

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Hämatologie und Onkologie,
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Hans-Joachim Schmoll



Auswirkungen fraktionierter Bestrahlung auf Radio- und Chemosensibilität der humanen testikulären Karzinomzelllinien 2102 EP und H 12.1

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Stephan Eisenmann
geboren am 14. November 1977 in Halle (Saale)

Datum der öffentlichen Verteidigung: 5. Juli 2006

Gutachter:

- 1) Prof. Dr. med. H.-J. Schmoll
- 2) Prof. Dr. med. J. Dunst
- 3) PD Dr. med. U. Vanhöfer

urn:nbn:de:gbv:3-000011248

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011248>]

Referat

Zelluläre Resistenz gegenüber Cisplatin kann in vitro durch sequentielle Chemo- und Radiotherapie etabliert werden. Verschiedene Resistenzmechanismen sind bisher beschrieben, wobei in der Regel von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen ist.

In klinischen Studien konnten bei männlichen Keimzelltumoren durch den Einsatz cisplatinhaltiger Therapieregime Heilungsraten von bis zu 95% erzielt werden. Bei primärer oder sekundärer Cisplatinresistenz wird derzeit u.a. der Einsatz neuer Platinderivate (z.B. Oxaliplatin) mit teilweise fehlender Kreuzresistenz zu Cisplatin untersucht.

Die molekularen Mechanismen einer Oxaliplatinresistenz sind derzeit noch nicht abschließend geklärt, es gibt jedoch experimentelle Hinweise auf teilweise gemeinsame Resistenzpathways für Cisplatin und Oxaliplatin.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von durch fraktionierte Bestrahlung (Gesamtdosis 40 Gy) der humanen Testikularkarzinomzelllinien 2102 EP und H 12.1 erzeugten DX-10-Sublinien und deren direkter Vergleich hinsichtlich Radiosensibilität (mittels Zellkoloniebildungstest), Chemosensibilität (im SRB-Assay) sowie Proteinexpression v.a. von Apoptose- und DNA-Reparaturproteinen (durch Western Blot).

Qualitativ ergaben sich für beide Zelllinien in den durchgeführten Experimenten gleiche Ergebnisse. Eine grundlegende Änderung der Strahlensensitivität wurde nicht erreicht (SF2: $p > 0,05$), allerdings ergaben sich Hinweise auf erhöhte Strahlensensibilität nach fraktionierter Bestrahlung im Niedrigdosisbereich (Einzeldosis 1 Gy). Interessanterweise führte die sequentielle Bestrahlung zu einer Sensibilisierung der Zelllinien gegenüber Cisplatin, jedoch zu einer Abnahme der Sensitivität gegenüber Oxaliplatin (jeweils $p < 0,05$). Im Western Blot zeigte sich eine Steigerung der Proteinexpression verschiedener Stressantwortmoleküle (PARP, p53, p21, Bax, hMSH2, Fas).

Die Sensibilisierung gegenüber Cisplatin scheint Folge einer Senkung der Apoptoseschwelle zu sein. Diese Beobachtung könnte eine mechanistische Grundlage für die bekannte Synergie zwischen Bestrahlung und Cisplatin darstellen. Für die in dieser Arbeit erstmalig beschriebenen Resistenzinduktionen gegenüber Oxaliplatin durch sequentielle Bestrahlung konnte keine mechanistische Erklärung gefunden werden. Im Falle einer Bestätigung derartiger Ergebnisse in größeren Untersuchungen wäre der klinische Einsatz von Oxaliplatin nach zuvor stattgehabter Radiatio kritisch zu erwägen.

Eisenmann, Stephan: Auswirkungen fraktionierter Bestrahlung auf Radio- und Chemosensibilität der humanen testikulären Karzinomzelllinien 2102 EP und H 12.1. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 60 Seiten; 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hodentumoren	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Genese	1
1.1.3	Therapie	2
1.2	Zytotoxische Therapie mit Platinderivaten	3
1.2.1	Cisplatin	3
1.2.1.1	Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Einsatzgebiete	3
1.2.1.2	Behandlungsprobleme, Entwicklung neuer Produkte	5
1.2.2	Oxaliplatin	5
1.2.2.1	Pharmakokinetik, Pharmakodynamik	5
1.2.2.2	Behandlungsprobleme	6
1.3	Zytostatikaresistenzmodelle in vitro	6
1.3.1	Generelles	6
1.3.2	Platinresistenzen	8
1.3.2.1	Platinresistenz: Reduktion der DNA-Bindung	8
1.3.2.1.1	Influx, Efflux	8
1.3.2.1.2	Stoffinaktivierung	8
1.3.2.2	Platinresistenz: Inadäquate Wirkung	9
1.3.2.2.1	Gesteigerte DNA-Reparatur	9
1.3.2.2.2	Erhöhte Schadenstoleranz	9
1.3.2.2.3	Veränderungen der Apoptosekaskade	10
1.3.2.2.4	Veränderungen der Onkogenexpression	11
1.3.2.3	Selektion von platinresistenten Zelllinien	11
1.3.2.4	Probleme in vivo	12
1.4	Möglichkeiten der Radiochemotherapie und der fraktionierten Radiotherapie	12
1.4.1	Radiochemotherapie mit Cisplatin/Oxaliplatin	13
1.4.2	Fraktionierung der Bestrahlung	14
2	Ziele und Fragestellungen	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Zelllinien	16
3.2	Zellkultur, Kulturmedium, Zellzahlbestimmung	16
3.3	Zellbestrahlung	17

3.4	Strahlensensitivitätsmessung im ZKB-Assay	17
3.5	Proteinbestimmung.....	18
3.5.1	Proteinisolation aus Zellkultur	18
3.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	18
3.5.3	Western Blot.....	19
3.6	Chemoresistenzbestimmung im SRB-Assay.....	21
3.6.1	Tag eins	22
3.6.2	Tag zwei	23
3.6.3	Tag drei	23
3.6.4	Tage vier und fünf.....	23
3.6.5	Tag sechs.....	23
3.6.6	Tag sieben	23
3.7	Materialauflistung im Einzelnen	24
3.7.1	Chemikalien	24
3.7.1.1	Zellkultur.....	24
3.7.1.2	Proteinbestimmung.....	24
3.7.1.3	SRB Assay.....	26
3.7.2	Firmenverzeichnis	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Zellkultur und Bestrahlung.....	28
4.2	Strahlensensitivitätsmessung im Zellkolonie-Bildungstest.....	28
4.3	Proteinbestimmung im Western Blot	29
4.4	Zytotoxizitätsmessung im SRB-Assay.....	31
5	Diskussion	35
5.1	Bestrahlung und Aktivierung von p53	35
5.2	Chemosensibilität nach Bestrahlung	38
5.3	Klinische Aspekte	43
6	Schlussfolgerung	44
7	Zusammenfassung.....	45
8	Literaturliste	46
9	Thesen der Dissertation.....	59
	Lebenslauf.....	1

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Moleküle	ATP-Bindungs-Cassette enthaltende Proteine
ANT	Adenin-Nukleotid-Transporter
APAF	Apoptosis Activating Factor
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Ataxia Teleangiectasia Mutated
ATP	Adenosintrisphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
Bcl	B-cell-lymphoma
CARD	Caspase-Associated Recruiting Domain
CDDP	Cisplatin
CDK	Cyclin Dependent Kinase
cMOAT	canalicular Multi Organic Associated Transporter
CTR	Copper Transporter
DACH	Diaminocyclohexan
DF	Death factor
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DISC	Death Inducing Signal Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleidacid
DR	Death Receptor
DRP	Damage Recognition Protein
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
DX	Designated via X-irradiation
EBM	Evidence Based Medicine
EDTA	Ethylendiamintetraacid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF-Receptor
FADD	Fas-associated Death Domain
FasL	Fas-Ligand
FKS	Fetales Kälberserum
GADD	Growth Arrest and DNA Damage
GSH	Glutathion

GST	Glutathion-S-Transferase
HMG	High Mobility Group
HSP	Hitzeschockprotein
HT	Hydroxytryptamin
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IGF	Insuline-like Growth Factor
IGFBP	IGF-Binding Protein
JNK	Jun-N-terminal Kinase
LOH	Loss of Heterozygoty
LRP	Lung-Resistance protein
MAPK	Mitogen-Associated Protein Kinase
MDR	Multi-Drug-Resistance
MMR	Mismatch-Reparatur
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
MRP	MDR-Related protein
MSH	MutS Homolog
MT	Metallothionein
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
OXA	Oxaliplatin
mt-p53	mutated type- p53
wt-p53	wild type-p53
PARP	Poly(ADPribose)-polymerase
PBS	Phosphate Buffer Solution
PBST	PBS-containing TWEEN
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
Pgp	Permeability Glycoprotein
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rb	Retinoblastom
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur

SCF	Squamous Cell Factor
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SF	Survival Fraction
SRB	Sulforhodamin B
SSB	Single Strand Break
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TCA	Trichloroacetat
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiammin
TIN	Testikuläre Intraepitheliale Neoplasie
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Trishydroxyethylaminomethan
Tween	entspricht Polysorbat
VDAC	Voltage-Dependent Anionic Channel
Zellzyklusphasen	G (Wachstum=Growth), S (Synthese), M (Mitose)
ZKB	Zellkoloniebildungstest

1 Einleitung

1.1 Hodentumoren

1.1.1 Epidemiologie

In der männlichen Bevölkerung sind Keimzelltumoren mit einer Inzidenz von einem Prozent seltene Tumoren, stellen aber zwischen dem 15. und 45. Lebensjahr den Hauptanteil³⁵. Gesicherte Prädispositionsfaktoren sind testikuläre Entwicklungsstörungen (Kryptorchismus, Maleszensus) und ein anamnestisch kontralateral sowie familiär aufgetretener Hodentumor³⁰. Darüber hinaus werden Anomalien der Spermatozyten, rassische und geografische Besonderheiten⁷⁰, pränatale Traumata und Östrogeneinwirkungen, Umwelt- und Ernährungsfaktoren sowie genetische Veränderungen als Einflussfaktoren diskutiert^{46,89}.

1.1.2 Genese

Die Tumorgenese vollzieht sich in mehreren Abschnitten über einen Zeitraum von Jahren bis Jahrzehnten, wobei aufgrund der Häufigkeitsspitze des männlichen Keimzelltumors im frühen Lebensabschnitt die initialen Ereignisse bereits intrauterin oder in den ersten Lebensjahren vermutet werden⁷⁰. Abbildung 1.1 zeigt die Entstehungshypothese der verschiedenen Tumorarten aus der gemeinsamen Vorstufe, der testikulären intraepithelialen Neoplasie (TIN)⁴⁶.

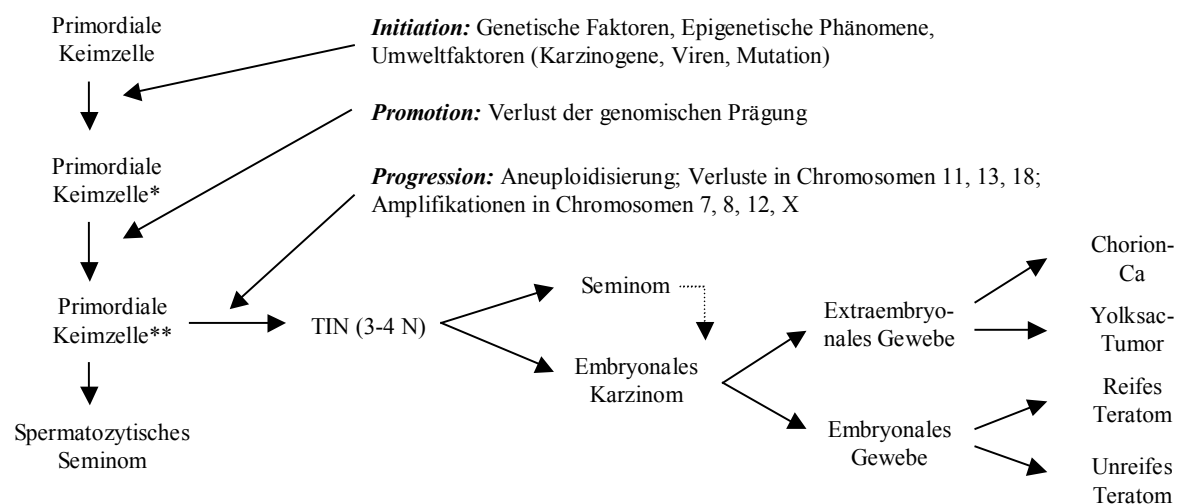


Abbildung 1.1: Pathogenese der Keimzelltumoren (*/**: zunehmende maligne Veränderung)

Bekannt, möglicherweise pathogenetisch relevante Faktoren sind^{42,46,70,89,109}:

- Überexpression von Abschnitten auf den Chromosomen 12p und 17q mit Überexpression dort lokalisierter Onkogene und Senkung der Apoptosefähigkeit

- Tumorsuppressorinaktivierung durch Allelveränderung nach „Loss of Heterozygoty“ (LOH; Nachweis für Suppressoren auf p18 und p19)
 - Polyploidisierung des Genoms
 - Inaktivierung des Tumorsuppressors Rb, nicht durch Mutation, sondern wahrscheinlich durch
 - o Inhibition von Transkription und/oder Translation
 - o Überexpression von Cyclin D, möglicherweise durch benachbarte Lokalisation zu aktivierten Abschnitten im Chromosom 12
- Folgen: Mangelhafter Zellzykluscheck in G1-Phase

Die in der Mehrzahl (ca. 60%) aller humanen Tumoren vorliegende Mutation des zentralen Tumorsuppressors p53 liegt im männlichen Keimzelltumor nicht vor, jedoch scheint der Gehalt an wt-p53 keinen Einfluss auf das Outcome zu haben⁷⁸. Vielmehr wird vermutet, dass sich das p53-Molekül während der Tumorgenese inaktiv verhält, durch zugegebene Chemotherapeutika aktiviert und damit die Apoptose eingeleitet wird⁷¹. Eine schematische Zusammenhangsdarstellung der genannten pathogenetischen Faktoren sowie weiterer, später erwähnten Faktoren zeigt Abbildung 1.2^{5,38,62,69}.

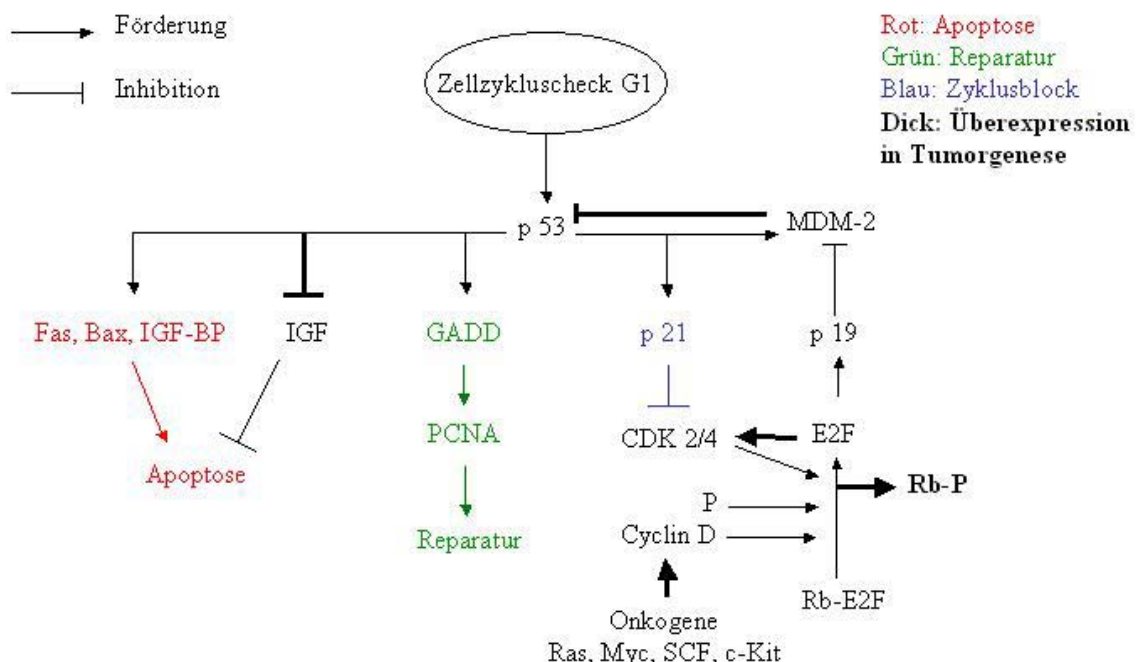


Abbildung 1.2: Einflussfaktoren in der Pathogenese der Keimzelltumoren

1.1.3 Therapie

Mit Heilungsraten von über 80% gilt der männliche Keimzelltumor als eines der am besten behandelbaren Malignome. Dies ist der Entdeckung der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin

zuzuschreiben, welches seit 1974 in der Tumorthherapie eingesetzt wird. Davor galten Remissionsraten von 50% und Komplettheilungsraten von 10% als realistisch³⁵.

Die derzeitige Therapiestrategie richtet sich nach der Histologie und dem Stadium des Tumors sowie individuellen Risikofaktoren und unterscheidet generell die Behandlung von Seminom und Nichtseminom. Dabei werden Chemotherapie, Radiotherapie und Chirurgie eingesetzt¹⁰⁸. Klinische Studien untersuchen darüber hinaus die Effizienz neuer Platinderivate sowie primärer Hochdosischemotherapien bei cisplatinrefraktären Tumoren^{56,114}.

1.2 Zytotoxische Therapie mit Platinderivaten

Der klassische Endpunkt der Therapie mit zytotoxischen Stoffen ist die Induktion der Apoptose, die histologisch durch Chromatin-Aggregation, Zytoplasma- und nukleäre Kondensation und Bildung phagozytierbarer apoptotischer Körperchen (apoptotic bodies) charakterisiert wird¹⁰¹. Intrazellulär finden sich pro- und antiapoptotische Faktoren, deren Verhältnis das Zellschicksal in Abhängigkeit von Art und Schwere der Zellschädigung bestimmt. Die Apoptose ist ein physiologischer, ATP-abhängiger Vorgang zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase, sowohl während der Embryonalentwicklung als auch nach irreversiblen Zellschaden im adulten Körper. Die fehlende Beeinflussung des umgebenden Gewebsumlieues unterscheidet sie von der Nekrose und macht sie interessant für die Tumorthherapie¹²⁸. Voraussetzung ist die Intaktheit zellulärer Systeme zur Erkennung und Reparatur von Schädigungen sowie die Effektorsignale der Apoptosekaskade. Die exakten Abläufe der Apoptose bei Chemotherapie sind Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung.

1.2.1 Cisplatin

1.2.1.1 Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Einsatzgebiete

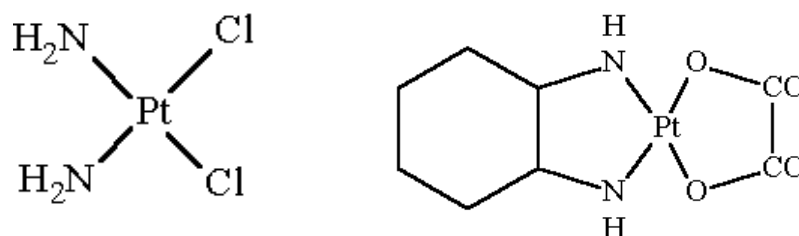


Abbildung 1.3: Cisplatin (links) und Oxaliplatin (rechts)

Cisplatin (Abbildung 1.3) als das klassische Platinderivat ist eines der am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika, welches v.a. in Kombinationen für verschiedene Tumoren gute bis exzellente Ansprechraten erzielt⁴⁰. Die erstmalige Synthese gelang 1844, die

sterische Analyse 1892, die Entdeckung seiner antiproliferativen Eigenschaften 1965 durch Rosenberg. Seit Beginn der siebziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts ist Cisplatin in die Chemotherapie verschiedener Tumoren integriert⁶⁴. Besonders wirksam und prognosebestimmend ist Cisplatin in der Therapie von Keimzelltumoren.

Die zelluläre Aufnahme erfolgt überwiegend durch passive Diffusion sowie zusätzlich mittels energieabhängigen erleichterten Transportes⁵⁴. Intrazellulär reagiert es nach Dissoziation der Chlorid-Ionen elektrophil mit protein- und DNA-assoziierten Gruppen. Durch kovalente Bindung an Cystein-Reste in Glutathion (GSH) und Metallothioneinen (MT) wird Cisplatin inaktiviert und energieabhängig der Exozytose zugeführt^{52,90}.

Das für den zytotoxischen Effekt wahrscheinlich wirkentscheidende DNA-Addukt bildet nur 1% der zellulär aufgenommenen Stoffmenge^{42,78,90}. Weitere intrazelluläre Bindungsstellen sind RNA, Proteine, Phospholipide, Zytoskelett und schwefelhaltige Moleküle¹²⁸.

