisplatin-sensitive Zelllinie H12.1 und die resistente Zelllinie 1411HP wurden mit p53-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. **(A):** Jeweils siRNA-transfizierte Zellen wurden mit der entsprechenden IC90-Dosis von Cisplatin behandelt und die adherenten Zellen nach den entsprechenden Zeiten gewonnen (K - unbehandelte Kontrollen). Die p53-Expression bzw. -Akkumulation wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. **(B):** Für eine Analyse der Cisplatin-Sensitivität wurde der SRB-Zytoxizitäts-Assay durchgeführt. (n = 3, MW \pm STABW) Die Transfektion mit p53-spezifischer siRNA führte zu einer Reduktion der basalen p53-Expression und resultierte in einer fehlenden Cisplatin-induzierten Akkumulation von p53 in beiden TKZT-Zelllinien (A). Eine fehlende p53-Akkumulation zeigte sowohl in sensitiven als auch in resistenten TKZT-Zellen keinen modulierenden Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von Cisplatin (B).

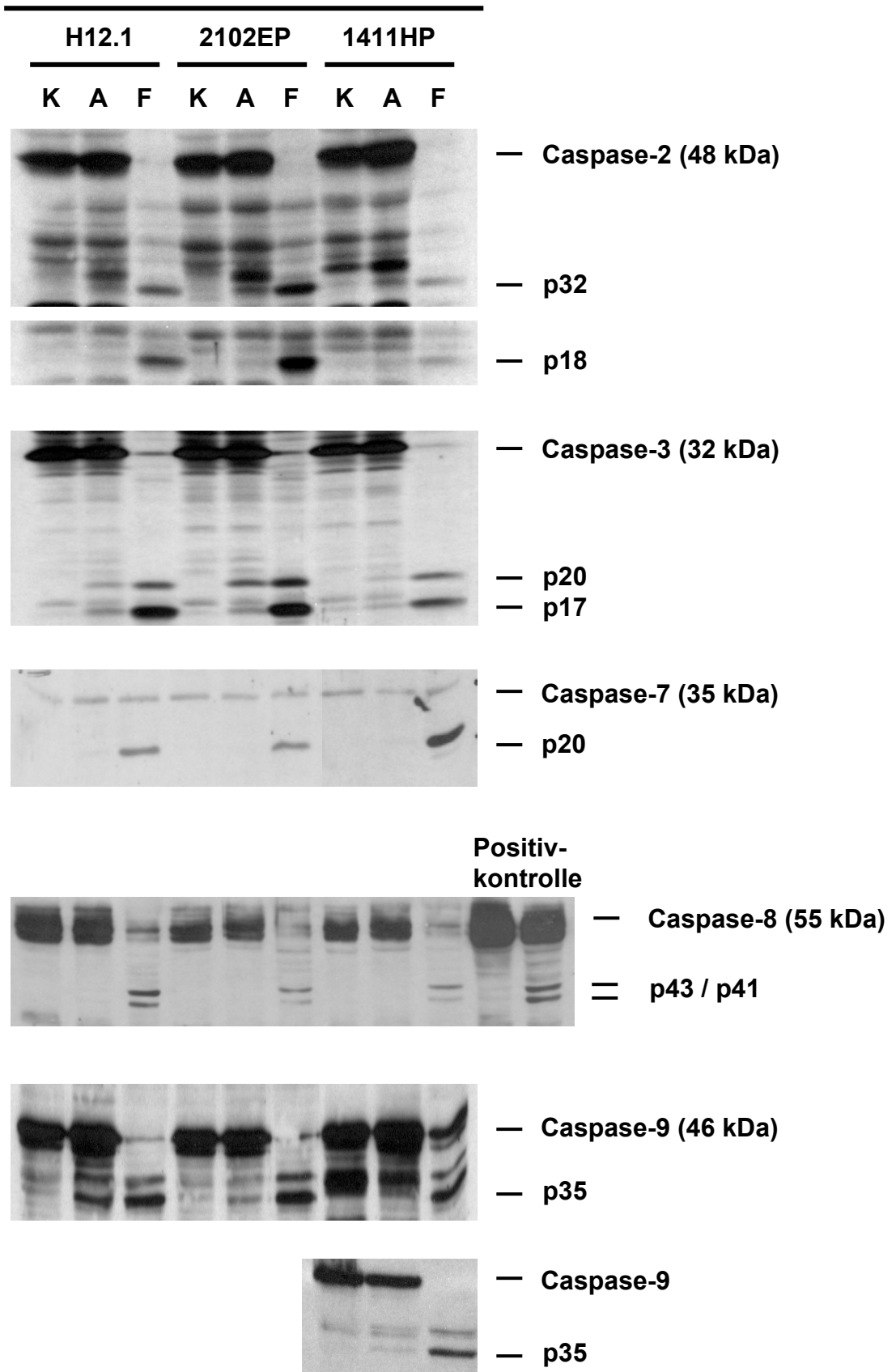
4.8 Spaltung und Aktivierung von Caspasen nach Cisplatin-Behandlung

Eine Hauptkomponente der apoptotischen Maschinerie ist das proteolytische System der Caspasen (siehe Kapitel 1.5). Auf Grund der verminderten Fähigkeit zur Apoptose-Induktion in den 1411HP-Tumorzellen, wurde die Expression und Spaltung bzw. Aktivierung der Apoptose-relevanten Caspasen -2, -3, -7, -8 und -9 untersucht. Die Zelllinien wurden mit der entsprechenden, Apoptose-induzierenden IC90-Dosis von Cisplatin für 24h behandelt und zusammen mit unbehandelten Kontrollen gewonnen. Von den behandelten Zellen wurden sowohl die adherenten als auch die floatierenden Zellen analysiert. Durch eine Cisplatin-Behandlung mit der IC90-Dosis sterben nahezu alle Zellen schließlich durch Apoptose ab. Die meisten Zellen verbleiben nach der 24h-Behandlung zunächst adherent, bis diese in der darauf folgenden Zeit den Zellmonolayer als floatierende, apoptotische Zellen verlassen. Die behandelten, noch adherenten Zellen zeigen keinen apoptotischen Phänotyp. Jedoch sind diese bereits „committed“ und repräsentieren eine Zellfraktion, die sich in einer frühen Phase des apoptotischen Prozesses befindet. Im Gegensatz dazu repräsentieren die floatierenden Zellen eine Zellfraktion in einem späten apoptotischen Stadium und zeigen typische Charakteristika der Apoptose (siehe Abb. 4-3). Diese Zellen wurden als Positivkontrolle für die gespaltenen/ aktivierten Formen der Caspasen in der Western-Blot-Analyse verwendet. Andererseits sollten die behandelten, noch adherenten Zellen hinsichtlich der Initiation des apoptotischen Programms eine Relevanz besitzen. Wie Abbildung 4-9A zeigt, wurde in allen drei Zelllinien jede getestete Caspase exprimiert. Ebenfalls wurde jede Caspase im Verlauf des apoptotischen Programms gespalten, welches durch die Abnahme der Procaspasen und/oder die Detektierung der Spaltungsprodukte in den floatierenden Zellen erkennbar wird (Abb. 4-9A). Die gespaltenen/ aktivierten Formen der Caspasen -2 und -3 konnten bereits in den adherenten Zellen detektiert werden. Jedoch war der Trend zur Entstehung der Spaltungsprodukte beider Caspasen in der resistenten Zelllinie 1411HP verringert. Das wird durch einen Vergleich der jeweiligen floatierenden Zellen deutlich (Abb. 4-9A). Besonders ausgeprägt zeigte sich der Unterschied zwischen den sensitiven und resistenten Zellen hinsichtlich der Caspase-3-Aktivierung. Hier konnten bereits in den adherenten Zellen deutliche Differenzen beobachtet werden. So wurde in den sensitiven Zellen das p20-Fragment sowie das reifere p17-Fragment gebildet (Abb. 4-9A). In den resistenten Zellen wurde ebenfalls das p20-Fragment gebildet, jedoch in einem geringeren Ausmaß. Eine signifikante Anreicherung des p17-Fragments konnte dagegen erst in den floatierenden Zellen

der resistenten Zelllinie beobachtet werden (Abb. 4-9A). Das deutet darauf hin, dass in den resistenten Zellen die Aktivierung der Caspasen -2 und -3 verzögert oder inhibiert wird. Die Spaltung/ Aktivierung der Caspasen -7 und -8 wurde sowohl in den sensitiven Zelllinien als auch in der resistenten Zelllinie erst in den floatierenden Zellen beobachtet (Abb. 4-9A). Da Caspase-8 eine potentielle Initiator-Caspase darstellt, wurde eine zusätzliche Positivkontrolle in die Untersuchungen einbezogen. Die Kolonkarzinom-Zelllinie DLD-1 wurde mit 200ng/ml TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) behandelt. TRAIL induziert in TRAIL-Rezeptor-tragenden Zellen Apoptose über Caspase-8 (Bodmer et al., 2000). Nach 45 min, vor Auftreten von floatierenden Zellen, wurden die behandelten DLD-1-Zellen und eine unbehandelte Kontrolle gewonnen und zusammen mit den TKZT-Zelllinien analysiert. Wie zu erwarten, entstanden bei der Caspase-8-vermittelten Apoptose die entsprechenden Spaltungsprodukte bereits in den adherenten Zellen (Abb. 4-9A). Das lässt schließen, dass Caspase-8 während der Initiation der Cisplatin-induzierten Apoptose in den TKZT-Zellen keine entscheidende Rolle spielt. Im Gegensatz dazu konnte die Spaltung/ Aktivierung der potentiellen Initiator-Caspase-9 bereits in den adherenten Zellen detektiert werden. Im Falle der resistenten Zelllinie 1411HP wurde das aktive p35-Fragment zunächst nicht detektiert, konnte jedoch unter Verwendung eines anderen Antikörpers schließlich nachgewiesen werden (Abb. 4-9A).

Die Aktivierung der Caspasen -2, -3 und -9 in den adherenten Zellen wurde mittels Caspase-Assays unter Verwendung der spezifischen Peptid-Substrate überprüft. Es konnten signifikante Aktivitäten der Caspasen -2 und -3 in den sensitiven H12.1-Zellen als auch in den resistenten 1411HP-Zellen gemessen werden (Abb. 4-9B). Jedoch waren die Aktivitäten beider Caspasen in den resistenten Zellen deutlich geringer. Das unterschiedliche Aktivitätsmuster der Caspasen in sensitiven und resistenten Zellen korrelierte mit dem unterschiedlichen Spaltungsmuster in der Western-Blot-Analyse (Abb. 4-9A). Eine signifikante Aktivität der potentiellen Initiator-Caspase-9 konnte in den sensitiven H12.1-Zellen, jedoch nicht in den resistenten 1411HP-Zellen beobachtet werden (Abb. 4-9B). Das zeigt, dass eine vollständige Aktivierung der Caspase-9 in den resistenten 1411HP-Zellen inhibiert wird. Es wird vermutet, dass die Inhibierung der Caspase-9-Aktivierung in den 1411HP-Zellen mit der verminderten Fähigkeit zur Apoptose-Induktion assoziiert ist. Folglich müsste die apoptotische Kaskade in den resistenten 1411HP-Zellen durch einen zusätzlichen, möglicherweise Caspase-9 unabhängigen Pathway gestartet werden, der jedoch erst bei einem stärkeren DNA-Schaden (Behandlung mit hoher Cisplatin-Dosis) ausgelöst wird.

A



B

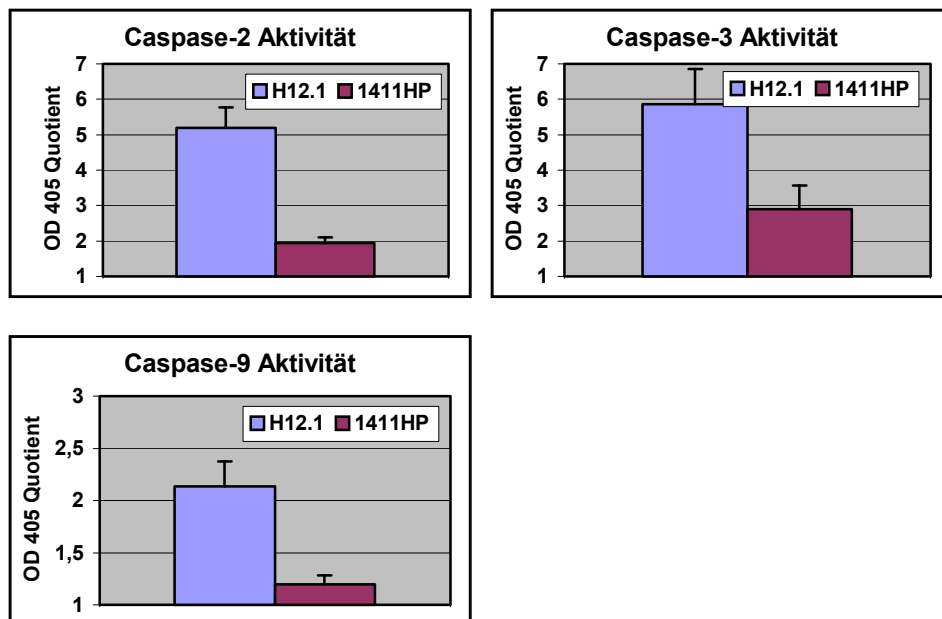


Abb. 4-9: Spaltung und Aktivierung der Caspasen. Die Zelllinien wurden mit der entsprechenden IC₉₀-Dosis von Cisplatin (H12.1/ 2102EP - 3 μ M, 1411HP - 10 μ M) für 24h behandelt und gewonnen. **(A):** Es wurden unbehandelte Kontrollen (K) sowie behandelte adherente (A) und behandelte floatierende Zellen (F) mittels Western-Blotting analysiert. Die mit „p“ gekennzeichneten Spaltungsprodukte entsprechen den aktiven Fragmenten der Caspasen. **(B):** Die Aktivitäten der Caspasen -2, -3 und -9 in den behandelten, adherenten Zellen relativ zur unbehandelten Kontrolle wurde mittels Caspase-Assay gemessen. (n = 4, MW \pm STABW)
Die Cisplatin-Behandlung mit der entsprechenden IC₉₀-Dosis resultierte in einer Spaltung (A) und Aktivierung (B) der Caspasen -2 und -3 in den sensitiven Tumorzellen sowie auf niedrigerem Level in den resistenten Tumorzellen. Eine Spaltung und damit verbundene Aktivierung der potentiellen Initiator-Caspase-9 konnte lediglich in den sensitiven Tumorzellen beobachtet werden (A) und (B). Die Spaltung der Caspase-7 und der potentiellen Initiator-Caspase-8 erfolgte in einem späteren apoptotischen Stadium und konnte erst in den floatierenden Zellen beobachtet werden (A).

4.9 Untersuchungen zur Aktivierung und Funktion von Caspase-9

Um die Konsequenz einer Inhibierung der Caspase-9-Aktivierung zu untersuchen, wurde die Aktivierung der Caspase-9 in sensitiven TKZT-Zellen mit dem spezifischen Caspase-9-Peptid-Inhibitor Z-LEHD-Fmk blockiert. Eine Inhibierung der Caspase-9 in den sensitiven H12.1-Zellen blockierte das Behandlungs-assoziierte Entstehen von floatierenden, apoptotischen Zellen nach einer Behandlung mit 3 μ M Cisplatin für 24h (IC₉₀ der sensitiven Zelllinien). Diese Cisplatin-Dosis führte normalerweise in den H12.1-Zellen konsequent zur Induktion von Apoptose, jedoch nicht in den 1411HP-Zellen (siehe Abb. 4-3). Wie Abbildung

4-10A zeigt, hatte die Blockierung der Caspase-9-Aktivierung in den H12.1-Zellen eine fehlende Aktivierung der Caspasen -2 und -3 zur Folge. Das deutete auf eine entscheidende Rolle der Caspase-9 als Initiator-Caspase während der Cisplatin-induzierten Apoptose in den sensitiven Zellen hin. Durch die Inhibierung der Caspase-9 zeigten die H12.1-Zellen einen ähnlichen resistenten Phänotyp im SRB-Assay wie die primär resistenten 1411HP-Zellen (Abb. 4-10B). Eine Behandlung der Caspase-9-blockierten H12.1-Zellen mit 10 μ M Cisplatin für 24h (IC90 der resistenten Zelllinie) führte zur Entstehung von floatierenden, apoptotischen Zellen. Ähnlich wie in den resistenten 1411HP-Zellen, war das mit einer Aktivierung der Caspasen -2 und -3 assoziiert (Abb. 4-10A und B). Das zeigte, dass eine Inhibierung der Caspase-9-Aktivierung in den sensitiven Zellen nicht endgültig Apoptose verhindern kann, jedoch in einer höheren Aktivierungsschwelle für das apoptotische Programm resultiert. Demzufolge ist eine höhere DNA-Platinierung zur Initiation der apoptotischen Kaskade notwendig und es liegt folglich eine Cisplatin-Resistenz vor. Die Western-Blot-Analyse bestätigte, dass Caspase-9 in den Inhibitor-behandelten H12.1-Zellen nach einer Cisplatin-Behandlung mit 3 μ M nicht gespalten wurde (Abb. 4-10C). Das lässt schließen, dass es in den sensitiven Zellen normalerweise zu einer Autoaktivierung der Caspase-9 kommt. Die Behandlung mit 10 μ M Cisplatin resultierte in einer Spaltung von Caspase-9 (Abb. 4-10C), jedoch konnte keine Aktivität gemessen werden (Abb. 4-10A). Das lässt vermuten, dass Caspase-9 durch einen anderen Faktor gespalten wird und auf Grund des Inhibitors nicht enzymatisch aktiv ist. Wie in den primär resistenten 1411HP-Zellen wird in den Caspase-9-blockierten H12.1-Zellen die Apoptose wahrscheinlich durch einen zusätzlichen, Caspase-9-unabhängigen Mechanismus ausgelöst. Eine weitere Parallele zwischen den beiden Zelltypen bestand hinsichtlich der Aktivitäten der Caspasen -2 und -3. Im Vergleich zu den H12.1-Zellen zeigten die Caspase-9-blockierten H12.1-Zellen deutlich geringere Aktivitäten für beide Caspasen, welche mit denen der 1411HP-Zellen vergleichbar waren (Abb. 4-10A und B). Das lässt schließen, dass eine Blockierung der Caspase-9-Aktivierung einen Einfluss auf die Aktivierung der gesamten Caspasen-Kaskade hat, wahrscheinlich auf Grund fehlender Amplifikationsloops. Die Behandlung mit einer hohen Cisplatin-Dosis überwindet die Caspase-9-Blockierung, so dass die Caspasen -2 und -3 unabhängig von Caspase-9 und weniger stark aktiviert werden und schließlich Apoptose ausgelöst wird. Durch die Inhibierung der Caspase-9 in den sensitiven Zellen konnte daher eine bestimmte intrazelluläre Situation nachvollzogen werden, die in den resistenten Zellen primär vorliegt.

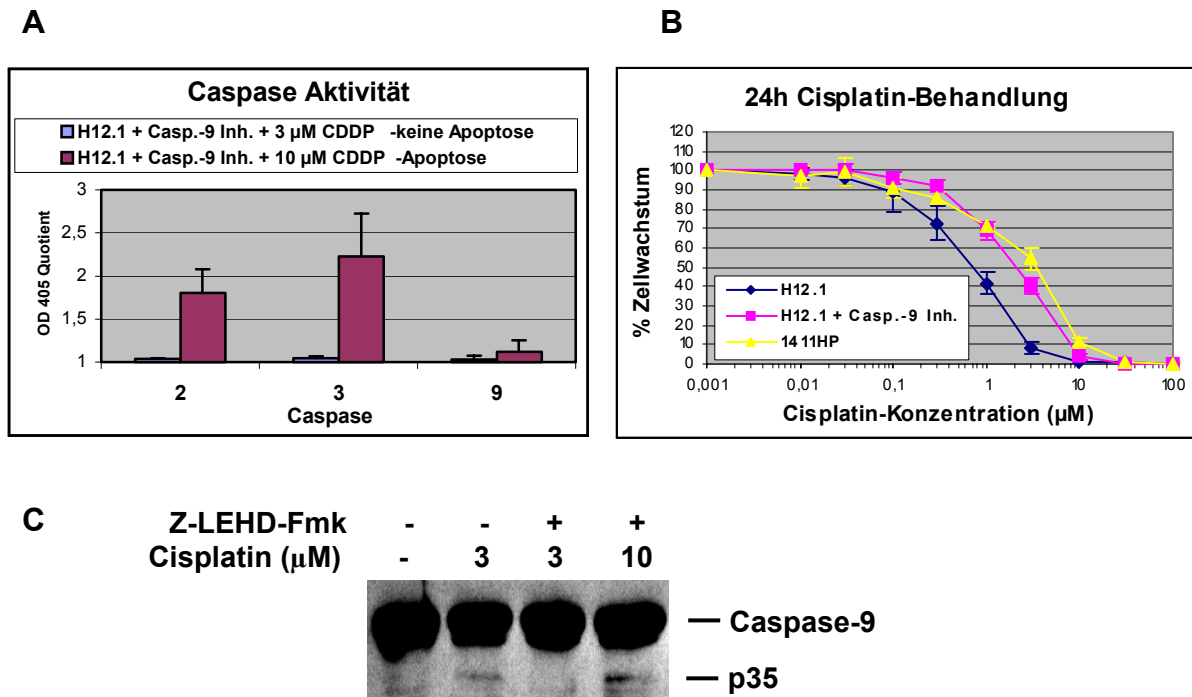


Abb. 4-10: Inhibierung der Aktivierung von Caspase-9 in sensitiven H12.1-Zellen. **(A)** und **(C)**: Die Zelllinie H12.1 wurde in Anwesenheit des spezifischen Caspase-9-Inhibitors Z-LEHD-Fmk mit 3 μ M und 10 μ M Cisplatin für 24h behandelt und jeweils adherente Zellen wurden mittels **(A)** Caspase-Assay und **(C)** Western-Blot-Analyse untersucht. **(B)**: SRB-Zytoxizitäts-Assay der Zelllinie H12.1 in An- und Abwesenheit von Z-LEHD-Fmk. Zum Vergleich wurde die primär resistente Zelllinie 1411HP mit abgebildet.

(n = 3, MW \pm STABW)

Die Inhibierung der Caspase-9 resultierte in einer fehlenden Spaltung **(C)** und Aktivierung **(A)** von Caspase-9 sowie in einer fehlenden Aktivierung der Caspasen -2 und -3 **(A)** nach einer Behandlung mit 3 μ M Cisplatin. Das blockierte ein Entstehen von floatierenden, apoptotischen Zellen und resultierte in einer Cisplatin-Resistenz, vergleichbar zur Zelllinie 1411HP **(B)**. Die Behandlung der Caspase-9-blockierten H12.1-Zellen mit 10 μ M Cisplatin führte zur Spaltung der Caspase-9 **(C)** und zu Apoptose, jedoch wurden, ähnlich zur resistenten Zelllinie 1411HP, lediglich Caspase-2 und -3 aktiviert **(A)**.

Zur weiteren Abklärung der Stellung von Caspase-9 in der Cisplatin-induzierten Apoptose von TKZT-Zellen wurde der Peptid-Inhibitor Z-VAD-Fmk verwendet, welcher eine höhere Affinität zu Effektor-Caspasen besitzt (Garcia-Calvo et al., 1998). Eine Behandlung mit diesem Caspase-Inhibitor führte ebenfalls zur Blockierung der Apoptose-Induktion in den sensitiven Zellen nach einer Behandlung mit 3 μ M Cisplatin. Wie Abbildung 4-11 zeigt, war das mit einer fehlenden Aktivierung der Caspase-3 assoziiert. Im Gegensatz dazu konnte das aktive Fragment von Caspase-9 detektiert werden (Abb.4-11). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Aktivierung der Caspase-9 das initiales Ereignis in der Cisplatin-induzierten Apoptose darstellt, jedoch die Aktivierung der Caspase-3 für den Ablauf des apoptotischen Programms notwendig ist.

