

**Aus der Frauenklinik und Poliklinik**

**der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Johannes Dietl**

**Lobaplatin als Agens zur Induktion von Zelltod in triple-negativen  
Brustkrebszelllinien**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Theresa Maria Christina Martens**

**aus Hamburg**

**Würzburg, August 2011**

**Referent: Prof. Dr. med. Arnd Hönig**

**Koreferent: Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou**

**Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2012**

**Die Promovendin ist Ärztin**

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Mammakarzinom	1
1.2	Das triplenegative Mammakarzinom	2
1.3	Lobaplatin	4
1.4	Zielsetzung	6
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>7</b>
2.1.1	Zelllinien	7
2.1.2	Antikörper und Plasmide	7
2.1.3	Chemotherapeutika und Inhibitoren	7
2.1.4	Geräte	8
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	9
2.1.6	Chemikalien und Enzyme	10
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>13</b>
2.2.1	Zellkultur	13
2.2.2	Kristallviolett-Assay	14
2.2.3	Reporter-gen-Assay	14
2.2.4	Herstellung von Proteinlysaten, SDS-Gel-Elektrophorese und Western Blot	16
2.2.5	Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus	19
2.2.6	DNA-Isolierung, Polymerase-Kettenreaktion und DNA- Sequenzierung	20
2.2.7	Verwendung der Chemotherapeutika	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1	Charakterisierung der Zelllinien HCC1806, HCC1937 und MCF7	22
3.1.1	Prüfung des p53-Status	22
3.1.2	Nachweis einer spezifischen Mutation bei HCC1937	23

3.2	Zytotoxische Wirkung von Lobaplatin	23
3.3	Behandlung cisplatinresistenter Zellen	25
3.4	Kombinationen von Lobaplatin mit anderen Zytostatika	26
3.4.1	Paclitaxel, Vinorelbin, Epirubicin und 5-Fluorouracil	26
3.4.2	TRAIL	28
3.5	Wirkmechanismen von Lobaplatin	30
3.5.1	Spaltung von PARP	30
3.5.2	Apoptose und Nekroptose	31
3.5.3	Veränderungen des Zellzyklus	34
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>49</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das Mammakarzinom**

Das Mammakarzinom ist ein invasiver und somit bösartiger Tumor der Brustdrüse. Insgesamt erkrankt in der Bundesrepublik etwa jede elfte Frau, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren. Im Jahr 2004 wurden unter den Frauen in Deutschland 57231 Neuerkrankungen und 17592 brustkrebsbedingte Todesfälle registriert. Bezogen auf das weibliche Geschlecht stellt das Mammakarzinom damit die fünfthäufigste Todesursache dar und führt die Liste der bösartigen Tumorerkrankungen an. Das Robert-Koch-Institut hat zuletzt eine 5-Jahres-Überlebensrate nach Erstdiagnose von ca. 81% angegeben [1-3].

Der Krankheitsverlauf ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Grundsätzlich wird gemäß Leitlinien Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung (kurz TNM-Stadium), postoperativ tumorfreier Rand des Resektionspräparates, histologischer Subtyp, Differenzierungsgrad und Gefäßeinbruch, Alter der Patientin, Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, HER-2/neu-Status und Menopausenstatus beurteilt, um aus dem Gesamtbild eine Prognose abzuleiten und die jeweils geeignete Therapie festzulegen. Von größter Bedeutung ist bis heute die möglichst vollständige operative Entfernung des Tumors, meist in Kombination mit vorheriger oder anschließender systemischer Therapie und Bestrahlung. Studien haben gezeigt, dass sowohl die Bestrahlung als auch die systemische Therapie das Rückfallrisiko und die Sterblichkeit beim Mammakarzinom reduzieren. Systemisch, also medikamentös gibt es zurzeit drei wichtige Ansätze, die auch teilweise kombiniert werden können: die klassische Chemotherapie, die endokrine Therapie und die Immuntherapie. Dabei richtet sich die endokrine Therapie an Patientinnen mit östrogen- und/oder progesteronrezeptorpositiven Tumoren. Die Immuntherapie mit dem Antikörper Trastuzumab ist bei Patientinnen mit HER2-überexprimierenden Tumoren sinnvoll. Chemotherapeutisch werden Kombinationsschemata bevorzugt. Wichtige Substanzen sind die Anthrazykline (Epirubicin und Doxorubicin) und die Taxane (Paclitaxel und Docetaxel), oft in Kombination mit Cyclophosphamid und 5-Fluorouracil. Die Indikation für den Einsatz von Chemotherapeutika hängt von dem geschätzten Rezidivrisiko und dem Hormon-rezeptorstatus ab. Wenn Patientinnen von einer

endokrinen Therapie nicht profitieren, sind sie umso dringlicher angewiesen auf eine geeignete Chemotherapie [4].

## **1.2 Das triple-negative Mammakarzinom**

Das triple-negative Mammakarzinom ist östrogenrezeptornegativ, progesteronrezeptornegativ und HER2 negativ.

Der Hormonrezeptorstatus wird in der Klinik immunhistochemisch bestimmt, wobei eine Gewebeprobe als hormonrezeptornegativ gilt, wenn kein einziger Tumorzellkern positiv angefärbt werden kann [5]. Zur Bestimmung des HER2 Status kann man entweder mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder Chromogene-in-situ-Hybridisierung (CISH) die Amplifikation des HER2 Gens feststellen, oder immunhistochemisch eine Proteinüberexpression nachweisen, hier gilt ein Score von 3+, also eine Anfärbung bei mehr als 30% der Tumorzellen als positiv [6].

Das triple-negative Mammakarzinom ist eng verwandt mit dem Basalzell-ähnlichen (basal-like) Mammakarzinom [7]. Diese beiden Subentitäten zeigen erhebliche Überschneidungen, sind allerdings nicht miteinander identisch, worüber es manche Verwirrung in der Literatur gibt. Das Basalzell-ähnliche Mammakarzinom wurde ursprünglich mittels Analyse der Genexpression in sogenannten Mikroarrays definiert als eine Gruppe mit Basalzell-typischem Gencluster [8]. Seither versucht man, dieser Gruppe geeignete immunhistochemisch anfärbbare Marker zuzuordnen. Die Hormonrezeptoren und der HER2-Rezeptor alleine genügen dazu nicht, sind aber die einzigen Proteine, die derzeit im klinischen Alltag bestimmt werden.