Durch Bindung an Position N7 des Imidazolrings der Purinbasen kommt es zur Ausbildung verschiedener Inter- und Intrastrang-DNA-Addukte. Entscheidend sind die Intrastrang-1,2-GG-Läsionen, die weniger toxische Platinderivate nicht zu bilden vermögen^{52,54,90,99}. Diese Schädigung wird durch verschiedene Proteinsysteme erkannt: Nukleotidexzisionsreparatur (NER), Mismatchreparatur (MMR), DNA-abhängige Proteinkinasen (DNA-PK) und „High mobility group“-Proteine (HMG)⁴². Nur die NER entfernt die gebildeten Addukte effektiv^{18,100}.

Hauptwirkungen von Cisplatin sind Apoptoseauslösung und Beeinflussung der Transkription. Die zur Apoptose führenden Mechanismen sind noch weitgehend ungeklärt. Eine DNA-Distorsion wird durch ein HMG-Molekül erkannt⁹⁰, was die NER-Bindung und damit die Reparatur der entstandenen Läsion beeinträchtigt^{9,93,96}. Die persistierenden Komplexe bedingen eine Aktivierung der MMR mit Einleitung des Zellzyklusstopps^{19,35,83,86,123}. Haupteffektor ist dabei das Tumorsuppressorprotein p53, das nach DNA-Schädigung durch posttranslationale Phosphorylierung durch Kinasen aktiviert wird⁴¹. Ein Zellzyklusstopp kann am G1/S- und am G2/M-Checkpoint erfolgen^{52,54,90}. Effektoren der finalen Apoptosestrecke sind Kaspasen, spezielle Proteasen, die durch Substratspaltungen das Zellklima zu Gunsten einer Autodestruktion verändern¹⁷.

Die Inhibition von Transkriptionsfaktoren durch DNA-schädigende Agenzien wird schon länger diskutiert. Das TATA-Box-bindende Protein (TBP), ein Transkriptionsfaktor für

Polymerasen, und auch HMG-gekoppelte Transkriptionsfaktoren sind mit Intrastrangläsionen assoziiert und werden inaktiviert. Insgesamt scheint die Hemmung der Bildung ribosomaler RNA durch RNA-Polymerase I effizienter zu sein als die mit der DNA-Polymerase II gekoppelten Gene, was eine präferentielle Wirkung des Cisplatin in schnell proliferierenden Geweben erklären könnte⁵².

Aktueller Gegenstand der Grundlagenforschung ist die Bedeutung der intrazellulären Bindungen, die Cisplatin als elektrophiles Molekül eingeht, für seine zytotoxische Wirkung.

1.2.1.2 Behandlungsprobleme, Entwicklung neuer Produkte

Die Hauptprobleme in der klinischen Anwendung von Cisplatin ergeben sich durch vielfältige unerwünschte Wirkungen sowie Resistenzentwicklungen. Limitierende Nebenwirkungen treten bereits bei Einzeldosen auf und erklären sich u.a. durch Plasmaproteinbindung des Moleküls sowie intrazelluläre Speicherung in renalen Tubuluszellen und Erythrozyten. Wesentliche Nebenwirkungen und mögliche Gegenmaßnahmen sind in Tabelle 1.1 aufgeführt^{54,55,90,92}.

Tabelle 1.1: Nebenwirkungen der Cisplatintherapie

	Häufigkeit	Gegenmaßnahmen
Nausea, Erbrechen	+++	Glukokortikoid + 5-HT3-Antagonist
Nephrotoxizität	+++	Aggressive Hydratation, Mannitol-Infusion
Ototoxizität	++	Medikamentenwechsel auf Carboplatin
Neurotoxizität	+	
Myelodepression	+	
Arrhythmien	(+)	
Pankreatitis	(+)	
Glukose-Intoleranz	(+)	

1.2.2 Oxaliplatin

1.2.2.1 Pharmakokinetik, Pharmakodynamik

Durch Entwicklung neuer Platinderivate entstanden die DACH-Moleküle, in denen ein 1,2-Diaminocyclohexanring substituiert ist. Als klinisch attraktiv aus dieser Gruppe gilt Oxaliplatin (Abbildung 1.3)^{64,88,99}. Der Einsatz ist momentan beim kolorektalen Karzinom, beim metastasierten Ovarialkarzinom sowie innerhalb von Studien bei verschiedenen anderen Tumoren indiziert^{22,56,107}.

Der Mechanismus der intrazellulären Aktivierung ist noch unklar, Voraussetzung scheint die extrazelluläre Dissoziation der Cl⁻-Ionen zu sein. Hinsichtlich Zellaufnahme, Aktivierung, Kontrolle durch GSH und MT sowie DNA-Bindung und Reparatur durch die NER ähnelt es Cisplatin. Die Sperrigkeit und Hydrophobie des Substituenten bedingen jedoch drei wesentliche Unterschiede: Bei Verwendung äquimolarer Mengen finden sich geringere intrazelluläre Stoffkonzentrationen, intrazelluläre Reaktionen erfolgen langsamer, und die Proteininteraktionen sind mit ca. 80% der intrazellulären Stoffmenge höher als bei Cisplatin^{29,99,104,128}. Weitere Unterscheidungsmerkmale sind:

- Höhere Einzelstrangbruch-Frequenz und gesteigerte Toxizität¹²⁹, möglicherweise durch vermehrte Proteininteraktionen
- Keine Aktivierung des MMR-Systems^{83,99,106}
- Fehlende Kreuzresistenz in cisplatinresistenten Zellen des kolorektalen Karzinoms und des Ovarialkarzinoms^{22,97}

Die Apoptoseinduktion durch Oxaliplatin ist aktueller Forschungsgegenstand, sie scheint nach momentanem Wissensstand hauptsächlich über den intrinsischen Apoptoseweg zu erfolgen³.

1.2.2.2 Behandlungsprobleme

Im Vergleich zu Cisplatin ist die Verträglichkeit von Oxaliplatin insgesamt besser. Therapeutisch relevant sind eine reversible sensorische Neuropathie in akuter Früh- und kumulativer Spätform, gastrointestinale Störungen sowie Neutro- und Thrombozytopenien¹⁶.

1.3 Zytostatikaresistenzmodelle in vitro

1.3.1 Generelles

Während einer chemotherapeutischen Behandlung treten oftmals mit zunehmender Behandlungsdauer partielle bis komplette Resistenzen auf, welche die Hauptgründe für ein Behandlungsversagen sind¹⁴. Unterschieden werden nichtzelluläre und zelluläre Resistenzmechanismen. Zu den nichtzellulären zählen vor allem eine schlechte Zugänglichkeit wegen mangelhafter Durchblutung und die Stoffinaktivierung im extrazellulären Milieu⁶⁰. Die zellulär bedingten Mechanismen, die durch veränderte oder verändert regulierte Zellproteine bedingt sind, entstehen durch Mutation sowie Merkmalsselektion während der Therapie und durch erhaltene Merkmale des Ursprungsgewebes. Zytostatikaresistenzen sind vielschichtige Vorgänge. Jeder Tumor entwickelt ein individuelles Resistenzprofil aus internen und externen Faktoren⁸⁷. Die multifaktoriellen Mechanismen der Entwicklung resistenter Phänotypen sind bisher unklar.

Tabelle 1.2: Mechanismen der Zytostatikaresistenz und ausgewählte

Beispiele^{1,6,25,27,31,54,67,75,87,88,90,117,119}

	Mechanismus	Erläuterungen, Beispiele
Transport	Membrangebundene Transporter; Energieabhängiger Stoff-Efflux; (ABC-Transporter)	Physiologische Funktionen in sezernierenden und Grenzgeweben, Vermittlung pleiotroper Resistenz in Tumoren durch erhöhten Efflux; z.B.: MDR, MRP, LRP, Pgp 170
Veränderung der Apoptosefähigkeit	Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen pro- und antiapoptotischen Einflüssen zu Gunsten der Apoptose-Inhibition durch Mutation oder Inhibition	Inhibition der proapoptotischen Funktion von p53; Upregulation proapoptotischer Bcl-2-Proteine; Expression funktionsloser Apoptose-Rezeptoren in Membran, Ceramid-Inhibition
Verschiebung des Redoxstatus durch Überexpression von Enzymen	Vermehrung von Redoxsystemen, Verhinderung der Apoptose durch ROS; bessere Inaktivierung zytotoxischer Substanzen	MT, GSH, GST, DHFR, PKA, PKC
Enzymdownregulation	Inhibition von DNA- und Zellschädigung bei Apoptose	Topoisomerasen, Kaspasen, PARP
Erhöhte DNA-Reparatur	Entfernung von Schädigungen aus DNA zur Verhinderung des Replikationsstopps	NER, HMG, DRP
Erhöhte Schadenstoleranz	Toleranz replikationsinhibierender Dann Addukte, kein Zyklusstopp	Verminderte Expression der MMR, erhöhter Replikationsbypass
Bevorzugte Reparatur von Genloci für Zellentwicklung	Vorrang der Reparatur in auf Zellproliferation und Zyklusdurchlauf bestimmenden Genabschnitten	Mechanismus und Wertigkeit unklar; widersprüchliche Berichte über Toxizitätssteigerungen bei Hemmung von Polymerasen
Erhöhte Onkogenexpression	Verschiebung des zellulären Gleichgewichtes in Richtung Proliferation; Aktivierung nachfolgender Proteine und Gene	Jun, Fos, Myc, Ras, IGF, IGFR, EGFR, HSP, c-erB-2

Tabelle 1.2 fasst derzeit bekannte, allgemeine Resistenzmechanismen zusammen. Dabei bilden mehrere Mechanismen die Resistenz gegen einen Stoff bzw. als pleiotrope Resistenz (Multi drug resistance, MDR) gegen verschiedene Stoffe^{1,6,25,27,31,35,54,67,75,88,90,117,119}. Als für Hodentumoren wichtigste Resistenzmechanismen werden derzeit diskutiert⁵¹:

- Verminderung der Stoffakkumulation durch Inaktivierung und Exozytose
- Erhöhte DNA-Reparatur (NER) und erhöhte Schadenstoleranz (MMR-Defekt, p53-Defekt)
- Reduzierte Apoptosesuszeptibilität durch Mutation der Effektorkaskaden und Transformation von Wachstumsfaktoren zu Onkogenen (EGFR).

1.3.2 Platinresistenzen

Die Mechanismen der Cisplatinresistenz werden eingeteilt in eine reduzierte DNA-Bindung und eine inhibierte Wirkung nach DNA-Bindung⁵⁴. Sie wurden durch in vitro Untersuchungen beschrieben. Spezifische Mechanismen der Oxaliplatinresistenz sind bisher noch nicht eindeutig identifiziert. Es sind vereinzelt Zelllinien mit spezifischen, in vitro erzeugten Oxaliplatinresistenzen beschrieben worden^{45,109,117}.

1.3.2.1 Platinresistenz: Reduktion der DNA-Bindung

1.3.2.1.1 Influx, Efflux

Der zelluläre Influx wird durch Inhibition der membranständigen Na⁺/K⁺-ATPase gesenkt, so dass die Beteiligung energieabhängiger Prozesse anzunehmen ist⁵⁴. Gleichzeitig wird eine Reduktion des Platineffluxes durch Ca²⁺-Kanalblocker beschrieben²⁶. Transmembranöse ATP-abhängige Transporter können auf diese Weise in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Mehrfach wurde in platinresistenten Zellen die Expression von den ABC-Transportern LRP, MRP, Pgp und cMOAT beschrieben, deren Stellenwert jedoch unklar ist^{54,57,124}. Erst kürzlich konnten Verbindungen zwischen der vermehrter Aktivität von Kupferinflux- (CTR1) sowie Kupfereffluxproteinen (ATP7A/B) und einer erhöhten Cisplatin- und Oxaliplatinresistenz gezeigt werden¹⁰⁴. Man findet bei den meisten in vitro als platinresistent beschriebenen Kulturen eine Abnahme des intrazellulären Stoffgehaltes um bis zu 75%⁵⁴.

1.3.2.1.2 Stoffinaktivierung

Die hemmende Wirkung von GSH und MT bei der Platinaktivierung wurde bereits beschrieben. Deren Überexpressionen und ihrer angeschlossenen Enzyme wie der Glutathion-S-Transferase (GST) können mit Resistenzen assoziiert sein. Aufgrund teilweise widersprüchlicher Publikationen ist die Wertigkeit dieses Vorgangs jedoch unklar^{23,24,27,34,54,90,98,110}.

In diesem Punkt scheint es zwischen Oxaliplatin und Cisplatin keine Unterschiede zu geben, werden doch beide auf diese Weise erkannt und gebunden^{79,98,117}.

1.3.2.2 Platinresistenz: Inadäquate Wirkung

1.3.2.2.1 Gesteigerte DNA-Reparatur

Cisplatin und Oxaliplatin werden durch die NER mit gleicher Effektivität¹⁰⁰ und unabhängig von der Zellzyklusphase aus der DNA entfernt⁹. Erhöhte Aktivitäten verschiedener NER-Bestandteile (XPA, ERCC) bewirken Cisplatinresistenzen^{45,90}, die außerordentliche Sensibilität von Hodentumoren scheint u.a. durch einen geringen NER-Gehalt erklärbar^{36,45,90}. Diskutiert wird dabei eine präferentielle Entfernung der Interstrangbrüche aus Genabschnitten mit hoher Transkriptionsrate, wodurch vermutlich vorrangig für das Zellüberleben wichtige Genabschnitte saniert werden^{19,26,54}.

Verminderte Expressionen von HMG-Proteinen wurden in Hefezellen mit erhöhter Resistenz in Verbindung gebracht. Dadurch wäre der Zugriff der NER auf die Addukte und damit deren Entfernung erleichtert⁵⁴. Umgekehrt wird ein Zusammenhang zwischen erhöhten Sensitivitäten gegenüber Cisplatin und verminderter Aktivität der NER⁵⁸ sowie erhöhter Aktivität der HMG-Proteine gesehen⁴⁴.

1.3.2.2.2 Erhöhte Schadenstoleranz

Ein anderer Weg zur Erkennung, nicht jedoch Beseitigung von DNA-Schäden, führt über die MMR durch die Kontrolle bereits synthetisierter DNA-Abschnitte¹⁰. Mutationen und Inaktivierungen der MMR-Proteine hMSH1, hMSH2 und hMLH1 führen zur Mikrosatelliteninstabilität (MSI), einer Veränderung kurzer repetitiver DNA-Abschnitte nach Spontanmutationen, die mit erhöhtem p53-Verlust assoziiert ist^{29,37,37,61,73,77,83,117}. Es kommt zum Fortgang der DNA-Replikation trotz eingebauter Platinmoleküle, einem erhöhten replikativen Bypass². Dies beinhaltet folgende Konsequenzen: Erhalt der DNA-Integrität; Behinderung der Aktivierung von Schädigungssensoren und der konsekutiven Einleitung des Zyklusstopps^{19,52}; Erhöhung der NER-Aktivität im Läsionsbereich (siehe 1.3.2.2.1). Langfristig wird die Initiation mutagener Prozesse erleichtert. Die Überexpression der genannten Proteine dagegen erhöht die Apoptosefrequenzen¹³².

Aufgrund der fehlenden Erkennung von Oxaliplatinaddukten durch die MMR ist die Aktivität von Oxaliplatin unabhängig von einer MMR-Mutation^{37,98,106,131}. Erhöhte Bypassfrequenzen an sowohl durch Cisplatin als auch durch Oxaliplatin gebildeten Addukten können ebenfalls

durch erhöhte Aktivitäten der DNA-Polymerasen β , γ und ϵ beobachtet werden und zur Resistenz gegen beide Stoffe führen¹¹⁶.

1.3.2.2.3 Veränderungen der Apoptosekaskade

Die Rolle veränderter Apoptoseinduktion als Resistenzfaktor nach DNA-Schädigung durch Cisplatin ist derzeit noch nicht abschließend geklärt. Einen vereinfachten Überblick über bekannte Zusammenhänge liefert Abbildung 1.4^{8,94,103,118,130}.

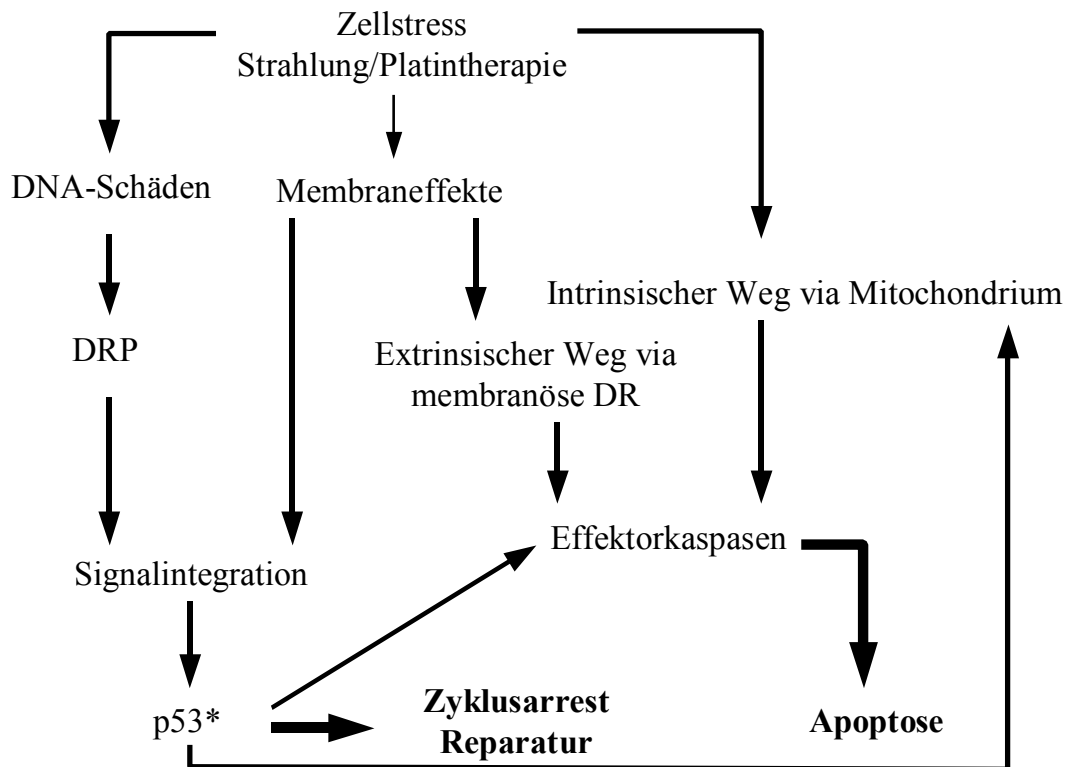


Abbildung 1.4: Zellreaktionen auf Stresseinwirkung (* aktiviertes Molekül)

Das intrazelluläre Gleichgewicht von pro- und antiapoptotischen Faktoren kann beidseitig verschoben sein. Eine Stressreaktion leitet die Apoptose ein. Mutationen und Selektionsdruck durch Radio- und Chemotherapie können zur Ausbildung antiapoptotischer Phänotypen und Resistenzbildung führen. Verminderte Expressionen oder Mutationen der proapoptotischen p53-Kaskade und Überexpression von antiapoptotischem Bcl-2 in cisplatinresistenten Zellen wurden durch mehrere Arbeitsgruppen beschrieben^{24,72,77,88}. Es gibt jedoch ebenfalls Berichte über Toxizitätssteigerungen nach p53-Verlust, die durch schnelleren Zelldurchlauf, fehlende Reparatur, kumulativ angehäufte Schäden und damit unabwendbaren Zelltod nach weiteren Zyklen erklärt werden⁹¹. Auch durch Inhibition²⁰ oder Expressionsminderung³³ der als Apoptoseeffektoren wirkenden Kaspasen zeigten sich Resistenzsteigerungen^{33,82}.

1.3.2.2.4 Veränderungen der Onkogenexpression

Neben bereits beschriebenen Resistenzfaktoren beeinflussen veränderte Onkogenexpressionen die Wirksamkeit der Platinbehandlung. Dabei kann die Formierung von DNA-Addukten gehemmt, die Toleranz der induzierten DNA-Schäden erhöht und die zelluläre Bereitschaft zur Apoptose vermindert werden²⁷. Für die Vielzahl hierbei beschriebener Moleküle existieren aber heute Veröffentlichungen mit unterschiedlichen Ergebnissen⁴². Dies erschwert den Überblick und die Bildung grundsätzlicher Aussagen.