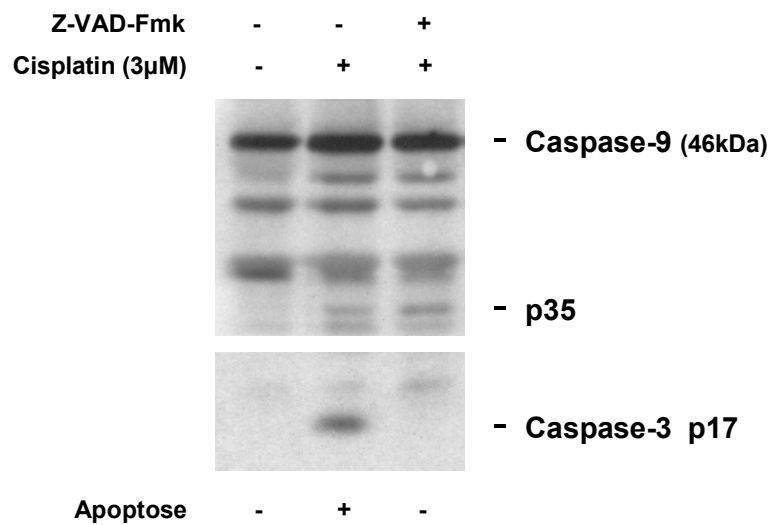


Abb. 4-11: Inhibierung der Aktivierung von Caspase-3. Die Zelllinie H12.1 wurde in Ab- und Anwesenheit des Caspase-Inhibitors Z-VAD-Fmk mit 3 µM Cisplatin für 24h behandelt und jeweils adherente Zellen wurden zusammen mit unbehandelten Kontrollen (K) mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

Die Inhibitor-Behandlung resultierte in einer fehlenden Spaltung von Caspase-3 und blockierte ein Entstehen von floatierenden, apoptotischen Zellen. Dagegen konnte das aktive Fragment der Caspase-9 detektiert werden.

Eine Caspase-9-vermittelte Apoptose wird über die Bildung des Apoptosoms initiiert (siehe Kapitel 1.5). Die Voraussetzung ist eine Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium in das Zytosol und die dadurch ermöglichte Interaktion des Adapterproteins Apaf-1 mit der Caspase-9. Für eine Analyse beider Vorgänge wurden die TKZT-Zelllinien mit der entsprechenden IC90-Dosis von Cisplatin behandelt und zusammen mit unbehandelten Kontrollen gewonnen. Die resistente Zelllinie 1411HP wurde zusätzlich mit der IC90-Dosis der sensitiven Zelllinien behandelt. Von den Zellproben wurden jeweils zytosolische Fraktionen isoliert und auf das Vorhandensein von Cytochrom c analysiert. Des Weiteren wurden Immunpräzipitationen von Caspase-9 durchgeführt. Wie Abbildung 4-12A zeigt, hatte in sensitiven und in resistenten Zellen eine Cisplatin-Behandlung mit der entsprechenden IC90-Dosis die Freisetzung von Cytochrom c zur Folge. Das korrelierte mit der Spaltung der Caspase-9 (Abb. 4-12B). Die Behandlung der resistenten Zelllinie mit der IC90-Dosis der sensitiven Zelllinien führte ebenfalls zur Freisetzung von Cytochrom c, der wesentlich geringere Anstieg war jedoch mit keiner Spaltung der Caspase-9 assoziiert (Abb. 4-12). Das apoptotische Adapterprotein Apaf-1 konnte in jedem Fall zusammen mit Caspase-9 immunpräzipitiert werden (Abb. 4-12C). Dabei zeigte sich, dass beide Proteine bereits in unbehandelten Zellen interagieren, wobei die Behandlung mit der jeweiligen IC90-

Cisplatin-Dosis zur weiteren Akkumulation von Apaf-1 führte. Diese pro-apoptotische Konstellation könnte ein weiterer Faktor für die generelle hohe Sensitivität von TKZT-Zellen sein. Jedoch bleibt diese Eigenschaft in resistenten TKZT-Zellen erhalten (Abb. 4-12).

Die erstellten Daten lassen schließen, dass bereits auf der regulatorischen Ebene des Mitochondriums bestimmte anti-apoptotische Faktoren in den resistenten Zellen die Freisetzung von Cytochrom c hemmen. Hinzu kommt eine Hemmung der Aktivierung und Aktivität der Caspase-9, wahrscheinlich durch andere anti-apoptotische Proteine, welche direkt mit Caspase-9 interagieren. Des Weiteren wird die Aktivierung der Caspase-3, welche zum Ablauf des apoptotischen Programms notwendig ist, durch die fehlende Caspase-9-Aktivität gehemmt. Diese intrazelluläre Konstellation scheint eine höhere Aktivierungsschwelle zur Induktion des apoptotischen Programms zur Folge zu haben, so dass die resistenten Zellen eine Behandlung mit einer niedrigen Cisplatin-Dosis tolerieren können.

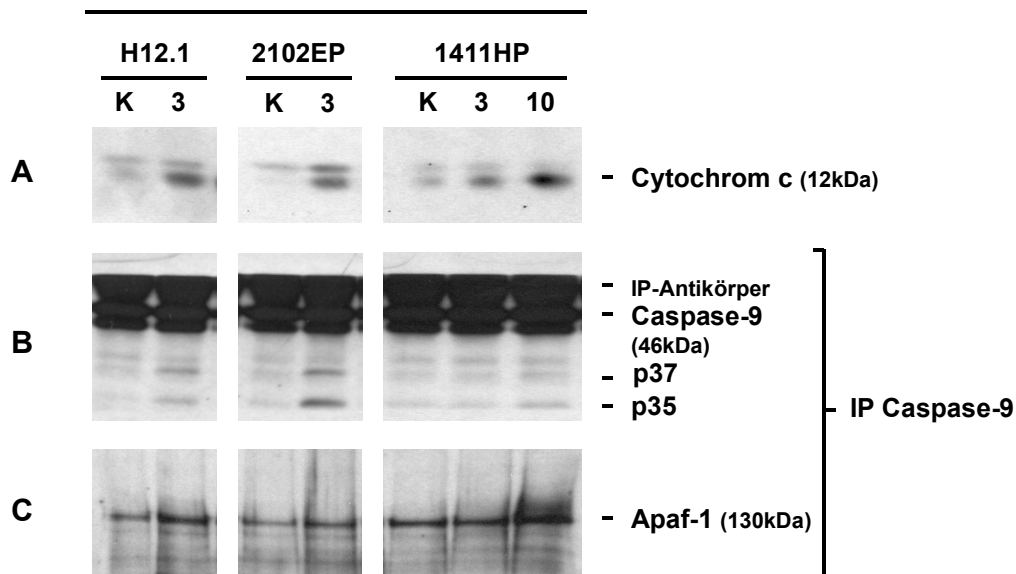


Abb. 4-12: Freisetzung von Cytochrom c und Interaktion von Caspase-9 und Apaf-1. Die Zelllinien wurden mit der entsprechenden IC90-Dosis von Cisplatin (H12.1/ 2102EP - 3 μ M, 1411HP - 10 μ M) für 24h behandelt und die adherenten Zellen zusammen mit unbehandelten Kontrollen (K) gewonnen. Die resistente Zelllinie 1411HP wurde zusätzlich mit der IC90-Dosis der sensitiven Zelllinien behandelt. **(A):** Zytosolische Fraktionen wurden mittels Western-Blotting auf das Vorhandensein von Cytochrom c analysiert. **(B)** und **(C):** Mit den Zytosolischen Fraktionen wurde eine Immunpräzipitation von Caspase-9 (IP Caspase-9) durchgeführt und die Präzipitate mittels Western-Blotting analysiert.

Eine Behandlung mit der entsprechenden IC90-Dosis führte in sensitiven und resistenten Zellen zur Freisetzung von Cytochrom c (A) und korrelierte mit der Spaltung der Caspase-9 (B). Die Behandlung der resistenten Zelllinie 1411HP mit der IC90-Dosis der sensitiven Zelllinien führte zu einer geringen Freisetzung von Cytochrom c (A) und war nicht mit einer Spaltung der Caspase-9 assoziiert (B). Das apoptotische Adapterprotein Apaf-1 wurde in jedem Fall zusammen mit Caspase-9 immunpräzipitiert (C).

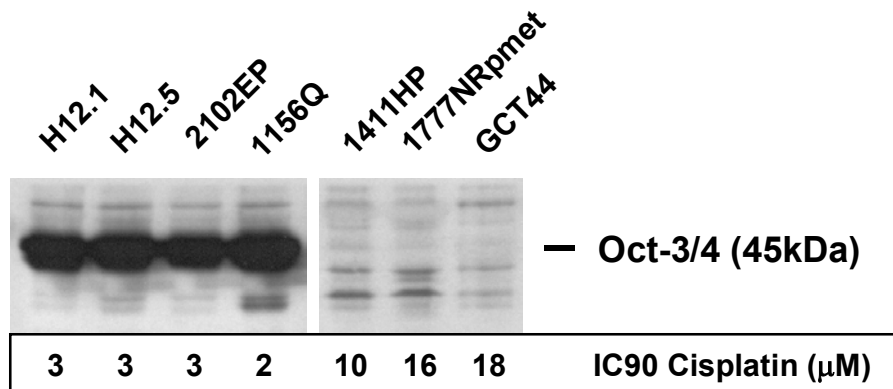
4.10 Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4

In den vorangegangenen Untersuchungen konnten auf molekularer Ebene Unterschiede in der Regulation von apoptotischen Mediatoren in TKZT-Zelllinien analysiert werden, welche mit einer Cisplatin-Resistenz assoziiert waren. Die histologischen Analysen der von den Zelllinien abgeleiteten Nacktmaus-Tumoren lassen dagegen auf zellulärer bzw. morphologischer Ebene bezüglich einer Cisplatin-Resistenz keine Voraussagen zu (siehe Tabelle 2-1). Sowohl sensitive als auch resistente Zelllinien formen als Xenografte in der Nacktmaus typische nichtseminomatöse Keimzelltumoren in Übereinstimmung mit entsprechenden klinischen Beschreibungen. Diese bestehen aus undifferenzierten EC-Zellen mit oder ohne somatisch (TE) oder extra-embryonal (YS/CC) differenzierten Komponenten (siehe Kapitel 1.1). Eine beschriebene klinische Beobachtung ist die Chemotherapie-Resistenz von reifen Teratomen, deren Resistenz jedoch durch die vollständige Differenzierung in somatisches Gewebe bedingt ist und als dieses auch histologisch identifiziert wird (siehe Kapitel 1.4). Andere Studien zeigen, dass TKZT mit YST-Histologien öfter eine Chemotherapie-Resistenz zeigen oder entwickeln (Logothetis et al., 1984; Saxman et al., 1991). Es kann daher vermutet werden, dass bei der Etablierung einer Chemotherapie-Resistenz in nichtseminomatösen TKZT auch Differenzierungsprozesse eine Rolle spielen könnten. Eine Besonderheit von Keimzelltumoren ist die Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4, welcher ausschließlich in dieser Tumorentität exprimiert wird (siehe Kapitel 1.3). Innerhalb der nichtseminomatösen TKZT beschränkt sich die Expression auf die undifferenzierten EC-Zellen, wohingegen somatisch differenzierte TE- und extraembryonal differenzierte YST- und CC- Komponenten keine Oct-3/4-Expression zeigen. Oct-3/4 stellt damit einen typischen Marker für die pluripotenten EC-Zellen dar (Looijenga et al., 2003a).

Die Expression von Oct-3/4 wurde in den TKZT-Zelllinien mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Für diese Analysen konnte das Zelllinien-Panel um vier weitere TKZT-Zelllinien ergänzt werden. Wie Abbildung 4-13A zeigt, offenbarte sich zwischen der Oct-3/4-Expression und der Cisplatin-Sensitivität eine strenge Korrelation. Eine vollständig fehlende Expression von Oct-3/4 wurde in allen resistenten Zelllinien beobachtet, wohingegen alle sensitiven Zelllinien eine ähnlich starke Oct-3/4-Expression zeigten. Daraufhin wurde die Expression von Oct-3/4 unter *in vivo*-Bedingungen untersucht. Sensitive H12.1-Tumor-Xenografte und resistente 1411HP-Tumor-Xenografte (siehe Kapitel 4.4) wurden

immunhistochemisch auf eine Oct-3/4-Expression analysiert. Beide Tumortypen zeigten die gleichen histologischen Eigenschaften wie bereits in Tabelle 2-1 beschrieben. Histomorphologisch bestehen H12.1-Tumore aus EC-Zellen und unreifen TE-Strukturen, die 1411HP-Tumoren aus EC-Zellen und YST-Anteilen. Wie zu erwarten zeigten die somatisch- bzw. extraembryonal differenzierten Areale in beiden Tumortypen keine Oct-3/4-Expression. In den EC-Arealen der H12.1-Tumore konnte eine starke Oct-3/4-Expression beobachtet werden, dagegen zeigten die EC-Areale der 1411HP-Tumore keine Expression von Oct-3/4 (Abb. 4-13B). Die *in vitro* beobachtete differentielle Oct-3/4-Expression in den beiden Zelllinien konnte daher *in vivo* reproduziert werden. Gleichzeitig führte diese Analyse zur Identifizierung eines noch unbeschriebenen Zelltyps – den Oct-3/4-negativen EC-Zellen. Das zeigt, dass EC-Zellen trotz des Verlustes der Oct-3/4-Expression den charakteristischen histomorphologisch undifferenzierten EC-Zell-Phänotyp beibehalten können. Jedoch ist der Verlust von Oct-3/4 in diesen EC-Zellen mit einer Cisplatin-Resistenz assoziiert, *in vitro* und *in vivo*. Eine histologische Analyse von Xenograften der Oct-3/4-negativen, Cisplatin-resistenten Zelllinie 1777NRpmet konnte diese Beobachtung bestätigen. 1777NRpmet-Tumore zeigen histomorphologisch EC-Zellen sowie unreife TE-Strukturen (Tab. 2-1). Xenografte der Oct-3/4-negativen, Cisplatin-resistenten Zelllinie GCT44 wurden innerhalb dieser Studie nicht etabliert. Laut Erstbeschreibung zeigen GCT44-Tumore EC kombiniert mit YST-Elementen (siehe Tab. 2-1). Das entspricht dem Tumortyp der 1411HP-Tumoren. Die somatisch- bzw. extraembryonal differenzierten Elemente in den 1777NRpmet- und 1411HP/GCT44-Tumoren zeigen, dass Oct-3/4-negative EC-Zellen, analog zu den Oct-3/4-positiven EC-Zellen der H12.1-Tumore, zur Differenzierung fähig sind. Diese Daten lassen auf eine Existenz von EC-Zellen schließen, die auf Grund eines sehr frühen Differenzierungsschrittes sich in einem Oct-3/4-negativen, Cisplatin-resistenten Status befinden und weiterhin typische EC-Zell-Charakteristika (Histomorphologie, Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit) beibehalten.

A



B

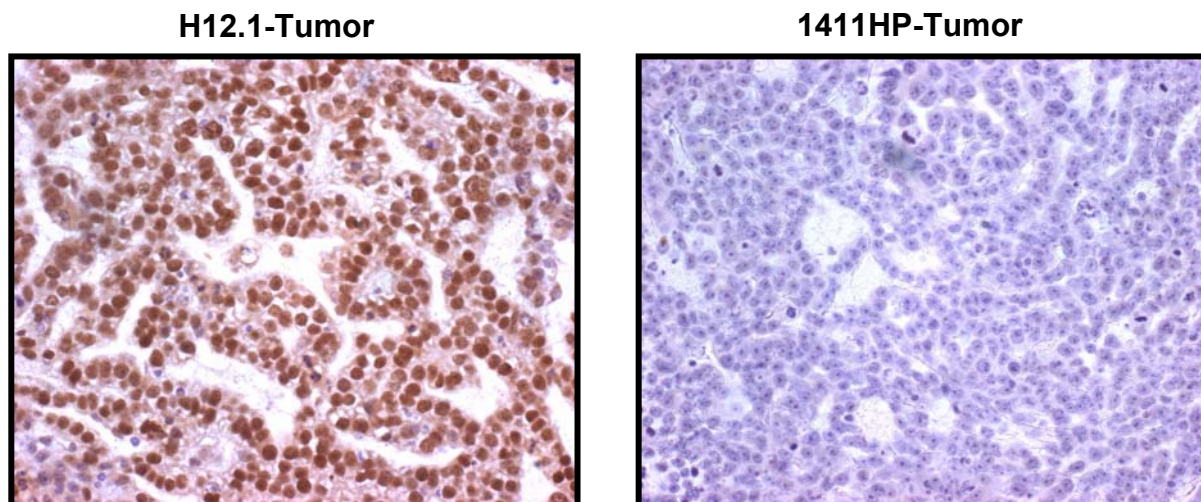


Abb. 4-13: Expression von Oct-3/4 in TKZT-Zelllinien und Tumor-Xenograften. **(A):** Die Expression von Oct-3/4 in Cisplatin-sensitiven und -resistenten TKZT-Zelllinien wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Zum Vergleich sind die Zelllinien-spezifischen IC90 Werte von Cisplatin angegeben. **(B):** Die Expression von Oct-3/4 in sensitiven H12.1- und resistenten 1411HP-Tumor-Xenograften wurde immunhistochemisch analysiert. Oct-3/4-positive Zellkerne sind durch eine Braunfärbung gekennzeichnet. (Diaminobenzidin / Hämatoxylin / x400)

Eine fehlende Expression von Oct-3/4 korrelierte deutlich mit einer Cisplatin-Resistenz *in vitro* (A). Dieser Zusammenhang konnte *in vivo* reproduziert werden. EC-Zellen der cisplatin-sensitiven H12.1-Tumoren zeigten eine starke Zellkern-bezogene Expression von Oct-3/4, wohingegen in EC-Zellen der resistenten 1411HP-Tumoren keine Oct-3/4-Expression beobachtet wurde (B).

4.11 Untersuchung zur Funktion von Oct-3/4

Die Vermutung, dass EC-Zellen während eines sehr frühen Differenzierungsschrittes, welcher durch den Verlust von Oct-3/4 indiziert wird, bereits eine Cisplatin-Resistenz erwerben, sollte untersucht werden. Die Oct-3/4-positive, Cisplatin-sensitive EC-Zelllinie H12.1 wurde in geringer Dichte gesetzt und mit einem differenzierungsinduzierenden Medium (siehe Kapitel 2.2) behandelt. Daraufhin konnten zunächst lokal Zellen mit einer veränderten Morphologie mikroskopisch beobachtet werden. Diese Zellen zeigten im Vergleich zu den ursprünglichen H12.1-Zellen ein verringertes Kern-Zytoplasma-Verhältnis mit einer Ähnlichkeit zu dem *in vitro*-Phänotyp der 1777NRpmet- bzw. 1411HP-Zellen. Darauf folgte eine Inkubationszeit, die durch ein inhomogenes Wachstum der Zellpopulation gekennzeichnet war. Nach 2 - 3 Wochen konnte schließlich eine homogen wachsende Population beobachtet werden, in der sich H12.1-Zellen mit verändertem Phänotyp durchgesetzt hatten. Eine weitere Kultivierung erfolgte in normalem Kulturmedium. Die resultierende Zellpopulation wurde mit H12.1D bezeichnet und zeigte eine ähnliche Wachstumskinetik wie H12.1 für einige Passagen. Es wurde die Expression von Oct-3/4 mittels Western-Blot-Analyse und auf Einzelzell-Ebene durch Immunzytochemie überprüft. Wie Abbildung 4-14A zeigt, ging die Veränderung der Zelllinie H12.1 mit dem vollständigen Verlust von Oct-3/4 einher. Daraufhin wurde die Expression des typischen EC/ES-Zell-Oberflächenmarker SSEA-4 (Andrews, 2002) mittels Immunzytochemie analysiert, um den Differenzierungsgrad von H12.1D einzuschätzen. Im Gegensatz zu Oct-3/4 wurde SSEA-4 in H12.1D weiterhin exprimiert (Abb. 4-14A). Das zeigt, dass es sich bei dem Übergang von H12.1 in H12.1D um einen sehr frühen Differenzierungsschritt handelt. H12.1D-Zellen wurden im SRB-Assay hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Cisplatin analysiert. Wie Abbildung 4-14B verdeutlicht, zeigte H12.1D eine ähnliche Cisplatin-Resistenz wie die primär resistente Zelllinie 1411HP. Das bekräftigt den vermuteten Zusammenhang und zeigt, dass EC-Zellen im Zuge eines frühen Differenzierungsschrittes, welcher durch den Verlust von Oct-3/4 indiziert wird, eine Cisplatin-Resistenz erwerben, wobei andere wesentliche EC-Zell-Charakteristika erhalten bleiben.

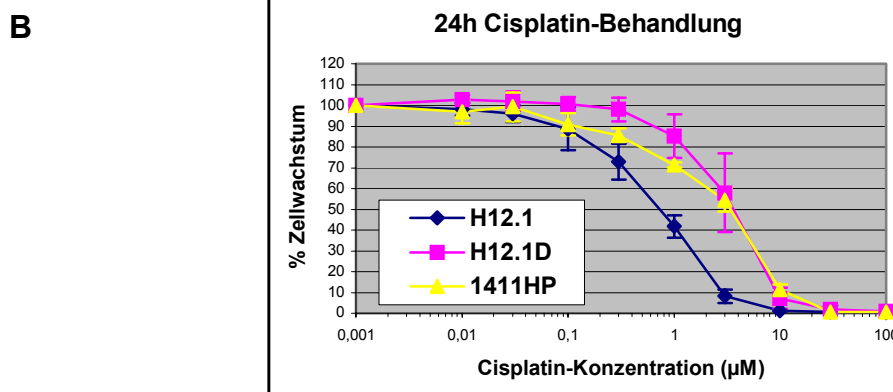
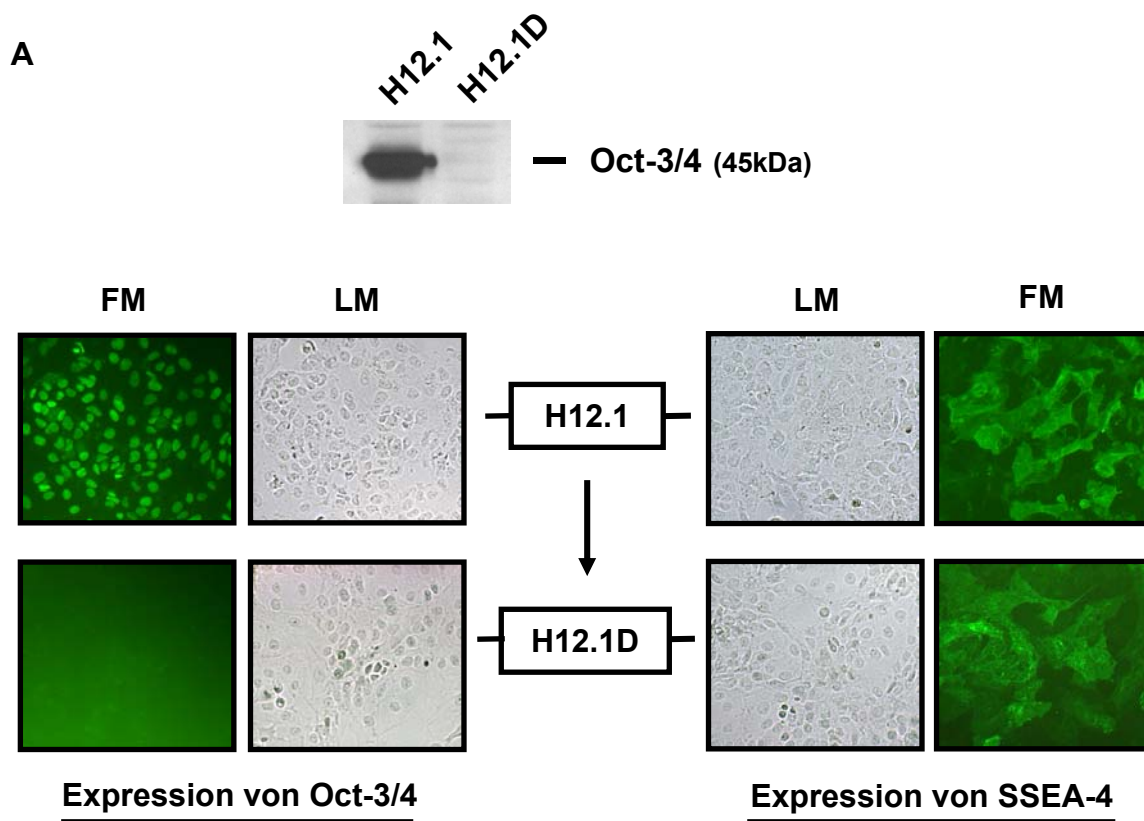


Abb. 4-14: Induktion der Differenzierung und Cisplatin-Resistenz in sensitiven EC-Zellen. Zur Generierung der differenzierungsinduzierten Zellpopulation H12.1D wurde die Cisplatin-sensitive, Oct-3/4-positive EC-Zelllinie H12.1 mit differenzierungsinduzierendem Medium behandelt. **(A):** Die Oct-3/4-Expression der Zellpopulation H12.1D wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft. Weiterhin wurde die Expression von Oct-3/4 und SSEA-4 in H12.1 und H12.1D mittels Immunzytochemie (Immunfluoreszenz) analysiert. Dargestellt sind jeweils identische Bildausschnitte, die lichtmikroskopisch (LM) und fluoreszenzmikroskopisch (FM) dokumentiert wurden. Oct-3/4 zeigt eine Zellkern-bezogene- und SSEA-4 als Oberflächenmarker eine Membran-bezogene Expression. (x100, zusätzlich gezoomt) **(B):** Die Cisplatin-Sensitivität von H12.1D wurde mittels SRB-Zytoxizitäts-Assay analysiert. Zum Vergleich wurde die primär resistente Zelllinie 1411HP mit abgebildet. (n = 3, MW ± STABW)

Die Induktion der Differenzierung in der Cisplatin-sensitiven EC-Zelllinie H12.1 resultierte in einem vollständigen Verlust von Oct-3/4 bei weiterer Expression des EC-Zell-Oberflächenmarkers SSEA-4 (A). Die resultierende, differenzierungsinduzierte EC-Zellpopulation H12.1D zeigte eine ähnliche Cisplatin-Resistenz wie die primär resistente Zelllinie 1411HP (B).