Etwa 15% aller Mammakarzinome sind triple-negativ. Insbesondere bei afroamerikanischen premenopausalen Frauen ist dieser Anteil jedoch deutlich höher [9, 10]. Das triple-negative Mammakarzinom ist im Vergleich mit nicht-triple-negativen Formen mit einer größeren Tumorgröße zum Zeitpunkt der Diagnose und einer schlechteren Differenzierung assoziiert, wird also oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt [9-14]. Von der Histologie her ist es zumeist invasiv-duktales. Der Proliferationsmarker Ki-67 ist häufig erhöht, was als Zeichen für ein rasches Tumorwachstum gilt [15]. Triple-negative Karzinome treten im Durchschnitt etwa fünf Jahre früher auf, lassen sich mammographisch schlechter nachweisen und werden daher überwiegend von den Patientinnen selbst zuerst ertastet [14]. Die Rate an

postoperativen Rezidiven ist erhöht, insbesondere in den ersten fünf Jahren nach Diagnose [16]. Anscheinend kommt es aufgrund des aggressiveren Charakters der Tumoren meistens zu frühen Rezidiven. Man findet häufiger Fernmetastasen, allerdings keinen vermehrten Befall von axillären Lymphknoten. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist niedriger, d.h. es versterben mehr Patientinnen tatsächlich an ihrer Erkrankung. So fand sich in einer Studie des California Cancer Registry mit etwa 51000 Patientinnen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 77 % für triple-negative Patientinnen im Vergleich zu 93 % in der Kontrollgruppe [9]. All diese Zusammenhänge zeigen, dass das triple-negative Mammakarzinom eine vergleichsweise ungünstige Prognose hat.

Derzeit sind die Östrogen- und Progesteronrezeptoren und der HER2-Rezeptor die wichtigsten Angriffspunkte in der gezielten Brustkrebstherapie. Für das triple-negative Mammakarzinom hingegen gibt es bisher keine tumor-spezifischen Behandlungsmöglichkeiten. In Studien wird der Einsatz von Rezeptorinhibitoren und Antikörpern erprobt. Diese richten sich u. a. gegen EGFR (z.B. Cetuximab) und c-KIT (z.B. Imatinib). EGFR und c-KIT sind Tyrosinkinase-rezeptoren, die in triple-negativen Tumoren teilweise überexprimiert werden [17].

Chemotherapeutische Zytostatika als einigermaßen ungezielte systemische Substanzen richten sich gegen diejenigen Zellen im Körper, die besonders schnell wachsen, bzw. sich besonders schnell teilen. Nun wissen wir, dass das triple-negative Mammakarzinom oft ein erhöhtes Ki-67 und rasches Tumorwachstum aufweist. Daher ist es nicht verwunderlich, dass dieser Tumor besser auf Chemotherapie anspricht, als nicht-triple-negative Formen. Dieser positive Effekt wird aber mehr als wettgemacht durch erhöhte Rückfallraten. Insbesondere diejenigen Tumoren, die nicht vollständig auf die Therapie ansprechen oder nicht im Gesunden entfernt werden konnten, neigen zu frühen Rezidiven [18]. Vermutlich haben die Zellen aufgrund ihres raschen Wachstums und ihrer großteils schlechten Differenzierung auch eine besondere Begabung dazu, Resistenzen zu entwickeln, also den Therapeutika auszuweichen. Derzeit werden in Studien neben den für Brustkrebs klassischen Kombinationsschemata diverse Zytostatika in verschiedensten Kombinationen an triple-negativen Patientinnen erprobt, um in Zukunft bessere Therapieerfolge zu erreichen [19].

### 1.3 Lobaplatin

Lobaplatin ist ein Platinderivat der dritten Generation.

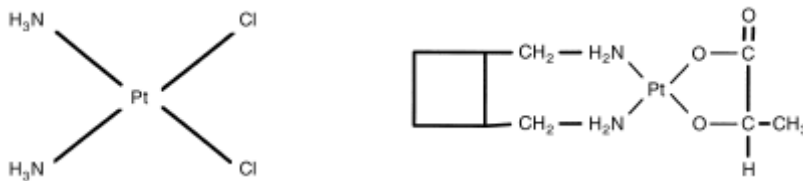


Abb. 1: Cisplatin und Lobaplatin [20]

Anfang der sechziger Jahre gelang es Forschern, mit platinhaltigen Komplexen die Zellteilung in *Escherichia coli* Zellen zu unterdrücken [21]. In der Folge wurden platinbasierte Zytostatika entwickelt. 1978 wurde als erster Vertreter Cisplatin für die systemische Tumorthherapie in den USA zugelassen. Cisplatin findet bis heute sehr weiten Einsatz im Kampf gegen verschiedenste Tumoren. Es wird von manchen Autoren zu den Alkylantien im weiteren Sinne gerechnet, obwohl es keine Alkylgruppen hat. Es bindet vorwiegend an zwei Basen innerhalb der DNA. Dadurch

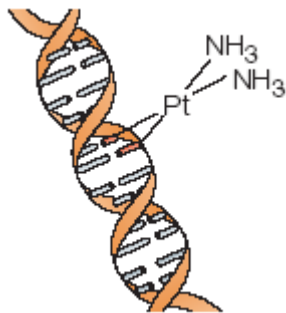


Abb. 2 intrastrand crosslinks [24]

entstehen Querverbindungen zwischen einem oder beiden DNA-Strängen, die sogenannten intra- und interstrand crosslinks. Cisplatin bildet zu 90% intrastrand crosslinks innerhalb eines Stranges, davon wiederum machen Verknüpfungen zwischen zwei benachbarten Guaninbasen den Großteil aus [22, 23]. Auf diese Weise wird die DNA

geschädigt, in der Folge können sich die Zellen nicht

mehr teilen und es kommt zum Zelltod. Cisplatin ist einerseits ein hochpotentes Zytostatikum, hat jedoch andererseits mehrere Nachteile. Es ist sehr toxisch, wichtige Nebenwirkungen sind die Schädigung der Nieren (Nephrotoxizität), des Nervensystems (Neurotoxizität) und des Gehörs (Ototoxizität), die Unterdrückung der Blutbildung im Knochenmark (Myelosuppression) sowie Durchfall, Übelkeit und Erbrechen. Hinzu kommt, dass viele Tumoren unter der Therapie mit Cisplatin Resistenzen entwickeln. Schließlich kann man Cisplatin nur intravenös verabreichen, wünschenswert wäre jedoch eine orale Darreichungsform [25]. Aufgrund dieser Nachteile sind mittlerweile viele Platinderivate entwickelt worden, in der Hoffnung, die Nebenwirkungen zu verringern, die Antitumor-Wirkung womöglich noch zu verbessern und Resistenzen zu umgehen. Die beiden wichtigsten alternativen



Substanzen, die inzwischen klinisch eingesetzt werden, sind Carboplatin und Oxaliplatin.