Hauptaugenmerk gilt den frühzeitig nach DNA-Schädigung aktivierten Genen c-myc, c-jun und c-fos. Das Heterodimer aus fos und jun, AP-1, fungiert als Promotor verschiedener Gene, deren Überexpression mit Resistenzen in Verbindung gebracht wurden: MDR-1, PKC, c-myc, Topoisomerase u.a. Die Bildung von AP-1 wird mittels posttranslationaler Phosphorylierung durch verschiedene MAP-Kinasen gesteuert, die durch intranukleäre Signale (DNA-Schädigung) und extranukleäre Signale (Membranschäden, Transmitter, Wachstumsfaktoren, Chemotherapeutika) aktiviert werden können. Im Zusammenhang mit der Platinresistenz werden Membranrezeptoren wie EGFR⁸¹, IGFR sowie RAS und die Tyrosinkinase c-kit als Aktivatoren der MAP-Kinasen diskutiert. Im Zuge der veränderten Onkogenexpression kann es zur Beeinflussung der p53-Kaskaden sowie der intrinsischen und extrinsischen Apoptosewege kommen.

1.3.2.3 Selektion von platinresistenten Zelllinien

Zur Resistenzzeugung wird die zytotoxische Tumorbehandlung experimentell rekonstruiert und das Antwortmuster sowie die molekularen Veränderungen der Zellkulturen beobachtet. Durch diesen Selektionsdruck konnten für Cisplatin und Oxaliplatin in eine Vielzahl von Resistenzzeugungen, aber auch Sensibilisierungen beschrieben werden^{32,45,63,109,110}. Andere Möglichkeiten bieten Untersuchungen intrinsisch resistenter Zelllinien, wie solche des hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinoms², von Ovarialtumoren⁹² oder der Keimzelltumormlinie 1411 HP⁸².

Eine weitere Möglichkeit ist die Zellbestrahlung. Ionisierende Strahlung und Platintherapie führen zu ähnlich schweren DNA-Läsionen und rufen vergleichbare molekulare Stressreaktionen hervor (siehe Abbildung 1.5). In vitro durch Bestrahlung erzeugte Resistenzen gegen Cisplatin wurden in verschiedenen³³ Zellkulturen beschrieben^{26,33,49,50}. Durch Bestrahlung generierte Oxaliplatinresistenzen sind bisher nicht gezeigt worden. Auch zeigen die meisten Experimente eine fehlende Kreuzresistenz gegenüber Oxaliplatin in

cisplatinresistenten Linien, nur in einigen Fällen wurde eine höhere Oxaliplatinresistenz beschrieben⁹⁷.

1.3.2.4 Probleme in vivo

Laborexperimente dienen zum besseren Grundlagenverständnis, können jedoch nicht mit den Verhältnissen im Patienten gleichgesetzt werden. Insgesamt ist der prädiktive Wert von in vitro-Untersuchungen in Abhängigkeit vom verwendeten Modell unterschiedlich statistisch eingeschränkt. In vitro-Untersuchungen eignen sich dagegen gut zur Beschreibung molekularer Mechanismen. Momentan werden als relevante Faktoren für Cisplatinresistenz das GSH, die Reparaturerhöhung durch die NER, die Schädigungstoleranz durch Minderexpression der MMR sowie Veränderungen der Apoptoseinduktion diskutiert, Untersuchungen anderer Faktoren ergaben widersprüchliche Ergebnisse^{34,40,102}.

Klinische Ansätze zur Verminderung von Therapieresistenzen sind^{27,98}:

- Dosiserhöhung unter Einsatz autologer Stammzelltransfers
- Alternative Applikationsformen
- Therapiekombinationen
- Nebenwirkungsbehandlung
- Inhibierung bekannter Resistenzmechanismen
 - o Effluxverminderung
 - o Glutathiondepletion
 - o Aktivitätsminderung der Polymerasen
- Entwicklung potenterer und verträglicherer Derivate

1.4 Möglichkeiten der Radiochemotherapie und der fraktionierten Radiotherapie

Die Radiotherapie ist eine weitere Alternative der multimodalen Tumorthherapie. Eine hohe Sensibilität auf Bestrahlung zeigen schnellproliferierende Gewebe wie das hämatopoietische System, testikuläres und renales Gewebe, das Intestinum sowie die Epidermis. Ein geringeres Ansprechen findet sich in langsam wachsenden, soliden Tumoren¹²². Problematisch ist die fehlende Selektivität zwischen normalem und malignem Gewebe. Zur Erhöhung der therapeutischen Anwendungsbreite gibt es mehrere Möglichkeiten, wobei physikalische und biologische Faktoren unterschieden werden (Tabelle 1.3)¹²⁵.

Tabelle 1.3: Strategien zur Erhöhung der Therapeutischen Effizienz der Strahlentherapie

Physikalische Möglichkeiten	Biologische Möglichkeiten
Lagerung/Immobilisierung des Patienten	Fraktionierung
Verbesserte Bildgebung	Oxygenierung
Effektivere Bestrahlungsplanung	Response-Modifizier Tumor/Normalgewebe
Bessere Bestrahlungstechnik	Radiochemotherapie
Strahlenqualitäten	Radiogentherapie

1.4.1 Radiochemotherapie mit Cisplatin/Oxaliplatin

Die Rationale dieser Therapieoption ist die Ergänzung zytotoxischer bzw. zytostatischer Effekte bei unterschiedlichen Nebenwirkungsspektren. Dadurch wird zwar nicht die Toleranz im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie gesenkt, allerdings verstärken Platinaddukte als Radiosensitizer die Strahlenwirkung so, dass Radioresistenzen überwunden werden können. Als Mechanismen werden diskutiert¹²⁵:

- Erhöhung der intrinsischen Radiosensibilität
- Reparaturhemmung bestrahlungsinduzierter DNA-Schäden
- Zellzyklussynchronisation
- Reoxygenierung der Tumorzellpopulation

Als Mechanismus der Sensibilitätssteigerung durch Platinaddukte wird u.a. eine Reparaturbehinderung angenommen. Ionisierende Bestrahlung provoziert eine Vielzahl an Veränderungen in der DNA der Zielzellen, die häufigsten sind Basenaustausch, Einzelstrangbruch (SSB) und Doppelstrangbruch (DSB)⁶⁵. Diese werden durch Kinasen wie ATM-Kinasen und die Poly(ADPribosyl)-polymerase (PARP) erkannt, was zur p53-Aktivierung und zum Zellzyklusstopp führen kann³⁶. Mit Ausnahme des DSB erfolgt eine schnelle Reparatur dieser Schädigungen. Durch multiple SSBs, die normalerweise sowohl nach Cisplatingabe als auch nach alleiniger Bestrahlung effektiv und schnell beseitigt werden, wird die Reparaturfähigkeit der Zelle behindert und überlastet. Diese irreparablen Schäden bedingen den erleichterten Zelltod (Abbildung 1.5)⁴⁷. Klinisch macht man sich diesen Effekt durch eine kombinierte Radiochemotherapie zu Nutze. Aufgrund der relativ hohen Toxizität einer Cisplatintherapie werden zunehmend andere Platinderivate wie Oxaliplatin als Radiosensitizer eingesetzt²¹.

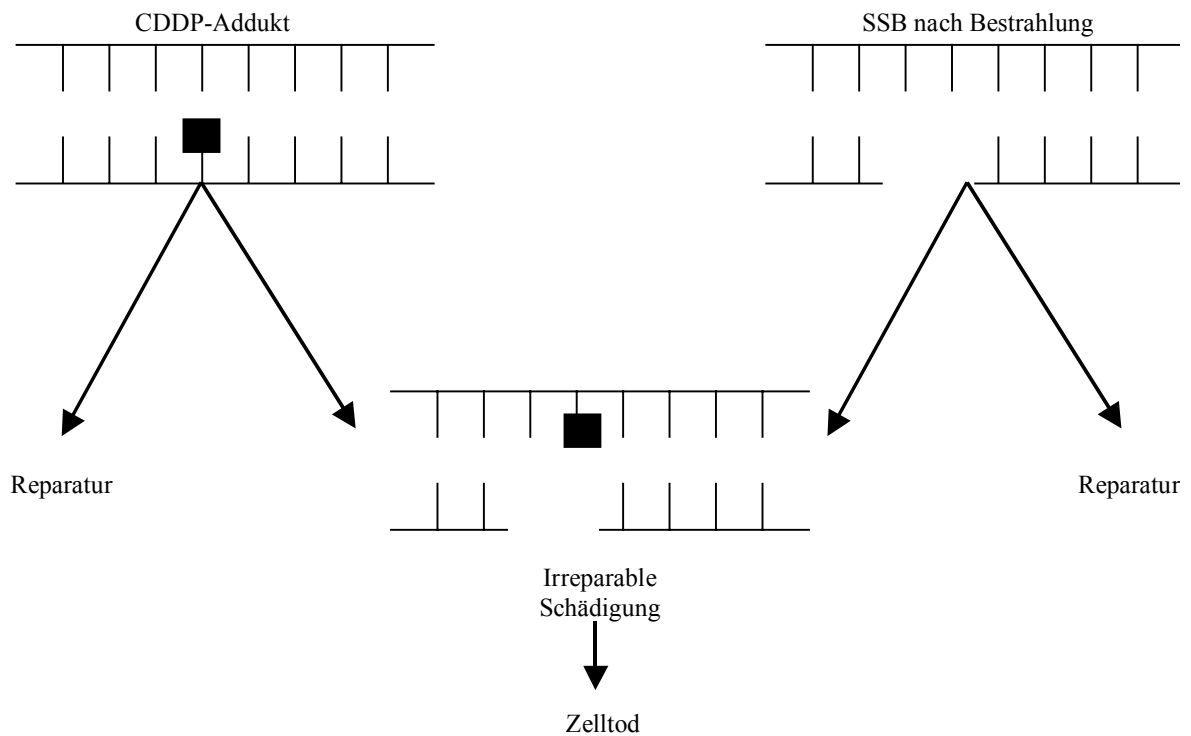


Abbildung 1.5: Interaktionsmodell Cisplatin/Bestrahlung, Einzelschädigung mit jeweils hoher Reparaturwahrscheinlichkeit, Kombination mit Einschränkung der Reparatur und Zelltod

1.4.2 Fraktionierung der Bestrahlung

Die Fraktionierung nutzt Unterschiede in der Erholungsdauer zwischen Geweben mit unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeit aus. Die Gesamtstrahlendosis wird aufgeteilt und täglich oder als Hyperfraktionierung (Reduzierung der Einzeldosis mit Erhöhung der Gesamtdosis oder Verlängerung der Behandlungszeit) mehrfach täglich appliziert. Dabei werden Gewebeschäden durch die Erniedrigung der Einzeldosen verringert. Gewebe mit langsamer Wachstumsgeschwindigkeit (Normalgewebe) erhalten so die Möglichkeit, anfallende Schädigungen adäquat zu beheben. Schnell wachsende Gewebe wie Tumoren oder Stammzellen profitieren wegen des schnelleren Zellzyklusdurchlaufes und der dadurch bedingten Verkürzung der Reparaturzeit nicht von diesem Erholungseffekt. Die Folge ist eine Akkumulation von Zellschäden, die den Zelltod hervorrufen. Die genauen Ursachen dieses Phänomens sind allerdings noch nicht hinreichend geklärt¹²⁵.

2 Ziele und Fragestellungen

Hodentumoren gelten allgemein als sehr sensibel für Chemo- und Radiotherapie⁷⁰. Trotzdem gibt es, v.a. bei Nichtseminomen und in „poor responder“-Situationen, eine Anzahl von Therapieversagern, die eine weitere Evaluation der zu Grunde liegenden Resistenzmechanismen erfordert. Neue Erkenntnisse über Cisplatinresistenzfaktoren könnten zu einer Verbesserung der Heilungschancen auch bei bisher refraktären Tumoren führen⁴⁶.

Die Ziele der durchgeführten Studie sind:

- 1) Etablierung von zehnfach bestrahlten Subzelllinien der etablierten Kulturlinien 2102 EP und H 12.1
- 2) Überprüfung auf Änderung der Strahlensensibilität nach Bestrahlung
- 3) Überprüfung auf Änderungen der Chemosensibilität gegenüber jeweils Cisplatin und Oxaliplatin nach Bestrahlung
- 4) Identifikation bestrahlungsinduzierter Cisplatin- und potentieller Oxaliplatinresistenzfaktoren

Aufgrund der möglichen Rolle als Strahlensensitizer und Alternative zu Cisplatin ist insbesondere die Entwicklung von Oxaliplatinresistenzen nach Radiatio von besonderem Interesse.

3 Material und Methoden

3.1 Zelllinien

Die verwendeten humanen Keimzelltumorzelllinien 2102 EP und H 12.1 sind etabliert und im Detail charakterisiert^{15,121}. Sie wurden primär aus Patiententumormaterial gewonnen. Eine histologische Charakterisierung erfolgte sowohl beim Primärmaterial als auch in Xenografts. Eine Zusammenfassung gibt Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Histologie und Erstbeschreibung der Zellen, Abkürzungen: EC (Embryonales Karzinom) S (Seminom), C (Chorionkarzinom), T (Teratom), STGC (spermatozytische Riesenzellen), IT (unreifes Teratom)

Linie	Patientenhistologie	Nacktmaushistologie	Literaturquellen
2102 EP	EC, S	EC	121
H 12.1	EC, C, T, S	EC, STGC, IT	15

3.2 Zellkultur, Kulturmedium, Zellzahlbestimmung

Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (25 cm²) unter Standardkulturbedingungen (Brutschrank bei 37°C und 5%-CO₂-Begasung) kultiviert. Als Nährmedium wurde RPMI 1640 (37°C) verwendet, komplettiert mit FKS-10% (30 min. hitzeinaktiviert bei 56°C), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Eine Herstellung größerer Mengen von Kulturmedium garantierte die Verwendung aus der gleichen Charge während einer Versuchsreihe zur Einhaltung vergleichbarer Bedingungen.

Das Zellwachstum als adhärenente Monolayerschicht wurde täglich visuell mittels Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Bei Erreichen einer nahezu vollständigen Konfluenz erfolgte Passagierung der Kulturen. Dazu wurde das verbrauchte Medium dekantiert, die verbleibende Zellschicht mit 5-10 ml RPMI 1640 gewaschen und mit 1 ml Trypsinzytrat vom Flaschenboden abgelöst. Nach Ablösung wurden die Zellen im beschriebenen Nährmedium suspendiert sowie im Verhältnis 1:3 in neue Flaschen gegeben und auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt. Die neue Zellpassage wurde entsprechend nummeriert und wie beschrieben kultiviert oder weiterverarbeitet.

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen nach Einwirken des Trypsinzytrats in Medium suspendiert und zur Auflösung größerer Agglomerate mittels Pipette durchmischt. Die Zellzahlbestimmung pro Milliliter erfolgte in der Neubauer-Zählkammer.

Zur Kryokonservierung wurden jeweils 2 Mio. Zellen nach Zentrifugation aus dem Kulturmedium bei 1 200/min in 1 ml FKS (mit DMSO-10%) suspendiert und unmittelbar danach auf -196°C heruntergekühlt. Zur erneuten Kultivierung der Zellen wurden diese nach dem Auftauen aus den Kryocubes in Nährmedium aufgenommen und bei 1 200/min für 10 min. zentrifugiert. Anschließend wurde das Pallet in 10 ml Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Diese und alle folgend beschriebenen Arbeiten wurden unter einer Laminarbox mit sterilen Arbeitsmitteln verrichtet.

3.3 Zellbestrahlung

Die Bestrahlung der Zellkulturen erfolgte mittels des Röntgentiefenstrahlengerätes RT 250 in der Strahlenklinik der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. J. Dunst).

Tabelle 3.2: Technische Daten des RT 250

Spannung:	200 kV
Strom:	20 mA
Dosisleistung:	2 Gy/min
Filterung:	0,5 mm Cu
Tubusmaße:	40x10x15 cm

Das Bestrahlungsregime sah zehn Einzelbestrahlungen zu 4 Gy (korrigierte Bestrahlungszeit: 2,56 Gy/min) vor. Die erreichte Gesamtdosis von 40 Gy ist klinischen Schemata angepasst¹¹³. Bei halber Konfluenz (ca. 3 Mio. Zellen) wurde bestrahlt, unmittelbar im Anschluss erfolgte ein Mediumwechsel. Bis zum Erreichen eines exponentiellen Wachstumsverlaufs erfolgte bei Bedarf Mediumwechsel und Passagierung. Die Erholungsphase nach Bestrahlung nahm in der Regel 14 Tage in Anspruch. Zusätzlich zur Passagenummer erhielten die bestrahlten Kulturen den Zusatz DX sowie die Nummer des aktuellen Bestrahlungsdurchgangs. Die Bestrahlungszyklen erforderten in jeder Zelllinie ca. 40 Passagen.

3.4 Strahlensensitivitätsmessung im ZKB-Assay

Die Bestimmung der Strahlensensitivität erfolgte mit Hilfe des Zellkoloniebildungstests (ZKB), in dem die Zellkulturen in steigenden Dosen gemäß Bestrahlungsprotokoll bestrahlt wurden. Aus danach erfolgter Passagierung wurden 300 Zellen in neuer Flasche über 14 Tage kultiviert, ein Wechsel des Nährmediums geschah bedarfsweise. Nach 14 Tagen erfolgte die Fixierung der adhärennten Zellen durch 4% Formaldehyd über 20 min. Nach Auswaschen mit

Aqua dest. wurde das fixierte Material mit Giemsa-Lösung gefärbt, nochmals gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die angefärbten Zellanhäufungen (Anfärbung in der Regel ab ca. 50 Zellen) wurden ausgezählt und halblogarithmisch gegen die Strahlendosis aufgetragen. Zeigt die Kurve eine Schulterform, gilt die Zellkultur als wenig, bei geradlinigem Abfall dagegen als erhöht sensibel.

Wichtige, aus der Überlebenskurve abzulesende Vergleichsparameter sind:

SF-2: Prozentuales Wachstum bei 2 Gy

D-10: Notwendige Strahlendosis zur Wachstumsreduktion auf 10%

3.5 Proteinbestimmung

3.5.1 Proteinisolation aus Zellkultur

Die Isolation des zellulären Gesamtproteins direkt im Anschluss an den Wiedereintritt eines exponentiellen Wachstums nach der zehnten Bestrahlung ist der erste Schritt zur qualitativen Proteinbestimmung. Dabei wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- 1) Trypsinierung, Zählung und Zentrifugation der Zellen bei 1 200/min für 5 min.
- 2) Dekantierung des Überstandes, Waschen in 10 ml PBS und nochmaliges Zentrifugieren

Die Schritte 3-6 erfolgten auf Eis.

- 3) Zelllyse in RIPA-Puffer versetzt mit 10 µl PMSF, 10 µl Proteaseinhibitor, 10 mM DTT (1 ml auf 10 Mio. Zellen)
- 4) Mischen von Puffer und Zellpellets bis zur Homogenität
- 5) 45 min. Inkubation auf Eis
- 6) 15 min. Zentrifugation, danach Pipettierung des Überstands mit Proteinen in neues Röhrchen und Notierung der Menge

3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes im Überstand der Proteinisolation schloss sich der Proteingewinnung direkt an:

- 1) Vermischen nacheinander von 798 µl Aqua dest, 2 µl Überstand, 200 µl Protein-Assay-Reagenz (Coomassie brilliant blue)
- 2) Messung der Absorptionzunahme der Probe am Spekol bei 595 nm
- 3) Berechnung der Proteinkonzentration und, falls erforderlich, Angleichung der Proteinkonzentration mit Aqua dest. zur Gewährleistung einer identischen Bandenbeladung im anschließenden Western Blot

Generell betrug die Zielkonzentration in der Probe 2-3 $\mu\text{g Protein}/\mu\text{l}$, bei einer Beladung pro Bande von 20 bis 50 μg je nach Gelgröße.

3.5.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine quantitative Proteinbestimmung. In einem SDS-Gel erfolgt die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld. Die Seife SDS bindet und denaturiert Proteine zu Komplexen, die sich bei negativer elektrischer Ladung nur durch ihre Molekülgröße unterscheiden. Während der Elektrophorese in einer Polyacrylamidmatrix wandern die Proteine dann zum Positivpol und werden durch den Molekularsiebeffekt nach ihrem Stokes-Radius aufgetrennt. Danach erfolgt die Übertragung der getrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, auf der spezifische Primär- und Sekundärantikörper die gesuchten Proteine markieren. Eine am Sekundärantikörper lokalisierte Peroxidase ermöglicht eine Lumineszenzreaktion, die mittels Röntgenfilmbelichtung detektiert wird.

Die Arbeitsschritte im Einzelnen:

- Probenvorbereitung:
 - Gesamtmenge pro Probe maximal 26 μl in kleiner Gelkammer
 - Zusammensetzung: 6,5 μl Gelbeladungspuffer, 2,6 μl 1 M DTT, ad 26 μl Überstand; gutes Mischen
 - Denaturierung durch Erhitzen auf 99°C über 15 min.