Eine Cisplatin-Dosis, welche in den sensitiven Zelllinien Apoptose induziert, wird von der resistenten Zelllinie 1411HP toleriert (siehe Kapitel 4.3). Die Oct-3/4-negative EC-Zellpopulation H12.1D zeigte eine ähnliche Cisplatin-Resistenz wie die primär resistente, Oct-3/4-negative Zelllinie 1411HP (Abb. 4-14). Aufbauend auf diesen Beobachtungen sollte untersucht werden, in wie weit innerhalb einer Zellpopulation, bestehend aus Oct-3/4-positiven und -negativen Zellen, eine Cisplatin-Resistenz auf die Oct-3/4-negativen Zellen beschränkt ist. Die Koexistenz von Oct-3/4-positiven und -negativen Zellen entspricht der Situation in den meisten nichtseminomatösen TKZT. Die Oct-3/4-positive, Cisplatin-sensitive EC-Zelllinie H12.1 wurde mit differenzierungsinduzierendem Medium behandelt, bis ein Stadium des inhomogenen Wachstums (siehe oben) mikroskopisch erkennbar war. Eine Analyse mittels Immunzytochemie bestätigte die Koexistenz von Oct-3/4-positiven- und negativen Zellen innerhalb der Zellpopulation und zeigte den selektiven Verlust von Oct-3/4 in den Zellen mit H12.1D-Phänotyp (Abb. 4-15A). Eine derartige, inhomogene Zellpopulation wurde mit der IC90-Cisplatin-Dosis der Zelllinie H12.1 (3 μ M) behandelt und nach 96h auf die Expression von Oct-3/4 analysiert. Wie Abbildung 4-15B zeigt, tolerierten lediglich Oct-3/4-negative Zellen diese Behandlung und zeigten weiterhin einen adherenten Phänotyp ohne Zeichen von Apoptose. Die meisten Oct-3/4-positiven Zellen wurden apoptotisch und lösten sich als floatierende Zellen vom Zellmonolayer ab. In einigen apoptotischen Zellen, welche an den adherenten Zellen haften blieben, konnte teilweise ein Restsignal beobachtet werden (Abb. 4-15B). Das selektive Absterben von ausschließlich Oct-3/4-positiven Zellen konnte jedoch nicht in jedem Fall beobachtet werden. Insbesondere wenn Areale von Zellen mit H12.1D-Phänotyp aus wenigen Zellen bestanden, konnte ein Absterben dieser Zellen beobachtet werden. Es wird vermutet, dass dieser Vorgang durch einen sogenannten „Bystander-Effekt“ verursacht wird, welcher durch das zahlreiche Absterben der sensitiven Zellen in der Mikroumgebung zustande kommt.

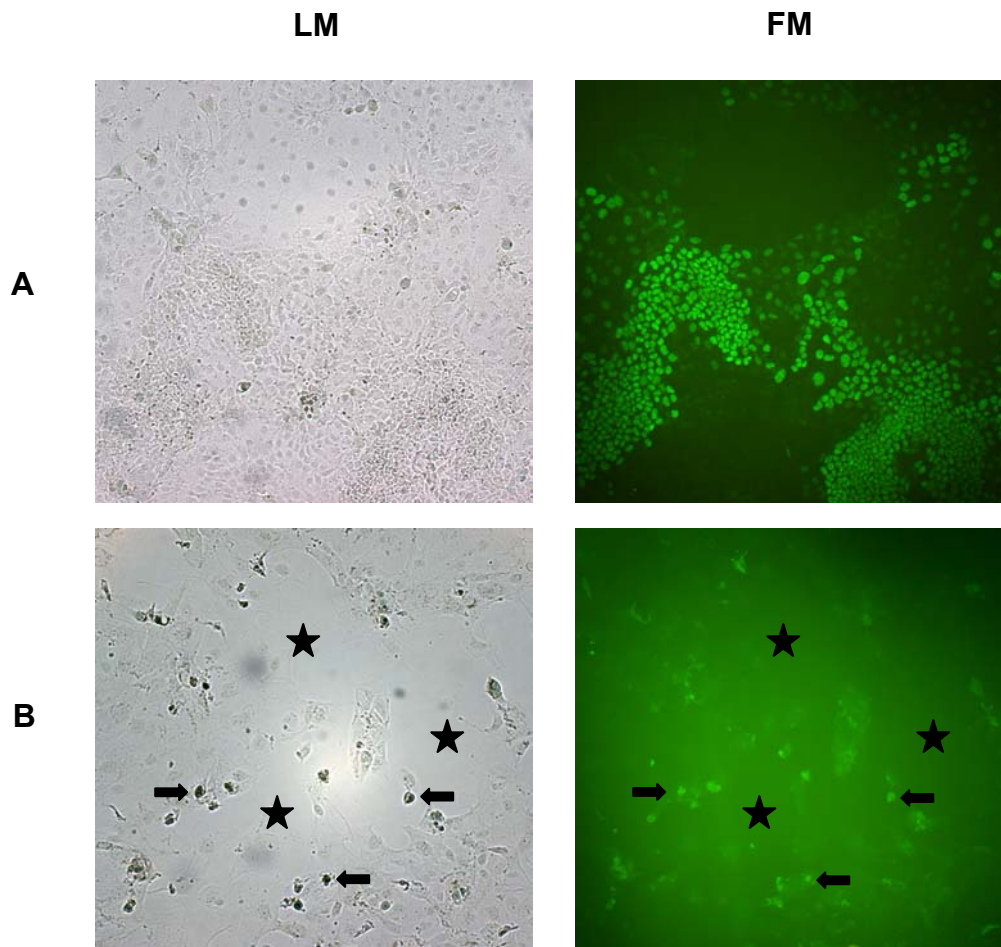


Abb. 4-15: Cisplatin-Behandlung von Oct-3/4-positiven und -negativen Zellen. Die Cisplatin-sensitiven, Oct-3/4-positiven EC-Zelllinie H12.1 wurde mit differenzierungsinduzierendem Medium behandelt bis eine Etablierung von Zellen mit H12.1D-Phänotyp erkennbar wurde. Die Oct-3/4-Expression wurde mittels Immunzytochemie (Immunfluoreszenz) analysiert. Dargestellt sind jeweils identische Bildausschnitte, die lichtmikroskopisch (LM) und fluoreszenzmikroskopisch (FM) dokumentiert wurden. Oct-3/4 zeigt eine Zellkern-bezogene Expression. ($\times 100$). Eine derartige Zellpopulation wie in (A) gezeigt, bestehend aus Oct-3/4-positiven und -negativen Zellen, wurde in (B) mit $3\mu\text{M}$ Cisplatin behandelt und nach 96h analysiert. Sterne kennzeichnen Areale von Zellen, welche durch Apoptose den Zellmonolayer verlassen haben. Pfeile kennzeichnen apoptotische Zellen, welche in Kontakt mit adherenten Zellen verblieben und ein Restsignal zeigten.

Die Zellen, welche eine Behandlung mit $3\mu\text{M}$ Cisplatin tolerierten und adherent verblieben, zeigten kein Zellkern-spezifisches Signal für eine Oct-3/4-Expression.

In den beiden Oct-3/4-positiven, Cisplatin-sensitiven EC-Zelllinien H12.5 und 2102EP erzeugte eine Behandlung mit differenzierungsinduzierendem Medium nicht die typischen morphologischen Veränderungen und führte weder zu einem Verlust von Oct-3/4 noch zur Entstehung einer Cisplatin-Resistenz. Das korrelierte mit dem Fehlen differenzierter Areale in den abgeleiteten Xenograften beider Zelllinien (Tab. 2-1) und zeigt, dass diese EC-Zellen unfähig sind, zu differenzieren. Weiterhin wird deutlich, dass ein Verlust von Oct-3/4

verbunden mit einem frühen Differenzierungsschritt notwendig ist, dass EC-Zellen ihre typische hohe Sensitivität gegenüber Cisplatin verlieren und resistent werden. Durch Untersuchungen in der Maus geht man davon aus, dass Oct-3/4 einen zentralen Regulator zur Aufrechterhaltung der zellulären Pluripotenz und des embryonalen Zellstatus darstellt (siehe Kapitel 1.2). Es wurde vermutet, dass die Unfähigkeit zur Differenzierung von EC-Zellen mit der Unfähigkeit zur Repression der Oct-3/4-Expression assoziiert ist. Die beiden differenzierungsunfähigen EC-Zelllinien H12.5 und 2102EP wurden daher mit Oct-3/4-spezifischer siRNA transfiziert und die Oct-3/4-Expression mittels Western-Blotting analysiert. Wie Abbildung 4-16 zeigt, konnte ein *Knock-down* von Oct-3/4 erzielt werden. Eine Inkubation der transfizierten Zellen erfolgte in differenzierungsinduzierendem Medium. Bereits nach 72h zeigten sowohl H12.5- als auch 2102EP-Zellen einen H12.1D-Phänotyp (siehe Abb. 4-14). Das zeigt, dass EC-Zellen durch die Oct-3/4-Expression in deren undifferenzierten Zustand gehalten werden und lässt schließen, dass Oct-3/4 auch in humanen Zellen einen zentralen Regulator des embryonalen Zellstatus darstellt. Jedoch konnte in beiden EC-Zelllinien H12.5 und 2102EP letztendlich keine stabile sogenannte D-Population wie in der EC-Zelllinie H12.1 etabliert werden. In der EC-Zelllinie H12.1 führte eine Inkubation in differenzierungsinduzierendem Medium zu einem vollständigen Verlust von Oct-3/4 und dies stellte einen irreversiblen Prozess dar. Dagegen zeigten sich die Differenzierungs-assoziierten morphologischen Veränderungen bei H12.5 und 2102EP rückläufig, so dass sich der undifferenzierte Phänotyp schließlich durchsetzte und erneut ein EC-Zell-typisches Oct-3/4-Expressionslevel beobachtet werden konnte (Abb. 4-16). Da siRNAs lediglich einen transienten *Knock-down* der Expression erzeugen, wird damit verdeutlicht, dass eine vollständige und permanente Repression von Oct-3/4 für einen frühen Differenzierungsschritt bzw. zur Etablierung des irreversiblen D-Zustandes notwendig ist. Das lässt schließen, dass in differenzierungsunfähigen EC-Zellen die Mechanismen für eine vollständige Oct-3/4-Reprimierung innerhalb des Differenzierungs-Pathways nicht aktiviert werden.

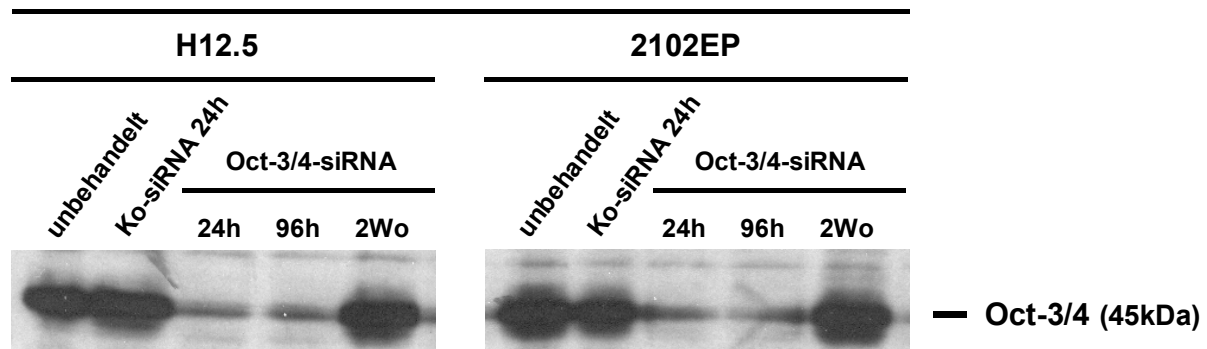
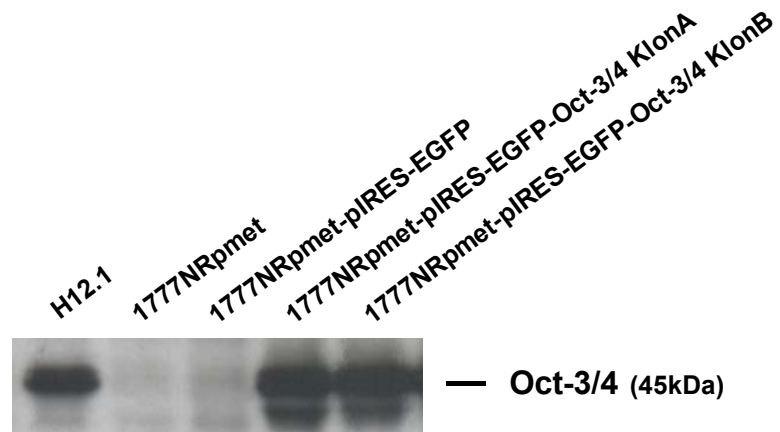


Abb. 4-16: Wirkung des siRNA-vermittelten *Knock-down* von Oct-3/4 in differenzierungsunfähigen EC-Zellen. Die differenzierungsunfähigen, Oct-3/4-positiven EC-Zelllinien H12.5 und 2102EP wurden mit Oct-3/4-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und mikroskopisch analysiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen gewonnen und die Oct-3/4-Expression mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Transfektion mit Oct-3/4-spezifischer siRNA führte zu einem transienten *Knock-down* der Oct-3/4-Expression. Nach 72h zeigten sowohl H12.5- als auch 2102EP-Zellen den H12.1D-Phänotyp (siehe Abb. 4-14). Eine vollständige Rückbildung der morphologischen Veränderungen verbunden mit dem ursprünglichen Oct-3/4-Expressionslevel konnte nach 2 Wochen beobachtet werden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob ein derartig früher, irreversibler Differenzierungsschritt in EC-Zellen, welcher den vollständigen Verlust von Oct-3/4 voraussetzt und die Cisplatin-Resistenz induziert, durch eine erneute Expression von Oct-3/4 revertiert werden kann. In der Oct-3/4-negativen, Cisplatin-resistenten Zelllinie 1777NRpmet wurde mittels Transfektion eine erneute Oct-3/4-Expression erzeugt. Da ein bestimmtes Ausmaß der Oct-3/4-Expression für die Aufrechterhaltung des embryonalen Zellstatus von Bedeutung ist (siehe Kapitel 1.2), sollte die Vektor-basierende Oct-3/4-Expression das Ausmaß der natürlich exprimierenden EC-Zelllinien erreichen. Nach einer G418-Selektion wurden daher Klone generiert und auf die Oct-3/4-Expression analysiert. Es konnten schließlich zwei Klone mit einer stabilen und entsprechend hohen Oct-3/4-Expression erhalten werden (Abb. 4-17A). Beide Klone wurden im SRB-Assay hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Cisplatin analysiert. Wie Abbildung 4-17B verdeutlicht, konnte durch eine Überexpression von Oct-3/4 kein Cisplatin-sensitiver Zustand induziert werden. Das lässt schließen, dass es während des Prozesses der Differenzierungsinduktion und des Oct-3/4-Verlustes bereits zu komplexen Veränderungen in der Zelle kommt, welche in deren Gesamtheit irreversibel sind, so dass der embryonale (Cisplatin-sensitive) Zellstatus nicht erneut etabliert werden kann.

A



B

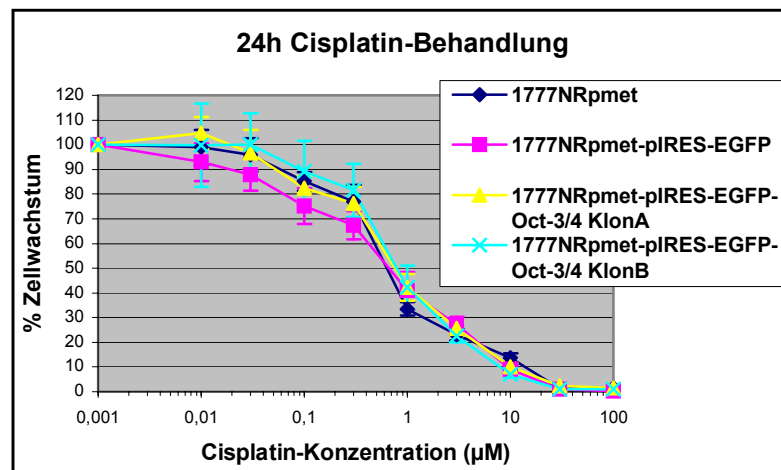


Abb. 4-17: Überexpression von Oct-3/4 in Oct-3/4-negativen, Cisplatin-resistenten Zellen. Die Cisplatin-resistente, Oct-3/4-negative Zelllinie 1777NRpmet wurde mit den Expressionsvektoren pIRES2-EGFP und pIRES2-EGFP-Oct-3/4 transfiziert und Vektor-positive Zellen durch G418-Behandlung selektiert. Aus der G418-resistenten Zellpopulation 1777NRpmet-pIRES2-EGFP-Oct-3/4 wurden zwei Klone mit stabiler und relevanter Oct-3/4-Expression generiert. Die Kontroll-Zellpopulation 1777NRpmet-pIRES2-EGFP wurde als Klon-Mix verwendet (A): Die Oct-3/4-Expression wurde mittels Western-Blotting analysiert. (B): Die Cisplatin-Sensitivität wurde mittels SRB-Zytoxizitäts-Assay überprüft. (n = 3, MW \pm STABW)
Die Überexpression von Oct-3/4 in Cisplatin-resistenten, Oct-3/4-negativen Zellen (A) führte zu keiner Sensitivierung gegenüber Cisplatin (B).

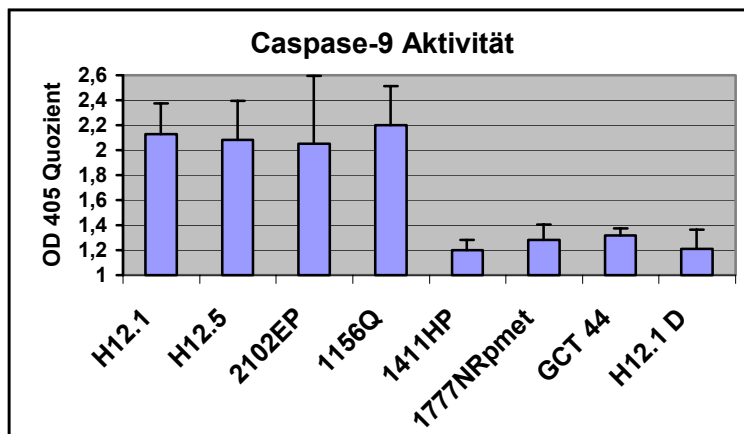
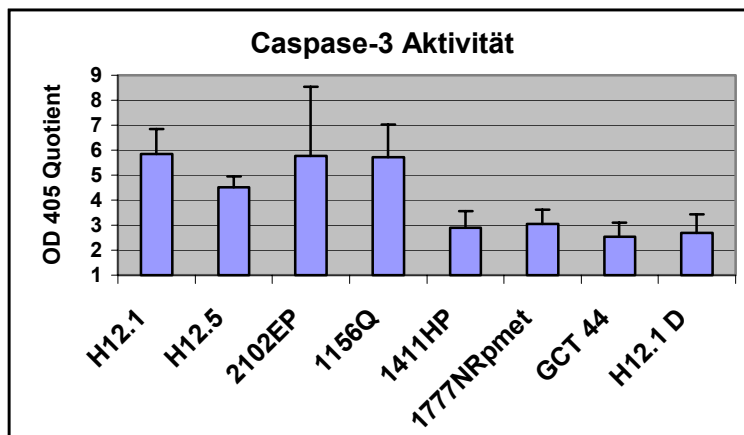
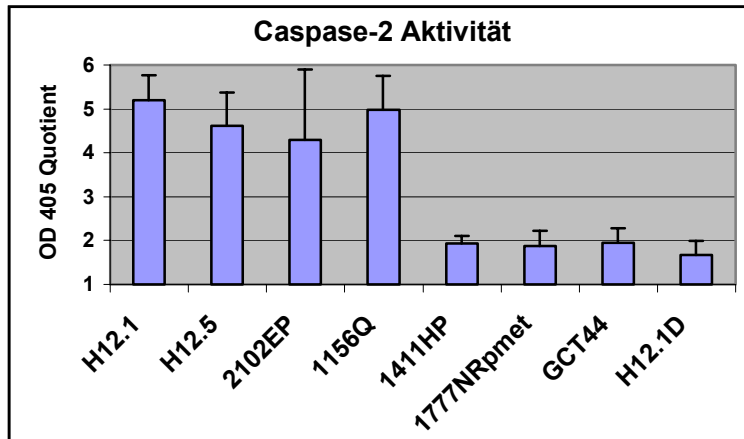
4.12 Assoziation zwischen Oct-3/4-Status, p53-Expression und Caspasen-Aktivierung

Durch die vergleichenden Untersuchungen an den TKZT-Zelllinien H12.1, 2102EP und 1411HP konnten spezifische, Resistenz-assoziierte Unterschiede in der Regulation von apoptotischen Mediatoren identifiziert werden. Im Wesentlichen handelte es sich dabei um eine Veränderung in der p53-Akkumulation, sowie eine Inhibierung der Caspasen-Aktivierung in den Cisplatin-resistenten 1411HP-Zellen (siehe Kapitel 4.6 und 4.8). In die Analysen zur Oct-3/4-Expression wurden vier weitere TKZT-Zelllinien einbezogen. An einem Panel von insgesamt acht verschiedenen TKZT-Zelllinien, einschließlich der abgeleiteten Zellpopulation H12.1D, konnte eine strenge Korrelation zwischen der Oct-3/4-Expression und der Cisplatin-Sensitivität gezeigt werden (siehe Kapitel 4.10 und 4.11). Eine gleichwertig starke Oct-3/4-Expression war mit Cisplatin-Sensitivität assoziiert, wohingegen ein Fehlen der Oct-3/4-Expression mit Cisplatin-Resistenz verbunden war. Daraus ergab sich ein Zell-spezifischer Oct-3/4-Expressionsstatus in Bezug auf die Cisplatin-Sensitivität. Es sollte überprüft werden, inwiefern der Oct-3/4-Status mit den zuvor beobachteten Veränderungen hinsichtlich der Regulation von apoptotischen Mediatoren assoziiert ist. Es wurde daher von allen verfügbaren Zelllinien, einschließlich der Zellpopulation H12.1D, die Aktivierung der Caspasen und die Expression von p53 analysiert. Obwohl gezeigt werden konnte, dass eine verminderte p53-Akkumulation keine Cisplatin-Resistenz induziert (siehe Kapitel 4.7), so stellt dies jedoch ein spezifisches Merkmal der resistenten 1411HP-Zellen dar. Wie Abbildung 4-18 zeigt, korreliert ein negativer Oct-3/4-Status in jedem Fall mit einer inhibierten Caspasen-Aktivierung und einer veränderten p53-Akkumulation. Das verdeutlicht, dass die beobachtete Assoziation zwischen dem Verlust der Oct-3/4-Expression, der veränderten Regulation apoptotischer Mediatoren und der Cisplatin-Resistenz kein Phänomen einer einzelnen Zelllinie darstellt, sondern spezifisch für den TKZT-Zelltyp ist. Insbesondere zeigen die Daten zur Zellpopulation H12.1D, welche keine Zelllinie sondern ein Derivat der EC-Zelllinie H12.1 ist, dass es sich dabei um einen funktionalen und induzierbaren Prozess in EC-Zellen handelt.

Insgesamt kann aus den Daten zur Oct-3/4-Expression, Apoptose-Regulation und Cisplatin-Sensitivität der folgende Zusammenhang geschlossen werden: Im Zuge eines frühen Differenzierungsschrittes in EC-Zellen, welcher den Verlust von Oct-3/4 voraussetzt, kommt es zu einer Neukonstellation des apoptotischen Systems und dadurch zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber der Induktion des apoptotischen Programms. Das hat eine

Cisplatin-Resistenz zur Folge, wobei andere wesentliche EC-Zell-Charakteristika (Histomorphologie, Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit) erhalten bleiben.