Lobaplatin wurde 1989 von Schumacher et al synthetisiert [26] und wird heute von der biopharmazeutischen Firma AEterna Zentaris Inc. vermarktet. Es ist bisher nur in China für die Therapie der chronischen myeloischen Leukämie, des kleinzelligen Bronchialkarzinoms und des inoperablen metastasierten Mammakarzinoms zugelassen [27]. Experimentell zeigte Lobaplatin an Tumorzelllinien und im Mausmodell eine vergleichbare und teilweise sogar bessere Wirksamkeit als Cisplatin und war auch in cisplatinresistenten Zelllinien wirksam [28, 29]. Lobaplatin wurde in verschiedenen klinischen Phase I und II Studien als Monotherapie erprobt. Die meisten Studien verwendeten eine Dosis von 50 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche intravenös als Bolus alle 4 Wochen. Hierunter wies Lobaplatin ein günstiges Nebenwirkungsprofil auf [30-40]. Nieren, Nervensystem und Gehör blieben unbeeinträchtigt. Häufig traten geringgradige Übelkeit und Erbrechen auf, beides konnte jedoch mit antiemetischen Medikamenten gut beherrscht werden. Als wichtigste Nebenwirkung wurde eine Unterdrückung der Blutbildung im Knochenmark beobachtet, insbesondere der Mangel an Blutplättchen (Thrombozytopenie) war dosislimitierend mit einem Tiefpunkt zwei Wochen nach Platingabe und Erholung auf normale Werte innerhalb der dritten Woche. Da Lobaplatin größtenteils über die Nieren ausgeschieden wird, können Nebenwirkungen vermieden werden, wenn man die Behandlungsdosis an die Nierenfunktion des Patienten anpasst [31, 41]. Die Studien wurden überwiegend an vorbehandelten Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium durchgeführt. Für das nicht-kleinzellige [40] und das vorbehandelte kleinzellige Bronchialkarzinom [38], das Blasenkarzinom [34], das platinresistente Ovarialkarzinom [35] und Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches [33] zeigte sich jeweils nur ein geringer oder gar kein Therapieerfolg. Vergleichsweise gute Ergebnisse wurden an dem rezidierten Ovarialkarzinom [32] und dem fortgeschrittenen Ösophaguskarzinom [39] erzielt mit einer Remissionsrate von 24% und 28%. Bedeutend erfolgreicher war eine Phase II Studie in China an vorwiegend nicht-vorbehandelten Patienten mit Remissionsraten um die 50% für das kleinzellige Bronchialkarzinom und das Mammakarzinom und noch besseren Remissionsraten für die chronische myeloische Leukämie [38, 27]. Insgesamt hat Lobaplatin also weniger schwerwiegende Nebenwirkungen als Cisplatin und stellt möglicherweise für bestimmte

Tumoren, insbesondere bei nicht-vorbehandelten Patienten, eine Alternative zum Cisplatin dar. Denkbar wären auch geeignete Kombinationen mit anderen Chemotherapeutika. Dazu liegen bisher keine aussagekräftigen Studienergebnisse vor [34]. Platinvorbehandelte, bzw. platinresistente Patienten sprechen leider kaum auf eine Therapie mit Lobaplatin an.

#### **1.4 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist es, einerseits die Wirksamkeit und andererseits die Wirkungsweise von Lobaplatin am Modell zweier triple-negativen und einer klassischen Brustkrebszelllinie genauer zu untersuchen. Geprüft wurden die dosis- und zeitabhängige Wirkung im Vergleich zu Cisplatin und die Wirkung in Kombination mit anderen Chemotherapeutika. Um das Verhalten der Zelllinien besser zu verstehen, wurde ihr p53-Status bestimmt. Die Aktivierung verschiedener Apoptosemechanismen durch Lobaplatin wurde nachgewiesen. Außerdem wurden Veränderungen des Zellzyklus nach Inkubation mit Lobaplatin genauer untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Spezies</b>	<b>Herkunft</b>
HCC1806	Human, Mammakarzinom	ATCC, Manassas, USA
HCC1937	Human, Mammakarzinom	ATCC, Manassas, USA
MCF7	Human, Mammakarzinom	ATCC, Manassas, USA
A2780	Human, Ovarialkarzinom	ECACC, Salisbury, UK
A2780cis	Human, Ovarialkarzinom, cisplatin-resistent	ECACC, Salisbury, UK
HÉK293	Human, embryonal, Niere	ATCC, Manassas, USA

#### 2.1.2 Antikörper und Plasmide

<b>Antikörper</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Herkunft</b>
anti-Beta Aktin	Maus, monoklonal	Abcam, Cambridge, GB
anti-PARP	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Danver, USA
anti-Caspase-3	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Danver, USA
Anti-p53	Kaninchen	AbD Serotec, Kidlington, GB
Anti-Kaninchen HRP	Ziege, polyklonal	KPL, Gaithersburg, USA
Anti-Maus HRP		KPL, Gaithersburg, USA
PathDetect p53 Cis-Reporting System		Agilent, Santa Clara, USA
pRL-CMV		Promega, Madison, USA

#### 2.1.3 Chemotherapeutika und Inhibitoren

<b>Chemotherapeutikum / Inhibitor</b>	<b>Hersteller</b>
Lobaplatin	Æterna Zentaris GmbH, Frankfurt, DE
Human TRAIL	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Z-VAD Caspaseninhibitor	Bachem AG, Bubendorf, CH
Necrostatin 1	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA
SuperFasLigand™ (human, rekombinant)	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA

Cisplatin, 5-Fluorouracil, Vinorelbin, Paclitaxel und Epirubicin wurden von der Apotheke der Universitätsklinik Würzburg bestellt.

#### 2.1.4 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Accu-jet pro	BRAND, Wertheim, DE
Blot Module Mini-V8.10	Biometra, Göttingen, DE
Brutschrank HERAcell 150	Heraeus, Hanau, DE
Dampfsterilisator Varioklav 25T	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, DE
Electrophoresis power supply EV265	Consort, Turnhout, BE
Elektrophorese-Apparatur Mini-V8.10	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
FACSCalibur Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Flockeneinsbereiter AF100	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Gefrierschrank Liebherr premium -20°	Liebherr-international, Bulle, CH
Gefrierschrank -40°	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, DE
Kühlschrank LABO-100 4°	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, DE
Kühlschrank Liebherr comfort 4°	Liebherr-international, Bulle, CH
Labor-pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Greifensee, CH
Magnetrührer mit Heizplatte	VWR international, Darmstadt, DE
Messpipetten 5ml, 15ml, 25ml	Hirschmann, Eberstadt, DE
Micromax Refridgerated Microcentrifuge	Thermo Electron, Waltham, USA
Mikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, DE
Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim, DE
Reagenzglasschüttler	VWR international, Darmstadt, DE
Research Pipette 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Roller mixer SRT6	Barloworld scientific, Stone, GB
Sicherheitswerkbank HERAsafe HS 12	Heraeus, Hanau, DE
Submarine electrophoresis system	Advance Co. Ltd, Tokio, JP
Mupid-exU	
Stickstoffbehälter ARPEGE 110	Air Liquide, Düsseldorf, DE
Sunrise ELISA Reader	Tecan Group, Männedorf, CH

Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen, DE
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, DE
Tiefkühl-lagerschrank HERAFreeze –80°	Heraeus, Hanau, DE
UV Transilluminator TII	Biometra, Göttingen, DE
Vakuumpumpensystem BVC 21	Vacuubrand, Wertheim, DE
Waage Sartorius LE 623 P	Sartorius, Göttingen, DE
Wasserbad TW20	Julabo, Seelbach, DE
Zählkammer Neubauer improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge Jouan C4	Thermo Electron, Waltham, USA

## 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

### Verbrauchsmaterial

CL-XPosure Film

Combitips plus

Einmalhandschuhe Flexam

FACS Röhrchen

Falcon-Röhrchen Cellstar (15 ml, 50 ml)

Kryoröhrchen

Luminometerplatten (96-well)

Multiply-Pro Gefäß (0,2 ml)

Nitrozellulosemembran

Pasteur Pipetten

PCR-Tube

Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)

Reagiergefäß / Eppendorf Cup  
(1,5 ml, 2 ml)

Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>)

Zellkulturplatten (6-well, 96-well)

### Hersteller

Thermo Scientific, Waltham, USA

Eppendorf, Hamburg, DE

Cardinal Health, Dublin, Ohio, USA

Hartenstein, Würzburg, DE

Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

Nunc, Roskilde, DK

Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

Sarstedt, Nümbrecht, DE

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Sarstedt, Nümbrecht, DE

Sarstedt, Nümbrecht, DE

Sarstedt, Nümbrecht, DE

Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

TPP, Trasadingen, CH

## 2.1.6 Chemikalien und Enzyme

### Chemikalie / Enzym

Accutase

Agarose

AmpliTaq DNA Polymerase

Aprotinin

APS

ATP

Bromphenol-Blau

BSA

CoA

Coelenterazine

Developer and replenisher GBX

DMEM High Glucose Medium

DMSO

DNA Ladder

DNA Loading dye

dNTP Mix (10 mM)

DTT

Dulbecco's PBS

EDTA

EGTA

Eisessig = konzentrierte Essigsäure Acetat

Ethanol

EZNA Tissue DNA Kit

Fetal Calf Serum FCS

Fixierer AL4

FuGENE HD Transfection Reagent

Gelred

Glycin

Glycylglycin

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### Hersteller

PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Applied Biosystems, Foster City, USA

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Fermentas, Burlington, Kanada

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Fermentas, Burlington, Kanada

P.J.K. GmbH, Kleinblittersdorf

P.J.K. GmbH, Kleinblittersdorf, DE

Kodak, Rochester, USA

PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Invitrogen, Carlsbad, USA

Fermentas, Burlington, Kanada

Applied Biosystems, Foster City, USA

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT

Fermentas, Burlington, Kanada

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Omega Bio-Tek, Norcross, USA

Biochrom, Berlin, DE

Kodak, Rochester, USA

Roche Applied Science, Indianapolis, USA

Biotium, Hayward, USA

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Merck, Darmstadt, DE

Albumin Fraktion V (Rind)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kristallviolett Indikator	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt, DE
D-Luciferin	P.J.K. GmbH, Kleinblittersdorf, DE
Luminol Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
$\text{MgSO}_4$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
$\text{NaCl}$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
$\text{Na}_2$ -EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
$\text{NaF}$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
$\text{NaN}_3$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natrium-Pyruvat	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	AppliChem, Darmstadt, DE
Natriumzitat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
NP-40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
10xPCR Buffer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Penicillin/Streptomycin P/S	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
PMSF	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Propidiumiodid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Proteinmarker Seeblue prestained	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
RNAse A	Fermentas, Burlington, Kanada
RotiQuant Bradfordreagenz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Tricine	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris-HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Trypanblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Trypsin EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Tween	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE



## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Offene Arbeiten mit den Zellen wurden stets steril an der Sicherheitswerkbank und mit Handschuhen durchgeführt. Das vollständige Zellkulturmedium enthielt 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,5 % Natrium-Pyruvat. Die HCC1806 Zellen wurden in 14 ml RPMI 1640 Medium, die HCC1937 Zellen und die MCF7 Zellen in 14 ml DMEM Medium in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, da wir mit diesen Medien jeweils ein besonders günstiges Wachstum beobachteten. Die Mediumflaschen wurden im Kühlschrank aufbewahrt. Das Medium in den Zellkulturflaschen wurde etwa alle 2 Tage ausgewechselt. Die adhärent wachsenden Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop begutachtet, um eine Besiedlung mit Bakterien oder Pilzen auszuschließen und das Wachstum der Zellen zu beurteilen. Sobald der Boden der Zellkulturflaschen dicht bewachsen war, wurden die Zellen abgelöst und verdünnt wieder eingesetzt. Je nach erwartetem Zellwachstum wurden die Zellen zwei- bis zehnfach verdünnt. Überzählige Zellen wurden entweder in neue Flaschen ausgesät, für Versuche verwendet, eingefroren oder verworfen. Um die Zellen abzulösen, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden sie mit 1 ml Accutase oder Trypsin (0,5 mg/ml) und EDTA (0,22 mg/ml) inkubiert und solange in den Brutschrank gestellt, bis unter dem Mikroskop eine erfolgreiche Ablösung vom Flaschenboden zu erkennen war. Die abgelösten Zellen wurden in Medium mit einer Glaspipette aufgenommen. Anschließend wurden sie entweder verdünnt oder zu genannten anderen Zwecken weiter verwendet. Bei Bedarf wurde die Gesamtzellzahl nach dem Ablösen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Tote Zellen wurden mit Trypanblau angefärbt und nicht mitgezählt. Gewünschte Zellkonzentrationen für die verschiedenen Versuche wurden durch entsprechende Verdünnung in Zellkulturmedium erreicht. Um Zellen einzufrieren, wurden die abgelösten Zellen in Medium in Falcon Röhrchen pipettiert und für 5 min bei 1800 rpm abzentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in etwa 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen für einige Tage bei –80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff bei –196 °C gelagert. Das Einfriermedium bestand aus 70 % vollständigem Zellkulturmedium, 20 % FCS und 10 % DMSO. Umgekehrt

wurden eingefrorene Zellen vorsichtig unter Zugabe von Zellkulturmedium aufgetaut und in 14 ml Zellkulturmedium in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen ausgesät.