- Gelherstellung (verwendet wurde das diskontinuierliche System nach Lämmli):
 - System aus zwei unterschiedlichen Gelen: Trenngel für Elektrophorese und Sammelgel zum Einbringen der Proben in Apparatur; Unterscheidung durch pH-Wert des Tris-Puffers und des Acrylamidanteils
 - Überschichtung der beiden Gele nacheinander in die zusammengebaute Apparatur, Polymerisationszeit jeweils mindestens 60 min.
 - Formung der Probenkammern (Slots) im Sammelgel während Polymerisation durch einen speziellen Kamm

- Elektrophorese:
 - Eingeben der bereiteten Proben in Slots, Einsetzen von Kontrollmarkern (5 μl) in separate Slots zur Größenquantifizierung der Proteine (definierte Molekülgrößen in Farbbanden), Verschluss der Elektrophoreseapparatur und Füllung mit Elektrophoresepuffer, Anlegen der Spannung (200 V) und Auftrennung unter regelmäßiger Kontrolle der Marker (Dauer ca. 45 min.)

- im Anschluss Entfernung des Sammelgels, Überführung des Trenngels in Blotting-Puffer
- Blotten (Überführung der Proteine aus dem Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran durch Elektrophorese, Haftung der Proteine an Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen, Verbesserung der Haftung durch Aktivierung der Proteinbindungsstellen durch Methanolzugabe im Puffer):
 - Zuschneidung einer Nitrozellulosemembran und zweier Filterpapiere entsprechend Gelgröße und Tränken dieser im Blotting-Puffer
 - Luftfreie Schichtung zur störungsfreien Proteinwanderung aus dem Gel in Richtung der positiv geladenen Anode in die Membran (siehe Abbildung 3.1), Einhüllung durch Filtermembranen
 - Blotten in halbtrockener Blotkammer bei konstantem Stromfluss (20 mA) für 25 min.
 - Membranspülung mit Aqua dest., Markierung der Kontrollmarkerbanden
 - Membranfärbung zur optischen Prüfung auf Bandengleichmäßigkeit mittels Ponceau S-Lösung 1-2 min. (Zusatz von Trichloracetat zur zusätzlichen Fixierung der Proteine auf der Membran)
 - Lagerung über Nacht in PBS bei 4°C

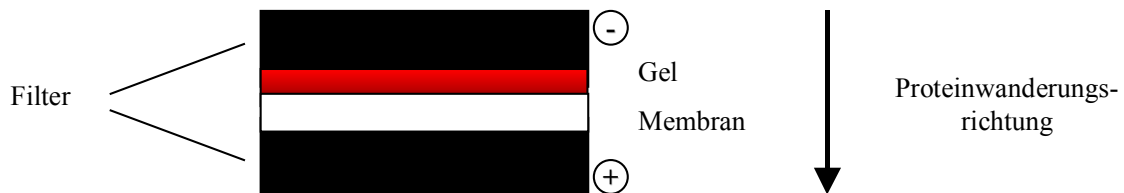


Abbildung 3.1: Schichtung bei Western Blot

Anmerkung: Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter ständigem Schwenken durch einen automatischen Schwenker durchgeführt.

- Blocken (Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen):
 - 60 min. Inkubation der Membran in Trockenmilchlösung (5% in PBST) unter Bewegung
- Inkubation mit spezifischem Primärantikörper:
 - Inkubation der Membran mit 5 ml Antikörperlösung für 120 min.

- Antikörperlösung in Trockenmilchlösung (5%) (Konzentration siehe Tabelle 3.3)
- Dreimaliges Waschen mit PBST (0,1%), je 5 min.
- Inkubation mit Sekundärantikörper:
 - Verdünnung 1:2 000 in Trockenmilchlösung (1%)
 - Inkubation für 60 min.
 - Dreimaliges Waschen mit PBST (0,1%), je 5 min.
- Detektion der spezifischen Antikörperbindung mittels der ECL[®]-Reaktion (Inkubation der Membran mit luminolhaltiger Lösung, Oxidation des Luminols durch Peroxidase, Erzeugung einer Chemolumineszenz an der Stelle des gebundenen Antikörpers):
 - Gleichmäßige Mischung beider Fertiglösungen (Menge in Abhängigkeit von Membranfläche: 0,125 ml/cm²) und Inkubation für 1 min.
 - Einlegen der Membran und eines Films in eine Belichtungskassette, Filmentwicklung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (1, 5, 10, 60 min.) im Entwicklungsgerät
 - Markierung der Referenzmolekülbanden auf dem Film, Beschriftung

3.6 Chemoresistenzbestimmung im SRB-Assay

Der SRB-Assay ist eine schnelle und sensitive Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität¹¹¹. Der anionische Farbstoff Sulforhodamin B (SRB) bindet bei saurem pH-Wert an Zellproteine, deren Menge photometrisch gemessen wird. Dabei korreliert die optische Dichte mit der Zellzahl. Logarithmisch und konfluent wachsende Kulturen werden steigenden Konzentrationen von Chemotherapeutika ausgesetzt und der antiproliferative Effekt durch SRB-Färbung gemessen.

Voraussetzung für den direkten Vergleich von Zelllinien ist eine simultane Inkubation aus einer Verdünnungsreihe (s.u.). Bei Verbindung der im Diagramm gegen die korrespondierenden Konzentrationen eingetragenen Extinktionen ergibt sich die Dosis-Wirkungskurve. Der Vergleichsparameter ist der IC-50-Wert. Dieser entspricht der Substanzkonzentration, bei der das Zellwachstum um 50%, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (100%), inhibiert wird. Die Ermittlung erfolgt grafisch aus der Dosis-Wirkungskurve. In der vorliegenden Studie wurde das Wachstumsverhalten nach 24 h-Exposition mit Cisplatin und Oxaliplatin in Konzentrationen von 0-100 µM bestimmt. Für statistisch signifikante Aussagen wurden die arithmetischen Mittelwerte mit

Standardabweichung dreier unabhängig voneinander durchgeführter Versuche verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem unilateralen Student's t-Test mit einem Konfidenzintervall von 5%. Als Computerprogramm wurde SPSS benutzt. Die grafische Darstellung ließ sich mit Hilfe des Computerprogramms Sigma Plot realisieren.

Der Testansatz erfolgte in einer 96-Lochplatte. Um ein exponentielles Wachstum über den gesamten Assayzeitraum zu garantieren, wurde zunächst die optimale Zellzahl pro Loch durch Wachstumskinetiken ermittelt. Das Wachstumsverhalten wurde täglich mikroskopisch kontrolliert. Aus den Wachstumskinetiken ergaben sich für die Zelllinien 2102 EP und H 12.1 folgende Zellzahlen (Zellen pro Loch): Parentale Zelllinien jeweils 3 000, DX-10-Linien jeweils 2 500.

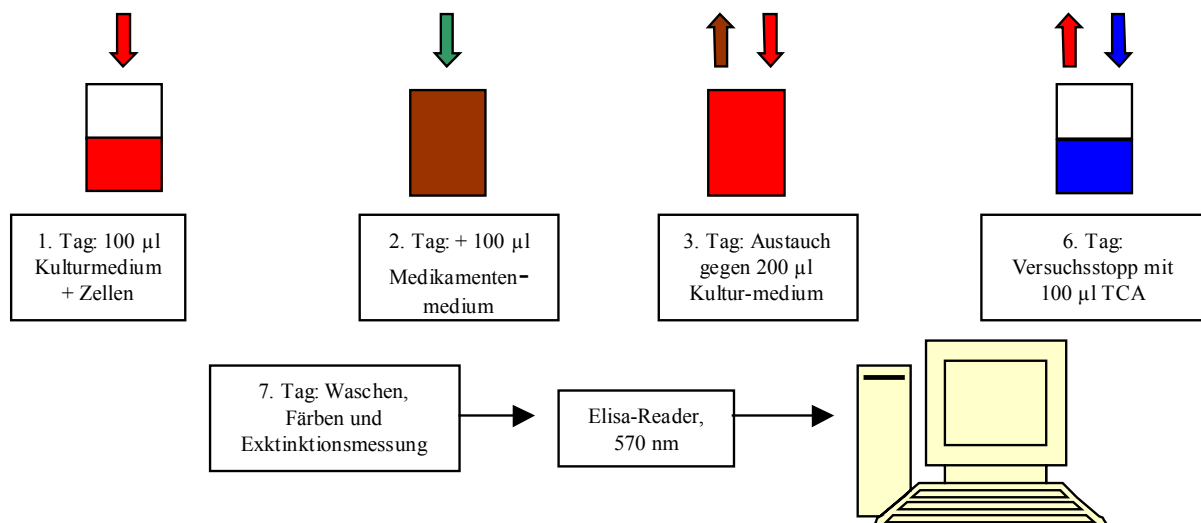


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des SRB-Assay

Die 96-Lochplatte enthält zwölf Reihen, die Reihen eins und zwölf dienen als Leerwertreferenz, in den verbleibenden 80 Löchern erfolgt der Ansatz der genannten zehn Verdünnungsstufen. Somit ergeben sich pro Versuchsansatz folgende notwendige Zellzahlen: Parentale Zelllinien 240 000, bestrahlte Linien 200 000.

Im folgenden Abschnitt sind die Arbeitsgänge des Versuches kurz zusammengefasst, Abbildung 3.2 zeigt den groben Ablauf schematisch.

3.6.1 Tag eins

- Abfüllung der gewünschten Zellmenge bei Passagierung in sterile Wanne
- Pro Loch notwendige Mediummenge: 100 µl; Auffüllung auf 8 ml in Wanne (Höhere Kalkulation zum Ausgleich von Pipettierverlust)
- Mischen der Suspension in Wanne und Einfüllung in Platte mit Mehrkanalpipette

- Auffüllung von reinem Kulturmedium in Leerwertreihen
- 24 h Inkubation bei 37°C

3.6.2 Tag zwei

- Herstellung der jeweiligen Zytostatikaverdünnungsreihen
- Einfüllen der Medikamentenlösungen mit Mehrkanalpipette, Auffüllen der Kontrollreihe und der Leerwertreihen auf 200 µl
- 24 h Inkubation bei 37°C

3.6.3 Tag drei

- Dekantierung des zytostatikahaltigen Mediums und Abtropfen auf steriler Kompresse
- Spülung mit 200 µl RPMI 1640 pro Loch
- Nochmaliges Dekantieren und Abtropfen
- 200 µl Kulturmedium in alle 96 Löcher
- Inkubation bei 37°C

3.6.4 Tage vier und fünf

- Mikroskopische Wachstumskontrolle

3.6.5 Tag sechs

- Abstoppen durch Dekantieren des Mediums und Pipettieren von 100 µl TCA (10%) pro Loch zur Proteifixierung
- Lagerung über Nacht bei 4°C

3.6.6 Tag sieben

Alle Waschdurchgänge wurden in einem Mikrotiterplattenwaschgerät durchgeführt, das Verfahren war somit für alle Platten standardisiert, beschleunigt und vereinfacht.

- 5 Waschdurchgänge mit Aqua dest.
- Entfernung von zellulärem Detritus durch starken Sog der Maschine
- 100 µl SRB-Färbelösung pro Loch, Inkubation über 60 min.
- 5 Waschdurchgänge mit Essigsäure (1%), dadurch Entfernung nicht gelösten Farbstoffs
- 60 min. Inkubation mit 100 µl Tris (10 mM) pro Loch; anschließend Schütteln und Messen der Extinktion bei 570 nm im Elisa-Reader; Datenübermittlung an Computer, Umwandlung der Extinktionswerte nach Leerwertkorrektur in Prozentwerte (100%

Wachstum entspricht unbehandelter Kontrolle); Berechnung des Mittelwerts der acht Löcher einer Reihe mit gleicher Konzentration und Angabe der Standardabweichung.

3.7 Materialauflistung im Einzelnen

3.7.1 Chemikalien

3.7.1.1 Zellkultur

Kulturmedium: 50 ml FKS (30 min. Hitzeinaktivierung bei 56°C), 450 ml RPMI 1640, 5 mg Streptomycin, 50 000 U Penicillin
Aufbewahrung bei 4°C, vor Gebrauch Erwärmung auf 37°C

Spülmedium: RPMI 1640, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Aufbewahrung bei 4°C, vor Gebrauch Erwärmung auf 37°C

Trypsinlösung: 100 ml Trypsin, 0,5 g EDTA
Aufbewahrung bei 4°C, vor Gebrauch Erwärmung auf 37°C

Einfriermedium: 18 ml FKS, 2 ml DMSO
Aufbewahrung bei 4°C

3.7.1.2 Proteinbestimmung

PBS: 0,4 g KCl, 8 g NaCl, 0,3 g NaHCO₃, 1 g Glukose, 0,2 g EDTA
Lösung in 1 l Aqua dest., sterile Filtration, Aufbewahrung bei 4°C

RIPA: 150 mM NaCl, NP 40 1%, Natriumdesoxychelate (0,5%), SDS (0,1%), 50 mM Tris bei pH 8

Isolutionslösung: 1 ml RIPA-Puffer
zusätzlich pro ml Puffer: 10 µl PMSF, 10 µl Proteaseinhibitor, 10 µl DTT (10 mM)

Probenvorbereitung: 6,5 µl Gelbeladungspuffer (SDS & Bromphenolblau), 2,6 µl DTT (1 M) 17,5 µl Proteingemisch

Trenngel (10 ml): 8%-Gel für Proteine ab 80 kDa: 4,6 ml Aqua dest., 2,7 ml Acrylamid (30%), 0,1 ml SDS (10%), 0,05 ml APS, 2,5 ml Tris (1,5 M) bei pH 8,8, 0,006 ml TEMED
15%-Gel für Proteine bis 80 kDa: 2,3 ml Aqua dest., 5 ml Acrylamid (30%), 0,1 ml SDS (10%), 0,05 ml APS, 2,5 ml Tris (1,5 M) bei pH 8,8, 0,004 ml TEMED

Sammelgel (5 ml): 2,87 ml Aqua dest., 0,832 ml Acrylamid (30%), 0,05 ml SDS (10%), 0,025 ml APS, 1,25 ml Tris (1,5 M) bei pH 8,8, 0,006 ml TEMED

Molekülmarkerbanden:

High Range (8%): 207 kDa Myosin, 120 kDa β -Galaktosidase, 78 kDa Bovine Serum Albumin, 47 kDa Ovalbumin

Low Range (15%): 112 kDa Phosphorylase B, 81 kDa Bovine Serum Albumin, 49,9 kDa Ovalbumin, 36,2 kDa Carbonic anhydrase, 29,9 kDa Soybean trypsin inhibitor, 21,3 kDa Lysozym

Laufpuffer (pH 8,3, Angaben für 5 l): 72 g Glycin, 15,1 g Tris-Base, 5 g SDS

Lösen in 5 l Aqua dest., Aufbewahrung bei Raumtemperatur

Blotting-Puffer (Angaben für 5 l): 72 g Glycin, 15,1 g Tris-Base, 5 g SDS, 500 ml Methanol, 4 500 ml Aqua dest., Aufbewahrung bei Raumtemperatur

PBST (0,1%): PBS versetzt mit Tween 20 (0,1%)

Trockenmilchlösung (Proteinblock, Antikörperinkubation, je 20 ml):

5%-Lösung: 20 ml PBST (0,1%), 1 g Trockenmilchpulver

1%-Lösung: 20 ml PBST (0,1%), 0,2 g Trockenmilchpulver

Tabelle 3.3: Primär- und Sekundärantikörper im Western Blot

Antikörper	Bezeichnung	Firma®	Epitop, Masse	Verdünnung
Anti-Mouse Ig				1:2000;
Anti-Rabbit Ig	MR12/53	DAKO	Fc des Rabbit Ig	1:2000; M
APAF-1	24	BD	n.b.; 130 kD	1:250; M
Bax	57 B	DAKO	AS 43-61; 21 kD	1:500; R
Kaspase 3	Ab-3	Oncogene	n.b., 37 kD	1:250; M
c-erbB-2	e2-4001+3B5	DAKO	Fc des Rabbit Ig	1:2000; M
c-myc	9E10	Pharmingen	C-Terminus; 62 kD	1:500; M
EGFR	1005	Santa Cruz	C-Terminus; 170 kD	1:200; R
FAS	C-20	Santa Cruz	C-Terminus; 48 kD	1:250; R
FASL	N-20	Santa Cruz	AS 2-19; n.b.	1:250; R
hMSH2	GB-12	Oncogene	N-Terminus; 100 kD	1:250; M
IGFI	H-70	Santa Cruz	AS 49-118; n.b.	1:200; R
IGFIR α	H-78	Santa Cruz	AS 123-200; 350 kD	1:500; R
MDR-1	C219	Alexis	MDR1/3; 170 kD	1:250; M
p21	p21-187	Santa Cruz	n.b.; 21 kD	1:300; M
p53	DO-7	DAKO	n.b.; 53 kD	1:250; M
PARP	4C10-5	Pharmingen	n.b.; 116 & 85 kD	1:250; M
TGF β -R	266	Pharmingen	n.b.; 180 kD	1:250; M

3.7.1.3 SRB Assay

Cisplatin: Substanzlösung in DMF, Herstellung der Stammlösung (20 000 μ M), Lagerung bei 4°C, Erwärmung durch Zugabe zum Medium

Oxaliplatin: Lösung des Pulvers in Aqua dest. (steril), Herstellung einer Stammlösung (2 000 μ M) nach steriler Filtration, Lagerung bei -20°C, Auftauen vor Zugabe zum Medium

TCA: Lösung in Aqua dest. zu 10%, Lagerung bei 4°C

SRB: Pulverauflösung in Essigsäure (1%) im Verhältnis 0,4 g/100 ml, Lagerung der 0,4%-Lösung bei 4°C

3.7.2 Firmenverzeichnis

Firma ®	Produkt
Amersham	ECL-Western
Bender	Wasserbad, Zählkammer
Biochrome KG	FKS, Penicillin, Streptomycin, Trypsin
Biometra	Elektrophoreseapparatur, Gelglasplatte, Spacer, Spekolküvette
Bioplex	Elektrophoresestromgerät
BioRAD	Filter, Filmentwickler, Blotkammer, Nitrozellulosemembran, Elisa-Reader, Ponceau S, Proteaseinhibitor, Proteinassay-Reagenz, RIPA, Röntgenfilm, Plattenwaschgerät
Boehringer	Bromphenolblau, DMSO, EDTA, SDS, TEMED, Tween 20
Braun-Dexon	Insulinkanüle, KCl
Costar	96-Loch-Mikrotiterplatten
Eppendorf	Pipetten, Pipettenzubehör
Falcon	Zellkulturflaschen
Greiner	Sterile Röhrchen, sterile Wannen
Heraeus	Brutschrank, Laminarbox, Zentrifuge
IKA-Labortechnik	Vortexer
Merck	Formaldehyd, Methanol, Molekülmarker, NaCl, NaHCO ₃ , Einmalhandschuhe
Merell	Essigsäure, TCA
Nunc	Kryocubes
Pharmacia	Blot-Reagenz, Photometer
Philips	Röntgentiefenstrahlengerät RT 250
Roth	Glycin
Sanofi	Oxaliplatin
Serva	Acrylamid, APS
Serva Feinbiochemica	RPMI 1640, Plattenschwenker
Siemens	Computer
Sigma	Cisplatin, Giemsa, Glukose, SRB, Kompressen
Slim Fast	Trockenmilchpulver
Systat	Sigma Plot
Zeiss Jena	Umkehrphasenmikroskop

4 Ergebnisse

4.1 Zellkultur und Bestrahlung

Durch zehnmalige sequentielle Bestrahlung der Zelllinien 2102 EP und H 12.1 wurden die Subzelllinien 2102 DX-10 und H 12.1 DX-10 selektioniert. Nach Radiatio mit jeweils 4 Gy als Einzeldosis setzte das logarithmische Wachstum nach ungefähr zehn Tagen wieder ein, nach einer Gesamtzeit von 25 Wochen (40 Zellpassagen) lagen den zwei Tumorzelllinien korrespondierende DX-10-Linien vor.

4.2 Strahlensensitivitätsmessung im Zellkolonie-Bildungstest

Im ZKB erfolgte die Bestrahlung der in Vorversuchen festgelegten Zellzahlen mit den Strahlendosen 0, 1, 2, 3 und 4 Gy. Die Werte der dreimal unabhängig voneinander durchgeführten Experimente, erhalten jeweils durch Auszählung der gebildeten Kolonien, wurden gemittelt und mit Hilfe des Computerprogramms Sigma Plot als Dosis-Wirkungskurve dargestellt.

Beide Zelllinien stellten sich in den Überlebenskurven sowohl vor als auch nach der Bestrahlung eher als Schulterform dar (Abbildungen 4.1 und 4.2) und waren schon intrinsisch eher insensitiv auf ionisierende Strahlung. Beim Vergleich von SF-2 und D-10 zwischen den korrespondierenden Linien zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Sensibilität auf ionisierende Strahlung (siehe Tabelle 4.1). Eine Strahlenresistenz entwickelte sich nicht.