A



Oct-3/4-positiv,
Cisplatin-sensitiv

Oct-3/4-negativ,
Cisplatin-resistent

B

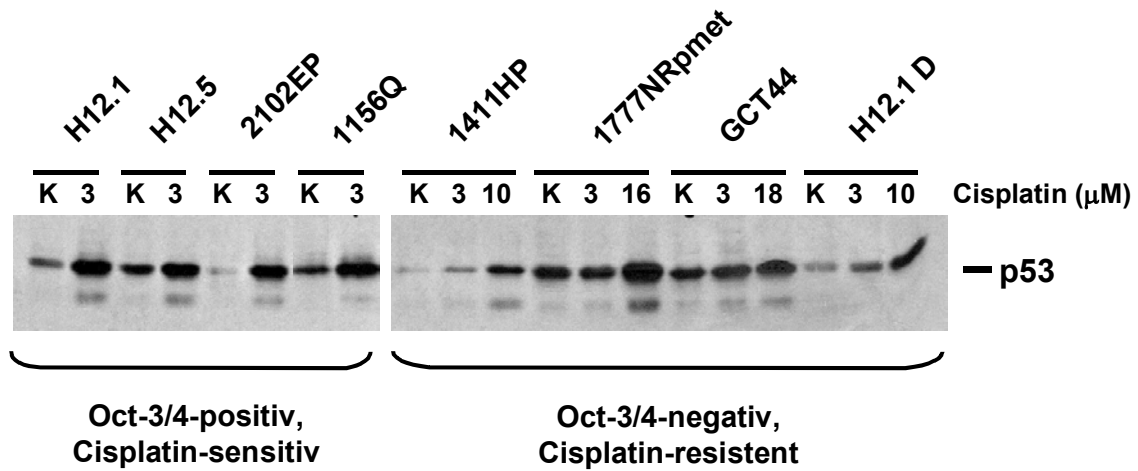


Abb. 4-18: Caspasen-Aktivierung und p53-Akkumulation in Bezug auf den Oct-3/4-Status. **(A)** und **(B)**: Die Zelllinien wurden mit der entsprechenden IC90-Dosis von Cisplatin (siehe Tabelle 4-3, H12.1D - 10 μ M) für 24h behandelt und die adherenten Zellen gewonnen. **(A)**: Die Aktivitäten der Caspasen -2, -3 und -9 wurden mittels Caspase-Assay gemessen. (n = 4, MW \pm STABW). **(B)**: Die Akkumulation von p53 wurde mittels Western-Blotting analysiert. Dabei wurden die resistenten Zelllinien zusätzlich mit der IC90-Dosis der sensitiven Zelllinien behandelt (3 μ M).

Eine negativer Oct-3/4-Status korrelierte in jedem Fall mit einer fehlenden bzw. reduzierten Aktivierung der Caspasen (A) sowie einer lediglich marginalen p53-Akkumulation nach der Behandlung mit 3 μ M Cisplatin (B). Keine Korrelation zeigte sich zwischen der basalen p53-Expression und der Cisplatin-Sensitivität (B).

5 DISKUSSION

5.1 Die Cisplatin-induzierte Apoptose in TKZT-Zellen und mögliche Mechanismen der zellulären Cisplatin-Resistenz

Der TKZT stellt das Modell einer durch Chemotherapie heilbaren fortgeschrittenen Tumorerkrankung dar. Der entscheidende Schritt in diese Richtung war die Einführung der Substanz Cisplatin in das Therapieregime von TKZT. Durch eine auf Cisplatin basierende Chemotherapie werden unter heutigen Bedingungen etwa 80% der Patienten mit einem fortgeschrittenen TKZT geheilt. In etwa 20% der Fälle werden Cisplatin-Resistenzen beobachtet, welche mit einer sehr schlechten Prognose einhergehen. Experimentelle Untersuchungen zur Chemotherapie-Resistenz beim TKZT werden daher vorrangig in Bezug auf die Substanz Cisplatin vorgenommen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden vergleichende Analysen an nichtseminomatösen TKZT-Zelllinien mit unterschiedlicher Cisplatin-Sensitivität durchgeführt. Im Mittelpunkt standen dabei die Mechanismen der Cisplatin-induzierten Apoptose und die Rolle des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4. Zur Bestimmung der Zelllinien-spezifischen Sensitivität gegenüber Cisplatin wurden SRB-Assays durchgeführt und für jede Zelllinie der IC90-Wert ermittelt. Auf Grundlage des IC90-Wertes konnten die TKZT-Zelllinien in eine Cisplatin-sensitive und eine Cisplatin-resistente Gruppe eingeordnet werden. Die Analysen wurden zunächst an den drei Zelllinien H12.1, 2102EP und 1411HP durchgeführt. Die Zelllinie 1411HP erwies sich gegenüber den beiden Zelllinien 2102EP und H12.1 als 3,3-fach Cisplatin-resistent (Abb. 4-2, Tab. 4-2). Alle weiteren Zelllinien konnten eindeutig jeweils einer Gruppe zugeordnet werden (Tab. 4-3). Die beiden Zelllinien H12.5 und 1156Q zeigten eine nahezu gleichwertige Cisplatin-Sensitivität wie H12.1 und 2102EP, wohingegen die Zelllinien 1777NRpmet und GCT44 sich als Cisplatin-resistent erwiesen. Darüber hinaus zeigten die Analysen zur Expression von Oct-3/4, dass eine eindeutige Zuordnung zur sensitiven oder resistenten Gruppe über den Oct-3/4-Expressionsstatus erfolgen kann. Eine in jedem Fall gleich starke Oct-3/4-Expression war mit Cisplatin-Sensitivität assoziiert, wohingegen ein vollständiges Fehlen der Oct-3/4-Expression mit Cisplatin-Resistenz verbunden war. Bezüglich einer Cisplatin-Behandlung unter *in vivo*-Bedingungen wurden Untersuchungen am Nacktmaus-Tumor-Modell durchgeführt. Dabei konnten die *in vitro*-Eigenschaften der sensitiven Zelllinie H12.1 und der resistenten Zelllinie 1411HP auch

in vivo als Tumor-Xenografte reproduziert werden. Klinisch relevante Cisplatin-Behandlungen über 5 Tage konnten bei H12.1-Tumoren vollständige Remissionen erzeugen, wohingegen bei 1411HP-Tumoren nur transiente Wachstumsinhibierungen beobachtet wurden. Die Determinierung von Sensitivität und Resistenz auf der Basis der *in vitro* erstellten IC90-Werte bzw. die Zuordnung über den Oct-3/4-Status bestimmte daher auch die Relation von Sensitivität und Resistenz in der klinisch relevanten *in vivo*-Situation. Ausgehend davon wurden sämtliche funktionellen Analysen an den TKZT-Zelllinien in Bezug auf eine Cisplatin-Behandlung mit der IC90-Dosis durchgeführt.

Differentielle Apoptose-Induktion und mögliche Mediatoren

Zahlreiche *in vitro*-Analysen haben gezeigt, dass chemotherapeutische Substanzen wie Cisplatin in Tumorzellen Apoptose induzieren (Eastman, 1990). Des Weiteren geht man davon aus, dass auch unter *in vivo*-Bedingungen die Induktion von Apoptose in Tumorzellen den entscheidenden Faktor darstellt, durch den chemotherapeutische Substanzen ihre zytoreduktive, anti-tumorale Wirkung erzielen. Zahlreiche Beobachtungen sprechen für eine Assoziation zwischen der zellulären Empfindlichkeit Apoptose zu induzieren und dem Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie (Fisher, 1994; Kerr et al., 1994). Die hohe Chemotherapie-Sensitivität von TKZT bleibt *in vitro* erhalten und nahezu alle in der Literatur diesbezüglich beschriebenen TKZT-Zelllinien zeigen eine Hypersensitivität gegenüber DNA-schädigenden Substanzen. TKZT-Zellen besitzen eine hohe Empfindlichkeit zur Apoptose-Induktion in Reaktion auf verschiedene toxische Stimuli, insbesondere jedoch gegenüber Cisplatin (Huddart et al., 1995). Das korreliert mit dem sehr guten Ansprechen dieser Tumoren auf die Chemotherapie. Die hier durchgeführten *in vitro*-Analysen haben gezeigt, dass eine Cisplatin-Behandlung mit der entsprechenden IC90-Dosis (equitoxische Dosis) sowohl in sensitiven als auch in resistenten TKZT-Zellen Apoptose induziert (Abb. 4-3). Gleichzeitig wurde gezeigt, dass eine Cisplatin-Dosis (equimolare Dosis), welche bei den sensitiven TKZT-Zellen Apoptose induziert, von den resistenten TKZT-Zellen toleriert wird (Abb. 4-3). Die beobachtete Cisplatin-Resistenz von TKZT-Zellen ist daher auf eine verminderte Induktion des apoptotischen Zelltodes zurückzuführen. Die Untersuchungen am Nacktmaus-Tumor-Modell lassen schließen, dass auch unter klinisch relevanten Bedingungen die Induktion von Apoptose die Hauptursache für die beobachtete Regression darstellt (Abb. 4-4).

Auf Grundlage der verfügbaren Daten aus den Untersuchungen an Zelllinien und Tumorproben kann hinsichtlich der generellen hohen Sensitivität von TKZT als auch hinsichtlich der hohen Chemotherapie-Resistenz von reifen benignen Teratomen jeweils auf einen multifaktoriellen Prozess geschlossen werden (siehe Kapitel 1.4). Der Chemotherapie-Resistenz bei malignen TKZT können derzeit keine bestimmten Marker zugeschrieben werden. Die vergleichenden Analysen am hier vorliegenden TKZT-Modell bezüglich relevanter Parameter führten zunächst zu keinen Unterschieden, welche die verminderte Induktion des apoptotischen Zelltodes in den resistenten TKZT-Zellen erklärten. Es konnte weder eine verminderte Bildung noch eine erhöhte Reparatur der DNA-Cisplatin-Addukte in den resistenten TKZT-Zellen beobachtet werden (Abb. 4-6). Daher konnten alle bekannten Resistenzmechanismen ausgeschlossen werden, die letztendlich zur Verminderung dieser primär toxischen Läsionen führen (siehe Kapitel 1.4). Das ähnliche Ausmaß an DNA-Cisplatin-Addukten in sensitiven und resistenten TKZT-Zellen korrelierte mit der ähnlich erzielten Wirkung von Cisplatin auf den Ablauf des Zellzyklus in beiden Zelltypen (Abb. 4-5). Darüber hinaus wurde deutlich, dass dasselbe Ausmaß an DNA-Cisplatin-Addukten, welches in den sensitiven Zellen massiv zur Induktion von Apoptose führt, von den resistenten Zellen toleriert wird. Resistente TKZT-Zellen besitzen daher eine geringere Empfindlichkeit zur Induktion von Apoptose, wobei die Prozesse der DNA-Cisplatin-Wechselwirkung und des Zellzyklus sehr ähnlich ablaufen. Die Behandlung mit der equitoxischen Dosis resultierte in einer erhöhten DNA-Platinierung und ließ schließen, dass in den resistenten Zellen eine höhere Aktivierungsschwelle zur Induktion des apoptotischen Programms existiert, so dass mehr zytotoxische DNA-Cisplatin-Addukte notwendig sind, um diese Schwelle zu überwinden. Insgesamt zeigen diese Daten, dass die unterschiedliche Cisplatin-Sensitivität bzw. die unterschiedliche Empfindlichkeit zur Apoptose-Induktion der TKZT-Zellen nicht durch Veränderungen in derartigen Prozessen begründet ist, die mit dem Transport, der Aktivierung/Detoxifikation sowie der DNA-Bindung/-Reparatur von Cisplatin oder mit Zellzyklus-Checkpunkten assoziiert sind.

Des Weiteren konnten keine Unterschiede in der Expression der MMR-Proteine MSH2 und MLH1 sowie den anti-apoptotischen Proteinen der Bcl2-Familie Bcl2 und BclXL und der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak beobachtet werden (Abb. 4-7A). Beide Protein-Familien können für die Erkennung und Weiterleitung bzw. Evaluierung der DNA-Schäden relevant sein (siehe Kapitel 1.4). Dagegen zeigte sich sowohl in sensitiven als auch in resistenten TKZT-Zellen das für TKZT typisch hohe Bax/Bcl2 Expressionsverhältnis,

welches zuvor, zusammen mit der Prävalenz von Wildtyp-p53, der allgemein hohen Sensitivität von TKZT zu Grunde gelegt wurde (siehe Kapitel 1.4).

Die Analysen zur Expression von p53 ließen zunächst vermuten, dass eine zu geringe Akkumulation von p53 in resistenten TKZT-Zellen die Cisplatin-Resistenz verursacht (Abb. 4-7B). Untersuchungen an Zelllinien anderer Tumorentitäten hatten gezeigt, dass die entsprechende Reaktion der Zelle, d.h. Zellzyklusarrest oder Apoptose, vom zellulären p53-Level abhängig sein kann (Chen et al., 1996). Dabei erzeugt ein niedriges p53-Level bevorzugt Zellzyklusarreste, wohingegen hohe p53-Level zur Induktion von Apoptose führen. Die hier durchgeführten Untersuchungen mittels siRNA-vermittelten *Knock-down* von p53 konnten jedoch klar zeigen, dass sowohl in sensitiven als auch in resistenten TKZT-Zellen die gesamte zytotoxische Wirkung von Cisplatin unabhängig von einer p53-Akkumulation erzielt wird (Abb. 4-8). Das bestätigt vorangegangene Vermutungen, dass p53 in Bezug auf die hohe Chemotherapie-Sensitivität von TKZT keine wichtige Rolle spielt (siehe Kapitel 1.4). Dagegen könnte die Tatsache, dass Mutationen im p53-Gen bei TKZT außerordentlich selten vorkommen, eher dafür sprechen, dass eine Inaktivierung von p53 für die Etablierung und Progression von TKZT nicht notwendig ist, im Gegensatz zu anderen soliden Tumoren. Zusammengefasst lassen die Daten den Schluss zu, dass die Mechanismen, die eine Sensitivität bzw. Resistenz von TKZT-Zellen gegenüber Cisplatin determinieren, außerhalb des nukleären Kompartiments ablaufen. Die Tatsache, dass lediglich ein geringer Teil des von der Zelle akkumulierten Cisplatins an die DNA bindet (siehe Kapitel 1.4), berechtigt eine derartige Vermutung. So könnte eine bestimmte grundlegende Zytotoxizität durch den allgemein akzeptierten Mechanismus basierend auf der DNA-Platinierung induziert werden. Darüber hinaus könnten jedoch noch weitere Mechanismen, die durch bestimmte Proteine in anderen Kompartimenten vermittelt werden und Nukleus-unabhängig ablaufen, für die Zelltyp-spezifisch variierende Sensitivität gegenüber Cisplatin verantwortlich sein. In TKZT-Zellen scheinen derartige Mechanismen über Sensitivität bzw. Toleranz zu entscheiden.

Mechanismen der Cisplatin-induzierten Caspasen-Aktivierung

Die Analysen zur zentralen Komponente des apoptotischen Systems, der Pathways zur Aktivierung der Caspasen, bekräftigen diese Annahme. Aus den Untersuchungen konnte zunächst geschlossen werden, dass die Cisplatin-induzierte Apoptose in sensitiven TKZT-Zellen über den intrinsischen Caspase-9/Apoptosom-assoziierten Pathway, und nicht über den extrinsischen, Caspase-8/DISC-assoziierten Pathway initiiert wird (siehe Kapitel 1.5). Eine

Cisplatin-Behandlung mit der Apoptose-induzierenden Dosis führte zur Spaltung und Aktivierung der Caspasen-9, -3 und -2, wohingegen Caspase-8 erst in einer späten Phase gespalten wurde (Abb. 4-9). Die Aktivierung der Caspasen war mit der Freisetzung von Cytochrome c aus dem Mitochondrium ins Zytosol sowie mit einer erhöhten Co-Lokalisation von Apaf-1 und Caspase-9 verbunden (Abb. 4-12). Caspase-9 erwies sich als Initiator-Caspase, wobei die Aktivierung der Caspase-3 als wesentlicher Schritt zur Propagierung der Caspasen-Kaskade (Slee et al., 1999) verdeutlicht werden konnte (Abb. 4-10 und 4-11). Gleichzeitig konnte aus diesen Untersuchungen geschlossen werden, dass der Caspase-9/Apoptosom-assoziierte Pathway in den resistenten TKZT-Zellen blockiert ist und dadurch eine Induktion der Apoptose nach einer Behandlung mit niedriger Cisplatindosis verhindert wird. Die Apoptose-Induktion in den resistenten TKZT-Zellen nach der Behandlung mit der entsprechend hohen Cisplatindosis wurde ebenfalls über einen intrinsischen Pathway und nicht über den extrinsischen, Caspase-8/DISC-assoziierten Pathway initiiert. Eine Behandlung mit der Apoptose-induzierenden equitoxischen Cisplatindosis führte zur deutlichen Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Zytosol sowie zur erhöhten Co-Lokalisation von Apaf-1 und Caspase-9 (Abb. 4-12). Daraufhin konnte eine Spaltung von Caspase-9 beobachtet werden, jedoch entwickelt diese keine Aktivität (Abb. 4-9). Des Weiteren zeigte sich die Aktivierung bzw. Aktivität der Caspasen -3 und -2 in den resistenten TKZT-Zellen inhibiert (Abb. 4-9). Das ließ vermuten, dass die Blockierung der Caspase-9-Aktivierung auch die Aktivierung der beiden anderen relevanten Caspasen hemmt und dies letztendlich zu der erhöhten apoptotischen Aktivierungsschwelle in den resistenten TKZT-Zellen führt.

Die Bedeutung der Caspase-9 als Initiator-Caspase im Pathway der Cisplatin-induzierten Apoptose in TKZT-Zellen konnte durch den Einsatz des Caspase-9-spezifischen Inhibitors verdeutlicht werden. Durch die Inhibierung der Caspase-9-Aktivierung in den sensitiven TKZT-Zellen wurde die Apoptose-Induktion nach Behandlung mit niedriger Cisplatindosis blockiert und dadurch eine bestimmte intrazelluläre Situation nachvollzogen, die in den resistenten TKZT-Zellen primär vorliegt. Caspase-9-blockierte, primär sensitive TKZT-Zellen zeigten eine erhöhte apoptotische Aktivierungsschwelle und Cisplatin-Resistenz (Abb. 4-10). Ähnlich zu den primär resistenten TKZT-Zellen konnte Apoptose durch eine erhöhte Cisplatindosis induziert werden. Das zeigt, dass andere potentielle Mechanismen der Apoptose-Induktion in den Zellen existieren. Offensichtlich wird durch die Behandlung mit einer hohen Cisplatindosis die Caspase-9-Blockierung überwunden, so dass die Caspasen -2

und -3 unabhängig von Caspase-9 und dadurch weniger stark aktiviert werden (Abb. 4-10). In beiden Zelltypen, Caspase-9-blockierte, primär sensitive TKZT-Zellen und primär resistente TKZT-Zellen, wird demnach die apoptotische Kaskade durch einen zusätzlichen, Caspase-9 unabhängigen Pathway gestartet, der jedoch erst bei einer höheren Cisplatinindosis ausgelöst wird. Die Aktivierung der Caspase-9 ist daher nicht zwingend notwendig für die Cisplatin-induzierte Apoptose, vermittelt jedoch die Sensitivität gegenüber Cisplatin in TKZT-Zellen. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit anderen Studien, welche die wichtige Rolle des Caspase-9-Pathways für die Chemotherapeutika-induzierte Apoptose in Zellen von verschiedenen Tumorentitäten beschreiben (Kuwahara et al., 2000; Liu et al., 2002; Schwartz and Waxman, 2001; Wu and Ding, 2002).

Die hier erstellten Daten zeigen, dass in sensitiven TKZT-Zellen die Freisetzung von Cytochrom c und die Autoaktivierung der Caspase-9 das oder eines der initialen Ereignisse der Apoptose darstellt, welche durch die Exposition mit einer geringen Cisplatinindosis induziert werden. Die Daten lassen weiterhin schließen, dass nach einer Behandlung mit hoher Cisplatinindosis ein Caspase-9-unabhängiger Pathway initiiert wird und Apoptose auslösen kann. Das wird durch die fehlende Aktivität der Caspase-9 in behandelten primär resistenten- und Caspase-9-blockierten sensitiven TKZT begründet. Während der Autoaktivierung wird Caspase-9 an der Aminosäureposition Asp315 gespalten, wodurch das p35-Fragment als große Untereinheit der aktiven Caspase-9 entsteht ((Zou et al., 2003), siehe Abb.4-9, 4-11, 4-12). Die durch aktive Caspase-9 gesplattene/aktivierte Caspase-3 spaltet im Zuge der Propagierung der Caspasen-Kaskade weitere Procaspase-9-Moleküle an der Aminosäureposition Asp330, wobei das p37-Fragment als große Untereinheit der aktiven Caspase-9 entsteht ((Zou et al., 2003), siehe Abb. 4-12). Die Entstehung des p37-Fragments in den resistenten TKZT-Zellen trotz fehlender Caspase-9-Aktivität ist deshalb nicht ungewöhnlich, da aktive Caspase-3 in den Caspase-9-unabhängigen apoptotischen Prozess involviert ist (Abb. 4-12, 4-9). Dagegen ist die Entstehung des p35-Fragments bei fehlender Caspase-9-Aktivität unklar. Es kann vermutet werden, dass in den Caspase-9-unabhängigen Pathway eine Protease involviert ist, die Caspase-9 an derselben Stelle spaltet, wie Caspase-9 selbst im Prozess der Autoaktivierung. Die inhibierte Caspase-9 wird jedoch nicht aktiv und induziert nicht die typische Caspasen-Kaskade durch die wechselseitige Interaktion mit Caspase-3, wodurch eine intensive Aktivierung der Effektor-Caspase erzielt wird. Ein derartiger Mechanismus scheint primär in TKZT-Zellen verankert zu sein, da dieser in resistenten- und Caspase-9-blockierten, sensitiven TKZT-Zellen initiiert werden kann.

Mögliche Mechanismen der Inhibierung der Caspasen-Aktivierung

Aus therapeutischer Sicht bedeutungsvoller ist letztendlich der Mechanismus, welcher eine fehlende Aktivierung bzw. Aktivität der Caspase-9 zur Folge hat und mit der Cisplatin-Resistenz assoziiert ist. Da durch die Inhibierung der Caspase-9-Aktivierung in den sensitiven TKZT-Zellen eine ähnliche intrazelluläre Situation wie in den resistenten TKZT-Zellen nachvollzogen werden konnte, kann vermutet werden, dass auch unter natürlichen Bedingungen Caspase-Inhibitoren involviert sind. Derartige Proteine existieren und gehören zur Familie der *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs). IAPs können durch direkte Interaktion die Aktivierung von Caspasen hemmen (Salvesen and Duckett, 2002). Weiterhin lassen zwei neue Studien vermuten, dass die Mechanismen der Caspase-9/-3 Aktivierung wesentlich komplexer ablaufen als bisher angenommen. Die Untersuchungen, welche sich erstmals mit der nativen Zusammensetzung des Apoptosoms beschäftigten, zeigen, dass das Apoptosom u.a. aus Apaf-1, Caspase-9, Caspase-3 und XIAP, einem Vertreter der IAPs, zusammengesetzt sein kann, wobei Cytochrom c lediglich einen transienten Bindungspartner darstellt (Hill et al., 2004; Twiddy et al., 2004). Gleichzeitig verdeutlichen diese Untersuchungen, dass die Aktivität des Apoptosoms durch zwei weitere mitochondriale Proteine positiv reguliert werden kann. Dabei handelt es sich um die pro-apoptischen Proteine Smac und Omi/HtrA2, welche im Prozess der Apoptose ins Zytosol freigesetzt werden können. Beide Proteine waren in der Lage XIAP zu sequestrieren und dadurch den Apoptosom-Komplex zu aktivieren. Andere Studien haben gezeigt, dass bestimmte Hitzeschockproteine (HSPs) in die Regulation der Apoptosom-induzierten Apoptose involviert sein können. Für das Hitzeschockprotein HSP27 konnte gezeigt werden, dass es die Freisetzung von Smac aus dem Mitochondrium hemmt (Chauhan et al., 2003) und darüber hinaus in der Lage ist, freigesetztes Cytochrom c sowie Caspase-3 zu sequestrieren (Concannon et al., 2001). HSP27 kann daher auf zwei regulatorischen Ebenen letztendlich die Formation und Funktion des Apoptosoms negativ beeinflussen. Ein weiteres Hitzeschockprotein, das HSP70, ist in der Lage die CARD- Domäne von Apaf-1 zu blockieren und dadurch die Oligomerisierung von Apaf-1 und die Wechselwirkung mit Caspase-9 zu hemmen (Saleh et al., 2000). Eine ähnliche Eigenschaft konnte auch für HSP90 gezeigt werden, wobei gleichzeitig verdeutlicht wurde, dass eine Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen zur Dissoziation des Apaf-1/HSP90-Komplexes führen kann (Pandey et al., 2000). Diese Studien zeigen, dass IAPs und HSPs wesentliche Regulatoren der Apoptosom-

induzierten Apoptose darstellen, die wiederum selbst einer Regulation unterliegen, welche u.a. durch DNA-schädigende Substanzen beeinflusst werden kann.