### **2.2.2 Kristallviolett-Assay**

Der Kristallviolettassay wurde verwendet, um mittels Anfärbung der lebenden Zellen die Zytotoxizität verschiedener Substanzen zu untersuchen. Hierzu wurden je 10.000 Zellen in 100 µl in 96-well Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag mit den zu untersuchenden Substanzen in angegebenen Konzentrationen und Kombinationen behandelt. Es wurde immer zu je drei Wells die gleiche Substanzkonzentration hinzugefügt. Die Zellen wurden für die jeweils angegebene Zeit wiederum im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Platten ausgeschüttet und mit PBS gewaschen. In jedes Well wurden 50 µl Kristallviolettlösung pipettiert. Diese Lösung enthielt 0,5 % Kristallviolett und 20 % Methanol. Nach 20 min wurde die überschüssige Kristallviolettlösung mit Wasser vorsichtig ausgespült. Die gefärbten Platten trockneten über Nacht. Am nächsten Tag wurden zu jedem Well 50 µl 0,1 M Natriumzitat-Lösung in 50 % Ethanol hinzugegeben. Die Absorption wurde im ELISA Reader bei 550 nm gemessen. Da tote Zellen abschwimmen und weggewaschen werden, lassen sich nur adhärente lebende Zellen mit dieser Methode anfärben. Folglich korreliert die Färbeintensität mit der Anzahl überlebender Zellen in den einzelnen Wells. Aus je drei gleichbehandelten Wells wurden mit Microsoft Excel die Mittelwerte und die Standardabweichung bestimmt. Beides wurde in Prozent umgerechnet, wobei der Mittelwert der Absorption in den unbehandelten Wells mit 100 % gleichgesetzt wurde. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt.

### **2.2.3 Reporteragen-Assay**

Die Genexpression eines bestimmten Gens kann man mithilfe eines Reporteragen-Assays untersuchen. Hierzu werden in die Zielzellen zwei Plasmide eingebracht. Das eigentliche Reporteragen wird spezifisch hinter den Promotor des zu untersuchenden Gens gehängt und in der Folge analog zu diesem Gen exprimiert. Das andere Plasmid enthält einen eigenen Promotor aus dem Cytomegalievirus, von dem eine hohe Aktivität bekannt ist. Letzteres dient als Kontrolle dafür, dass die Transfektion, also das

Einbringen der Plasmide in die DNA der Zellen erfolgreich ist. Das Reportergen kodierte in unserem Versuch für die Firefly-Luziferase des Leuchtkäfers *photinus pyralis*, das Kontrollplasmid kodierte für die Renilla-Luziferase der Seegurke. In den Zellen werden diese beiden Luziferasen synthetisiert. Es handelt sich dabei um Enzyme, die unterschiedliche Substrate umsetzen können, wobei Licht emittiert wird. Auf diese Weise wird die Genexpression in ein Lichtsignal übersetzt und messbar gemacht.

In unserem Versuch wurden etwa 6.000 Zellen pro well in 100 µl Medium in 96-well Platten ausgesät, über Nacht in den Brutschrank gestellt und am nächsten Tag transfiziert. Es wurden mehrere Transfektionsreagenzien erprobt, wobei Fugene von Roche die besten Ergebnisse zeigte. Es wurden je 2 µg DNA und 6 µl bzw. 8 µl Fugene Transfektionsreagenz zu je 100 µl serumfreiem Medium ohne FCS hinzugefügt. Die DNA bestand aus fünf Teilen Reportergen-Plasmid und einem Teil Renilla-Luziferase-Plasmid. Als Reportergen-Plasmid wurde p53-luc verwendet. Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 µl davon in jedes well pipettiert, die Platten wurden für 48 h in den Brutschrank gestellt. Darauf erfolgte die Lyse der Zellen. Das Medium wurde abgeschüttet und die Platten wurden vorsichtig mit PBS gewaschen. Zu jedem well wurden je 50 µl eines Lysepuffers hinzugefügt.

Die Platten wurden für 20 min geschüttelt und gegebenenfalls bei – 20 °C bis zur Messung aufbewahrt. Für die Messung wurde der Inhalt der Platten in weiße 96-well Luziferase Platten transferiert. Weiterhin wurden zwei Lösungen A und B benötigt.

<u>5 x Lysepuffer</u>	<u>Lösung A</u>	<u>Lösung B</u>
40 mM Tricine (pH 7.8)	25 mM Glycylglycin,	1,1 M NaCl
50 mM NaCl	15 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 8.0),	2,2 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
2 mM EDTA	4 mM EGTA,	220 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH
1 mM MgSO <sub>4</sub>	2 mM ATP,	5.1)
5 mM DTT	1 mM DTT,	0,44 mg/ml BSA
1% Triton X-100	15 mM MgSO <sub>4</sub> ,	1,3 mM NaN <sub>3</sub>
	0,1 mM CoA	1,43 µM Coelenterazine
	75 µM Luciferin	→ pH 5,1
	→ pH 8.0	

Die Firefly-Luziferase setzte das Luciferin aus Lösung A um, die Renilla-Luziferase das Coelenterazine aus Lösung B. Beide Reaktionen emittierten Licht, welches im Luminometer gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel.

#### **2.2.4 Herstellung von Proteinlysaten, SDS-Gel-Elektrophorese und Western Blot**

Mittels Gel-Elektrophorese und anschließendem Western Blot kann man Proteine auftrennen und in der Folge spezifisch nachweisen. Hierzu werden zunächst die Zellen lysiert. Es wird ein Proteinextrakt gewonnen. Die Proteine werden ihrer Größe nach in einem Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Mit einem spezifischen Primärantikörper kann man das jeweils gesuchte Protein markieren. Ein geeigneter Sekundärantikörper wird hinzugegeben, bindet an den Primärantikörper und macht Antikörper und Protein sichtbar. Für unsere Versuche haben wir Sekundärantikörper verwendet, die mit einer Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, hrp) versehen waren. Die Meerrettichperoxidase ihrerseits setzt Luminol um unter Emission von Licht, welches man als positive Bande auf einem Röntgenfilm festhalten kann. Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden je 500.000 bis 1.000.000 Zellen pro Flasche in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Nach einem Tag wurden die Zellen für 24 h mit den angegebenen Substanzen behandelt. Anschließend wurden sie abgelöst und in kaltem PBS mit 1 mM PMSF abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50-100 µl Lysepuffer

Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5 % NP-40

Vor Gebrauch zu 1 ml Lysepuffer hinzugeben:

2 µg Aprotinin, 10 µg Leupeptin, 100 µg PMSF, 50 mM NaF und  
200 µM NaVO<sub>3</sub>

resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat erneut abzentrifugiert, das Pellet verworfen und der Proteingehalt im Überstand nach Bradford bestimmt. Hierfür wurden in einer 96-well Platte 50 µl destilliertes Wasser vorgelegt. In je drei Wells wurden aufsteigende Mengen von 0 bis 12 µl von einer HSA-Standardlösung (10 mg/ml Albumin Fraktion V in H<sub>2</sub>O gelöst und vor Gebrauch 1:10 verdünnt) und daneben in je drei Wells 1 µl der Proteinlysate hinzugefügt. Anschließend wurden 200 µl Bradfordreagenz RotiQuant in jedes Well pipettiert. Nach 10-20 Minuten erfolgte die Messung bei 596 nm im ELISA-Reader. Mithilfe der HSA-

Standardlösung, die genau 1 mg/ml Protein enthielt, wurde eine Standardkurve gezeichnet. Auf dieser Kurve konnte entsprechend der jeweils im ELISA-Reader gemessenen Absorption die Proteinkonzentration der einzelnen Lysate abgelesen werden. Im nächsten Schritt wurde das Gel für die Elektrophorese vorbereitet. Zunächst wurde zwischen zwei Glasplatten das Trenngel gegossen. Je nach Größe der gesuchten Proteine wurde ein Gel mit einem Acrylamidgehalt zwischen 8 und 15 % gewählt. Sobald das Trenngel polymerisiert war, wurde darüber das Sammelgel gegossen.

<u>10 ml Trenngel (12 % Acrylamid)</u>	<u>3 ml Sammelgel</u>
3,3 ml H <sub>2</sub> O	2,1 ml H <sub>2</sub> O
4 ml 30 % Acrylamidmix	0,5 ml Acrylamidmix
2,5 ml TrisHCL-Lösung (1,5 M, pH 8,8)	0,38 ml TrisHCL-Lösung (1 M, pH 6,8)
100 µl SDS (10 % in H <sub>2</sub> O)	30 µl SDS (10 % in H <sub>2</sub> O)
100 µl APS (10 % in H <sub>2</sub> O)	30 µl APS (10 % in H <sub>2</sub> O)
4 µl TEMED	3 µl TEMED

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut. Von jedem Proteinlysate wurden etwa 20 µg verwendet, entsprechend der gemessenen Proteinkonzentration. Jeweils 3 µl Lämmli-Ladepuffer wurden hinzugegeben. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und

<u>Lämmli-Ladepuffer</u>	<u>5 x Laufpuffer</u>
100 mM Tris-HCL pH 6.8	25 mM Tris
4% SDS	193 mM Glycin
0,2% Bromphenol-Blau	0,5 % SDS
20% Glycerol	→ pH 8.3
vor Gebrauch 10% β-Mercaptoethanol zugeben	

anschließend auf Eis gelegt. Eine Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer gefüllt, die Gele wurden hineingesetzt und die Proben sowie ein Proteinmarker aufgetragen. Die Proteine wurden im Sammelgel bei einer angelegten Spannung von 100 V konzentriert und anschließend bei 130 V etwa 100 min lang im Trenngel aufgetrennt. Der Proteinmarker kennzeichnete mit farbigen Banden verschiedene definierte Proteingrößen. Im nächsten Schritt wurden die Proteine und der Marker von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurden Gel und Membran in eine

Blottingkammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt. Es wurde eine Spannung von 150 V für 75 min angelegt.

10 x Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin → pH 8.8  
vor Gebrauch 20% Methanol zugeben

Mit Ponceau-Rot wurden die einzelnen Proteinspuren auf der Membran nachgewiesen und gekennzeichnet. Die Banden des Proteinmarkers wurden nachgezeichnet. Die Membran wurde mit TBS entfärbt und eine Stunde lang mit 5% Milchpulver in TBST geblockt.

10 x TBS: 0,5 M Tris, 1,5 M NaCl → pH 7.6

TBST mit Milch: 1 x TBS + 5 % Magermilchpulver + 0,1 % Tween

Über Nacht wurden die Membranen mit dem in Milch-TBST 1:1.000 verdünnten Primärantikörper inkubiert. Die Membranen wurden anschließend dreimal mit TBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in Milch-TBST 1:5.000 verdünnt, und eine Stunde lang auf die Membranen gegeben. Nach nochmaliger Waschung wurden die Membranen drei Minuten mit der selbstgemachten ECL-Lösung inkubiert.

ECL-Lösung: 1 ml Lösung A + 0,1 ml Lösung B + 0,3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %)

Lösung A: 200 ml Tris-HCl (0,1 M, pH 8,6) + 50 mg Luminol

Lösung B: 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure + 10 ml DMSO

In einer Dunkelkammer wurden die markierten Banden je nach Signalstärke zwischen 10 s und 10 min auf einem Röntgenfilm abgelichtet. Der Film wurde in einer Entwicklerlösung maximal 3 min entwickelt und 7 min lang mittels Fixierlösung fixiert. Die Membran wurde nacheinander jeweils 10 min mit einer Stripping-Lösung und einer Neutralisations-Lösung inkubiert und wiederum eine Stunde geblockt.

Stripping-Lösung: 500 ml H<sub>2</sub>O + 7,5 g Glycin + 14,8 g NaCl → pH 2.8

Neutralisationslösung: 500 ml H<sub>2</sub>O + 118,2 g TrisHCl → pH 7.4

Danach konnten erneut Proteine mit einem Primärantikörper markiert werden.

### **2.2.5 Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus**

Propidiumjodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA-Doppelhelix interkaliert. Die im Durchflusszytometer (FACS) messbare Fluoreszenzintensität korreliert mit dem Propidiumjodid-Einbau und somit mit dem DNA-Gehalt in den Zellen. Dabei kommt es im Verlauf eines Zellzyklus zu typischen Veränderungen. Während der G1-Phase liegt die Erbinformation einfach vor (normaler doppelter Chromosomensatz =  $2n$ ), in der S-Phase wird sie verdoppelt und in der G2-Phase enthalten die Zellen dann zwei identische DNA-Kopien ( $4n$ ). Als Korrelat hierzu kann man die Farbintensität in den einzelnen Zellen mit der Durchflusszytometrie auswerten und damit abschätzen, wie viele Zellen sich in welcher Phase des Zellzyklus befinden. Auf diese Weise kann z. B. der Einfluss verschiedener Substanzen auf den Zellzyklus sichtbar gemacht werden.