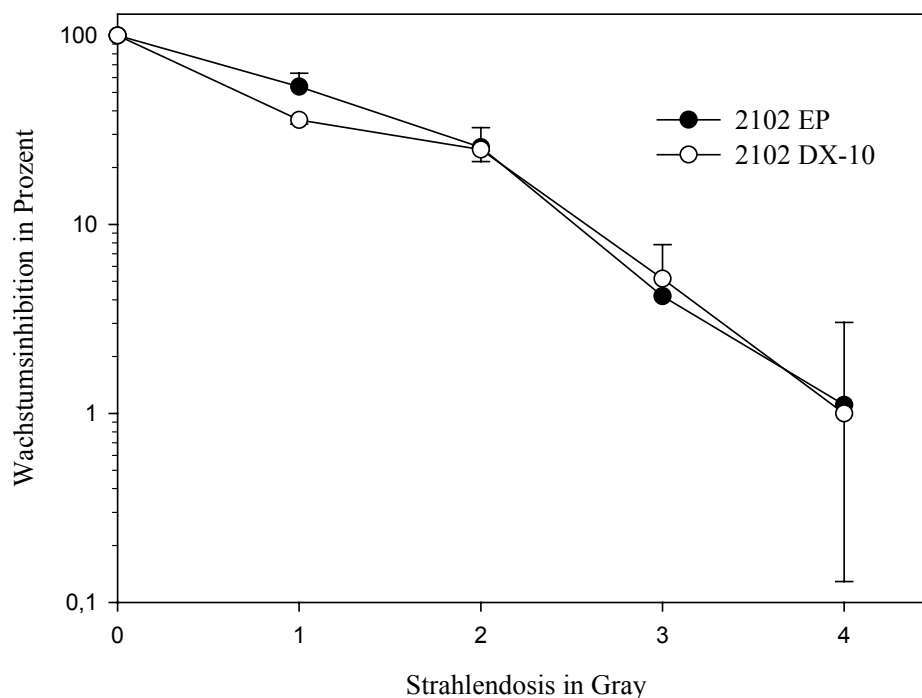


Abbildung 4.1: Dosis-Wirkungsbeziehung 2102 EP/DX-10

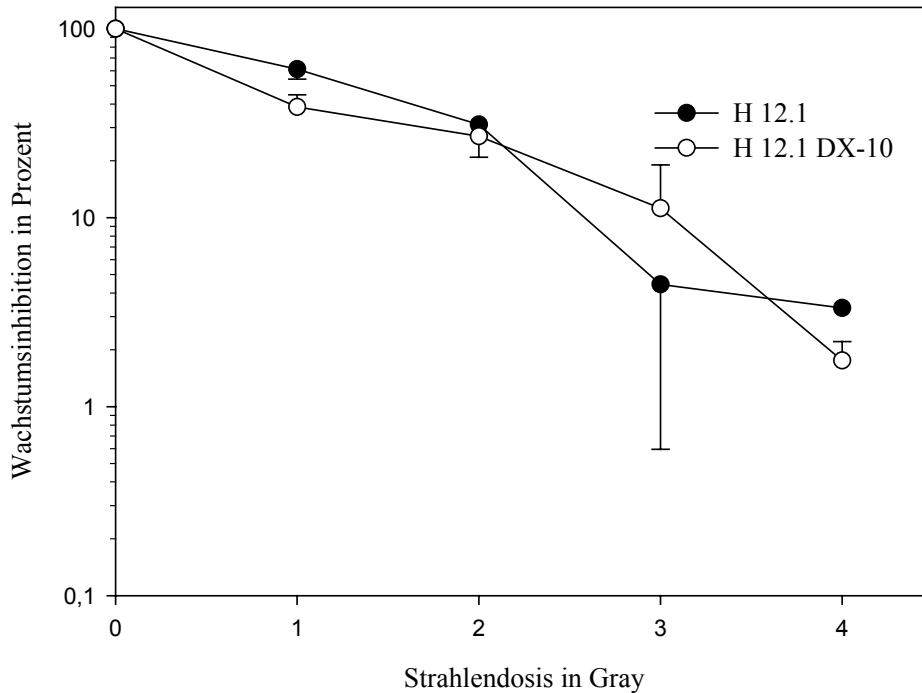


Abbildung 4.2: Dosis-Wirkungsbeziehung H 12.1/DX-10

Tabelle 4.1: Vergleichsparameter des ZKB (Standardabweichung in Klammern)

Zelllinie	SF-2	D-10 in Gy	SF-1
2102 EP	0,26 (+/- 0,07)	2,8	0,55 (+/- 0,07)
2102 DX-10	0,25 (+/- 0,03)	2,8	0,35 (+/- 0,02)
H 12.1	0,31 (+/- 0,10)	2,8	0,61 (+/- 0,07)
H 12.1 DX-10	0,27 (+/- 0,026)	3,2	0,39 (+/- 0,06)

4.3 Proteinbestimmung im Western Blot

Ziel der Western Blot-Experimente war die Evaluierung des zellulären Expressionsmusters von für Cisplatinresistenz relevanten Proteinen sowie wesentlicher Proteine der Apoptosekaskade vor und nach Abschluss der sequentiellen Bestrahlung. Verglichen wurde dabei die Bandenintensität der verschiedenen Zielproteine in den korrespondierenden Zelllinien. Eine Ergebnisauflistung erfolgt in Tabelle 4.2. Relevante Änderungen zeigen die Abbildungen 4.3 a-f. In beiden Zellsystemen zeigten sich qualitativ vergleichbare Resultate. Diese wurden durch Testwiederholungen bestätigt.

Die Untersuchung der p53-Kaskade umfasste neben p53 auch die Effektorproteine p21, Bax sowie hMSH2. Bei allen genannten Elementen ließ sich eine erhöhte Expression im Vergleich zur parentalen Zelllinie darstellen. Weiterhin zeigt die Abbildung des p53-Upstreammoleküls PARP eine Erhöhung sowohl der Ausgangsform bei 116 kDa als auch des inaktiven

Spaltproduktes bei 85 kDa. Als nach Bestrahlung vor allem durch p53-Aktivierung positiv reguliertes Element wird Fas gesehen, dessen Erhöhung gleichfalls gezeigt werden konnte.

Die Untersuchungen weiterer Proteine, die in Tabelle 4.3 genannt werden, ergab keine Änderung nach Bestrahlung. Hierbei waren entweder keine Expressionen in den Zelllinien nachweisbar, oder die Basalexpression der Referenzlinie änderte sich durch die Bestrahlung nicht. Diese Ergebnisse blieben bei Variation der Konzentrationsverhältnisse in den Antikörperlösungen konstant.

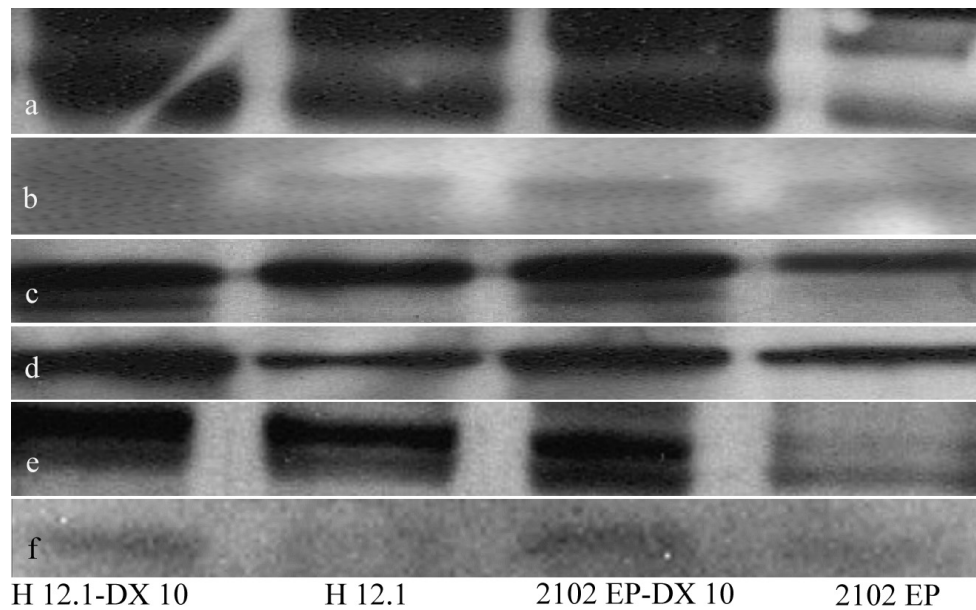


Abbildung 4.3: Expressionsprofile der Western-Blot-Experimente:

- a) PARP: Inaktives Spaltprodukt bei 85 kDa, darüber Ausgangsform bei ca. 116 kDa, Erhöhung durch Bestrahlung in 2102 DX-10 deutlicher als in H 12.1 DX-10
- b) p21: Erhöhung (schlechte Reproduktion der H 12.1 DX-10-Bande)
- c) p53: Deutliche Erhöhung der Bande in beiden DX-10-Kulturen, Erhöhung durch Bestrahlung in 2102 DX-10 deutlicher als in H 12.1 DX-10
- d) hMSH2: Expressionssteigerung bei ca. 100 kDa
- e) Fas: Expressionsprofil bei ca. 48 kDa (obere Bande), starke Unterscheidung der Grundexpressionen der Parentalkulturen, Erhöhung durch Bestrahlung in 2102 DX-10 deutlicher als in H 12.1 DX-10
- f) Bax: Antikörperbande bei 21 kDa

Tabelle 4.2: Getestete Antikörper und Reaktionsmuster

(↑): Erhöhung in DX10-Linie; (=): keine Änderung; (0): kein Signal

Antikörper	Bande	2102 EP vs. 2102 DX-10	H 12.1 vs. H 12.1 DX-10
IGFI	p21	0	0
IGFIR α	p350	0	0
EGFR	p170	0	0
TGF β R	p180	0	0
Fas	p48	↑	↑
Bcl-2	p19	0	0
Bax	p21	↑	↑
p53	p53	↑	↑
p21	p21	↑	↑
PARP	p116 & p85	↑	↑
Pgp 170	p170	0	0
c-myc	p62	=	=
hMSH2	p100	↑	↑
APAF-1	p130	0	0
c-erbB-2	p185	0	0
Kaspase 3	p37	=	=

4.4 Zytotoxizitätsmessung im SRB-Assay

Die Zytotoxizitätsmessung für Cisplatin und Oxaliplatin erfolgte mittels SRB-Assay. Die Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen wurden unter Verwendung des Computerprogramms Sigma Plot zusammengefasst und als Dosis-Wirkungskurve halblogarithmisch dargestellt. Hauptkriterium war die Änderung der Sensibilität der bestrahlten Sublinien gegenüber den verwendeten Platinderivaten. Als Vergleichsparameter galt der IC-50-Wert, der diejenige Stoffkonzentration angibt, bei der in den Zellkulturen eine Halbierung des Wachstums beobachtet wird. Die statistische Signifikanzprüfung erfolgte mittels student's t-Test, wofür das Computerprogramm SPSS verwendet wurde.

Auch hier waren in beiden Zelllinien qualitativ gleichwertige Veränderungen zu beobachten. Bei der Inkubation mit Cisplatin ergab sich eine deutlichere Sensibilisierung der H 12.1 DX-10 als der 2102 DX-10. Dies zeigte sich durch einen Vergleich der IC-50-Werte. Die Senkung des IC-50-Wertes bei 2102 DX-10 erfolgte auf 66%, bei H 12.1 DX-10 sogar auf 43% im

Vergleich zur korrespondierenden Parentallinie. Konträr verhielten sich die Kulturen im Hinblick auf die Inkubation mit Oxaliplatin. Nach der Bestrahlung waren um 50% höhere Stoffkonzentrationen zum Erreichen gleicher Toxizitäten notwendig. Die Ausprägung war auch hier in H 12.1 DX-10 deutlicher als in 2102 DX-10. Die Mittelwerte und ihre jeweiligen Standardabweichungen sowie die ermittelten p-Werte finden Darstellung in Tabelle 4.3. In den Abbildungen 4.4 bis 4.7 sind die Dosis-Wirkungskurven der durchgeführten SRB-Experimente gezeigt.

Tabelle 4.3: IC-50-Werte (mM) des SRB-Assays (Standardabweichung in Klammern) und p-Werte aus t-Test

	2102 EP	2102 DX-10	p	H 12.1	H 12.1 DX-10	p
CDDP	0,3 (+/- 0,03)	0,2 (+/- 0,02)	0,01	0,42 (+/- 0,1)	0,18 (+/- 0,01)	0,02
OXA	0,21 (+/- 0,01)	0,31 (+/- 0,04)	0,02	0,26 (+/- 0,01)	0,4 (+/- 0,02)	0

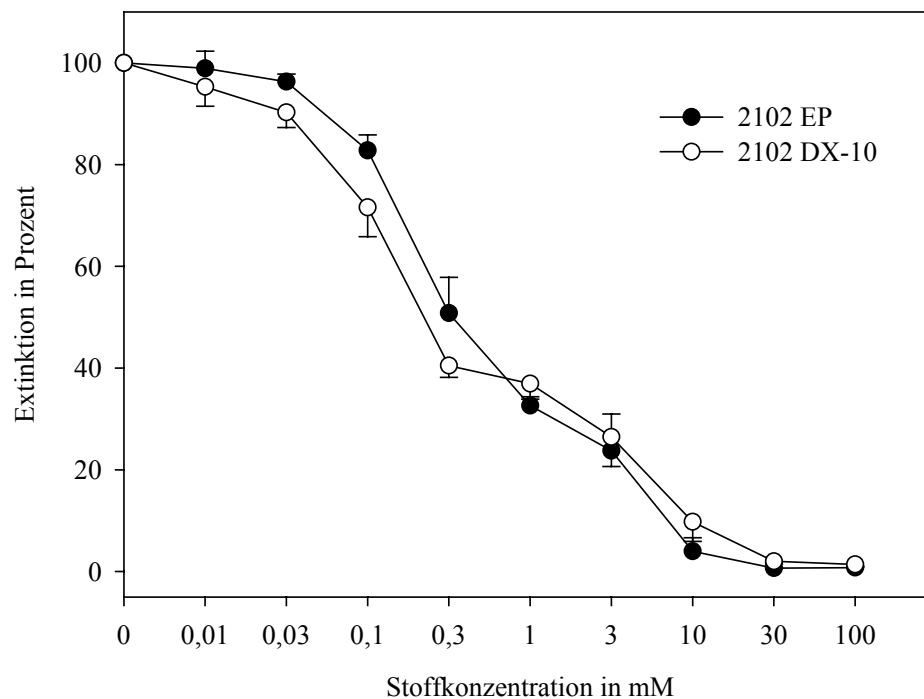


Abbildung 4.4: SRB-Assay mit Cisplatin bei 2102 EP/DX-10

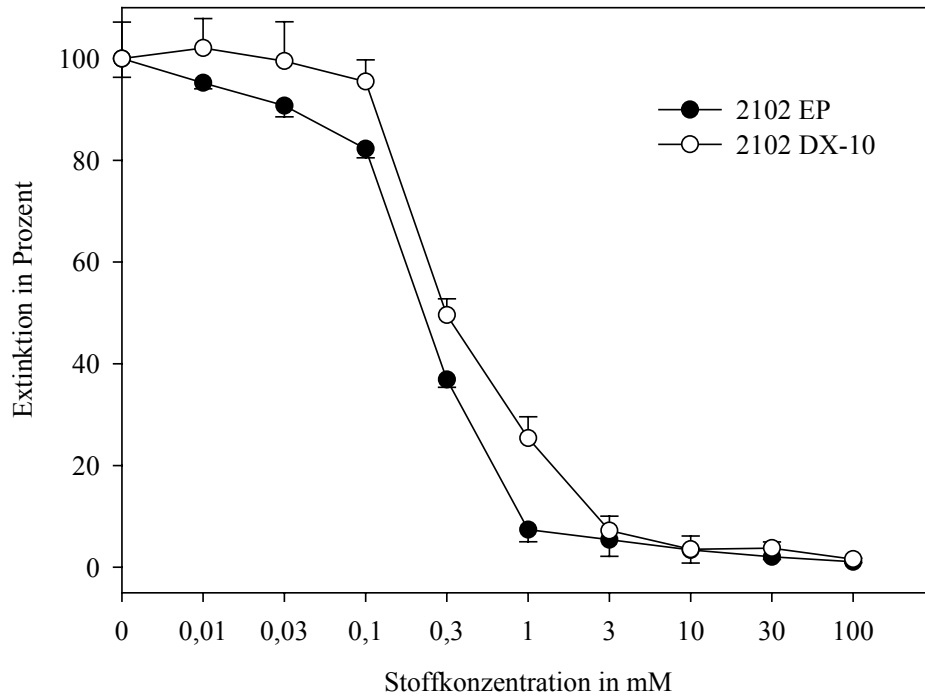


Abbildung 4.5: SRB-Assay mit Oxaliplatin bei 2102 EP/DX-10

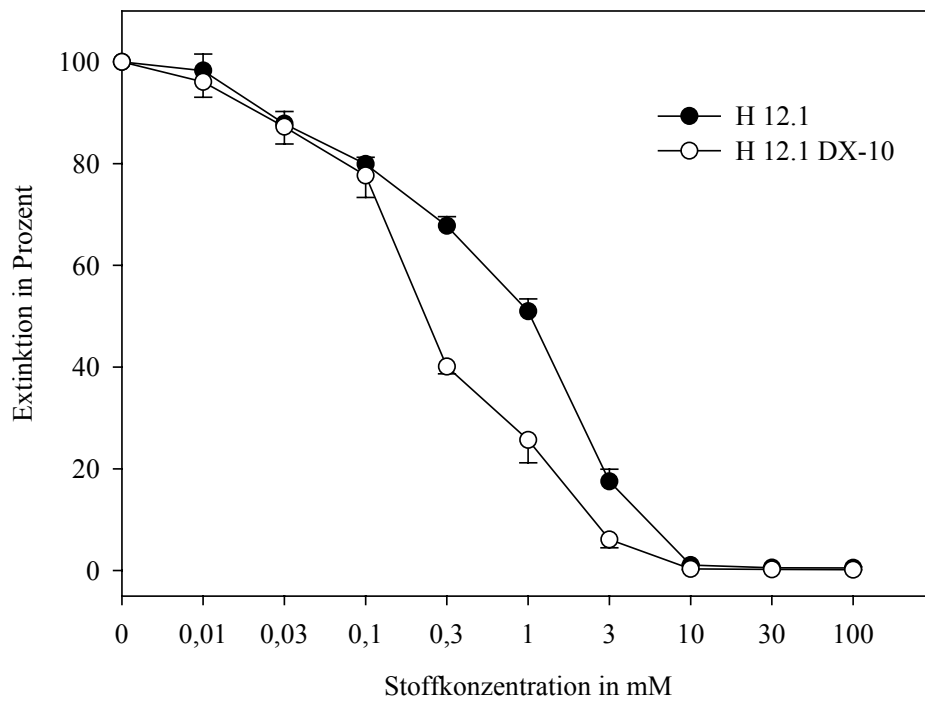


Abbildung 4.6: SRB-Assay mit Cisplatin bei H 12.1/DX-10

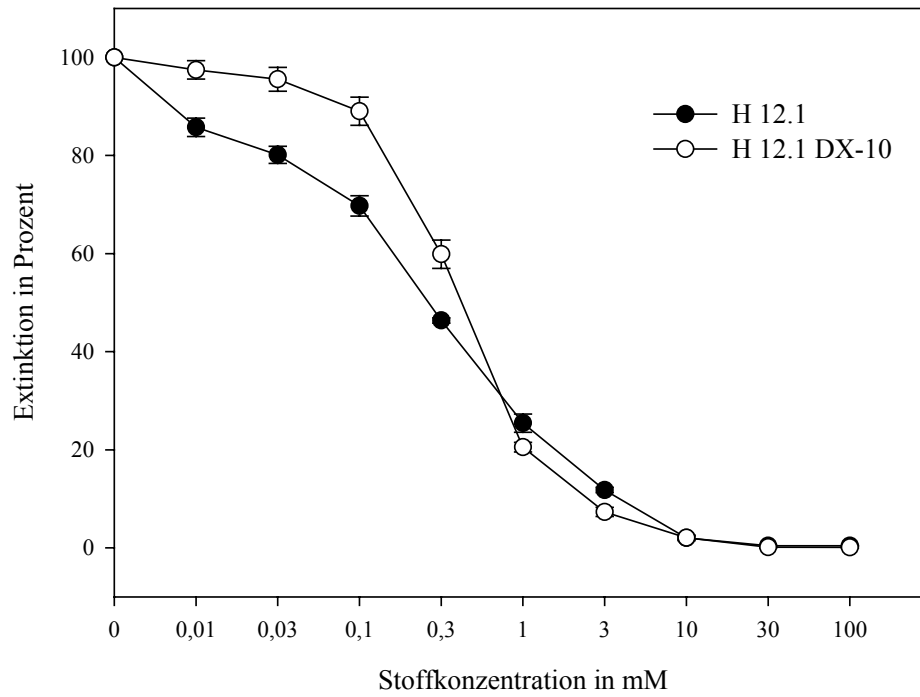


Abbildung 4.7: SRB-Assay mit Oxaliplatin bei H 12.1/DX-10

5 Diskussion

5.1 Bestrahlung und Aktivierung von p53

Ionisierende Strahlung ist stark zytotoxisch durch Effekte an diversen Stellen des Zytoskeletts und der Zellorganellen. Die wahrscheinlich entscheidenden Schädigungen stellen DNA-Doppelstrangbrüche dar. Diese Defekte werden durch verschiedene Kinasen detektiert (ATM, DNA-PK, PARP), die wiederum durch selektive Phosphorylierung p53 aktivieren¹⁰³. Je nach Schadensausmaß und zellulärer Reparaturkapazität erfolgt entweder eine Defektreparatur bzw. -toleranz oder die Apoptose (siehe Abbildung 5.1)³⁶. Der p53-Status korreliert in proliferierendem Gewebe positiv mit der Radiosensibilität, in soliden Tumoren kann dieser Zusammenhang nicht eindeutig festgestellt werden¹²². Die Beziehung zwischen p53-Status und Radiosensibilität gilt nicht nur für Tumoren, sondern konnte wiederholt auch für Normalgewebe dargestellt werden, so z. Bsp. durch Fei et al., die verschiedene Abschnitte des Intestinums sowie weitere Organe mit wt-53 und mt-p53 hinsichtlich ihrer Radiosensibilität verglichen. Es konnte eine fehlende Aktivierung der Kaspase 3 bei p53-Defekt gezeigt werden³⁶.