Innerhalb der Studien wurden jeweils zellfreie zytosolische Extrakte untersucht, welche aus Leukämie- oder Lymphom-Zelllinien hergestellt wurden. Die Beobachtungen geben daher eine bessere Vorstellung darüber, wie die biochemischen Vorgänge der Apoptosom-vermittelten Apoptose-Induktion innerhalb der Zelle grundlegend ablaufen können. Jedoch kann dies von der Situation in der intakten Zelle abweichen bzw. zwischen Zellen unterschiedlicher Herkunft variieren. So können nicht nur differentielle Expressionsmuster relevanter Proteine in unterschiedlichen Zelltypen, sondern auch Membran- oder Zytoskelett-bezogene Mechanismen zu einer unterschiedlichen Kompartimentierung oder Sequestrierung relevanter Proteine führen und dadurch eine Zelltyp-spezifische Regulation des Apoptosoms bedingen. Die Verfügbarkeit bzw. spezifische Induzierbarkeit von Proteinen, welche die Aktivität des Apoptosoms positiv regulieren, scheinen die unterschiedliche Sensitivität von verschiedenen Zelltypen gegenüber zytotoxischen Stimuli zu determinieren. In den resistenten TKZT-Zellen wird durch eine Behandlung mit niedriger Cisplatinosis lediglich eine marginale Freisetzung von Cytochrom c induziert (Abb. 4-12). Das lässt schließen, dass auch die Freisetzung anderer pro-apoptotischer mitochondrialer Proteine, welche zur Aktivierung des Apoptosoms notwendig sind, gehemmt oder blockiert wird. Eine derartig veränderte Regulation könnte z. B. durch andere Proteine der Bcl2-Familie, welche innerhalb dieser Studie nicht analysiert wurden, verursacht werden. Von Bedeutung könnten sogenannte BH3-only Bcl2-Homologe sein, wie z.B. das Protein Nbk, welche durch Interaktion mit anderen Proteinen der Bcl2-Familie die Freisetzung von Cytochrom c fördern (Gillissen et al., 2003). Darüber hinaus könnten bestimmte IAPs über eine Inhibierung oder HSPs über Sequestrierung die Aktivierung bzw. Aktivität der Caspase-9 oder relevanter Bindungspartner in den resistenten TKZT-Zellen blockieren.

Die hier erstellten Daten lassen vermuten, dass sich die apoptotische Maschinerie in den resistenten TKZT-Zellen im Gegensatz zu den sensitiven TKZT-Zellen in einer anti-apoptotischen Konstellation befindet, welche durch Veränderungen in den regulatorischen Ebenen *upstream* und *downstream* des Mitochondriums determiniert ist. Dabei könnten die oben diskutierten Proteine bzw. Zusammenhänge eine entscheidende Rolle spielen. Eine klinisch relevante Cisplatinosis kann in den resistenten TKZT-Zellen keine pro-apoptotische Situation in Bezug auf den Apoptosom-Komplex hervorrufen, so dass dieser nicht aktiviert und eine Apoptose-Induktion blockiert wird. Das äußert sich letztendlich in der fehlenden

Caspase-9-Aktivierung während des apoptotischen Prozesses nach einer Behandlung mit hoher Cisplatin-Dosis, welche in allen analysierten resistenten TKZT-Zellen beobachtet werden konnte. Die Analysen zur Cisplatin-resistenten Zellpopulation H12.1D verdeutlichen, dass die anti-apoptotische Konstellation der resistenten TKZT-Zellen kein Zelllinien-spezifisches Phänomen darstellt. Es handelt sich dabei um einen induzierbaren Prozess in TKZT-Zellen, wobei ausgehend von einer pro-apoptischen Konstellation eine anti-apoptotische Konstellation neu etabliert wird. Die Apoptosom-assoziierten Vorgänge nehmen dabei eine zentrale Position ein. Die Identifikation und Analysierung sämtlicher Bindungspartner von Caspase-9 in sensitiven und resistenten TKZT, und dies ohne und unter Cisplatin-Exposition, stellt daher den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Cisplatin-Resistenz in TKZT-Zellen dar.

5.2 Charakterisierung des Cisplatin-resistenten TKZT-Zelltyps – die Bedeutung der Oct-3/4-Expression

Durch die Untersuchungen am Zelllinien-Modell konnten Cisplatin-resistente TKZT-Zellen determiniert werden, die sich durch eine veränderte Regulation von apoptotischen Prozessen kennzeichnen. In allen drei resistenten TKZT-Zelllinien handelt es sich um eine Resistenz, die primär vorliegt und nicht *in vitro* gezüchtet wurde. Die Untersuchungen am Nacktmaus-Modell haben gezeigt, dass der Grad der Resistenz für die *in vivo*-Situation eine Relevanz besitzt. Für einen Bezug auf die *in vivo*-Situation von TKZT in Patienten ist es darüber hinaus von Bedeutung, inwiefern es sich bei diesen Zellen um typische TKZT-Zellen handelt. Zelllinien werden aus resezierten Tumorproben etabliert, wobei in der Regel nur eine kleine Menge an Zellen aus der hergestellten Zellsuspension anwächst. Eine Überprüfung ob und inwiefern die etablierten Zelllinien dem Ursprungstumortyp entsprechen, kann durch die Etablierung von Xenograften in Nacktmäusen durchgeführt werden. Vorangegangene und im Rahmen dieser Studie durchgeführte Experimente haben gezeigt, dass alle verwendeten TKZT-Zelllinien tumorigenes Potential besitzen und in Nacktmäusen Tumor-Xenograften bilden. Darüber hinaus verdeutlichen die histologischen Analysen, dass es sich dabei um typische nichtseminomatöse Keimzelltumoren handelt in Übereinstimmung mit entsprechenden klinischen Beschreibungen (siehe Tabelle 2-1). Diese bestehen aus undifferenzierten EC-Zellen mit oder ohne somatisch (TE) oder extra-embryonal (YS/CC)

differenzierten Komponenten (siehe Kapitel 1.1). Die hier analysierten Zelllinien stellen daher geeignete, klinisch relevante Modelle von nichtseminomatösen TKZT dar.

Die histologischen Untersuchungen der abgeleiteten Tumor-Xenografte zeigen, dass durch eine Analyse der Zellmorphologie keine Voraussagen bezüglich einer Cisplatin-Resistenz getroffen werden können. Das entspricht der derzeitigen klinischen Praxis, da für eine Therapieentscheidung lediglich die histologische Unterscheidung in Nichtseminom oder Seminom relevant ist. Seminome lassen sich besser behandeln und Cisplatin-Resistenzen, wie diese in etwa 20% der Nichtseminome zu beobachten sind, kommen bei Seminomen praktisch nicht vor. Innerhalb der nichtseminomatösen TKZT ist die Häufigkeit und Art der differenzierten Elemente von keiner Therapie-relevanten Bedeutung. Die histologischen Untersuchungen werden an den orchiektomierten testikulären Primärtumoren vorgenommen. Für eine Chemotherapie-Resistenz sind jedoch die disseminierten Tumorzellen in Form von Metastasen verantwortlich, welche in diesem Fall die systemische Behandlung überleben. Inwiefern die disseminierten Tumorzellen noch denen des Primärtumors entsprechen ist unklar. Diesbezügliche Untersuchungen von resistenten metastasierten TKZT sind unter den heutigen Bedingungen nur erschwert durchführbar, da eine Resektion von disseminierten Tumoranteilen in diesem Fall zumeist nicht indiziert ist. Anhaltspunkte ergeben sich jedoch durch die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse im Zusammenhang mit Studien der achtziger Jahre, welche die Etablierung und Charakterisierung von TKZT-Zelllinien beschreiben. So konnten durch Pera et al. sechs verschiedene TKZT-Zelllinien etabliert werden (Pera et al., 1987a). Durch die Bestimmung spezifischer Marker (z.B. SSEA-4) und die Etablierung von abgeleiteten Tumor-Xenograften in der Nacktmaus wurden diese Zelllinien ausführlich charakterisiert. Die aus dem Material von testikulären Primärtumoren etablierten Zelllinien zeigten im Xenograft entweder pures EC oder EC mit somatisch und extra-embryonal differenzierten Arealen. Zwei aus Metastasen etablierte Zelllinien zeigten EC mit YST-Elementen. Es wurde daraus geschlossen, dass humane Keimzelltumoren aus EC-Zellen bestehen, welche entweder nullipotent, pluripotent oder „committed“ für eine extra-embryonale Differenzierung sein können (Pera et al., 1987a).

Die in der vorliegenden Studie untersuchten TKZT-Zelllinien repräsentieren alle diese beschriebenen EC-Zelltypen (siehe Tabelle 2-1). Dabei handelt es sich bei GCT44 um die von Pera et al. etablierte TKZT-Zelllinie, welche von einer Metastase abstammt und EC-Zellen präsentiert, die für eine extra-embryonale Differenzierung *committed* sind und im Xenograft YST-Elemente bildet. Dieser EC-Zelltyp wird darüber hinaus durch die Zelllinie 1411HP

repräsentiert, welche aus einer Metastase eines chemotherapeutisch vorbehandelten Patienten gewonnen wurde. Des Weiteren entsprechen die Zelllinien H12.5, 2102EP und 1156Q den nullipotenten EC-Zellen, wohingegen die Zelllinie H12.1 die pluripotenten EC-Zellen repräsentiert. Alle vier Zelllinien wurden aus testikulären Primärtumoren etabliert. Einen zusätzlichen Typ stellt die Zelllinie 1777NRpmet dar, die aus einer Metastase etabliert wurde und im Xenograft EC-Zellen und somatisch differenzierte Areale zeigt. In Anlehnung an die oben beschriebene Klassifizierung werden durch diese Zelllinie EC-Zellen repräsentiert, die für eine somatische Differenzierung *committed* sind. Daraus ergeben sich schließlich vier verschiedene Typen von EC-Zellen. Es sind daher EC-Zellen, die während der Etablierung einer TKZT-Zelllinie anwachsen, weiter kultiviert werden können und darüber hinaus tumorigenes Potential besitzen. Weitere aus der Literatur bekannte Studien zur Etablierung und Charakterisierung von TKZT-Zelllinien beschreiben ähnliche Beobachtungen analog zu den in Tabelle 2-1 angegebenen Daten. EC-Zellen stellen nahezu immer eine Komponente in den jeweils abgeleiteten Tumor-Xenograften dar, im Gegensatz zu den verschiedenen differenzierten Zelltypen. Das lässt darauf schließen, dass EC-Zellen die Grundlage für das Wachstum von nichtseminomatösen TKZT bilden. Darüber hinaus wird deutlich, dass TKZT-Zelllinien im Grunde EC-Zelllinien entsprechen, wobei unterschiedliche Typen bzw. Entwicklungsstufen von EC-Zellen repräsentiert werden.

Neuere Daten haben gezeigt, dass EC-Zellen innerhalb von TKZT durch die Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4 gekennzeichnet sind, wohingegen dieser in den differenzierten Arealen fehlt (Looijenga et al., 2003a). Dies wurde an Hand der Analyse von testikulären Primärtumoren gezeigt. Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Analysen zur Expression von Oct-3/4 führten zur Identifizierung eines noch unbeschriebenen Zelltyps – den Oct-3/4-negativen EC-Zellen (Kapitel 4.10). Auf Grund der Gemeinsamkeiten in der Entwicklung von nichtseminomatösen TKZT und der normalen Embryogenese stellt sich die Frage, auf welche Stufe hinsichtlich der zellulären Entwicklung der Oct-3/4-negative EC-Zelltyp einzuordnen ist. Dabei kann in Betracht gezogen werden, dass die Oct-3/4-negativen EC-Zellen entweder eine somatische (1777NRpmet) oder eine extra-embryonale Differenzierung (1411HP, GCT44) zeigen, wohingegen die pluripotenten, Oct-3/4-positiven EC-Zellen (H12.1) zur Differenzierung in beide Richtungen fähig sind (siehe Tabelle 2-1). Oct-3/4-negative EC-Zellen entsprechen daher einer fortgeschrittenen Entwicklungsstufe und sind hinsichtlich einer Entscheidung, ob ein somatischer oder ein extra-embryonaler Differenzierungsprozess ablaufen wird, determiniert. Die somatisch determinierten EC-Zellen

entsprechen dann weiterhin multipotenten Zellen, da mehrere Gewebetypen gebildet werden können (TE). Bei extra-embryonal determinierten EC-Zellen könnte es sich bereits um primitive Progenitorzellen handeln. Nullipotente EC-Zellen befinden sich in einem potentiell pluripotenten Zustand, jedoch scheinen die Mechanismen zur Induktion der Differenzierung blockiert zu sein. Es wird deutlich, dass die bereits durch Pera et al. beschriebenen *committed* EC-Zellen den determinierten, Oct-3/4-negativen EC-Zellen entsprechen, wohingegen es sich bei nullipotenten und pluripotenten EC-Zellen um Oct-3/4-positive EC-Zellen handelt. Oct-3/4 kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Rolle zu, da durch diesen Faktor bzw. der Abwesenheit des Faktors die *committed*/determinierten EC-Zellen in Tumorproben identifiziert werden könnten.

Dass vor allem die Unterscheidung in Oct-3/4-positive und Oct-3/4-negative EC-Zellen von großer Bedeutung ist, zeigen die in dieser Studie durchgeführten Analysen zur Apoptose-Regulation und Cisplatin-Sensitivität. Oct-3/4-negative EC-Zellen besitzen eine veränderte Regulation von apoptotischen Prozessen und eine Resistenz gegenüber Cisplatin. Eine zusätzliche Unterscheidung zwischen nullipotent und pluripotent Oct-3/4-positiv oder zwischen somatisch und extra-embryonal determiniert Oct-3/4-negativ ist diesbezüglich nicht von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass EC-Zellen durch die Oct-3/4-Expression in deren undifferenzierten embryonalen (Cisplatin-sensitiven) Zustand gehalten werden und dass ein vollständiger Verlust der Oct-3/4-Expression notwendig ist, um einen *committed*/determinierten Zustand zu erreichen (Kapitel 4.11). Des Weiteren wurde verdeutlicht, dass bereits *committed*/determinierte EC-Zellen durch eine Überexpression von Oct-3/4 nicht in den Cisplatin-sensitiven Zustand zurückgeführt werden können. Das lässt schließen, dass entsprechende Oct-3/4-regulierte Gene, welche in ihrer Gesamtheit den embryonalen Status aufrecht erhalten, bereits im Prozess der Zell-Determinierung durch epigenetische Modifikationen inaktiviert und dadurch unzugänglich werden. Derartige Prozesse der Zell-Determinierung und Differenzierung laufen naturgemäß gerichtet ab und sind irreversibel. Durch Analysen in Mauszellen ist bekannt, dass auch die Oct-3/4-Expression durch epigenetische Inaktivierung abgeschaltet wird. Der vollständige Verlust von Oct-3/4 durch epigenetische Inaktivierung könnte in EC-Zellen den irreversiblen Übergang vom embryonalen, Cisplatin-sensitiven Zustand in den determinierten, Cisplatin-resistenten Zustand darstellen. Die Cisplatin-Sensitivität von EC-Zellen ist daher durch den endogen Oct-3/4-exprimierenden Zustand gegeben.

Insgesamt konnte aus den hier erstellten Daten geschlossen werden, dass im Zuge eines sehr frühen Differenzierungsschrittes in EC-Zellen, welcher den Verlust von Oct-3/4 voraussetzt, es bereits zu einer Neukonstellation des apoptotischen Systems kommt mit der Konsequenz einer Cisplatin-Resistenz. Dass eine Assoziation zwischen dem Oct-3/4-Verlust, einer Veränderung im apoptotischen System und einer Cisplatin-Resistenz besteht und dies darüber hinaus einen induzierbaren Prozess in EC-Zellen darstellt, konnte durch die Etablierung und Untersuchung der Zellpopulation H12.1D gezeigt werden. Insbesondere durch die beobachtete Irreversibilität des Prozesses erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass im Zuge dieses frühen Differenzierungsschrittes lediglich Apoptose-relevante Proteine einer Um- bzw. Neuordnung unterliegen. Man kann davon ausgehen, dass dieser Prozess im Zusammenhang mit einer globaleren Veränderung im Genexpressionsmuster steht, obwohl die unveränderte Histomorphologie der Oct-3/4-negativen EC-Zellen dagegen spricht. Die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse einer *cDNA-microarray*-Analyse bestätigen die Annahme, dass in Oct-3/4-negativen EC-Zellen bereits ein global verändertes Genexpressionsmuster vorliegt. Sperger et al. analysierten ES-Zelllinien, EC-Zelllinien, somatische Tumorzelllinien sowie Tumorproben von Seminomen und Proben von normalen testikulären Gewebe (Sperger et al., 2003). Durch eine hierarchische Cluster-Analyse der Genexpressionsmuster wurde vor allem die enge zelluläre Verwandtschaft von ES- und EC-Zellen verdeutlicht (siehe Kapitel 1.2). Dabei bildeten sowohl nullipotente als auch pluripotente Oct-3/4-positive EC-Zelllinien zusammen mit den ES-Zelllinien ein Cluster. Das zeigt, dass die Unterschiede in der Genexpression zwischen nullipotenten und pluripotenten Oct-3/4-positiven EC-Zellen nur sehr gering sind. Möglicherweise ist die Unfähigkeit zur Differenzierung lediglich durch den Verlust eines oder weniger Mediatoren begründet, welche während der Differenzierungs-Induktion die epigenetische Inaktivierung von Oct-3/4 steuern. Die Gesamtkonstellation beider EC-Zelltypen, vor allem in Bezug auf das apoptotische System und der assoziierten Cisplatin-Sensitivität bleibt jedoch gleich. Des Weiteren waren die innerhalb der vorliegenden Studie untersuchten Oct-3/4-negativen EC-Zelllinien GCT44 und 1411HP in die Analyse von Sperger et al. einbezogen. Diese beiden Zelllinien bildeten ein von den ES/EC-Zellen differentielles Cluster. Das global veränderte Genexpressionsmuster der Oct-3/4-negativen EC-Zellen sowie die auf eine Richtung eingeschränkte Differenzierungsfähigkeit bestätigen, dass diese Zellen determiniert sind und sich bereits innerhalb eines Differenzierungsweges befinden. Weiterhin wird deutlich, dass die Veränderungen im apoptotischen System mit

Veränderungen des gesamten Genexpressionsmusters in Oct-3/4-negativen EC-Zellen einhergehen.

Die in dieser Studie erstellten Daten zusammen mit denen der *cDNA-microarray*-Analyse von Sperger et al. zeigen, dass Oct-3/4-negative EC-Zellen im Grunde nicht mehr den typischen Cisplatin-sensitiven embryonalen pluripotenten bzw. potentiell pluripotenten Oct-3/4-positiven EC-Zellen entsprechen. Eine Bezeichnung als EC-Zelle ist lediglich auf Grund der gleichen undifferenzierten Histomorphologie berechtigt. Wichtig für die klinische Praxis wäre die Erkenntnis, in welchem Entwicklungsstadium des Tumors derartig veränderte EC-Zellen auftreten und ob diese EC-Zellen für die klinische Cisplatin-Resistenz von TKZT verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass alle Oct-3/4-negativen, Cisplatin-resistenten EC-Zelllinien aus dem Material von Metastasen gewonnen wurden, wohingegen alle Oct-3/4-positiven, Cisplatin-sensitiven EC-Zelllinien von Primärtumoren abstammen. Das zeigt, dass in metastasierten TKZT Oct-3/4-negative EC-Zellen existieren, welche darüber hinaus während der Zelllinien-Etablierung bevorzugt proliferieren. Im Fall der Zelllinie 1411HP ging der Etablierung eine Chemotherapie voraus, so dass für diese Zellen eine klinische Chemotherapie-Resistenz praktisch dokumentiert ist (Vogelzang et al., 1985). Diese *in vivo*-Resistenz konnte hier am Xenograft-Modell reproduziert werden. Für die beiden resistenten Zelllinien GCT44 und 1777NRpmet wurde eine Vorgeschichte des Patienten hinsichtlich einer Chemotherapie nicht mit angegeben. Von einer Resistenz unter *in vivo*-Bedingungen kann jedoch auch bei diesen beiden Zelllinien ausgegangen werden, da die *in vitro*-Resistenzen jene der 1411HP noch übersteigen. Diese Tatsachen sprechen dafür, dass unter natürlichen Bedingungen ein Oct-3/4-negativer, Cisplatin-resistenter EC-Zelltyp sich in metastasierten TKZT manifestieren kann, der weiterhin tumorigenes Potential und die Fähigkeit zur weiteren Differenzierung besitzt. Es bleibt fraglich, ob ein derartiger Etablierungsprozess von Oct-3/4-negativen EC-Zellen bereits im Primärtumor minimal auftreten kann und dadurch realisiert werden könnte oder ob dies erst im Zuge der Metastasierung stattfindet. Eine hohe Tumorlast beispielsweise könnte theoretisch die Wahrscheinlichkeit zur Etablierung von Oct-3/4-negativen EC-Zellen steigern, da mehr Differenzierungsprozesse ablaufen. Für einen mit der Tumor-Disseminierung assoziierten Mechanismus würde die Existenz der hier analysierten Oct-3/4-negativen, Cisplatin-resistenten Zelllinie 1777NRpmet sprechen, welche aus einer Metastase etabliert wurde. Aus dem testikulären Primärtumor des selben Patienten wurde die Zelllinie 1777N etabliert (Bronson et al., 1983), die jedoch Oct-3/4 exprimiert (Sperger et al., 2003). Darüber hinaus

zeigen die unterschiedlich stark ausgeprägten Cisplatin-Resistenzen der drei resistenten Zelllinien, dass auf der Grundlage des determinierten, Oct-3/4-negativen Status zusätzliche Resistenzmechanismen akkumuliert werden können. Die nahezu übereinstimmende Cisplatin-Sensitivität der sensitiven Zelllinien zeigen dagegen, dass innerhalb des embryonalen pluripotenten bzw. potentiell pluripotenten, Oct-3/4-positiven Status keine relevanten Resistenzmechanismen etabliert werden.

Zusammengefasst lassen die Daten schließen, dass sowohl Oct-3/4-positive, Cisplatin-sensitive als auch Oct-3/4-negative, Cisplatin-resistente EC-Zellen in nichtseminomatösen TKZT vorkommen. Des Weiteren bilden EC-Zellen offenbar die Grundlage für das maligne Wachstum von nichtseminomatösen TKZT. Wie können daher EC-Zellen im Kontext des Keimzelltumors unter Berücksichtigung aktueller tumorbiologischer Untersuchungen eingeordnet werden und welche Rolle könnten Oct-3/4-negative EC-Zellen für die Cisplatin-Resistenz von metastasierten, nichtseminomatösen TKZT spielen?

5.3 Die Tumorstammzell-Hypothese und mögliche Mechanismen der Cisplatin-Resistenz beim metastasierten TKZT

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre lieferten Erkenntnisse, die einen engen Zusammenhang zwischen der Biologie von Stammzellen und dem Wachstum maligner Tumoren belegen. Diese Erkenntnisse haben schließlich zu einer neuen Auffassung bezüglich der Entstehung und des Wachstums maligner Tumoren geführt (siehe (Al-Hajj and Clarke, 2004; Pardal et al., 2003)). Aus heutiger Sicht stellen adulte Stammzellen ein mögliches Ziel onkogener Aberrationen dar. Diese Annahme setzt nicht eine Dedifferenzierung somatischer Zellen voraus, sondern postuliert die Entwicklung von Malignomen aus primär undifferenzierten Zellen. Die generelle definierende Eigenschaft von Stammzellen ist ihre Fähigkeit, durch Proliferation sowohl Zellen mit identischem Stammzellcharakter („self renewal“) als auch proliferierende Progenitorzellen zu generieren, aus denen wiederum differenzierende Tochterzellen entstehen (Weissman, 2000). Stammzellen verfügen damit über eine Eigenschaft, die auch Tumorzellen auszeichnet - die Fähigkeit zur selbstreplizierenden Proliferation.