Es wurden je 500.000 Zellen in 2 ml Zellkulturmedium in 6-well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden jeweils den Angaben entsprechend vorbehandelt. Für die Färbung wurden die im Medium schwimmenden, abgestorbenen Zellen gesammelt. Die adhärennten Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und hinzugefügt. Die Proben wurden bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und 20 min in eiskaltem 70 % Ethanol fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mindestens 20 min lang bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit einer Propidiumjodid-Lösung angefärbt. Diese Lösung enthielt in PBS gelöst  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  Propidiumjodid und  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  RNase A. Die Messung erfolgte in kleinen FACS-Röhrchen am FACSCalibur Durchflusszytometer. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Summit ausgewertet. Auf der X-Achse wurde die Lichtemission im Zytometer, FL2 Area, entsprechend der Färbung mit Propidiumjodid dargestellt. Darüber ergaben sich Peaks, welche den einzelnen Phasen des Zellzyklus entsprachen. Diese Peaks wurden per Hand mittels Balken eingegrenzt und zugeordnet. Die Zellen in der G1-Phase bildeten den ersten Peak, die Zellen der G2-Phase den zweiten Peak. Zwischen den beiden Peaks fanden sich Zellen in der S-Phase, die Zellen vor dem ersten Peak sind als tot zu betrachten, die Zellen jenseits des zweiten Peaks als polyploid. Dann wurde abgelesen, wie viel Prozent der gemessenen Zellen sich innerhalb der einzelnen Balken und Zellzyklusphasen befanden. Die Versuche wurden dreimal unter gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt, um die Ergebnisse zu bestätigen.

### 2.2.6 DNA-Isolierung, Polymerase-Kettenreaktion und DNA-Sequenzierung

Aus den Zelllinien HCC1806 und HCC1937 wurde die genomische DNA isoliert. Hierzu wurde das E.Z.N.A. Tissue DNA Kit protokollgemäß angewandt. Der gewünschte Abschnitt mit einer Länge von 402 bp auf dem BRCA1-Gen wurde mit einer Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Die geeigneten Primer wurden bei Eurogentec bestellt. Die Primersequenzen wurden der Literatur entnommen [42]. Die Sequenz 5'-ATATGACGTGTCTGCTCCAC-3' wurde als forward-Primer verwendet, die Sequenz 5'-GGGAATCCAAATTACACA-3' diente als reverse-Primer. Es wurde ein Mastermix hergestellt. Vor Gebrauch wurden in jedes PCR-Tube 22,2 µl Mastermix,

#### PCR-Mastermix (für 10 Proben):

190 µl H<sub>2</sub>O

25 µl PCR Puffer

5 µl dNTP Mix (10 mM)

2 µl Taq DNA Polymerase

1,25 µl forward-Primer (10 µM), 1,25 µl reverse-Primer (10 µM) und 0,5 µl der jeweiligen genomischen DNA gegeben. Eine Leerkontrolle ohne DNA wurde ebenfalls verwendet. Die weiteren Schritte erfolgten in den PCR-Tubes im Thermocycler unter den angegebenen Reaktionsbedingungen.

#### PCR-Reaktionsbedingungen:

Denaturierung	5 min	94 °C
35 Zyklen:		
Denaturierung	45 s	94 °C
Hybridisierung	45 s	65 °C
DNA-Synthese	1 min	72 °C
Endelongation	1 min	72 °C
Pause		4 °C

Die Proben wurden in einem Agarosegel entsprechend der Größe der synthetisierten DNA-Segmente elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel enthielt 1 g Agarose, 50ml TAE-Puffer und 2 µl GelRed. Die Elektrophoresekammer wurde mit TAE-Puffer



aufgefüllt. Der 50 x TAE-Puffer enthielt 2 M Tris, 1 M Eisessig und 0,1 M EDTA. Für die Proben wurden 8 µl PCR-Produkt mit 2 µl DNA Loading dye vermengt und auf das Gel aufgetragen. Als Referenz wurde eine DNA Leiter mit Fragmenten im Abstand von 100 Basenpaaren verwendet. Das Gel lief etwa eine Stunde bei 70 V und 100 mA. Anschließend wurde das Gel in der Dunkelkammer unter UV-Licht fotografiert. Die in der PCR vervielfältigten spezifischen und unspezifischen DNA-Abschnitte wurden durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff GelRed sichtbar gemacht. Die Länge der Abschnitte konnte mithilfe der DNA Leiter abgeschätzt werden. Der gesuchte Abschnitt ergab für beide Zelllinien deutliche Banden bei etwa 400 bp. Die Banden wurden vorsichtig ausgeschnitten. Die DNA wurde nach Protokoll mit Perfectprep Gel Cleanup extrahiert. Das DNA-Extrakt wurde von dem Sequencing Service der GENEART AG entziffert.

### **2.2.7 Verwendung der Chemotherapeutika**

Um eine 50 mM Lobaplatin-Lösung herzustellen wurden 50,58 mg Lobaplatin in 2,24 ml gegeben. Allerdings war Lobaplatin in Dimethylformamid erst nach Zugabe von destilliertem Wasser löslich. Die Gesamtlösung enthielt 10 mM Lobaplatin und 20 % Dimethylformamid. Dimethylformamid wurde in sämtlichen Versuchen als Kontrolle verwendet, um einen eigenen zytotoxischen Effekt in den entsprechenden Konzentrationen auszuschließen.

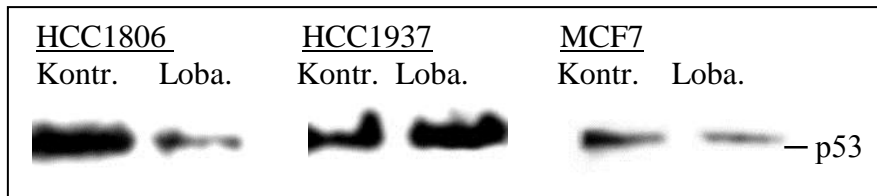
Die übrigen Chemotherapeutika wurden ebenfalls in destilliertem Wasser gelöst. Alle Substanzen wurden gemäß Anweisung gelagert. Vor Gebrauch wurden sie entsprechend der gewünschten Endkonzentration in Medium vorverdünnt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Zelllinien HCC1806, HCC1937 und MCF7

##### 3.1.1 Prüfung des p53-Status

Der p53-Status der drei Zelllinien HCC1806, HCC1937 und MCF7 wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden geprüft. Einerseits wurde versucht, das p53 Wildtyp-Protein in einem Western Blot darzustellen. Mit einem spezifischen Antikörper ließ sich eine Proteinbande von etwa 53 kDa bei allen drei Zelllinien nachweisen (Abb. 3). Es konnte jedoch nicht belegt werden, dass der Antikörper tatsächlich spezifisch für das p53 Wildtyp-Protein ist.