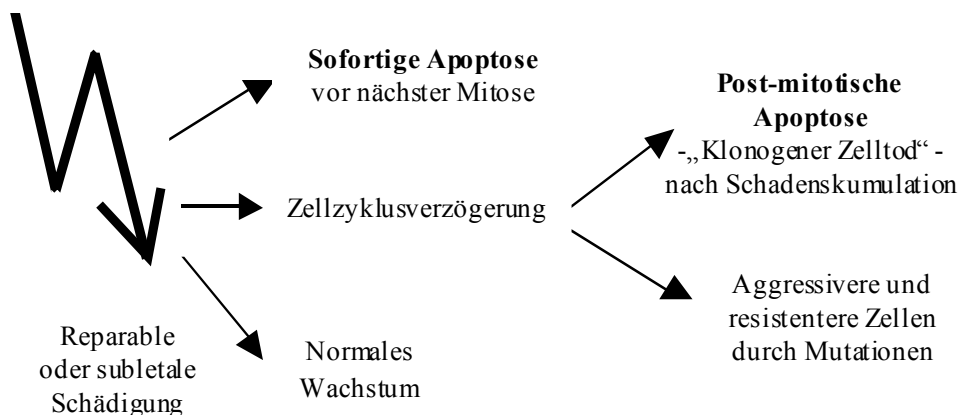


Abbildung 5.1: Reaktionswege nach ionisierender Bestrahlung

Die Tumorzelllinie 2102 EP wurde in früheren Arbeiten als ein strahlenresistentes Modell beschrieben¹³. Interessant ist dies v.a., da im Gegensatz dazu ein Großteil der Hodentumoren als äußerst strahlensensibel gilt⁶³. Burger et al. demonstrierten, dass eine Transfektion der 2102 EP mit HPV-E6, welches die p53-Transkription einschränkt, im Gegensatz zu anderen Keimzelltumoren des Hodens keine Änderung der Radiosensibilität bewirkt. Auch weitere, nach Bestrahlung aktivierbare Apoptosewege zeigten eine beeinträchtigte Aktivierbarkeit. Allerdings erfolgte in jener Arbeit keine Untersuchung der Kulturen unter dem Aspekt der Veränderung durch vorhergehende fraktionierte Bestrahlung¹³. Insgesamt scheint für die Wirksamkeit einer Bestrahlung eine funktionelle p53-Expression nicht unbedingt erforderlich

zu sein. Vielmehr wird eine Vielzahl anderer Effekte der Bestrahlung, die zu p53-unabhängiger Apoptoseinduktion führen, mit verantwortlich gemacht¹²².

Durch fraktionierte Bestrahlung konnte in dieser Arbeit keine signifikante Änderung der Empfindlichkeit der 2102 EP gegenüber ionisierender Strahlung induziert werden, wie die Vergleiche der Standardvergleichsparameter SF-2 und D-10 zeigen. Ein Unterschied ist aber bei einer Einzeldosis von 1 Gy sichtbar, bei der die DX-10-Kulturen eine tendentiell sensitivere Reaktion zeigen. Möglicherweise könnte diese Beobachtung mit der p53-Überexpression zusammenhängen. Qin beobachtete bei einer Cisplatintherapie einen erhöhten Einfluss der p53-Kaskade im Niedrigdosisbereich, der bei Erhöhung der Wirkstoffkonzentration abnahm⁹⁵. Für Radiotherapie ist eine solche Differenzierung zwar bisher nicht beschrieben worden, es findet sich interessanterweise in einer von Fei veröffentlichten Übersichtsarbeit die Feststellung, dass die Dosishöhe einen Einfluss auf die Funktionsweise des p53 ausübt³⁶. Unter der Voraussetzung einer intakten Funktionalität der in der aktuellen Arbeit vermehrt exprimierten p53-Moleküle ist die Veränderung bei der Dosis von 1 Gy ein Hinweis darauf, dass auch bei Bestrahlung die erhöhte p53-Wirkung in niedrigen Dosierungen funktionell relevant sein könnte. Der SF-2-Wert der Parentalkulturen zeigt sich gegenüber den DX-10-Linien noch geringfügig erhöht, dieser Effekt verschwindet allerdings bei steigender Dosierung. Der in den Western Blots verwendete p53-Antikörper differenziert zwar nicht zwischen wt-p53 und mt-p53, da aber die beiden parental Zellenlinien den wt-Status aufweisen^{15,121} und andere Proteine der p53-Kaskade nach der Bestrahlung ebenfalls vermehrt exprimiert wurden, kann man von einer intakten Funktion des p53 ausgehen. Insgesamt ist eine Aussage über die Veränderung bei der Dosis von 1 Gy sicherlich zurückhaltend zu treffen, da dieser Wert kein Routinevergleichsparameter dieses Assays ist.

Nach DNA-Schädigung erfolgt die Aktivierung von p53 durch Kinasen, die als Schädigungssensoren wirken. Eine wichtige ist die PARP, deren Aktivierung durch Bindung an DNA-Strangbrüche erfolgt. Dieses Enzym überträgt ADP-Ribosyl-Reste von NAD⁺ zum einen auf DNA-Bindungsproteine, die dadurch vor dem Zugriff durch Endonukleasen geschützt bleiben, wodurch die DNA-Reparatur effektiver wird, und zum anderen auf p53, welches somit aktiviert wird. Die PARP im funktionellen Zustand ist, wie auch andere Proteinkinasen, ein Hilfsmittel zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität¹¹⁵. Experimentell konnte eine positive Korrelation zwischen PARP-Aktivierung nach Bestrahlung und nachfolgendem Zyklusstopp durch p53-Aktivität festgestellt werden. Wieler et al. zeigten, dass unter selektiver Blockade der DNA-Interaktionsdomäne und daraus

entstehender Inaktivierung der PARP nach Bestrahlung eine mangelhafte Expression von p53, p21 und mdm-2 erfolgte¹²⁶. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Expressionssteigerung der funktionellen PARP kann somit als ein möglicher Initiator der p53-Aktivierung gesehen werden. Möglicherweise stellt der Synergismus aus PARP und p53 im Niedrigdosisbereich auch einen Grund für die tendenzielle Sensibilisierung bei 1 Gy dar. Bei Dosissteigerung gleichen sich die Überlebenskurven an, die Proteinveränderungen würden zunehmend an Einfluss verlieren. Eventuell sind dann die extranukleären Veränderungen der Bestrahlung für die Wirkung entscheidend, wie z.B. direkte Ionisierungen in der zellulären und mitochondrialen Membran mit Zusammenbruch des Membranpotenzials⁶⁶.

In den Western Blots konnte neben der aktiven auch die inaktive Form der PARP nachgewiesen werden, die ein Indikator für eine abgelaufene Apoptose ist⁶⁸. Die Effektor-kaspasen 3 und 7 spalten das Molekül an einem spezifischen DEVD-Motiv in unwirksame Teilmoleküle. Dadurch wird der Angriff auf die DNA erleichtert und genügend ATP zur Apoptose freigegeben^{112,115}. Das Level der Kaspase 3 zeigte sich in dieser Arbeit nach Bestrahlung unverändert, das dargestellte PARP-Spaltprodukt von 85 kDa scheint das Ergebnis der Aktivität der Kaspasen zu sein und deutet auf einen intakten Apoptoseapparat der hier verwendeten Zellkulturen hin.

Die Zelllinien H 12.1 und H 12.1-DX10 reagierten in diesen Experimenten qualitativ wie die 2102 EP und deren DX10-Sublinie. Anhand des schulterförmigen Kurvenverlaufes in den vorliegenden Experimenten kann man sehen, dass auch hier trotz wt-p53 eine relative Strahlenresistenz vorliegt. Diese Eigenschaft wurde durch die Bestrahlung nicht verändert, und auch bei 1 Gy ist die o.g. Senke zu sehen.

Der Zelltod nach Bestrahlung erfolgt u.a. durch die Apoptose. Voraussetzung dafür ist die Integrität der DNA-Schädigungssensoren und der Apoptoseeffektoren. Die wichtigste Verknüpfungsstelle scheint das p53 zu sein, welches auf mehreren Wegen aktiviert wird und sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Apoptosekaskade zu initiieren vermag. Diese Funktion vermittelt p53 entweder als Transkriptionsfaktor oder transkriptionsunabhängig³⁶. Eines der bekanntesten Beispiele für den Ausfall sensorischer Kinasen ist die Phakomatose Ataxia teleangiectasia, bei der u.a. die ATM-Kinasen ausfallen. Solche Zellen sind radioresistent, bei Bestrahlung persistieren defekte Zellen, die sich zu Hauttumoren und Teleangiektasien entwickeln können. Experimentell konnte nach Bestrahlung eine Apoptosehemmung durch Überexpression von IAP mit Hemmung der Kaspasen 3 und 9¹³³ sowie mittels Überexpression von Bcl-2 und Hemmung von APAF-1 in Lymphozyten gezeigt

werden⁸⁵. Die in der hier vorliegenden Arbeit kultivierten DX-10-Zellen zeigten eine unveränderte Strahlenempfindlichkeit im Vergleich zu den Parentalkulturen. Die in den DX-10 als erhöht exprimiert nachgewiesenen Bestandteile der p53-Kaskade, p21 und Bax, zeugen von deren Aktivierung durch die Bestrahlung. Es sind daher sowohl die Sensoren als auch die Effektoren primär als funktionell intakt anzunehmen, jedoch vermögen sie offensichtlich nicht, trotz ihrer Überexpression die Sensibilität der DX-10-Kulturen gegenüber ionisierender Strahlung zu erhöhen. Die Funktionalität des Apoptoseapparates und die Induktion der Apoptose kann allerdings aus diesen Experimenten allein nicht definitiv gezeigt werden.

5.2 Chemosensibilität nach Bestrahlung

Erkenntnisse über modifizierte Wirkungen antineoplastischer Substanzen nach vorheriger Bestrahlung konnten in der Vergangenheit v.a. an Zellkulturen gewonnen werden. Mehrfach wurden dabei Resistenzen sowohl durch Einzeldosen, als auch durch fraktionierte Bestrahlung induziert, u.a. in Ovarialtumoren^{26,33,48}, Lungentumoren⁷⁶ sowie ebenfalls in einer Testistumorlinie⁴⁹. Mehrfach konnten bis heute Überexpressionen verschiedener ABC-Transporter wie MDR-1, MRP, c-MOAT und LRP gezeigt und mit Cisplatinresistenz in Verbindung gebracht werden. In dieser Studie konnte MDR-1 nicht nachgewiesen werden, obwohl die Gesamtdosis von 40 Gy im Bereich der Dosen der genannten Publikationen liegt. Durch Bestrahlung erzeugte Chemoresistenzen gegen Oxaliplatin wurden bisher nicht beschrieben.

Eine Sensibilisierung gegenüber Cisplatin nach Bestrahlung *in vitro* ist in der zugänglichen Literatur bislang nur einmal beschrieben. 1988 publizierten Hill et al. einen auf 50% verringerten IC-50-Wert nach fraktionierter Bestrahlung in Blasen Tumoren (8x6 Gy), im Epithelkarzinom der Zunge (11x ohne Dosisangabe) und in Lymphoblasten (10x2 Gy). Eine Erklärung dafür wurde in der Arbeit jedoch nicht gefunden⁴⁹. Die dabei beschriebenen Sensibilisierungen liegen mit bis zu 75% im Bereich der in dieser Arbeit erreichten Ergebnisse.

Eine Vielzahl von Arbeiten beschäftigte sich mit der Resistenz erzeugung *in vitro* mittels kontinuierlicher Applikation von Cisplatin oder Oxaliplatin. Als Modelle wurden u.a. Ovarialtumoren, Blasen Tumoren, Weichteiltumoren und Keimzelltumoren verwendet^{32,45,52,54,79,90,110}. Diese Ansätze führten zur Identifikation verschiedener Resistenzfaktoren (siehe Einleitung). Häufig fehlte die Oxaliplatin Kreuzresistenz in cisplatinresistenten Tumoren, nicht jedoch umgekehrt. Die Wirkung von Cisplatin in

oxaliplatinresistenten Kulturen war meist abgeschwächt. Dies führte zur Postulierung der Überlegenheit des Oxaliplatins gegenüber dem Cisplatin. Die Gründe dafür sind noch unklar²⁸. Grundsätzlich lassen sich durch sequentielle Zytostatikaexposition deutlich höhere, bis zu 30fache Resistenzgrade als durch Bestrahlung (bis zu 10fach) erzielen. Die in der durchgeführten Arbeit durch Bestrahlung induzierte Zytostatikaresistenz bzw. -sensibilisierung ist weniger deutlich ausgeprägt, aber dennoch signifikant. Es existieren weitere Arbeiten mit ebenso geringem Resistenzniveau³⁷.

Für die Cisplatinsensibilisierung können verschiedene Mechanismen diskutiert werden, wobei, wie bereits erwähnt und von Hector et al. vermutet, die Hauptunterschiede durch die MMR, in der Zellaufnahme und Inaktivierung⁴⁵ sowie auf der Ebene der Signalkette nach DNA-Adduktbildung liegen. Die hier vorliegende Arbeit ist ein weiteres Indiz für die Annahme, dass eine intakte MMR die Oxaliplatinwirkung im Gegensatz zur Cisplatinwirkung nicht beeinflusst. In murinen Fibroblasten, die einen Mangel am MMR-Initiationsmolekül hMSH2 aufwiesen, stieg durch dessen Expressionssteigerung die Apoptosefrequenz in der anschließenden zytotoxischen Behandlung mit Cisplatin an¹³². Primär cisplatinresistente Kolonkarzinome und Ovarialtumoren weisen MMR-Defekte auf^{2,37,73}. Die bis heute nicht hinreichend erklärbare außerordentliche Sensibilität von Hodentumoren gegenüber Cisplatin wird unter anderem in Zusammenhang mit einer herabgesetzten NER-Reparaturkapazität gebracht, wobei die Menge des in die DNA eingebauten Platins keine Korrelation zur Apoptoserate aufweist^{58,105}. Oxaliplatin dagegen wird durch die MMR nicht erkannt, sondern nur durch die NER aus der DNA entfernt^{98,129,131}.

Die einzige Proteinbestimmung dieser Funktionskaskaden zeigte eine Erhöhung des hMSH2. Dieser zentrale Initiator des MMR, der als Bestandteil der Schadenserkennung sowohl für den G2/M-Checkpoint als auch für die Reparatur- bzw. Apoptoseeinleitung bei verschiedenen DNA-Schädigungen im Rahmen von Chemotherapie und Bestrahlung verantwortlich ist^{7,123} und kürzlich als nach Bestrahlung vermehrt exprimiert beschrieben wurde⁵⁹, würde eine erhöhte Cisplatinsensibilität ohne gleichartige Reaktion auf Oxaliplatin durchaus erklären, reicht aber als alleiniges Argument für das erzielte Ergebnis sicherlich nicht aus. Zu vermuten ist, dass beispielsweise die NER im vorliegenden Fall keinen entscheidenden Einfluss besitzt, denn beide Stoffe werden durch dieses System gleichermaßen erkannt und entfernt^{19,100}. Eine Veränderung der NER sollte deshalb gleichartige Zellreaktionen auf Cisplatin und Oxaliplatin hervorrufen, im vorliegenden Modell sind diese jedoch konträr. Interessant ist im Hinblick darauf eine Untersuchung von

Hector et al., in der in vitro im Ovarialkarzinom Resistenzen sowohl gegenüber Cisplatin als auch Oxaliplatin erzeugt wurden. Ihre Schlussfolgerung läuft auf einen Unterschied in der MMR und in der Zellaufnahme hinaus, der NER wird kein Einfluss zugeschrieben⁴⁵. Die Tatsache, dass Cisplatin, nicht jedoch Oxaliplatin, eine Apoptose durch die MMR initiiert, kann ein Hinweis für die Bedeutung des upregulierten hMSH2 auf die erhöhte Cisplatintoxizität sein.

Sowohl für Cisplatin⁹² als auch für Bestrahlung scheint der intrinsische Apoptoseweg eine bedeutendere Rolle zu spielen als der extrinsische^{31,85,90,127}. Die intrinsische Apoptose wird nach Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials durch die Freisetzung des Cytochrom-c ausgelöst, welches sich mit APAF-1 und dATP zum „Death-Inducing Signal Complex“ (DISC) zusammenlagert. Dieser aktiviert die Kaspase 9 über eine entsprechende CARD-Domäne^{69,101}. Nach Cisplatingabe erfolgt eine Aktivierung proapoptotischer Bcl-2-Proteine⁷⁴. Eine Überexpression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine führt zur Reduktion sowohl der Cisplatinaktivität wie auch der Effektivität einer Bestrahlung in Kolonkarzinomzellen¹²⁰. Eine Übersicht zum Ablauf sowie Möglichkeiten der Beeinflussung der intrinsischen Apoptose zeigt in groben Zügen Abbildung 5.2.

Die Arbeitsgruppe um Burger sah bei der Zelllinie 2102 EP keinen Einfluss der Bcl-2-Proteine auf die Apoptoseinitiation durch Cisplatin, da keine Korrelation des Bestandes am proapoptotischen Bax mit der durch Cisplatin hervorgerufenen Apoptose festgestellt werden konnte¹¹. In den beiden hier untersuchten Zelllinien findet sich nach der Bestrahlung eine Erhöhung von Bax, nicht jedoch von Bcl-2. Diese Konstellation ist ein weiterer Hinweis auf die intakte Funktion des p53, welches als Transkriptionsfaktor die Transkription des Bax und damit die intrinsische Apoptose fördert. Das durch die Bestrahlung erhöhte Bax stünde damit in positiver Korrelation zur Sensibilität gegenüber Cisplatin, nicht jedoch gegenüber Oxaliplatin. Gourdier et al. beobachteten in oxaliplatinresistenten Tumorzellen des Kolons eine Reduktion des Bax-Spiegels mit konsekutiver Reduktion der intrinsischen Apoptose durch Kaspase 3⁴³, Arango beschreibt ebenfalls in Kolontumorzellen die intrinsische Apoptose als Hauptwirkungsweg von Oxaliplatin³. Diese Beschreibungen stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen in dieser Arbeit (Bax-Erhöhung sowie keine Veränderung der Kaspase 3), deuten vielleicht auf tumorspezifische Antworten hin und unterstreichen die Notwendigkeit der weiteren Erforschung der Apoptoseinduktion durch Oxaliplatin sowie der Resistenzmechanismen.