Tumoren stellen eine heterogene Zellpopulation dar. Sowohl in epithelialen als auch in hämatologischen Malignomen findet sich eine große Population von nicht-proliferierenden

Zellen (Clarkson et al., 1970; Mendelsohn, 1962). Nur eine kleine Fraktion von Tumorzellen hat die Fähigkeit *in vitro* als Kolonie zu wachsen und nach Transplantation *in vivo* Tumoren zu generieren (Buick et al., 1979; Hamburger and Salmon, 1977). Diese Beobachtungen begründen ein hierarchisches Modell des Tumorwachstums, nach dem nicht alle Zellen des Tumors, sondern nur einige wenige über ein tumorigenes Potential verfügen (McCulloch, 1993). Aus diesem Modell lässt sich die Existenz einer „Tumorstammzelle“ postulieren, die über die Fähigkeit zur Generierung von Tumoren verfügt (Al-Hajj and Clarke, 2004; Reya et al., 2001; Warner et al., 2004). Untersuchungen in verschiedenen humanen Tumoren und im Tiermodell konnten derartige, phänotypisch jeweils distinkte Tumorstammzell-Populationen nachweisen (Al-Hajj et al., 2003; Lapidot et al., 1994) oder lassen auf deren Existenz schließen (Hemmati et al., 2003; Hirschmann-Jax et al., 2004; Singh et al., 2003). *In vitro*-Untersuchungen belegen, dass auch etablierte maligne Zelllinien heterogen proliferieren und eine Subpopulation mit Stammzellcharakter enthalten (Hirschmann-Jax et al., 2004; Kondo et al., 2004). In den jeweiligen Modellen sind diese Tumorstammzellen analog zu nicht-malignen Stammzellen zur replikativen Selbsterneuerung und zur Generierung von differenzierten Tochterzellen fähig. Darüber hinaus scheinen nur diese Tumorstammzellen zur Propagation des Tumors in der Lage. Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung einer Genese von Tumoren aus maligne transformierten Stammzellen und lassen auf eine identische Regulation von Proliferation und Differenzierung in Tumorstammzellen und nicht-malignen Stammzellen schließen.

Beim nichtseminomatösen TKZT zeigt sich die heterogene Zusammensetzung von Tumoren sehr offensichtlich und ist daher seit langem bekannt. Ein Subtyp des nichtseminomatösen TKZT, das Teratokarzinom, stellt ein klassisches Forschungsobjekt dar, welches sowohl unter stammzellbiologischen als auch unter tumorbiologischen Gesichtspunkten untersucht wurde (siehe (Andrews, 2002; Pierce, 1967), siehe Kapitel 1.2). Auf Grund ähnlich ablaufender Vorgänge in nichtseminomatösen TKZT und während der normalen Embryogenese verdeutlichen besonders diese Tumoren die Gemeinsamkeiten in der Regulation von Proliferation und Differenzierung in nicht-malignen Stammzellen und Tumorstammzellen. Der entscheidende Unterschied zwischen einem malignen Teratokarzinom (EC+TE) und einem benignen Teratom ist eine persistierende Population von undifferenzierten EC-Zellen im Teratokarzinom (Sperger et al., 2003). Humane ES-Zellen, die in immunsupprimierte Mäuse injiziert werden bilden benigne Teratome, in denen jedoch keine undifferenzierten ES-Zellen persistieren (Sperger et al., 2003). Das deutet darauf hin, dass die Tumorstammzell-

Population im nichtseminomatösen TKZT durch EC-Zellen verkörpert wird, welche sowohl für die Ausbildung verschiedener Gewebetypen verantwortlich sind, als auch das maligne Tumorwachstum aufrecht erhalten. Nahezu alle aus der Literatur bekannten Zelllinien, welche aus TKZT etabliert wurden und auf ihr tumorigenes Potential im Nacktmaus-Modell überprüft wurden, zeigen EC mit oder ohne differenzierten Komponenten (siehe auch Kapitel 5.2). Das verdeutlicht, dass größtenteils nur EC-Zellen während des Etablierungsprozesses in der Lage sind, zu expandieren und weiterhin tumorigenes Potential besitzen. EC-Zellen stellen nahezu immer eine Komponente in nichtseminomatösen TKZT dar, wohingegen die drei anderen typischen Komponenten (TE, YST, CC) jeweils nur zu einem bestimmten Prozentsatz vorkommen (Ulbright, 1993). Eine häufige klinische Situation bei Patienten mit fortgeschrittenem TKZT ist das Persistieren von Residuen nach erfolgter Chemotherapie, welche chirurgisch entfernt und histologisch untersucht werden (Schmoll, 1999). In etwa 15-25% der Fälle befindet sich vitales Karzinom in den Resektaten, welches histomorphologisch EC entspricht (persönliche Mitteilung, Prof. A. Heidenreich, Universität zu Köln). Diese Patienten werden erneut einer Chemotherapie unterzogen, da die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs sehr hoch ist (Schmoll, 1999). Diese Daten sprechen dafür, dass EC-Zellen die Tumorstammzellen des nichtseminomatösen TKZT darstellen.

Die typisch hohe Chemotherapie-Sensitivität von TKZT, welche darüber hinaus in den meisten Fällen zu einer vollständigen Eradikation des Tumors führt, kann mit Hilfe der Tumorstammzell-Hypothese sehr gut erklärt werden. Man geht davon aus, dass TKZT von embryonalen Keimzellen bzw. Gonozyten abstammen und initiale Schritte der Onkogenese bereits pränatal eingeleitet werden. (Skakkebaek et al., 1987). Ziel der malignen Transformation ist daher die potentiell totipotente Keimzelle. Diese Zellen besitzen naturgemäß eine inhärente Hypersensitivität gegenüber einer DNA-Schädigung. Um das Risiko einer Akkumulation von Mutationen in der Keimbahn gering zu halten, muss in diesen Zellen die Neigung zur Apoptose-Induktion wesentlich größer sein als die Fähigkeit zur Reparatur der DNA-Schäden. Diese Eigenschaft bleibt nach der malignen Transformation bestehen. Zahlreiche Untersuchungen an EC-Zelllinien bestätigen diese Eigenschaft und zeigen, dass diese Zellen gegenüber Zelllinien anderer Tumorentitäten besonders sensitiv sind (siehe Kapitel 1.4). Dem malignen Wachstum von nichtseminomatösen TKZT liegen folglich Tumorstammzellen zu Grunde, welche eine hohe Empfindlichkeit zur Apoptose-Induktion insbesondere nach DNA-Schädigung aufweisen. Die Cisplatin-haltige Chemotherapie tötet daher vor allem die Zellen des TKZT ab, welche das maligne Tumorwachstum aufrecht

erhalten. Wahrscheinlich aus diesem Grund ist der TKZT der einzige solide Tumor im Erwachsenenalter, der zu einem hohen Prozentsatz durch Chemotherapie geheilt werden kann.

In soliden Tumoren anderer Entitäten entsprechen die Tumorstammzellen den adulten Stammzellen bzw. Gewebe-determinierten Progenitorzellen. Diese Zellen sind bereits vor der malignen Transformation weniger chemo-sensitiv als die embryonalen Zellen, die dem Wachstum von TKZT zu Grunde liegen. Eine Chemotherapie kann ebenfalls zu einer vollständigen Remission führen, jedoch ist diese in den meisten Fällen nur scheinbar. Die zytotoxische Wirkung der Chemotherapie wirkt sich wahrscheinlich vor allem auf die zahlenmäßig größere Population der differenzierten Zellen aus. Dies wird dadurch unterstützt, dass die Chemotherapie auf die Tumorstammzellen zunächst zytostatisch wirkt und daher eine Neubildung von differenzierten Zellen gehemmt wird. Die Tumorstammzellen, welche unter der Chemotherapie nicht abgetötet werden und lediglich einen transienten Zellzyklusarrest erfahren, können im Körper persistieren. Diese zahlenmäßig kleine Zellpopulation wird durch die gegebenen diagnostischen Verfahren nicht erkannt. Zu gegebener Zeit können diese Zellen erneut einen Tumor bilden. Durch Akkumulation zusätzlicher Mutationen kann der Rezidivtumor schließlich aggressiver und gegenüber der Chemotherapie refraktärer sein. Die meisten Patienten mit einem fortgeschrittenen soliden Tumor, außer einem TKZT, können durch Chemotherapie nicht geheilt werden und erliegen schließlich ihrer Tumorerkrankung (siehe Kapitel 1.3). Ein ähnliches Szenario spielt sich in etwa 20% der Fälle auch beim metastasierten nichtseminomatösen TKZT ab. Eine allgemeingültige Erklärung bzw. Hypothese für die Chemotherapie-Resistenz beim nichtseminomatösen TKZT gibt es bisher nicht.

Die innerhalb der vorliegenden Studie gewonnenen Erkenntnisse lassen bezüglich der Chemotherapie-Resistenz beim nichtseminomatösen TKZT eine Hypothese zu. Die Untersuchungen führten zur Identifizierung und Charakterisierung des Oct-3/4-negativen EC-Zelltyps. Diese EC-Zellen besitzen tumorigenes Potential und bilden typische nichtseminomatöse TKZT in der Nacktmaus, besitzen jedoch eine veränderte apoptotische Regulation, die in einer Cisplatin-Resistenz resultiert. Es kann postuliert werden, dass Oct-3/4-negative EC-Zellen die Tumorstammzell-Population in resistenten nichtseminomatösen TKZT bilden. Ein Anzeichen dafür ist das Auftreten von EC-Zellen in resezierten Residuen nach erfolgter Chemotherapie. Zu einem großen Prozentsatz beinhalten die Resektate entweder reifes Teratom oder Nekrose/Fibrose. Auch nach einer in einigen Fällen

notwendigen Salvage-Chemotherapie werden nach anschließender zweiter Residuen-Resektion EC-Zellen in den Resektaten beobachtet (Heidenreich et al., 2005). Das ist mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert, im Gegensatz zu Residuen, die Teratom oder Nekrose/Fibrose enthalten (Heidenreich et al., 2005). Dieser Zusammenhang wird durch eine weitere Studie bekräftigt, welche sich darüber hinaus speziell mit früh- und spät-rezidivierenden nichtseminomatösen TKZT beschäftigte (Sugimura et al., 2004). Es erscheint sehr unwahrscheinlich, dass es sich bei derartigen EC-Zellen weiterhin um die hoch Cisplatin-sensitiven Oct-3/4-positiven EC-Zellen handelt, welche ursprünglich dem Tumorwachstum der TKZT zu Grunde liegen. Es erscheint dagegen wahrscheinlich, dass es sich bei derartigen EC-Zellen um die hier beschriebenen Oct-3/4-negativen, Cisplatin-resistenten EC-Zellen handelt. Eine herkömmliche histologische Analyse kann diesbezüglich keine Unterscheidung treffen. Die innerhalb dieser Studie durchgeführten Analysen zeigen, dass eine eindeutige Unterscheidung beider EC-Zelltypen durch eine immunhistochemische Analyse der Oct-3/4-Expression getroffen werden kann.

Derzeit existiert in der Literatur lediglich eine Studie, in der Tumorproben speziell von Chemotherapie-sensitiven und -rezidivierenden bzw. -refraktären TKZT immunhistochemisch auf eine Oct-3/4-Expression untersucht wurden (Looijenga et al., 2003a). Anhand der Resektate von 34 Patienten mit nichtseminomatösen TKZT wurden durch Looijenga et al. keine Unterschiede in der Oct-3/4-Expression zwischen beiden Gruppen beobachtet. Jedoch handelte es sich bei den Resektaten um therapienaive Primärtumoren und eine Klassifizierung in sensitive und resistente TKZT erfolgte retrospektiv an Hand des dokumentierten klinischen Verlaufs. Eine derartig erstellte Assoziation muss nicht zwingend relevant sein. Nach dem derzeitigen Wissensstand ist die Chemotherapie-Resistenz maligner Tumoren das Resultat eines multifaktoriellen Prozesses, in dessen Verlauf resistente Zellen selektioniert werden (Hazlehurst et al., 2003). Dieses Konzept wird unterstützt durch aktuelle Untersuchungen, die belegen, dass das Tumorwachstum durch eine zahlenmäßig kleine Population von Tumorstammzellen propagiert wird, die sich phänotypisch von den restlichen Zellen des Tumors abgrenzen lässt (siehe oben). Basierend auf diesen Beobachtungen lässt sich Chemotherapie-Resistenz als Ergebnis einer Selektion von Tumorstammzellen begreifen, die entweder primär über eine Resistenz verfügten oder aber diese sekundär im Rahmen von Differenzierungsprozessen oder zusätzlichen Mutationen erworben haben, ohne die Fähigkeit zur Tumorpropagation zu verlieren. Die Tatsache, dass bei der immunhistochemischen Untersuchung von nichtseminomatösen TKZT durch Looijenga et al. keine Unterschiede in

der Oct-3/4-Expression in Abhängigkeit des klinischen Verlaufs beobachtet wurden, steht deshalb nicht im Widerspruch zu der Annahme, dass der Cisplatin-Resistenz fortgeschrittener TKZT Oct-3/4-negative EC-Zellen zu Grunde liegen könnten. Da diese Tumoren von Oct-3/4-positiven Keimzellen ausgehen, sind folglich im testikulären Primärtumor auch vorrangig Oct-3/4-positiv EC-Zellen anzutreffen. Hinzu kommt, dass das Ausmaß der Oct-3/4-Expression innerhalb der EC-Zellpopulationen in den TKZT variiert (Looijenga et al., 2003a). Sollten überhaupt Oct-3/4-negative, resistente EC-Zellen bereits im testikulären Primärtumor vorhanden sein, so entgehen diese mit großer Wahrscheinlichkeit der histologischen Untersuchung, da derzeit nicht gezielt auf diese EC-Zellen untersucht wird.

Für eine Untersuchung der Oct-3/4-Expression zur Überprüfung der Hypothese wären EC-Zellen relevant, die eine oder mehrere Chemotherapien überstanden haben (siehe oben (Heidenreich et al., 2005)). Diesbezüglich liegen bisher keine vergleichenden Analysen zur Oct-3/4-Expression von nichtseminomatösen TKZT im therapie-naiven- und rezidivierenden Zustand vor. Nur diese könnten Aufschluss geben, inwiefern sich der Phänotyp der Tumorstammzell-Population des Rezidivtumors gegenüber dem Primärtumor verändert hat. Die Daten der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass es sich dabei um einen frühen Differenzierungsprozess in EC-Zellen handelt, welcher den Verlust von Oct-3/4 voraussetzt. Die Existenz von Oct-3/4-positiven EC-Zellen in therapie-naiven, prospektiv resistenten nichtseminomatösen TKZT unterstützt vielmehr einen Selektionsmechanismus zur Resistenzentwicklung, so dass Oct-3/4-negative, Cisplatin-resistente EC-Zellen entweder geringfügig im Primärtumor vorhanden sind oder diese im Zuge der Metastasierung sich entwickeln und schließlich durchsetzen. Die Existenz der hier verwendeten Cisplatin-resistenten, Oct-3/4-negativen TKZT-Zelllinien, welche ursprünglich aus dem Tumormaterial von Metastasen etabliert wurden, unterstützen ebenfalls einen derartigen Mechanismus. Für einen Entwicklungs- und Selektionsmechanismus spricht darüber hinaus die differentielle Oct-3/4-Expression der beiden Zelllinien 1777N und 1777NRpmet.

Die innerhalb dieser Studie erstellten Daten in Verbindung mit den erläuterten Zusammenhängen aus der Literatur unterstützen die Hypothese, dass in resistenten nichtseminomatösen TKZT die ursprüngliche Tumorstammzell-Population von Cisplatin-sensitiven, Oct-3/4-positiven EC-Zellen durch eine Cisplatin-resistente, Oct-3/4-negative EC-Zellpopulation im Zuge eines Selektionsprozesses ersetzt wurde. In diesem Zustand kann der fortgeschrittene TKZT bezüglich des Verhaltens während einer Chemotherapie mit anderen soliden Tumoren verglichen werden (siehe oben). Durch die Chemotherapie werden vor allem

die differenzierten Zellen abgetötet, während die Tumorstammzellen weniger chemo-sensitiv sind und einige überleben können. Eine Ausnahme in Bezug auf den TKZT stellen die vollständig somatisch differenzierten und chemo-resistenten Gewebezellen im reifen Teratom dar. Der postulierte Mechanismus findet jedoch seine Anwendung im Falle der extra-embryonal differenzierten Zellen (YST, CC). Ein typisches Erkennungsmerkmal von TKZT sind erhöhte Level der Tumormarker *Humanes Choriongonadotropin* (HCG) und/oder *α Fetoprotein* (AFP) im Serum der Patienten, welche für eine sichere Diagnosestellung bestimmt werden (Schmoll, 1999). Umfangreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass beide Marker direkt mit einer extra-embryonalen Differenzierung im Tumor assoziiert sind. Erhöhte AFP-Level korrelieren mit dem Vorkommen von YST-Elementen im Tumor wohingegen trophoplastische Elemente (CC) mit einem erhöhten HCG-Level assoziiert sind (Norgaard-Pedersen et al., 1983; Talerman, 1980; Talerman et al., 1980). Die Level beider Marker werden als Verlaufskontrolle während und nach der Chemotherapie kontrolliert. Eine Resektion von Tumorresiduen nach erfolgter Chemotherapie ist meist nur indiziert, wenn sich eine Markernormalisierung eingestellt hat (Schmoll, 1999). Die Existenz von EC-Zellen in 15-25% der Residuen (siehe oben) zeigt, dass diese Zellen keine oder nur in geringem Maße Tumormarker produzieren. Das verdeutlicht, dass durch die Chemotherapie vor allem die Marker-produzierenden differenzierten Zellen abgetötet wurden. Bei einigen Patienten, die eine vollständige Tumorremission erfahren haben, kann in der Rezidivsituation durch eine erneute Chemotherapie mehrfach eine vollständige Remission verbunden mit einem normalen Markerstatus erreicht werden, bis schließlich die Chemotherapie versagt (Schmoll, 1999). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass in diesen Patienten auch während der Remission resistente EC-Zellen persistieren, welche durch die gegebenen diagnostischen Verfahren nicht erkannt werden. Nach einer bestimmten Zeit bilden diese EC-Zellen durch Proliferation und Differenzierung erneut einen Marker-produzierenden Tumor. Dabei unterliegen diese Tumorstammzellen wahrscheinlich weiteren Veränderungen, die letztendlich in einer von den ursprünglichen Keimzelltumoren distinkten Tumorbilogie der resistenten Keimzelltumoren resultiert.

Darüber hinaus dienen die Tumormarker AFP und HCG als prätherapeutische Kriterien für eine Prognoseklassifikation der Patienten (siehe IGCCCG-Klassifikation, (IGCCCG, 1997)). Dabei sind hohe Markerlevel mit einer schlechten Prognose assoziiert. Hohe Markerlevel sind nicht nur mit einer größeren Tumormasse assoziiert, sondern indizieren vielmehr eine hohe Ereignisrate an Differenzierungsprozessen. Das lässt vermuten, dass auch die Prozesse zur

Etablierung einer Cisplatin-resistenten EC-Zellpopulation in Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren und schlechten Prognosekriterien vermehrt ablaufen. Je mehr Oct-3/4-negative EC-Zellen im Tumor vorhanden sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass derartige Zellen überleben können und sich schließlich durchsetzen. Patienten der Kategorie mit schlechten Prognosekriterien haben eine Überlebenschance von lediglich 48% (siehe IGCCCG-Klassifikation, (IGCCCG, 1997)). In einer vorläufigen Studie zur primären Hochdosis-Chemotherapie von Patienten mit schlechten Prognosekriterien konnte ein Überlebensvorteil im Vergleich zur Standardtherapie erreicht werden (Schmoll et al., 2003). Ausgehend von der Hypothese der resistenten Tumorstammzellen werden in diesem Fall die wenigen bereits existierenden resistenten EC-Zellen wahrscheinlich durch die initial eingesetzte erhöhte Dosis noch erreicht, bevor diese sich gegenüber den sensitiven EC-Zellen durchsetzen können und darüber hinaus zusätzliche Resistenzmechanismen akkumulieren. Die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf eine Hochdosis-Chemotherapie im Rezidivfall ist dagegen geringer, da resistente EC-Zellen bereits selektioniert wurden. Alternativ oder zusätzlich zu dieser Vorgehensweise wären Therapieoptionen denkbar, die gezielt überlebenswichtige Pathways der Tumorstammzellen beeinflussen. Wesentlich für weitere Untersuchungen jedoch ist zunächst die Bestätigung der Hypothese, dass Oct-3/4-negative EC-Zellen die resistenten Tumorstammzellen von nichtseminomatösen TKZT bilden. Daraufhin könnten weitere molekularbiologische Untersuchungen insbesondere zur Apoptose-Regulation neue Targets identifizieren, die bei gezielter Beeinflussung die resistenten EC-Zellen gegenüber der konventionellen Chemotherapie erneut sensitivieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Arbeiten der vorliegenden Dissertation dienten der Zielsetzung, durch Untersuchungen auf zellulärer bzw. molekularer Ebene zur Aufklärung der Ursachen einer Cisplatin-Resistenz beim malignen TKZT beizutragen. Aus den Untersuchungen sollten sich Grundlagen bzw. neue Ausgangspunkte für weiterführende Analysen ergeben. Es wurden vergleichende Analysen an nichtseminomatösen TKZT-Zelllinien mit unterschiedlicher Cisplatin-Sensitivität durchgeführt. Dabei konnte das verwendete Zelllinien-Panel im Laufe der Studie erweitert werden, so dass die Aussagekraft des Modells verstärkt wurde. Des Weiteren konnte durch die *in vivo*-Analysen an abgeleiteten Nacktmaus-Tumor-Xenograften gezeigt werden, dass die Untersuchungen zur Cisplatin-Resistenz unter klinisch relevanten Behandlungsbedingungen durchgeführt wurden. Die Schwerpunkte der Untersuchungen bildeten die Mechanismen der Cisplatin-induzierten Apoptose sowie die Rolle des embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass eine Cisplatin-Behandlung in equitoxischer Dosis sowohl in sensitiven als auch in resistenten TKZT-Zellen den apoptotischen Zelltod auslöst. Die Cisplatin-Resistenz der resistenten TKZT-Zellen war mit einer verminderten Induktion der Apoptose im Vergleich zu sensitiven TKZT-Zellen assoziiert. Resistente TKZT-Zellen zeigten eine höhere Aktivierungsschwelle zur Induktion des apoptotischen Programms, so dass eine niedrige, klinisch relevante Cisplatin-Dosis toleriert wurde. Das korrelierte mit der fehlenden Regression der resistenten Nacktmaus-Tumor-Xenograften *in vivo* und ließ schließen, dass die Induktion der Apoptose den Hauptmechanismus der Tumor-Regression darstellt. Die Analyse relevanter Parameter wie DNA-Platinierung, Zellzyklusarretierung, Expression von p53 sowie von Proteinen der Bcl2-Familie und Proteinen des *Mismatch repair pathways*, führten zu keinen Unterschieden, welche die verminderte Induktion des apoptotischen Zelltodes in den resistenten TKZT-Zellen erklären könnte. Dabei wurde die noch uneindeutige Rolle von p53 für die Cisplatin-Sensitivität von TKZT-Zellen näher untersucht. Es stellte sich heraus, dass die zytotoxische Wirkung von Cisplatin in sensitiven und resistenten TKZT-Zellen unabhängig von einer p53-Akkumulation erzielt wird. Zusammengefasst konnte aus den Daten geschlossen werden, dass die Mechanismen, die eine Sensitivität bzw. Resistenz von TKZT-Zellen gegenüber Cisplatin determinieren, außerhalb des nukleären Kompartiments ablaufen.

Die Analysen zur Aktivierung der Caspasen bekräftigten diese Annahme. Die Untersuchungen zeigten, dass die Cisplatin-induzierte Apoptose in sensitiven TKZT-Zellen über den intrinsischen Caspase-9/Apoptosom-assoziierten Pathway, und nicht über den extrinsischen, Caspase-8/DISC-assoziierten Pathway initiiert wird. Die Aktivierung der Caspasen war mit der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Zytosol sowie mit einer erhöhten Co-Lokalisation von Apaf-1 und Caspase-9 verbunden. Des Weiteren konnte aus diesen Untersuchungen geschlossen werden, dass der Caspase-9/Apoptosom-assoziierte Pathway in den resistenten TKZT-Zellen blockiert ist, und dadurch eine Induktion der Apoptose nach einer Behandlung mit niedriger Cisplatin-Dosis verhindert wird. Die Apoptose-Induktion in den resistenten TKZT-Zellen erfolgt durch einen zusätzlichen intrinsischen, Caspase-9 unabhängigen Pathway, der jedoch erst bei einer höheren Cisplatin-Dosis ausgelöst wird. Die Aktivierung der Caspase-9 ist daher nicht zwingend notwendig für die Cisplatin-induzierte Apoptose, vermittelt jedoch die Sensitivität gegenüber Cisplatin in TKZT-Zellen. Die Resistenz von TKZT-Zellen war mit einer inhibierten Freisetzung von Cytochrom c und einer fehlenden Aktivität der gespaltenen Caspase-9 sowie mit reduzierten Aktivitäten der Caspasen-2 und -3 assoziiert. Insgesamt konnte aus den Untersuchungen zur Apoptose-Regulation geschlossen werden, dass die Apoptosom-assoziierten Vorgänge eine zentrale Position einnehmen und die Cisplatin-Resistenz in TKZT-Zellen durch Veränderungen in den regulatorischen Ebenen *upstream* und *downstream* des Mitochondriums determiniert ist. Unter Berücksichtigung neuer Daten aus der Literatur wurden spezielle Proteine wie IAPs, HSPs und BH3-only Bcl2-Homologe, welche durch unterschiedliche Mechanismen an der Regulation des Apoptosom-Komplexes beteiligt sein können, als mögliche relevante Proteine in die Diskussion mit einbezogen.

Die Analyse zur Expression des EC-Zell-typischen, embryonalen Transkriptionsfaktors Oct-3/4 zeigte, dass eine eindeutige Zuordnung bezüglich Cisplatin-Sensitivität bzw. Resistenz über den Oct-3/4-Expressionsstatus erfolgen kann. Eine in jedem Fall gleich starke Oct-3/4-Expression war mit Cisplatin-Sensitivität assoziiert, wohingegen ein vollständiges Fehlen der Oct-3/4-Expression mit Cisplatin-Resistenz verbunden war. Weitere Untersuchungen zeigten, dass EC-Zellen durch die Oct-3/4-Expression in ihrem undifferenzierten embryonalen Cisplatin-sensitiven Zustand gehalten werden und ein früher Differenzierungsschritt, welcher den vollständigen Verlust von Oct-3/4 voraussetzt, notwendig ist, dass EC-Zellen ihre typische hohe Sensitivität gegenüber Cisplatin verlieren und resistent werden. Dies stellt einen irreversiblen Vorgang dar und führt zur Etablierung der

committed/determinierten, Cisplatin-resistenten EC-Zellen, welche durch eine erneute Expression von Oct-3/4 nicht in den Cisplatin-sensitiven Zustand zurückgeführt werden konnten. Die Cisplatin-Sensitivität von EC-Zellen ist daher durch den endogen Oct-3/4-exprimierenden Zustand gegeben. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Apoptose-Regulation konnte daher geschlossen werden, dass im Zuge eines sehr frühen Differenzierungsschrittes in EC-Zellen, welcher den Verlust von Oct-3/4 voraussetzt, es bereits zu einer Neukonstellation des apoptotischen Systems kommt mit der Konsequenz einer Cisplatin-Resistenz. Die Analysen zur H12.1-derivatisierten, Cisplatin-resistenten Zellpopulation H12.1D verdeutlichten, dass diese anti-apoptotische Konstellation in den resistenten TKZT-Zellen kein Zelllinien-spezifisches Phänomen darstellt. Es handelt sich dabei um einen induzierbaren Prozess in EC-Zellen, wobei ausgehend von einer pro-apoptischen Konstellation eine anti-apoptotische Konstellation neu etabliert wird. Gleichzeitig führten diese Analysen zur Identifizierung und Charakterisierung des noch unbeschriebenen Zelltyps – den Oct-3/4-negativen EC-Zellen.

Die hier erstellten Daten im Zusammenhang mit denen einer *cDNA-microarray*-Analyse aus der Literatur verdeutlichten, dass die induzierbaren Veränderungen im apoptotischen System mit globalen Veränderungen im Genexpressionsmusters der *committed*/determinierten, Oct-3/4-negativen EC-Zellen einhergehen. Eine Bezeichnung als EC-Zelle ist auf Grund der gleichen undifferenzierten Histomorphologie gegeben. Darüber hinaus besitzen Oct-3/4-negative EC-Zellen weiterhin tumorigenes Potential und bilden, genau wie Oct-3/4-positive EC-Zellen, typische nichtseminomatöse Keimzelltumoren in Nacktmäusen, welche jedoch Cisplatin-refraktär sind. Auf Grund dieser Beobachtungen und unter Voraussetzung der Tumorstammzell-Hypothese wurde daher in Bezug auf die Cisplatin-Resistenz beim TKZT die Hypothese erstellt, dass Oct-3/4-negative EC-Zellen als Tumorstammzell-Population dem malignen Wachstum von resistenten nichtseminomatösen TKZT zu Grunde liegen könnten. Die hier erstellten Daten zusammen mit histologischen Befunden von resezierten Residualtumoren lassen eine derartige Vermutung zu. Dagegen könnten die Oct-3/4-positiven, stark Cisplatin-sensitiven EC-Zellen als ursprüngliche Tumorstammzellen des nichtseminomatösen TKZT die außerordentlich hohe Sensitivität und Heilbarkeit dieser Tumorentität erklären.

In weiterführenden Untersuchungen müsste zunächst an der Bestätigung der Hypothese gearbeitet werden, dass Oct-3/4-negative EC-Zellen die resistenten Tumorstammzellen von nichtseminomatösen TKZT darstellen. Diesbezüglich sollten Residualtumoren, welche nach

einer Chemotherapie entnommen wurden, auf Oct-3/4-negative Zellen mit EC-Histomorphologie analysiert werden. Eine Analyse von metastasierten Residualtumoren im Vergleich zu den dazugehörigen testikulären Primärtumoren könnte darüber hinaus Anhaltspunkte schaffen, inwiefern die Etablierung einer Cisplatin-Resistenz schon frühzeitig prognostiziert werden kann. Des Weiteren könnten aus geeigneten Residualtumoren weitere Cisplatin-resistente TKZT-Zelllinien etabliert werden um das bisher kleine zur Verfügung stehende Zelllinienpanel von resistenten TKZT-Zellen zu erweitern. Derartig neu etablierte TKZT-Zelllinien zusammen mit den hier analysierten TKZT-Zelllinien stellen geeignete Untersuchungsobjekte für weitere molekularbiologische Untersuchungen insbesondere zur Apoptose-Regulation dar. Die hier durchgeführten Analysen zur Apoptose-Regulation zeigen, dass die Identifikation und Analysierung sämtlicher Bindungspartner von Caspase-9 in sensitiven und resistenten TKZT ein geeigneter Ausgangspunkt ist, um weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Cisplatin-Resistenz in TKZT-Zellen durchzuführen. Darüber hinaus könnten überlebenswichtige Pathways der resistenten TKZT-Zellen analysiert werden. In beiden Ansätzen sollten neue Targets identifiziert werden, die bei gezielter Beeinflussung die resistenten TKZT-Zellen gegenüber der konventionellen Chemotherapie erneut sensitivieren. Zusätzlich könnte an den resistenten TKZT-Zelllinien die Testung neuer Substanzen oder Substanzkombinationen erfolgen. Letztendlich sollten die Untersuchungen darauf abzielen, die Chemotherapie von Patienten mit schlechter Prognose zu optimieren und etablierte Chemotherapie-Resistenzen zu überwinden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Adams J. M., and Cory S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* *281*, 1322-1326.

Aebi S., Kurdi-Haidar B., Gordon R., Cenni B., Zheng H., Fink D., Christen R. D., Boland C. R., Koi M., Fishel R., and Howell S. B. (1996). Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* *56*, 3087-3090.

Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S. J., and Clarke M. F. (2003). From the Cover: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3983-3988.

Al-Hajj M., and Clarke M. F. (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* *23*, 7274-7282.

Alnemri E. S., Livingston D. J., Nicholson D. W., Salvesen G., Thornberry N. A., Wong W. W., and Yuan J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* *87*, 171.

Andrews P. W., Bronson D. L., Benham F., Strickland S., and Knowles B. B. (1980). A comparative study of eight cell lines derived from human testicular teratocarcinoma. *Int J Cancer* *26*, 269-280.

Andrews P. W., Nudelman E., Hakomori S., and Fenderson B. A. (1990). Different patterns of glycolipid antigens are expressed following differentiation of TERA-2 human embryonal carcinoma cells induced by retinoic acid, hexamethylene bisacetamide (HMBA) or bromodeoxyuridine (BUdR). *Differentiation* *43*, 131-138.

Andrews P. W., Casper J., Damjanov I., Duggan-Keen M., Giwercman A., Hata J., von Keitz A., Looijenga L. H., Millan J. L., Oosterhuis J. W., *et al.* (1996). Comparative analysis of cell surface antigens expressed by cell lines derived from human germ cell tumours. *Int J Cancer* *66*, 806-816.

Andrews P. W. (1998). Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *Apmis* *106*, 158-167.

Andrews P. W. (2002). From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *357*, 405-417.

Arends M. J., and Wyllie A. H. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* *32*, 223-254.

Bedford P., Fichtinger-Schepman A. M., Shellard S. A., Walker M. C., Masters J. R., and Hill B. T. (1988). Differential repair of platinum-DNA adducts in human bladder and testicular tumor continuous cell lines. *Cancer Res* *48*, 3019-3024.

- Bergstrom R., Adami H. O., Mohner M., Zatonski W., Storm H., Ekblom A., Tretli S., Teppo L., Akre O., and Hakulinen T. (1996). Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon. *J Natl Cancer Inst* 88, 727-733.
- Bernstein C., Bernstein H., Payne C. M., and Garewal H. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* 511, 145-178.
- Boatright K. M., and Salvesen G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 725-731.
- Bodmer J. L., Holler N., Reynard S., Vinciguerra P., Schneider P., Juo P., Blenis J., and Tschopp J. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* 2, 241-243.
- Borst P., Evers R., Kool M., and Wijnholds J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92, 1295-1302.
- Bosl G. J., and Motzer R. J. (1997). Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* 337, 242-253.
- Bronson D. L., Andrews P. W., Vessella R. L., and Fraley E. E. (1983). In vitro differentiation of human embryonal carcinoma cells. In: *Teratocarcinoma Stem Cells*, Silver LM, Martin GR, Strickland S (eds) 10th Edition, 597-605.
- Bronson D. L., Vessella R. L., and Fraley E. E. (1984). Differentiation potential of human embryonal carcinoma cell lines. *Cell Differ* 15, 129-132.
- Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., and Wang X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-290.
- Buick R. N., Minden M. D., and McCulloch E. A. (1979). Self-renewal in culture of proliferative blast progenitor cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 54, 95-104.
- Burger H., Nooter K., Boersma A. W., Kortland C. J., and Stoter G. (1997). Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer* 73, 592-599.
- Burger H., Nooter K., Boersma A. W., van Wingerden K. E., Looijenga L. H., Jochemsen A. G., and Stoter G. (1999). Distinct p53-independent apoptotic cell death signalling pathways in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer* 81, 620-628.
- Casper J., Schmoll H. J., Schnaidt U., and Fonatsch C. (1987). Cell lines of human germinal cancer. *Int J Androl* 10, 105-113.
- Chaganti R. S., and Houldsworth J. (2000). Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res* 60, 1475-1482.

- Chauhan D., Li G., Hideshima T., Podar K., Mitsiades C., Mitsiades N., Catley L., Tai Y. T., Hayashi T., Shringarpure R., *et al.* (2003). Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* 102, 3379-3386.
- Chen X., Ko L. J., Jayaraman L., and Prives C. (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 10, 2438-2451.
- Chresta C. M., Masters J. R., and Hickman J. A. (1996). Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. *Cancer Res* 56, 1834-1841.
- Clarkson B., Fried J., Strife A., Sakai Y., Ota K., and Okita T. (1970). Studies of cellular proliferation in human leukemia. 3. Behavior of leukemic cells in three adults with acute leukemia given continuous infusions of 3H-thymidine for 8 or 10 days. *Cancer* 25, 1237-1260.
- Cohen G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1), 1-16.
- Cohen J. J., Duke R. C., Fadok V. A., and Sellins K. S. (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 10, 267-293.
- Concannon C. G., Orrenius S., and Samali A. (2001). Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr* 9, 195-201.
- Consortium T. I. T. C. L. (1998). Candidate regions for testicular cancer susceptibility genes. The International Testicular Cancer Linkage Consortium. *Apmis* 106, 64-70; discussion 71-62.
- Damjanov I., Horvat B., and Gibas Z. (1993). Retinoic acid-induced differentiation of the developmentally pluripotent human germ cell tumor-derived cell line, NCCIT. *Lab Invest* 68, 220-232.
- Degterev A., Boyce M., and Yuan J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
- Devouassoux-Shisheboran M., Mauduit C., Bouvier R., Berger F., Bouras M., Droz J. P., and Benahmed M. (2001). Expression of hMLH1 and hMSH2 and assessment of microsatellite instability in testicular and mediastinal germ cell tumours. *Mol Hum Reprod* 7, 1099-1105.
- Earnshaw W. C., Martins L. M., and Kaufmann S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- Eastman A. (1990). Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 2, 275-280.

- Einhorn L. H., and Donohue J. (1977). Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann Intern Med* 87, 293-298.
- Einhorn L. H. (2002). Curing metastatic testicular cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4592-4595.
- Ellis H. M., and Horvitz H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.
- Ellis R. E., Yuan J. Y., and Horvitz H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7, 663-698.
- Ferreira C. G., Span S. W., Peters G. J., Kruyt F. A., and Giaccone G. (2000). Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Cancer Res* 60, 7133-7141.
- Fink D., Nebel S., Aebi S., Zheng H., Cenni B., Nehme A., Christen R. D., and Howell S. B. (1996). The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 56, 4881-4886.
- Fink D., Aebi S., and Howell S. B. (1998). The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 4, 1-6.
- Fisher D. E. (1994). Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78, 539-542.
- Fitzharris B. M., Kaye S. B., Saverymuttu S., Newlands E. S., Barrett A., Peckham M. J., and McElwain T. J. (1980). VP16-213 as a single agent in advanced testicular tumors. *Eur J Cancer* 16, 1193-1197.
- Fraval H. N., Rawlings C. J., and Roberts J. J. (1978). Increased sensitivity of UV-repair-deficient human cells to DNA bound platinum products which unlike thymine dimers are not recognized by an endonuclease extracted from *Micrococcus luteus*. *Mutat Res* 51, 121-132.
- Friesen C., Fulda S., and Debatin K. M. (1999). Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia* 13, 1854-1858.
- Fry A. M., Chresta C. M., Davies S. M., Walker M. C., Harris A. L., Hartley J. A., Masters J. R., and Hickson I. D. (1991). Relationship between topoisomerase II level and chemosensitivity in human tumor cell lines. *Cancer Res* 51, 6592-6595.
- Garcia-Calvo M., Peterson E. P., Leiting B., Ruel R., Nicholson D. W., and Thornberry N. A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273, 32608-32613.
- Gidekel S., Pizov G., Bergman Y., and Pikarsky E. (2003). Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 4, 361-370.

Gillissen B., Essmann F., Graupner V., Starck L., Radetzki S., Dorken B., Schulze-Osthoff K., and Daniel P. T. (2003). Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *Embo J* 22, 3580-3590.

Green D. R., and Reed J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Group U. K. T. C. S. (1994). Aetiology of testicular cancer: association with congenital abnormalities, age at puberty, infertility, and exercise. United Kingdom Testicular Cancer Study Group. *Bmj* 308, 1393-1399.

Hamburger A. W., and Salmon S. E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461-463.

Harlow E., and Lane D. (1988). *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory (Press).

Harris C. C. (1996). Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 88, 1442-1455.

Hay D. C., Sutherland L., Clark J., and Burdon T. (2004). Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 225-235.

Hazlehurst L. A., Landowski T. H., and Dalton W. S. (2003). Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death. *Oncogene* 22, 7396-7402.

Heidenreich A., Schenkman N. S., Sesterhenn I. A., Mostofi K. F., Moul J. W., Srivastava S., and Engelmann U. H. (1998). Immunohistochemical and mutational analysis of the p53 tumour suppressor gene and the bcl-2 oncogene in primary testicular germ cell tumours. *Apmis* 106, 90-99; discussion 99-100.

Heidenreich A., Ohlmann C., Hegele A., and Beyer J. (2005). Repeat retroperitoneal lymphadenectomy in advanced testicular cancer. *Eur Urol* 47, 64-71.

Heimdal K., Lothe R. A., Lystad S., Holm R., Fossa S. D., and Borresen A. L. (1993). No germline TP53 mutations detected in familial and bilateral testicular cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 6, 92-97.

Hemmati H. D., Nakano I., Lazareff J. A., Masterman-Smith M., Geschwind D. H., Bronner-Fraser M., and Kornblum H. I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15178-15183.

Hengartner M. O., Ellis R. E., and Horvitz H. R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494-499.

Hengartner M. O., and Horvitz H. R. (1994). *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 76, 665-676.

- Higby D. J., Wallace H. J., Jr., Albert D. J., and Holland J. F. (1974). Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors. *Cancer* 33, 1219-1215.
- Hill B. T., Scanlon K. J., Hansson J., Harstrick A., Pera M., Fichtinger-Schepman A. M., and Shellard S. A. (1994). Deficient repair of cisplatin-DNA adducts identified in human testicular teratoma cell lines established from tumours from untreated patients. *Eur J Cancer* 30A, 832-837.
- Hill M. M., Adrain C., Duriez P. J., Creagh E. M., and Martin S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J* 23, 2134-2145.
- Hirschmann-Jax C., Foster A. E., Wulf G. G., Nuchtern J. G., Jax T. W., Gobel U., Goodell M. A., and Brenner M. K. (2004). A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14228-14233.
- Honecker F., Oosterhuis J. W., Mayer F., Hartmann J. T., Bokemeyer C., and Looijenga L. H. (2004). New insights into the pathology and molecular biology of human germ cell tumors. *World J Urol* 22, 15-24.
- Houldsworth J., Xiao H., Murty V. V., Chen W., Ray B., Reuter V. E., Bosl G. J., and Chaganti R. S. (1998). Human male germ cell tumor resistance to cisplatin is linked to TP53 gene mutation. *Oncogene* 16, 2345-2349.
- Huddart R. A., Titley J., Robertson D., Williams G. T., Horwich A., and Cooper C. S. (1995). Programmed cell death in response to chemotherapeutic agents in human germ cell tumour lines. *Eur J Cancer* 5, 739-746.
- IGCCCG (1997). International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. *J Clin Oncol* 15, 594-603.
- Kassim S. K., Ali H. S., Sallam M. M., Fayed S. T., Seada L. S., abd-Elkawy E., Seada M. A., and Khalifa A. (1999). Increased bcl-2 expression is associated with primary resistance to chemotherapy in human epithelial ovarian cancer. *Clin Biochem* 32, 333-338.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., and Currie A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kerr J. F., Winterford C. M., and Harmon B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.
- Kersemaekers A. M., Mayer F., Molier M., van Weeren P. C., Oosterhuis J. W., Bokemeyer C., and Looijenga L. H. (2002). Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J Clin Oncol* 20, 1551-1561.

- Koberle B., Payne J., Grimaldi K. A., Hartley J. A., and Masters J. R. (1996). DNA repair in cisplatin-sensitive and resistant human cell lines measured in specific genes by quantitative polymerase chain reaction. *Biochem Pharmacol* 52, 1729-1734.
- Koberle B., Grimaldi K. A., Sunters A., Hartley J. A., Kelland L. R., and Masters J. R. (1997). DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer* 70, 551-555.
- Koberle B., Masters J. R., Hartley J. A., and Wood R. D. (1999). Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol* 9, 273-276.
- Kollmannsberger C., Mayer F., Kuczyk M., Kanz L., and Bokemeyer C. (2001). Treatment of patients with metastatic germ cell tumors relapsing after high-dose chemotherapy. *World J Urol* 19, 120-125.
- Kondo T., Setoguchi T., and Taga T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 781-786.
- Koropatnick J., Kloth D. M., Kadhim S., Chin J. L., and Cherian M. G. (1995). Metallothionein expression and resistance to cisplatin in a human germ cell tumor cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 275, 1681-1687.
- Kuwahara D., Tsutsumi K., Kobayashi T., Hasunuma T., and Nishioka K. (2000). Caspase-9 regulates cisplatin-induced apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Lett* 148, 65-71.
- Lage H., and Dietel M. (1999). Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 156-165.
- Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M. A., and Dick J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
- Li M. C., Whitmore W. F., Jr., Golbey R., and Grabstald H. (1960). Effects of combined drug therapy on metastatic cancer of the testis. *Jama* 174, 1291-1299.
- Liu J. R., Opiari A. W., Tan L., Jiang Y., Zhang Y., Tang H., and Nunez G. (2002). Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance. *Cancer Res* 62, 924-931.
- Lockshin R. A., and Williams C. M. (1965). Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkmoth. *J Insect Physiol* 11, 123-133.
- Logothetis C. J., Samuels M. L., Trindade A., and Johnson D. E. (1982). The growing teratoma syndrome. *Cancer* 50, 1629-1635.

- Logothetis C. J., Samuels M. L., Trindade A., Grant C., Gomez L., and Ayala A. (1984). The prognostic significance of endodermal sinus tumor histology among patients treated for stage III nonseminomatous germ cell tumors of the testes. *Cancer* 53, 122-128.
- Looijenga L. H., Gillis A. J., van Gurp R. J., Verkerk A. J., and Oosterhuis J. W. (1997). X inactivation in human testicular tumors. XIST expression and androgen receptor methylation status. *Am J Pathol* 151, 581-590.
- Looijenga L. H., Rosenberg C., van Gurp R. J., Geelen E., van Echten-Arends J., de Jong B., Mostert M., and Wolter Oosterhuis J. (2000). Comparative genomic hybridization of microdissected samples from different stages in the development of a seminoma and a non-seminoma. *J Pathol* 191, 187-192.
- Looijenga L. H., and Oosterhuis J. W. (2002). Pathobiology of testicular germ cell tumors: views and news. *Anal Quant Cytol Histol* 24, 263-279.
- Looijenga L. H., Stoop H., de Leeuw H. P., de Gouveia Brazao C. A., Gillis A. J., van Roozendaal K. E., van Zoelen E. J., Weber R. F., Wolffenbuttel K. P., van Dekken H., *et al.* (2003a). POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* 63, 2244-2250.
- Looijenga L. H., Zafarana G., Grygalewicz B., Summersgill B., Debiec-Rychter M., Veltman J., Schoenmakers E. F., Rodriguez S., Jafer O., Clark J., *et al.* (2003b). Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *Apmis* 111, 161-171; discussion 172-163.
- Lothe R. A., Peltomaki P., Tommerup N., Fossa S. D., Stenwig A. E., Borresen A. L., and Nesland J. M. (1995). Molecular genetic changes in human male germ cell tumors. *Lab Invest* 73, 606-614.
- Masters J. R., Thomas R., Hall A. G., Hogarth L., Matheson E. C., Cattan A. R., and Lohrer H. (1996). Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. *Eur J Cancer* 32A, 1248-1253.
- Masters J. R., and Koberle B. (2003). Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* 3, 517-525.
- Mayer F., Gillis A. J., Dinjens W., Oosterhuis J. W., Bokemeyer C., and Looijenga L. H. (2002). Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* 62, 2758-2760.
- Mayer F., Stoop H., Scheffer G. L., Scheper R., Oosterhuis J. W., Looijenga L. H., and Bokemeyer C. (2003). Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 9, 767-773.
- McCulloch E. A. (1993). Stem cell renewal and determination during clonal expansion in normal and leukaemic haemopoiesis. *Cell Prolif* 26, 399-425.

- Meijer C., Timmer A., De Vries E. G., Groten J. P., Knol A., Zwart N., Dam W. A., Sleijfer D. T., and Mulder N. H. (2000). Role of metallothionein in cisplatin sensitivity of germ-cell tumours. *Int J Cancer* 85, 777-781.
- Mendelsohn M. L. (1962). Chronic infusion of tritiated thymidine into mice with tumors. *Science* 135, 213-215.
- Meyn R. E., Jenkins S. F., and Thompson L. H. (1982). Defective removal of DNA cross-links in a repair-deficient mutant of Chinese hamster cells. *Cancer Res* 42, 3106-3110.
- Mostofi F. K., and Sesterhenn I. A. (1985). Pathology of germ cell tumors of testes. *Prog Clin Biol Res* 203, 1-34.
- Narasimhan S. R., Yang L., Gerwin B. I., and Broaddus V. C. (1998). Resistance of pleural mesothelioma cell lines to apoptosis: relation to expression of Bcl-2 and Bax. *Am J Physiol* 275, L165-171.
- Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Scholer H., and Smith A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.
- Nicholson D. W. (1996). ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nat Biotechnol* 14, 297-301.
- Niwa H., Miyazaki J., and Smith A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-376.
- Norgaard-Pedersen B., Schultz H., Arends J., Brincker H., Jacobsen G. K., Lindelov B., Rorth M., and Svennekjaer I. L. (1983). Biochemical markers for testicular germ-cell tumors in relation to histology and stage: some experiences from the Danish testicular cancer (DATECA) Study from 1976 through 1981. *Ann N Y Acad Sci* 417, 390-399.
- Oosterhuis J. W., Suurmeyer A. J., Sleyfer D. T., Koops H. S., Oldhoff J., and Fleuren G. (1983). Effects of multiple-drug chemotherapy (cis-diammine-dichloroplatinum, bleomycin, and vinblastine) on the maturation of retroperitoneal lymph node metastases of nonseminomatous germ cell tumors of the testis. No evidence for De Novo induction of differentiation. *Cancer* 51, 408-416.
- Oosterhuis J. W., Andrews P. W., Knowles B. B., and Damjanov I. (1984). Effects of cisplatin on embryonal carcinoma cell lines in vitro. *Int J Cancer* 34, 133-139.
- Oosterhuis J. W., Kersemaekers A. M., Jacobsen G. K., Timmer A., Steyerberg E. W., Molier M., Van Weeren P. C., Stoop H., and Looijenga L. H. (2003). Morphology of testicular parenchyma adjacent to germ cell tumours. An interim report. *Apmis* 111, 32-40; discussion 41-32.