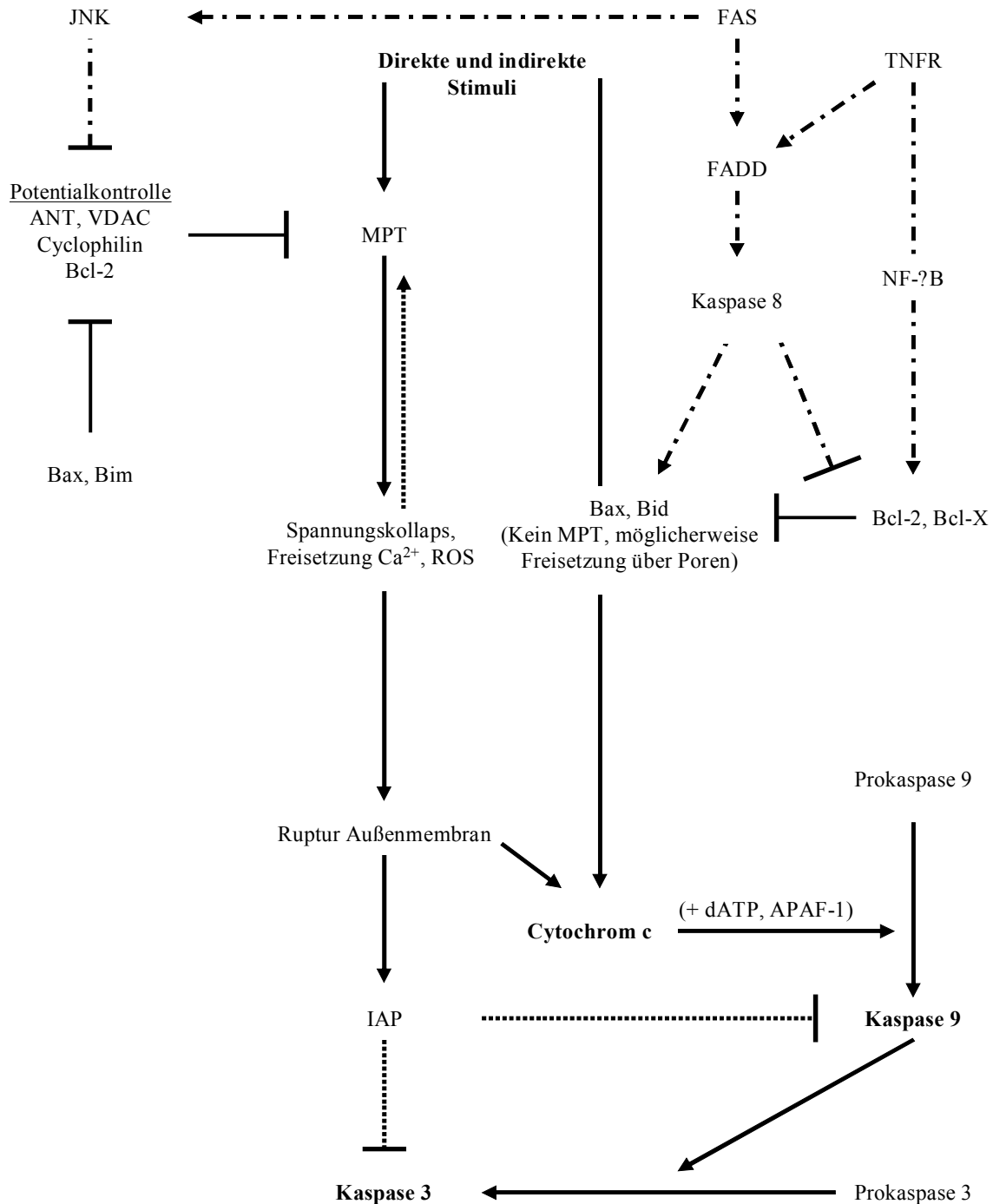


Abbildung 5.2: Schema der intrinsischen Apoptose mit Modulationsfaktoren
 Intrinsische Modulation: punktiert;
 Extrinsische Modulation: strichpunktiiert

Der Einfluss des p53 auf zelluläre Reaktionen während einer Cisplatinbehandlung wird kontrovers diskutiert. Beobachtungen einer Cisplatinresistenz bei der Inaktivierung oder Mutation des p53³⁹ stehen konträre Berichte gegenüber, nach denen hohe Cisplatin-sensibilitäten in testikulären Tumoren nicht unbedingt mit einem wt-p53 verbunden sein müssen^{11,12}.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren jedoch, dass eine Aktivierung von p53 durch Bestrahlung positiv mit Cisplatin-, hingegen nicht mit Oxaliplatinaktivität korreliert. Dies stützt Vermutungen, dass p53 im Hodentumor zwar in der Tumorgenese inaktiv ist, durch zytotoxische Therapie aber aktiviert werden kann⁹³.

Die H 12.1 gilt gegenüber anderen Hodentumorlinien als platinsensibel³². Im Vergleich der parentalen IC-50-Werte erscheint die 2102 EP sogar stärker sensibel als die H 12.1. Diese Eigenschaften beider Linien wurden durch die Bestrahlungszyklen verstärkt. Die IC-50-Unterschiede für Cisplatin sind in der Zelllinie H 12.1 DX-10 deutlicher ausgeprägt als in der 2102 DX-10 im Vergleich zur korrespondierenden Kontrolle. Bei höheren Konzentrationen erfolgt eine Angleichung an die Werte der Kontrollzelllinie. Ein Grund könnte das vermehrt exprimierte p53 sein, welches nach der bereits genannten Beobachtung von Qin im niedrigen Konzentrationsbereich des Cisplatins die Apoptose einleitet und bei Konzentrationssteigerung an Einfluss auf die Steuerung des programmierten Zelltodes verliert⁹⁵.

Die multifaktorielle Genese der Cisplatin- und Oxaliplatinresistenz ist noch nicht abschließend geklärt. Bisher scheinen überwiegend die gleichen Faktoren für Resistenzen gegenüber beiden Substanzen verantwortlich zu sein^{80,84,104}. Die Ergebnisvielfalt impliziert verschiedene Mechanismen der Zytotoxizität. Jedoch ist festzuhalten, dass Zellkulturen in vitro hinsichtlich ihres Verhaltens nicht mit den aus Patienten gewonnenen, resistenten Zellen vergleichbar sind, welche geringere Resistenzindizes und multifaktorielle Resistenzmuster aufweisen²⁸.

Die vorliegende Arbeit zeigt mit Cisplatinsensibilisierung und Oxaliplatinresistenz nach vorheriger fraktionierter Bestrahlung ein Reaktionsmuster, welches auf diese Weise bisher noch nicht beobachtet wurde. Im Gegenteil konnte durch Hill eine Cisplatinresistenz durch Bestrahlung erzeugt werden. Direkte Vergleiche zu früheren Studien können deshalb nicht aufgestellt werden. Festzuhalten ist der gleichsinnige Effekt der zytotoxischen Therapie mit Cisplatin und ionisierender Bestrahlung, der sich durch die erhöhte Expression der p53-Kaskade, des PARP und des hMSH2 erklären ließe. Konträr dazu steht die Reduktion der Sensibilität gegenüber Oxaliplatin, dessen Wirkungen anscheinend entweder gegensätzlich zum p53-Gehalt korrelieren, oder, wie in verschiedenen Übersichtsarbeiten vermutet^{28,128} und durch jüngere Beobachtungen gefestigt⁴, abseits der DNA-Addukte vermittelt werden könnten. Die vielschichtigen Mechanismen der Oxaliplatinresistenz sind noch nicht ausreichend geklärt. Teilweise scheinen aber ähnliche Pathways operativ wie für Cisplatin⁴³.

Eine abschließende Erklärung der Resistenzunterschiede in dieser Arbeit ist aufgrund der Komplexität der Resistenzbildung anhand der durchgeführten Experimente nicht möglich.

5.3 Klinische Aspekte

Die kombinierte Radiochemotherapie ist ein etabliertes Verfahren zur Optimierung einer onkologischen Behandlung. Dabei sind vier Effekte theoretisch denkbar⁴⁷:

- Räumliche Kooperation
- Effektaddition
- Protektion normalen Gewebes
- Supraaddition (Potenzierung, Sensibilisierung)

Platinderivate werden als „Sensitizer“ eingesetzt, um Radioresistenzen zu überwinden¹²⁵. Cisplatin ist dabei eine bewährte Substanz. Zur Vermeidung der erheblichen Nebenwirkungen werden vermehrt auch neuere Platinderivate eingesetzt, die die gleiche Effektivität bei verringerten unerwünschten Wirkungen aufweisen sollen. Diese Vermutungen konnten durch Tierversuche und einzelne klinische Studien bestätigt werden, allerdings war der Kombinationseffekt abhängig vom Therapieschema. Die Gabe sollte in zeitlicher Nähe zur Bestrahlung, nicht jedoch neoadjuvant erfolgen⁵³. Vermutlich behindert der durch Platinderivate bedingte Zellzyklusstopp die Wirkung nachfolgender Bestrahlung, die auf Zellproliferation angewiesen ist. Eine simultane oder leicht verzögerte Gabe hingegen könnte den klonogenen Zelltod („mitotic death“) oder die Apoptose erleichtern. Der klonogene Zelltod tritt nach DNA-Schädigung, die keine Reparatur oder sofortige Apoptose erfahren hat, durch Schadensakkumulation nach einigen Zellzyklen ein und ist die wichtigste Ursache des Zelltodes nach Bestrahlung⁶⁵. Auch für Oxaliplatin existieren einige Studien, die einen positiven Effekt durch simultane Gabe mit der Bestrahlung in vivo und in vitro vermuten lassen²¹.

Die aktuelle Arbeit zeigte, dass nach Radiotherapie in vitro eine adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin dem Oxaliplatin überlegen ist. Es ergibt sich daher die Notwendigkeit, die Interaktionen des Oxaliplatin, welches bisher v.a. in fortgeschrittenem Krankheitsstadium eingesetzt wird, mit anderen im Vorfeld eingesetzten Therapiesäulen abzustimmen und kritisch zu prüfen. Die Tatsache, dass geringe Strahlendosen bei vorbestrahlten Kulturen effektiver waren als in den Parentalkulturen, könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Hyperfraktionierung in vorbestrahlten Zellen die Effektivität einer erneuten Strahlenbehandlung erhöht.

6 Schlussfolgerung

Durch die Bestrahlung der beiden humanen Embryonalkarzinomzelllinien 2012 EP und H 12.1 konnte keine Änderung der Strahlensensibilität im Vergleich der parentalen und der bestrahlten Linie erzeugt werden, möglicherweise liegt aber eine geringe Sensibilisierung im Dosisbereich von 1 Gy vor. Dies ist zwar kein routinemäßiger Vergleichsparameter, könnte aber hinweisgebend auf einen Vorteil der Hyperfraktionierung bei vorbestrahlten Keimzelltumoren sein.

Die im Western Blot detektierten Upregulationen der Moleküle PARP, hMSH2, p53, p21, Fas und Bax in den DX-10-Linien erschließen sich logisch aus dem Bestrahlungsvorgang.

Der SRB-Assay über 24h zeigte für beide Zelllinien eine signifikant erhöhte Sensibilität gegenüber Cisplatin bei gleichzeitiger Resistenzzeugung gegenüber Oxaliplatin. Anhand der Proteinveränderungen können keine abschließenden Erklärungen für diese Konstellation gegeben werden. Im Trend ist die Cisplatinsensibilität beider Zelllinien proportional dem Status der p53-Kaskade und der MMR, für Oxaliplatin können diese Zusammenhänge nicht aufgestellt werden. Für eingehendere Untersuchungen der unterschiedlichen Zellreaktionen und Veränderungen wären Bestimmungen weiterer, bei der Platinaktivierung beteiligter Proteine oder einiger Signalwege vom DNA-Addukt zur Apoptose sowie der NER notwendig. Auch kann über die funktionelle Relevanz der vermehrt exprimierten Faktoren nichts Definitives gesagt werden.

Sollten sich diese Ergebnisse in größeren Studien jedoch bestätigen, wären genauere in vitro-Untersuchungen der Interaktionen von Bestrahlung und Platinderivaten sowie möglicherweise ein kritisches Hinterfragen bei der klinischen Anwendung von Oxaliplatin nach stattgehabter Radiatio notwendig.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit bestand aus zwei Abschnitten. Im ersten Teil wurden durch zehnfach fraktionierte Bestrahlung (Einzeldosis 4 Gy, Gesamtdosis 40 Gy) der beiden humanen Embryonalkarzinomzelllinien 2102 EP und H 12.1 korrespondierende DX-10-Zelllinien etabliert. Im zweiten Teil wurden diese DX-10-Linien mit ihren jeweiligen Parentallinien hinsichtlich einer Veränderung ihrer Radio- und Chemosensibilität gegenüber Cisplatin und Oxaliplatin sowie der Proteinexpression verschiedener relevanter Apoptoseproteine sowie Cis- und Oxaliplatinresistenzfaktoren verglichen. Die dabei verwendeten Methoden sind etablierte Experimente *in vitro*.

Eine Änderung der Radiosensibilität durch vorherige sequentielle Bestrahlung wurde im ZKB nicht beobachtet, allerdings ergaben sich Hinweise auf eine erhöhte Radiosensibilität nach Bestrahlung im Niedrigdosisbereich (Einzeldosis 1 Gy). Im SRB-Assay zeigte sich eine sehr interessante Konstellation: Beide Zelllinien erfuhren eine Sensibilitätssteigerung gegenüber Cisplatin bei gleichzeitiger Resistenzzeugung gegenüber Oxaliplatin. Eine solche Konstellation ist bislang nicht beschrieben worden. Im Western Blot ergaben sich Upregulationen von PARP, p53, p21, Bax, hMSH2 und Fas in den DX-10-Linien.

Die Sensibilisierung gegenüber Cisplatin scheint Folge einer Senkung der Apoptoseschwelle zu sein. Diese Beobachtung könnte eine mechanistische Grundlage für die bekannte Synergie zwischen Bestrahlung und Cisplatin darstellen. Für die in dieser Arbeit erstmalig beschriebenen Resistenzinduktionen gegenüber Oxaliplatin durch sequentielle Bestrahlung konnte keine mechanistische Erklärung gefunden werden. Im Falle einer Bestätigung derartiger Ergebnisse in größeren Untersuchungen wäre der klinische Einsatz von Oxaliplatin nach zuvor stattgehabter Radiatio kritisch zu erwägen.

8 **Literaturliste**

1. Aebi S, Fink D, Gordon R, Kim H, Zheng H, Fink L, Howell SB: Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 3 (1997) 1763-1767
2. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordin R, Cenni B, Zheng H, Fink D, Christen RD, Boland C, Koi M, Fishel R, Howell SB: Loss of DNA mismatch repair in aquired resistance to Cisplatin. *Cancer Res*, 56 (1996) 3087-3090
3. Arango D, Wilson A, Shi Q, Corner G, Aranes M, Nicholas C, Lesser M, Mariadason J, Augenlicht L: Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 91 (2004) 1931-1946
4. Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R, Guichard S: Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer* 39 (2004) 112-119
5. Ashcroft M, Vousden K: Regulation of p53 stability. *Oncogene*, 18 (1999) 7637-7642
6. Aszalos A, Ross D: Biochemical and clinical aspects of efflux pump related resistance to anti-cancer drugs. *Anticancer Res* 18 (1998) 2937-2944
7. Bignami M, Casorelli I, Karran P: Mismatch repair and response to DNA-damaging antitumour therapies. *Eur J Cancer* 39 (2003) 2142-2149
8. Blatt N, Glick G: Signaling pathways and effector mechanisms of pre-programmed cell death. *Bioorg med chem* 9 (2001) 1371-1384
9. Brabec V, Kasparikova J: Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resist Updat* 5 (2002) 147-161
10. Bracey T, Williams A, Paraskeva C: Inhibition of radiation-induced G2-delay potentiates cell death by apoptosis and/or the induction of giant cells in colorectal tumor cells with disrupted p53 function. *Clin Cancer Res* 3 (1997) 1371-1381
11. Burger H, Nooter K, Boersma A, Kortland C, Stoter G: Lack of correlation between Cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour lines. *Int J Cancer* 73 (1997) 592-599

12. Burger H, Nooter K, Boersma A, Kortland C, Stoter G: Expression of p53, Bcl-2 and Bax in cisplatin-induced apoptosis in testicular germ cell tumour cell lines. *Br J Cancer* 77 (1998) 1562-1567
13. Burger H, Nooter K, Boersma A, Kortland C, Van Den Berg P, Stoter G: Expression of p53, p21, Bcl-2, Bax, Bcl-X and bak in radiation-induced apoptosis in testicular germ cell tumour lines. *Int J Radiat oncol biol phys* 41 (1998) 415-424
14. Cabot M: The potential for harnessing ceramide metabolism when chemotherapy fails. *Proc Am Associat Cancer Res Suppl* 28 (2002).
15. Casper J, Schmoll HJ, Schnaidt U, Fonatsch C: Cell lines of human germinal cancer. *Int J Androl* 10 (1987) 105-113
16. Cassidy J, Misset JL: Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Semin Oncol* 29 (2002) 11-20
17. Cenni B, Aebi S, Nehme A, Christen RD: Epidermal growth factor enhances cisplatin-induced apoptosis by a caspase 3 independent pathway. *Cancer Chemother Pharmacol* 47 (2001) 397-403
18. Chaney S G, Sancar A: DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst* 88 (1996) 1346-1357
19. Chaney SG, Vaisman A: Specificity of platinum-DNA adduct repair. *J Inorg Biochem* 77 (1999) 71-81
20. Chen Z, Naito M, Mashima T, Tsuruo T: Activation of actin-cleavable interleukin 1beta-converting enzyme (ICE) family protease CPP-32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 56 (1996) 5224-5229
21. Cividalli A, Ceciarelli F, Livdi E, Altavista P, Cruciani G, Marchetti P, Danesi D: Radiosensitization by oxaliplatin in a mouse adenocarcinoma: influence of treatment schedule. *Int J Radiat oncol biol phys* 52 (2002) 1092-1098
22. Culy CR, Clemett D, Wiseman LR: Oxaliplatin. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in metastatic colorectal cancer and its potential in other malignancies. *Drugs* 60 (2000) 895-924

23. Cvitkovic E: Ongoing and unsaid on oxaliplatin: the hope. *Br J Cancer* 77 *Suppl 4* (1998) 8-11
24. D'Incalci M, Bonfanti M, Pifferi A, Mascellani E, Tagliabue G, Berger D, Fiebig H: The antitumor activity of alkylating agents is not correlated with the levels of GSH, GST and O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase of human tumour xenografts. *Eur J Cancer* 34 (1998) 1749-1755
25. Dean M, Hamon Y, Chimini G: The human ATP-binding cassette transporter superfamily. *J Lipid Res* 42 (2001) 1007-1017
26. Dempke W, Shellard S, Hosking L, Fichtinger-Schepman A, Hill B: Mechanisms associated with the expression of cisplatin resistance in a human ovarian tumor cell line following exposure to fractionated X-irradiation in vitro. *Carcinogenesis* 13 (1992) 1209-1215
27. Dempke W, Voigt W, Grothey A, Hill B, Schmoll HJ: Cisplatin and oncogenes. *Anticancer Drugs* 11 (2000) 225-236
28. Desoize B, Madoulet C: Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 42 (2002) 317-325
29. Di Francesco A, Ruggiero A, Riccardi R: Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. *CMLS* 59 (2002) 1914-1927
30. Dieckmann KP, Pichlmeier U: Epidemiologie der testikulären Keimzelltumoren. *Onkologie* 9 (2003) 943-954
31. Ding Z, Yang X, Pater A, Tang S: Resistance to apoptosis is correlated with the reduced caspase-3 activation and enhanced expression of antiapoptotic proteins in human cervical multidrug-resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 270 (2000) 415-420
32. Dunn T, Schmoll HJ, Grünwald V, Bokemeyer C, Casper J: Comparative cytotoxicity of oxaliplatin and cisplatin in non-seminomatous germ cell cancer cell lines. *Invest New Drugs* 15 (1997) 109-114

33. Eichholtz-Wirth H, Stoetzer O, Marx K: Reduced expression of the ICE-related protease CPP32 is associated with radiation-induced cisplatin resistance in HeLa cells. *Br J Cancer* 76 (1997) 1322-1327
34. Eid H, Geczi L, Magori A, Bodrogi I, Institoris E, Bak M: Drug resistance and sensitivity to germ cell testicular tumors: evaluation of clinical relevance of MDR1/Pgp, p53, and MT proteins. *Anticancer Res* 18 (1998) 3059-3064
35. Einhorn L: Testicular cancer: An oncological success story. *Clin Cancer Res* 3 (1997) 2630-2632
36. Fei P, El-Deiry W: P53 and radiation responses. *Oncogene* 22 (2003) 5774-5783
37. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, Christen RD, Howell SB: The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 56 (1996) 4881-4886
38. Funk J, Kind P: Zellzykluskontrolle und genetische Instabilität. *Hautarzt* 48 (1997) 157-165
39. Gallagher W, Cairney M, Schott B, Roninson I, Brown R: Identification of p53 genetic suppressor elements which confer resistance to cisplatin. *Oncogene* 14 (1997) 185-193
40. Giaccone G: Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* 59 *Suppl* 4 (2000) 9-17
41. Gong J, Costanzo A, Yang H, Melino G, Kaelin jr W, Levrero M, Wang JY: The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 399 (1999) 806-809
42. Gonzalez V, Fuertes M, Alonso C, Perez J: Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharm* 59 (2001) 657-663
43. Gourdier I: Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett* 529 (2002) 232-236
44. He Q, Liang A, Lippard A: Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *PNAS* 97 (2000) 5768-5772