- Ottesen A. M., Skakkebaek N. E., Lundsteen C., Leffers H., Larsen J., and Rajpert-De Meyts E. (2003). High-resolution comparative genomic hybridization detects extra chromosome arm 12p material in most cases of carcinoma in situ adjacent to overt germ cell tumors, but not before the invasive tumor development. *Genes Chromosomes Cancer* 38, 117-125.
- Pandey P., Saleh A., Nakazawa A., Kumar S., Srinivasula S. M., Kumar V., Weichselbaum R., Nalin C., Alnemri E. S., Kufe D., and Kharbanda S. (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo J* 19, 4310-4322.
- Pardal R., Clarke M. F., and Morrison S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 895-902.
- Pera M. F., Blasco Lafita M. J., and Mills J. (1987a). Cultured stem-cells from human testicular teratomas: the nature of human embryonal carcinoma, and its comparison with two types of yolk- sac carcinoma. *Int J Cancer* 40, 334-343.
- Pera M. F., Friedlos F., Mills J., and Roberts J. J. (1987b). Inherent sensitivity of cultured human embryonal carcinoma cells to adducts of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA. *Cancer Res* 47, 6810-6813.
- Pera M. F., Cooper S., Mills J., and Parrington J. M. (1989). Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cells. *Differentiation* 42, 10-23.
- Pesce M., Gross M. K., and Scholer H. R. (1998). In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays* 20, 722-732.
- Pesce M., and Scholer H. R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19, 271-278.
- Petak I., and Houghton J. A. (2001). Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathol Oncol Res* 7, 95-106.
- Pierce G. B. (1967). Teratocarcinoma: model for a developmental concept of cancer. *Curr Top Dev Biol* 2, 223-246.
- Poulaki V., Mitsiades C. S., and Mitsiades N. (2001). The role of Fas and FasL as mediators of anticancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 4, 233-242.
- Rajpert-De Meyts E., and Skakkebaek N. E. (1994). Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int J Androl* 17, 85-92.
- Rajpert-De Meyts E., Hanstein R., Jorgensen N., Graem N., Vogt P. H., and Skakkebaek N. E. (2004). Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod* 19, 1338-1344.
- Reed E. (1998). Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 24, 331-344.

- Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., and Weissman I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105-111.
- Rie C., Hammer C., Voigt W., Müller T., Müller L. P., Grothey A., and Schmoll H. J. (2000). Cytotoxicity of oxaliplatin (LOHP) vs. cisplatin (CDDP) in xenotransplanted non-seminomatous germ cell cancer (NSGCC) cell lines. *Proc Am Soc Clin Oncol* *19*, # 1425.
- Roach S., Cooper S., Bennett W., and Pera M. F. (1993). Cultured cell lines from human teratomas: windows into tumour growth and differentiation and early human development. *Eur Urol* *23*, 82-87.
- Roach S., Schmid W., and Pera M. F. (1994). Hepatocytic transcription factor expression in human embryonal carcinoma and yolk sac carcinoma cell lines: expression of HNF-3 alpha in models of early endodermal cell differentiation. *Exp Cell Res* *215*, 189-198.
- Rosenberg B., Vancamp L., and Krigas T. (1965). Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* *205*, 698-699.
- Rosenberg B., VanCamp L., Trosko J. E., and Mansour V. H. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* *222*, 385-386.
- Rosenberg C., Van Gorp R. J., Geelen E., Oosterhuis J. W., and Looijenga L. H. (2000). Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas. *Oncogene* *19*, 5858-5862.
- Saleh A., Srinivasula S. M., Balkir L., Robbins P. D., and Alnemri E. S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* *2*, 476-483.
- Salvesen G. S., and Duckett C. S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 401-410.
- Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory (Press) *2nd Edition*.
- Samuels M. L., Lanzotti V. J., Holoye P. Y., Boyle L. E., Smith T. L., and Johnson D. E. (1976). Combination chemotherapy in germinal cell tumors. *Cancer Treat Rev* *3*, 185-204.
- Sark M. W., Timmer-Bosscha H., Meijer C., Uges D. R., Sluiter W. J., Peters W. H., Mulder N. H., and de Vries E. G. (1995). Cellular basis for differential sensitivity to cisplatin in human germ cell tumour and colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer* *71*, 684-690.
- Sartorius U. A., and Krammer P. H. (2002). Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines. *Int J Cancer* *97*, 584-592.
- Saxman S., Nichols C. R., Williams S. D., Loehrer P. J., and Einhorn L. H. (1991). Mediastinal yolk sac tumor. The Indiana University experience, 1976 to 1988. *J Thorac Cardiovasc Surg* *102*, 913-916.

- Schabel F. M., Jr., Trader M. W., Laster W. R., Jr., Corbett T. H., and Griswold D. P., Jr. (1979). cis-Dichlorodiammineplatinum(II): combination chemotherapy and cross-resistance studies with tumors of mice. *Cancer Treat Rep* 63, 1459-1473.
- Schmoll H.-J. H. K., Possinger K (1999). *Kompendium Internistische Onkologie Teil 2. 3. Auflage.*
- Schmoll H. J. (1999). Maligne Keimzelltumoren des Mannes. In: *Kompendium Internistische Onkologie Teil 2*, Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K 3. Auflage, 1659-1732.
- Schmoll H. J., Kollmannsberger C., Metzner B., Hartmann J. T., Schleucher N., Schoffski P., Schleicher J., Rick O., Beyer J., Hossfeld D., *et al.* (2003). Long-term results of first-line sequential high-dose etoposide, ifosfamide, and cisplatin chemotherapy plus autologous stem cell support for patients with advanced metastatic germ cell cancer: an extended phase I/II study of the German Testicular Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 21, 4083-4091.
- Schwartz P. S., and Waxman D. J. (2001). Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. *Mol Pharmacol* 60, 1268-1279.
- Singh S. K., Clarke I. D., Terasaki M., Bonn V. E., Hawkins C., Squire J., and Dirks P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.
- Skakkebaek N. E., Berthelsen J. G., Giwercman A., and Muller J. (1987). Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 10, 19-28.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., and Boyd M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82, 1107-1112.
- Slee E. A., Adrain C., and Martin S. J. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 1067-1074.
- Soini Y., and Paakko P. (1996). Extent of apoptosis in relation to p53 and bcl-2 expression in germ cell tumors. *Hum Pathol* 27, 1221-1226.
- Sorenson C. M., and Eastman A. (1988). Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 48, 6703-6707.
- Spector D. L., Goldman R. D., and Leinwand L. A. (1998). *Cells: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory (Press).
- Sperger J. M., Chen X., Draper J. S., Antosiewicz J. E., Chon C. H., Jones S. B., Brooks J. D., Andrews P. W., Brown P. O., and Thomson J. A. (2003). Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13350-13355.

- Sugimura J., Foster R. S., Cummings O. W., Kort E. J., Takahashi M., Lavery T. T., Furge K. A., Einhorn L. H., and Teh B. T. (2004). Gene expression profiling of early- and late-relapse nonseminomatous germ cell tumor and primitive neuroectodermal tumor of the testis. *Clin Cancer Res* 10, 2368-2378.
- Summersgill B., Osin P., Lu Y. J., Huddart R., and Shipley J. (2001). Chromosomal imbalances associated with carcinoma in situ and associated testicular germ cell tumours of adolescents and adults. *Br J Cancer* 85, 213-220.
- Suzuki N., Yamada T., Matsuoka K., Hiraoka N., Iwamaru Y., and Hata J. (1999). Functional expressions of *fms* and M-CSF during trophoectodermal differentiation of human embryonal carcinoma cells. *Placenta* 20, 203-211.
- Talanian R. V., Quinlan C., Trautz S., Hackett M. C., Mankovich J. A., Banach D., Ghayur T., Brady K. D., and Wong W. W. (1997). Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 272, 9677-9682.
- Talerman A. (1980). Endodermal sinus (yolk sac) tumor elements in testicular germ-cell tumors in adults: comparison of prospective and retrospective studies. *Cancer* 46, 1213-1217.
- Talerman A., Haije W. G., and Baggerman L. (1980). Serum alphafetoprotein (AFP) in patients with germ cell tumors of the gonads and extragonadal sites: correlation between endodermal sinus (yolk sac) tumor and raised serum AFP. *Cancer* 46, 380-385.
- Thompson C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Thornberry N. A., Rano T. A., Peterson E. P., Rasper D. M., Timkey T., Garcia-Calvo M., Houtzager V. M., Nordstrom P. A., Roy S., Vaillancourt J. P., *et al.* (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-17911.
- Tilby M. J., Styles J. M., and Dean C. J. (1987). Immunological detection of DNA damage caused by melphalan using monoclonal antibodies. *Cancer Res* 47, 1542-1546.
- Tilby M. J., Johnson C., Knox R. J., Cordell J., Roberts J. J., and Dean C. J. (1991). Sensitive detection of DNA modifications induced by cisplatin and carboplatin in vitro and in vivo using a monoclonal antibody. *Cancer Res* 51, 123-129.
- Twiddy D., Brown D. G., Adrain C., Jukes R., Martin S. J., Cohen G. M., MacFarlane M., and Cain K. (2004). Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. *J Biol Chem* 279, 19665-19682.
- Ulbricht T. M., Loehrer P. J., Roth L. M., Einhorn L. H., Williams S. D., and Clark S. A. (1984). The development of non-germ cell malignancies within germ cell tumors. A clinicopathologic study of 11 cases. *Cancer* 54, 1824-1833.

- Ulbright T. M. (1993). Germ cell neoplasms of the testis. *Am J Surg Pathol* 17, 1075-1091.
- van Echten J., van der Vloedt W. S., van de Pol M., Dam A., te Meerman G. J., Schraffordt Koops H., Sleijfer D. T., Oosterhuis J. W., and de Jong B. (1997). Comparison of the chromosomal pattern of primary testicular nonseminomas and residual mature teratomas after chemotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 99, 59-67.
- van Gurp R. J., Oosterhuis J. W., Kalscheuer V., Mariman E. C., and Looijenga L. H. (1994). Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in human testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 86, 1070-1075.
- Vogelstein B., Lane D., and Levine A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Vogelzang N. J., Bronson D., Savino D., Vessella R. L., and Fraley E. F. (1985). A human embryonal-yolk sac carcinoma model system in athymic mice. *Cancer* 55, 2584-2593.
- Walker M. C., Parris C. N., and Masters J. R. (1987). Differential sensitivities of human testicular and bladder tumor cell lines to chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst* 79, 213-216.
- Wang N., Trend B., Bronson D. L., and Fraley E. E. (1980). Nonrandom abnormalities in chromosome 1 in human testicular cancers. *Cancer Res* 40, 796-802.
- Warner J. K., Wang J. C., Hope K. J., Jin L., and Dick J. E. (2004). Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 23, 7164-7177.
- Weissman I. L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.
- Welsh C., Day R., McGurk C., Masters J. R., Wood R. D., and Koberle B. (2004). Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer* 110, 352-361.
- Williams S. D., Birch R., Einhorn L. H., Irwin L., Greco F. A., and Loehrer P. J. (1987). Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N Engl J Med* 316, 1435-1440.
- Williamson K. E., Kelly J. D., Hamilton P. W., McManus D., and Johnston S. R. (1998). Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer* 78, 553-554.
- Wu G. S., and Ding Z. (2002). Caspase 9 is required for p53-dependent apoptosis and chemosensitivity in a human ovarian cancer cell line. *Oncogene* 21, 1-8.
- Wylie C. (1999). Germ cells. *Cell* 96, 165-174.
- Wyllie A. H., Kerr J. F., and Currie A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.

Yuan J., and Horvitz H. R. (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* *116*, 309-320.

Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H. M., and Horvitz H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* *75*, 641-652.

Zheng T., Holford T. R., Ma Z., Ward B. A., Flannery J., and Boyle P. (1996). Continuing increase in incidence of germ-cell testis cancer in young adults: experience from Connecticut, USA, 1935-1992. *Int J Cancer* *65*, 723-729.

Zhou B. B., and Elledge S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* *408*, 433-439.

Zou H., Henzel W. J., Liu X., Lutschg A., and Wang X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* *90*, 405-413.

Zou H., Yang R., Hao J., Wang J., Sun C., Fesik S. W., Wu J. C., Tomaselli K. J., and Armstrong R. C. (2003). Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J Biol Chem* *278*, 8091-8098.

ANHANG

Erklärung

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in den Jahren 2000 bis 2004 an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Hämatologisch-Onkologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin IV durchgeführt.

Teile der vorliegenden Arbeit sind in Publikationen eingegangen oder wurden zur Publikation eingereicht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig erarbeitet sowie 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.

Halle, den 01.07.2005

Thomas Müller

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zur Entstehung der vorliegenden Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Schmoll für die Themenstellung, die entsprechenden Voraussetzungen zur Bearbeitung des Themas sowie für seine Diskussionsbereitschaft. Vor allem danke ich für die gewährte Freiheit bei der wissenschaftlichen Bearbeitung des interessanten Forschungsgebietes und für das dabei entgegengebrachte Vertrauen.

Ein großes Dankeschön für die sehr gute Zusammenarbeit, dem sehr angenehmen Arbeitsklima sowie der ständigen Diskussionsbereitschaft gilt unserem gesamten Laborteam, bestehend aus: Heike Simon, Angelika Frühauf, Jana Lützkendorf, Katrin Reichelt, Andrea Dietrich, Andre Bulankin, Dr. Wieland Voigt und Dr. Lutz Peter Müller. Dr. Wieland Voigt danke ich besonders für seine Unterstützung bei meiner Tätigkeitsaufnahme in unserem ersten kleinen Hämatologisch-Onkologischen Forschungslabor. Bei Heike Simon bedanke ich mich für die unentbehrliche Zusammenarbeit bei der Bearbeitung sämtlicher Projekte in unserem Labor. Angelika Frühauf danke ich für die Messung der DNA-Cisplatin-Addukte. Für die Erstellung der DNA-Histogramme bedanke ich mich bei Andre Bulankin. Jana Lützkendorf danke ich für die Überlassung des Vektor-Konstrukts pIRES2-EGFP-Oct-3/4. Dr. Lutz Peter Müller gilt mein Dank für die hilfreichen Tips während der schriftlichen Erstellung der Dissertation.

Unserer Chefsekretärin Frau Grit Gardelegen danke ich für die Unterstützung bei zahlreichen, für den Uni-Alltag wichtigen Belangen.

Bei Herrn Prof. Holzhausen vom Institut für Pathologie möchte ich mich für die Einbettung der Tumor-Xenograften sowie für die histologische Evaluierung der Proben bedanken.

Für den privaten Ausgleich und die moralische Unterstützung bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie. Dabei gebührt meiner Lebensgefährtin Conny besonderer Dank für das ständig entgegengebrachte Verständnis und den starken Rückhalt.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Thomas Müller
Anschrift	06108 Halle, Kleine Ulrichstraße 31
Geburtsdatum	26.07.1970
Geburtsort	Halle
Familienstand	ledig, 1 Kind
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1977 – 1979	Wittekindschule, Halle
1979 – 1986	Rosa-Luxemburg-Oberschule, Halle
1986 – 1990	Kinder- und Jugend-Sportschule Friedrich Engels, Halle
07/ 1990	Abitur

Sportliche Laufbahn

1983 – 1986	Trainingszentrum Halle Neustadt
1986 – 1990	Leistungssportler, Fallschirmsportclub Halle-Oppin

Studium

1990 – 1995	Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
11/ 1994 – 08/ 1995	Diplomarbeit am Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Thema: „Der Einfluss der Expression des <i>tna</i> -Operons auf das Supercoiling der DNA und die Entstehung von Duplikationen in <i>Escherichia coli</i> “
09/ 1995	Diplomverteidigung

Wehrdienst

10/ 1995 – 11/ 1995	4./ ABC Abw Btl 7, Höxter
12/ 1995 – 07 1996	San Btl 131, Halle

Nebentätigkeiten

1990 – 1998	Kleintransportgewerbe in Zusammenarbeit mit dem Mitteldeutschen Druck- und Verlagshaus, Halle
03 – 07/ 1999	Produktionsarbeiter, Wendeln Brot Ost GmbH & Co. KG, Halle
07/ 1999 – 07/ 2000	Sacharbeiter, Optica Abrechnungszentrum Halle

Beruf und Weiterbildung

04/ 1997 – 10/ 1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Klinik für Innere Medizin IV, Hämatologie/ Onkologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; tätig im Institut für Anatomie und Zellbiologie
seit 10/ 1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Klinik für Innere Medizin IV, Hämatologie/ Onkologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, tätig im Hämatologisch/ Onkologischen Forschungslabor
seit 2000	Promotionsarbeit zum Thema: „Untersuchungen zur Chemotherapie-Resistenz des malignen testikulären Keimzelltumors“
04/ 1998	Fortbildungskurs für Projektleiter gentechnischer Arbeiten und Beauftragte für biologische Sicherheit (BBS), Zertifikat
04/ 2003	Sachkundenachweis „Tierschutz/ Versuchstierkunde“ für tierexperimentell tätige Mitarbeiter

Halle, 01.07.2005

Thomas Müller

Publikationsverzeichnis

Artikel

Mueller T., Mueller L. P., Luetzkendorf J., Voigt W., Simon H., and Schmoll H. J. (2005). Loss of Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells is associated with induction of cisplatin resistance. *Tumour Biol* (in press).

Voigt W., Kegel T., Weiss M., Mueller T., Simon H., and Schmoll H. J. (2005). Potential activity of paclitaxel, vinorelbine and gemcitabine in anaplastic thyroid carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* (in press).

Rennicke A., Voigt W., Mueller T., Fruehauf A., Schmoll H. J., Beyer C., and Dempke W. (2005). Resistance mechanisms following cisplatin and oxaliplatin treatment of the human teratocarcinoma cell line 2102EP. *Anticancer Res* 25, 1147-1155.

Mueller T., Voigt W., Simon H., Fruehauf A., Bulankin A., Grothey A., and Schmoll H. J. (2003). Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. *Cancer Res* 63, 513-521.

Paschke R., Kalbitz J., Paetz C., Luckner M., Mueller T., Schmoll H. J., Mueller H., Sorkau E., and Sinn E. (2003). 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* 94, 335-342.

Paschke R., Paetz C., Mueller T., Schmoll H. J., Mueller H., Sorkau E., and Sinn E. (2003). Biomolecules linked to transition metal complexes--new chances for chemotherapy. *Curr Med Chem* 10, 2033-2044.

Voigt W., Bulankin A., Muller T., Schoeber C., Grothey A., Hoang-Vu C., and Schmoll H. J. (2000). Schedule-dependent antagonism of gemcitabine and cisplatin in human anaplastic thyroid cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 6, 2087-2093.

Grothey A., Voigt W., Schober C., Muller T., Dempke W., and Schmoll H. J. (1999). The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 166-173.

Abstracts

Mueller T., Mueller L. P., Simon H., Luetzkendorf J., Voigt W., and Schmoll H. J. (2003). Loss of expression of the embryonal transcription factor Oct-4 is associated with impairment of caspase-9 activation and cisplatin resistance in testicular germ cell cancer. *Onkologie* 26, Suppl. 5, #P-964.

Mueller T., Paschke R., Paetz C., Voigt W., Simon H., Mueller W., Sorkau E., Grothey A., and Schmoll H. J. (2003). A cholic-acid platinum compound overcomes cisplatin resistance of a yolk sac carcinoma cell line by inducing caspase-independent apoptotic cell death. 12th AEK Cancer Congress, Würzburg, #P-195.

Mueller T., Voigt W., Simon H., and Schmoll H. J. (2003). Cytotoxic effects of oxaliplatin and TNF-related apoptosis-inducing ligand treatment with respect to p53 status, Bcl 2 und Bax expression in colon cancer cell lines. *Onkologie* 26, Suppl. 5, #P-791.

Mueller L. P., Luetzkendorf J., Mueller T., Reichelt K., Simon H., and Schmoll H. J. (2003). Isolation of mesenchymal stem cells from adult human bone marrow affected by disease or chemotherapy. *Onkologie* 26, Suppl. 5, #P-743.

Mueller T., Simon H., Voigt W., Grothey A., and Schmoll H. J. (2002). Failure of activation of upstream caspases-8 and -9 induces a higher cellular threshold for apoptosis leading to cisplatin resistance in testicular cancer cells. *Proc Am Ass Cancer Res* 43, #1294.

Mueller T., Paetz C., Voigt W., Simon H., Grothey A., Paschke R., and Schmoll H. J. (2002). ChAPt-11 – a new cisplatin-derivate that overcomes multi-drug resistance in vitro by inducing caspase-independent apoptotic cell death. *Onkologie* 25, Suppl. 4, #897.

Mueller T., Simon H., Mc Crea P.D., and Grothey A. (2001). The motility-associated actin-bundling protein fascin – a main mediator of HER-2/c-erbB-2 induced changes in the malignant phenotype in breast cancer? *Proc Am Ass Cancer Res* 42, #4507.

Mueller T., Simon H., Voigt W., Schmoll H. J., and Grothey A. (2001). Differential activation of caspases in cisplatin-sensitive and -resistant testicular cancer cells. *Mol Biol Cell* 12, Suppl., #2284.

Rennicke A., Voigt W., Mueller T., Fruehauf A., Schmoll H. J., and Dempke W. (2001). Different resistance mechanisms following cisplatin (CDDP) and oxaliplatin (OXA) treatment of the human teratocarcinoma cell line 2102EP. *Proc Am Ass Cancer Res* 42, #4875.

Mueller T., Voigt W., Bulankin A., Frühauf A., Kegel T., Grothey A., Dempke W., and Schmoll H. J. (2000). Decreased induction of apoptosis is associated with intrinsic cisplatin-resistance in the human testicular carcinoma cell line (HTCCL) 1411HP. *Proc Am Ass Cancer Res* 41, #4975.

Mueller T., Rie C., Voigt W., Bulankin A., Frühauf A., Grothey A., Dempke W., and Schmoll H. J. (2000). Primary cisplatin-resistance is associated with a higher apoptotic threshold in a human testicular tumor model. *Onkologie* 23, Suppl. 7, #420.

Rie C., Hammer C., Voigt W., Mueller T., Müller L.P., Grothey A., and Schmoll H. J. (2000). Cytotoxicity of oxaliplatin (LOHP) vs. Cisplatin (CDDP) in xenotransplanted non-seminomatous germ cell cancer (NSGCC) cell lines. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19, #1425.

Harba A., Voigt W., Mueller T., Simon H., Grothey A., Dempke W., and Schmoll H. J. (2000). Primary resistance to Cisplatin is associated with resistance to drugs of other substance classes in human testicular cancer cell lines. *Onkologie* 23, Suppl. 7, #419.

Voigt W., Grothey A., Mueller T., Schmoll H. J., and Dempke W. (1999). Gene specific repair of N-ras gene in human K562 cell line following exposure to Cisplatin (CDDP). *Proc Am Ass Cancer Res* 40, #1027.

Voigt W., Bulankin A., Mueller T., Kegel T., Frühauf A., Grothey A., Dempke W., and Schmoll H. J. (1999). Molecular effects of cisplatin (CDDP) downstream of the formation of CDDP-adducts in the process of induction of apoptosis in human testicular carcinoma cell line 2102Ep. *Eur J Cancer* 35, Suppl. 4, #756.

Voigt W., Bulankin A., Mueller T., and Schmoll H. J. (1998). Evaluation of mitochondrial membrane protein specific monoclonal antibody Apo2.7 as marker for monitoring of cisplatin induced apoptosis in adherent growing human testicular cancer cell lines. *Ann Hematol* 77, Suppl. 11, #134.