45. Hector S, Bolanowska-Higdon W, Zdanowicz J, Hitt S, Pendyala L: In vitro studies on the mechanisms of oxaliplatin resistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 48 (2001) 398-406
46. Heidenreich A, Kuczyk M, Albers P: Molekulare Pathogenese und Prognosefaktoren des Hodentumors. *Urologe (A)* 37 (1998) 593-608
47. Hennequin C, Favaudon V: Biological basis for chemo-radiotherapy interactions. *Eur J Cancer* 38 (2002) 223-230
48. Hill B, Moran E, Etievant C, Perrin D, Masterson A, Larkin A, Whelan R: Low-dose twice-daily fractionated X-irradiation of ovarian tumor cells in vitro generates drug-resistant cells overexpressing two multidrug resistance-associated proteins, P-glycoprotein and MRP1. *Anticancer Drugs* 11 (2000) 193-200
49. Hill B, Whelan R, Hosking L, Shellard S, Bedford P, Lock R: Interactions between antitumor drugs and radiation in mammalian tumor cell lines: differential drug responses and mechanisms of resistance following fractionated x-irradiation or continuous drug exposure in vitro. *NCI Monographs* 6 (1988) 177-181
50. Holland J, Glidewell O, Cooper R: Adverse effect of radiotherapy on adjuvant chemotherapy of breast cancer. *Surg Gynecol Obstet* 150 (1980) 817-821
51. Jones R, Vasey P: New directions in testicular cancer; molecular determinants of oncogenesis and treatment success. *Eur J Cancer* 39 (2003) 147-156
52. Jordan P, Carmo-Fonseca M: Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *CMLS* 57 (2000) 1229-1235
53. Joschko M, Webster L, Bishop J, Groves J, Yuen K, Olver I, Narayan K, Ball D: Radioenhancement by cisplatin with accelerated fractionated radiotherapy in a human tumour xenograft. *Cancer Chemother Pharmacol* 40 (1997) 534-539
54. Kelland LR: Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* 59 Suppl 4 (2000) 1-8
55. Kollmannsberger C, Kuczyk M, Mayer F, Hartmann JT, Kanz L, Bokemeyer C: Late toxicity following curative treatment of testicular cancer. *Semin Surg Oncol* 17 (1999) 275-281

56. Kollmannsberger C, Rick O, Derigs HG, Schleucher N, Schoffski P, Beyer J, Schoch R, Sayer HG, Gerl A, Kuczyk M, Spott C, Kanz L, Bokemeyer C: Activity of oxaliplatin in patients with relapsed or cisplatin-refractory germ cell cancer: a study of the german testicular cancer study group. *J Clin Oncol* 20 (2002) 2031-2037
57. Kool M, de Haas M, Scheffer G: Analysis of the expression of cMOAT (MRP1), MRP2-5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57 (1997) 3537-3547
58. Köberle B, Grimaldi K, Sunter A, Hartley J, Kelland L, Masters J: DNA repair capacity and CPPD sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer* 70 (1997) 551-555
59. Köberle B, Masters J, Hartley J, Wood R: Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol* 9 (1999) 273-276
60. Krishna R, Mayer L: MDR in cancer; mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Scien* 11 (2000) 265-283
61. Lage H, Christmann M, Kern M, Dietel M, Pick M, Kaina B, Schadendorf D: Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase and N-methylpurine-DNA-glycosylase in melanoma cells with aquired drug resistance. *Int J Cancer* 80 (1999) 744-750
62. Lakin ND, Jackson SP: Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18 (1999) 7644-7655
63. Langley RE, Palayoor ST, Coleman CN, Bump EA: Radiation-induced apoptosis in F9 teratocarcinoma cells. *Int J Radiat Biol* 65 (1994) 605-610
64. Lebowitz D, Canetta R: Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 34 (1998) 1522-1534
65. Li L, Story M, Legerski R: Cellular responses to ionizing radiation damage. *Int J Radiat oncol biol phys* 49 (2001) 1157-1162
66. Little J: Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21 (2000) 397-404

67. Liu Y, Han T, Giuliano A, Cabot M: Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB J* 15 (2001) 719-730
68. Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, Herceg Z, Wang Z, Schulze-Osthoff K: Activation and caspase mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell* 13 (2002) 978-988
69. Lundberg A, Weinberg R: Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer*, 35 (1999) 1886-1894
70. Lutzker S, Barnard N: Testicular germ cell tumors: molecular understanding and clinical implications. *Mol Med Today*, *September* (1998) 404-411
71. Lutzker S, Levine A: A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated either by DNA damage or cellular differentiation. *Nat Med* 2 (1996) 804-810
72. Lutzker S, Mathew R, Taller D: A dose-response relationship for sensitivity to DNA damage in isogenic teratocarcinoma cells. *Oncogene* 20 (2004) 2982-2986
73. Mamenta E, Poma E, Kaufmann W, Delmastro D, Grady H, Chaney SG: Enhanced replicative bypass of platinum-DNA adducts in CDDP-resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* 54 (1994) 3500-3505
74. Mandic A, Viktorsson K, Molin M, Akusjärvi G, Eguchi H, Hayashi S, Toi A, Hansson J, Linder S, Shoshan M: Cisplatin induces the proapoptotic conformation of Bak in a MEKK1-dependent manner. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 3684-3691
75. Mano Y, Kikuchi Y, Yamanato K, Kita T, Hirata J, Tode T, Ishii K, Nagata I: Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 35 (1999) 1214-1219
76. Mattern J, Efferth T, Volm M: Overexpression of P-gp in human lung carcinoma xenografts after fractionated irradiation in vivo. *Radiat Res* 127 (1991) 335-338
77. Mayer F, Gillis A, Dinjens W: Microsatellite instability of germ cell tumours is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* 62 (2002) 2758-2760

78. Mayer F, Kollmannsberger C, Bokemeyer C: Behandlung von Patienten mit cisplatinrefraktären Tumoren. *Onkologe* 9 (2003) 1004-1008
79. Mishima M, Samimi G, Kondo A, Lin X, Howell SB. The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance. *Eur J Cancer* 38 (2002) 1405-1412
80. Moll U, Erster S, Zaika A: p53, p63 and p73 - solos, alliances and feuds among family members. *Biochim Biophys Acta* 1552 (2001) 47-59
81. Moroni M, Veronese S, Schiavo R: Epidermal growth factor receptor expression and activation in nonseminomatous germ cell tumours. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 2770-2775
82. Müller T, Simon H, Voigt W, Fruehauf A, Schmoll HJ: Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. *Cancer Res* 63 (2003) 513-521
83. Nehme A, Baskaran R, Nebel S, Fink D, Howell SB, Wang JY, Christen R: Induction of JNK and c-Abl signaling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells. *Br J Cancer* 79 (1999) 1104-1110
84. Nehme A, Rajasekaran B, Aebi S, Fink D, Nebel S, Cenni B, Wang JY, Howell SB, Christen RD: Differential induction of JNK and c-Abl in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. *Cancer Res* 57 (1997) 3253-3257
85. Newton K, Strasser A: Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy. *J Exp Med* 191 (2000) 195-200
86. Nilsen H, Krokan H: Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis* 22 (2001) 987-998
87. Nooter K, Stoter G: Molecular mechanisms of multi drug resistance in cancer chemotherapy. *Path Res Pract* 192 (1996) 768-780
88. O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW: Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs* 59 Suppl 4 (2000) 19-27
89. Oliver RT: Testicular cancer. *Curr Opin Oncol* 13 (2001) 191-198

90. Perez R: Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer* 34 (1998) 1535-1542
91. Pestell K, Hobbs S, Titley J, Kelland L, Waltin M: Effects of p53 Status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line. *Mol Pharm* 57 (2000) 503-511
92. Piccart MJ, Lamb H, Vermorken JB: Current and future potential roles of the platinum drugs in the treatment of ovarian cancer. *Ann Oncol* 12 (2001) 1195-1203
93. Pil PM, Lippard SJ: Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *Science* 256 (1992) 234-237
94. Pruschy M, Rocha S, Zaugg K, Tenzer A, Hess C, Fisher D, Glanzmann C, Bodis S: Key targets for the execution of radiation-induced tumor cell apoptosis: the role of p53 and caspases. *Int J Radiat oncol biol phys* 49 (2001) 561-567
95. Qin L, Ng I: Induction of apoptosis by cisplatin and its effects on cell cycle related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells. *Cancer Lett* 175 (2002) 27-38
96. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed J, Perucho M: Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275 (1997) 967-969
97. Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E: Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 9 (1998) 1053-1071
98. Raymond E, Faivre S, Chaney SG, Woynarowski JM, Cvitkovic E: Cellular and molecular pharmacology of Oxaliplatin. *Mol Cancer Therap* 1 (2002) 227-235
99. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG: Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 25 (1998) 4-12
100. Reardon J, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A: Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin and bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum (IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res* 59 (1999) 3968-3971
101. Reed J: Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157 (2000) 1415-1430

102. Reles A, Wen W, Schmider A, Gee C, Runnebaum I, Kilian U, Jones L, El-Naggar A, Minguillon C, Schönborn I, Reich O, Kreienberg R, Lichtenegger W, Press M: Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 2984-2997
103. Ross G: Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 6 (1999) 41-44
104. Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer A, Rochdi M, Tomioka M, Goodman M, Howell SB: Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 4661-4669
105. Sark M, Timmer-Bosscha H, Meijer C, Uges D, Sluiter W, Peters W, Mulder N, Devries E: Cellular basis for differential sensitivity to CDDP in human germ cell tumour and colon carcinoma lines. *Br J Cancer* 71 (1995) 684-690
106. Scheff E, Briggs J, Howell SB: Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 56 (1999) 633-643
107. Schmoll HJ, Cassidy J: Integrating oxaliplatin into the management of colorectal cancer. *Oncologist* 6 Suppl 4 (2001) 24-28
108. Schmoll HJ, Souchon R, Krege S, Albers P, Beyer J, Kollmannsberger C, Fossa S, Skakkebaek N, de Wit E, Fizazi K, Droz J, Pizzocaro G, Dougaard G, de Mulder P, Horwich A, Oliver RT, Huddart R, Rosti G, Paz Ares L European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG). *Ann Oncol* 15 (2004) 1377-1399
109. Sharp S, O'Neill C, Rogers P, Boxall F, Kelland LR. Retention of activity by the new generation platinum agent AMD0473 in four human tumour cell lines possessing acquired resistance to oxaliplatin. *Eur J Cancer* 38 (2002) 2309-2315
110. Siegsmond M, Marx C, Seeman O, Schummer B, Steidle A, Toktomambetova L, Köhrmann K, Rassweiler J, Alken P: Cisplatin-resistant bladder carcinoma cells: enhanced expression of metallothioneins. *Urol Res* 27 (1999) 157-163

111. Skehan P: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82 (1990) 1107-1112
112. Soldatenkov V, Smulson M: Poly(ADP-ribose) polymerase in DNA damage-response pathway: implications for radiation oncology. *Int J Cancer (Radiat Oncol Invest)* 90 (2000) 59-67
113. Souchon R, Krege S, Schmoll HJ, Albers P, Beyer J, Bokemeyer C, Claßen J, Dieckmann K, Hartmann M, Heidenreich A, Höftl W, Kliesch S, Köhrmann K, Kuczyk M, Schmidberger H, Weinknecht S, Winter E, Wittekind C, Bamberg C: Interdisziplinärer Konsensus zur Diagnostik und Therapie von Hodentumoren. *Strahlenther Onkol* 176 (2000) 388-405
114. Soulie P, Garrino C, Bensmaine MA, Bekradda M, Brain E, Di Palma M, Goupil A, Misset JL, Cvitkovic E: Antitumoral activity of oxaliplatin/cisplatin-based combination therapy in cisplatin-refractory germ cell cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 125 (1999) 707-711
115. Tong W, Cortes U, Wang Z: Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1552 (2001) 27-37
116. Vaisman A, Masutani C, Hanaoka F, Chaney SG: Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta. *Biochemistry*, 39 (2000) 4575-4580
117. Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, Hamilton TC, Chaney SG: The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum- DNA adducts. *Cancer Res* 58 (1998) 3579-3585
118. Valerie K, Dritschilo A, McKenna G, Schmidt-Ullrich R: Novel molecular targets for tumor radiosensitization. *Int J Cancer (Radiat Oncol Invest)* 90 (2000) 51-58
119. Volm M: MDR and its reversal. *Anticancer Res* 18 (1998) 2905-2918
120. Wachek V: Bcl-x1 antisense oligonucleotides radiosensitise colon cancer cells. *Br J Cancer* 89 (2003) 1352-1357

121. Wang N, Perkins K, Bronson D, Fraley E: Cytogenetic evidence for premeiotic transformation of human testicular cancers. *Cancer Res* 41 (1981) 2135-2140
122. Weber K, Wenz F: p53, apoptosis and radiosensitivity - experimental and clinical data. *Onkologie* 25 (2002) 136-141
123. Wei Q, Frazier M, Levin B: DNA repair: a double-edged sword. *J Natl Cancer Inst* 92 (2000) 440-441
124. Welters M, Fichtinger-Schepman A, Baan R, Flens M, Scheper R, Brakhuis B: Role of glutathione, glutathione S-transferases and multidrug resistance-related proteins in cisplatin sensitivity of head and neck cancer cell lines. *Br J Cancer* 77 (1998) 556-561
125. Wenz F, Tiefenbacher U, Willeke F, Weber K: Auf der Suche nach der therapeutischen Breite in der Radioonkologie. *Onkologie* 24(suppl 5) (2001) 51-55
126. Wieler S, Gagne J, Vaziri H, Poirier G, Benchimol S: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a positive regulator of the p53-mediated G1-arrest response following ionizing radiation. *J Biol Chem* 278/21 (2003) 18914-18921
127. Wolf BB, Schuler M, Li W, Eggers-Sedlet B, Lee W, Tayler P, Fitzgerald P, Mills G, Grenn D: Defective cytochrome c-dependent caspase activation in ovarian cancer cell lines due to diminished or absent APAF-1 activity. *J Biol Chem* 276/36 (2001) 34244-34251
128. Woynarowska B, Woynarowski JM: Preferential targeting of apoptosis in tumor versus normal cells. *Biochim Biophys Acta* 1587 (2002) 309-317
129. Woynarowski JM, Faivre S, Herzig M, Arnett B, Chapman W, Trevino A, Raymond E, Chaney SG, Vaisman A, Varchenko M, Juniewicz P: Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol Pharmacol* 58 (2000) 920-927
130. Yoshida K, Komatsu K, Wang H, Kufe D: c-Abl tyrosine kinase regulates the human Rad9 checkpoint protein in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 22 (2002) 3292-3300
131. Zdraveski ZZ, Mello JA, Farinelli CK, Essigmann JM, Marinus MG: MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA. *J Biol Chem* 277 (2002) 1255-1260

132. Zhang H, Richards B, Wilson T, Lloyd M, Cranston A, Thornburn A, Fishel R, Meuth M: Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1. *Cancer Res* 59 (1999) 3021-3027
133. Zhang Y, Dimtchev A, Dritschilo A, Jung M: Ionizing radiation-induced apoptosis in ataxia telangiectasia fibroblasts: roles of caspase-9 and c-IAP-1. *J Biol Chem* 276/31 (2001) 28842-28848

9 **Thesen der Dissertation**

1. Durch Einführung von Cisplatin in die Therapie von männlichen Keimzelltumoren konnte eine Heilungsrate von über 90% erreicht werden.
2. Die Apoptose nach Zellschädigung ist ein physiologischer, aktiver, energieabhängiger Vorgang als Summe verschiedener Pathways. Eine Auslösung ist auch durch viele antineoplastische Substanzen möglich. Platinderivate wirken wahrscheinlich vor allem über den intrinsischen Apoptoseweg.
3. Radiotherapie kann Apoptose auslösen. Eine erhöhte therapeutische Effektivität wird durch kombinierte Radiochemotherapie erreicht, Platinderivate gelten als potente Radiosensitizer.
4. Resistenzen und verschiedene Nebenwirkungen bei Cisplatintherapie führten zur Entwicklung neuer Generationen von Platinderivaten. Vor allem Oxaliplatin gilt als potentes Mittel zur Überwindung einer Cisplatinresistenz in verschiedenen Tumoren.
5. Die Entwicklung von Zytostatikaresistenz ist wesentlich für ein Behandlungsversagen.
6. In vitro-Zellkulturversuche eignen sich sehr gut zur Wirkungstestung von antineoplastischen Substanzen und Bestrahlung.
7. Zytostatikaresistenzen können in vitro durch Einsatz klinisch etablierter Behandlungsregime induziert werden, die jeweiligen Dosierungen liegen dabei meist noch im klinisch relevanten Bereich. Für die Erforschung von Platinderivaten sind Keimzelltumoren aufgrund ihrer intrinsischen Sensibilität besonders geeignet.
8. Eine signifikante Änderung der Radiosensibilität bei hohen Strahlendosierungen durch vorangegangene Bestrahlung ist in den Tumorzelllinien 2102 EP und H 12.1 sowie deren DX-10-Sublinien nicht erreicht worden.
9. Im Niedrigdosisbereich (Einzeldosis 1 Gy) scheinen die DX-10-Sublinien sensitiver auf die wiederholte Bestrahlung zu reagieren. Dies zeigt möglicherweise die Überlegenheit kleinerer Bestrahlungsdosierungen nach vorangegangenen Bestrahlungszyklen im männlichen Keimzelltumor.

10. Die Überexpression des Moleküls PARP nach Bestrahlung spricht für funktionierende DNA-Damage-response-pathways.
11. Durch insgesamt zehnfache Bestrahlung wurden mit p53, p21 und Bax verschiedene Proteine der p53-Kaskade überexprimiert.
12. Durch die fraktionierte Bestrahlung konnte in beiden Zelllinien eine Sensibilisierung gegenüber Cisplatin bei gleichzeitiger Resistenzentwicklung gegenüber Oxaliplatin erzeugt werden.
13. Die vermehrt exprimierte, intakte p53-Kaskade sowie das erhöhte hMSH2 als Bestandteil des MMR-Systems könnte ursächlich für die erhöhte zelluläre Sensibilität gegenüber Cisplatin sein.
14. Eine Klärung der molekularen Mechanismen für die aufgetretene und hier erstmalig beschriebene Oxaliplatinresistenz nach Radiatio ist durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht möglich.
15. Die multifaktorielle Genese der Platinresistenzen wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstrichen.
16. Im Falle einer Bestätigung derartiger Ergebnisse in größeren Untersuchungen wäre der klinische Einsatz von Oxaliplatin nach zuvor stattgehabter Radiatio kritisch zu erwägen.

Lebenslauf

Name: Stephan Eisenmann

Geburtsdatum: 14.11.1977 in Halle (Saale)

Mutter: Gudrun Eisenmann, geb. Wittenbecher

Vater: Dr. paed. Siegfried Eisenmann

Schulbildung

1984-1989: POS Ernst-Thälmann, Halle-Neustadt

1989-1991: POS August-Hermann-Francke, Halle (Saale)

1991-1996: Latina August-Hermann-Francke, Landesgymnasium, Halle (Saale)

1996: Abitur

Studium

1996-1997: Zivildienst

1997-2004: Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2000-2002: Durchführung der praktischen Arbeiten für die Dissertation

2002: Auslandssemester an der Università dello Studio di Parma, Italien

2000-2004: Stipendiat der Konrad-Adenauer-Stiftung

1999: Physikum an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2000: 1. Staatsexamen an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2003: 2. Staatsexamen an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2004: 3. Staatsexamen an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

27.12.2004: Erhalt der Approbation

Halle (Saale), den

Stephan Eisenmann

Publikation der Ergebnisse

Abstract

Resistance to oxaliplatin but collateral sensitivity to cisplatin in the human teratocarcinoma cell lines in vitro after fractionated X-irradiation.

Eisenmann S., Simon H., Müller T., Schmoll H-J., Dempke W., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Vol 43, Mar 2002

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Auswirkungen fraktionierter Bestrahlung auf Radio- und Chemosensibilität der humanen testikulären Karzinomzelllinien 2102 EP und H 12.1“ in der Universitätsklinik für Innere Medizin IV unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. habil. Hans-Joachim Schmoll und mit der Unterstützung durch die Herren PD Dr. med. Wolfram Dempke, Dipl. Bioch. Thomas Müller und Dr. med. Wieland Voigt ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ich reichte bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion ein und legte weder diese noch eine andere Arbeit als Dissertation vor.

Halle (Saale), den

Stephan Eisenmann

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. H.-J. Schmoll für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für die Betreuung und stete Unterstützung.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. W. Voigt, Herrn T. Müller, Frau H. Simon und Herrn PD Dr. W. Dempke für die methodische Einarbeitung und konstruktiv-kritische Diskussionen sowie der Strahlenklinik der Medizinischen Fakultät der Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. habil. J. Dunst) für die Möglichkeit der Zellbestrahlung.

Ein herzlicher Dank gilt Christina, Gerald sowie meinem Vater für ihre wertvollen unabhängigen Meinungen.

Besonderer Dank richtet sich an meine Familie, die mir das sorgenfreie Studieren durch immerwährende Unterstützung ermöglichte.