[Abb. 3: p53-wt Western Blot jeweils unbehandelter und mit Lobaplatin behandelter Zellen]

Andererseits wurde in einem Reporterassay die Expression des p53-Wildtyp-Gens untersucht. Als Transfektionsreagenz wurde Fugene in unterschiedlichen Verdünnungen verwendet (s. 2.2.3). Die erfolgreiche Transfektion der Zellen wurde mittels Kontrollplasmid pRL-CMV-luc nachgewiesen, ersichtlich an der Aktivität der Renilla-Luziferase. Ein aktives p53-Gen ließ sich nur in den MCF7-Zellen und der Zelllinie HEK293 mit bekanntem p53-Wildtyp-Status nachweisen, nicht jedoch in den HCC1937- und HCC1806-Zellen (Tab. 1).

<b>Fugene 6:2</b>						
	<b>HCC1806</b>		<b>MCF7</b>		<b>HEK293</b>	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
p53-luc	<b>11</b>	3	<b>4869</b>	4021	<b>889</b>	498
pRL-CMV-luc	<b>3087</b>	933	<b>5772</b>	3455	<b>1568</b>	337

<b>Fugene 8:2</b>				
	<b>HCC1806</b>		<b>HCC1937</b>	
	MW	SD	MW	SD
p53-luc	<b>19</b>	7	<b>5</b>	2
pRL-CMV-luc	<b>56679</b>	15172	<b>36899</b>	9398

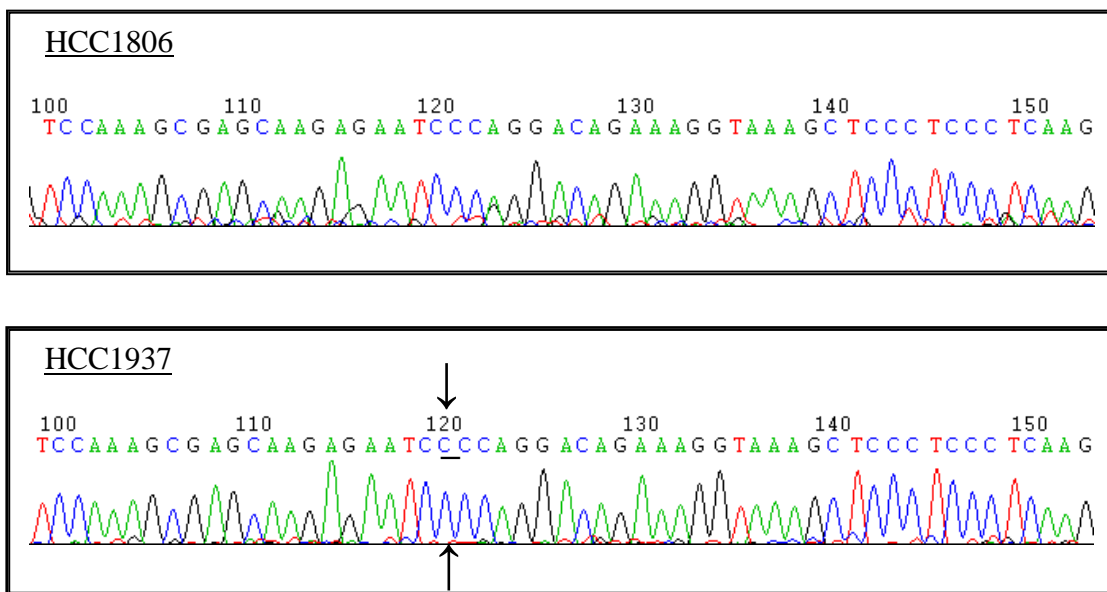
[Tab. 1: p53- und pRL-Expression im Luziferaseassay.

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

**Rote Schrift** = aktive Renilla-Luziferase, **Grüne Schrift** = aktive Firefly-Luziferase]

### 3.1.2 Nachweis einer spezifischen Mutation bei HCC1937

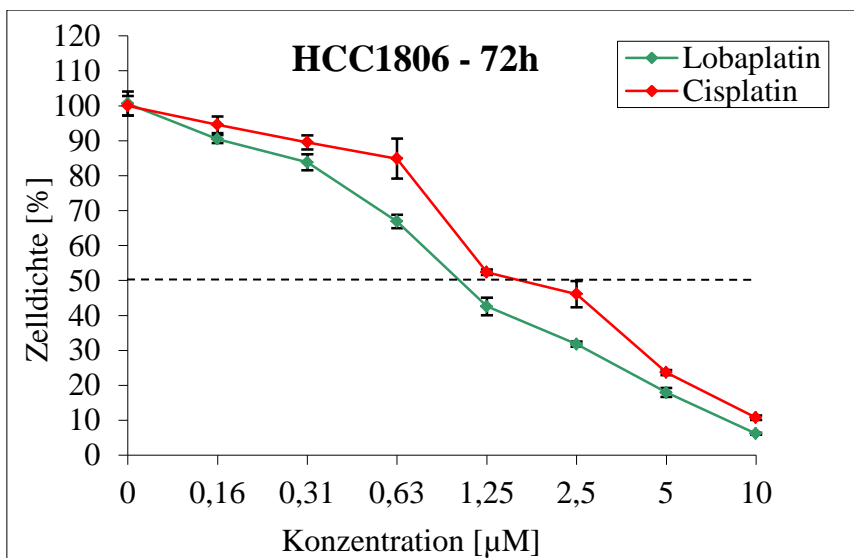
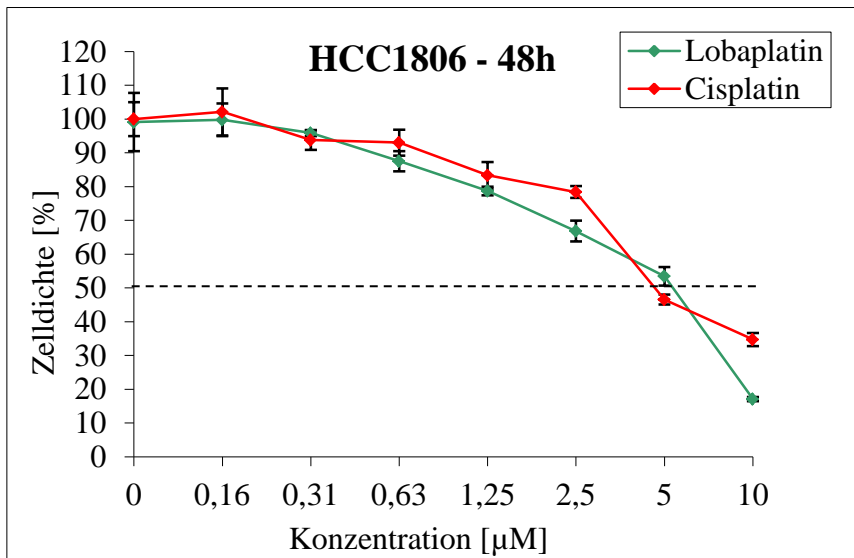
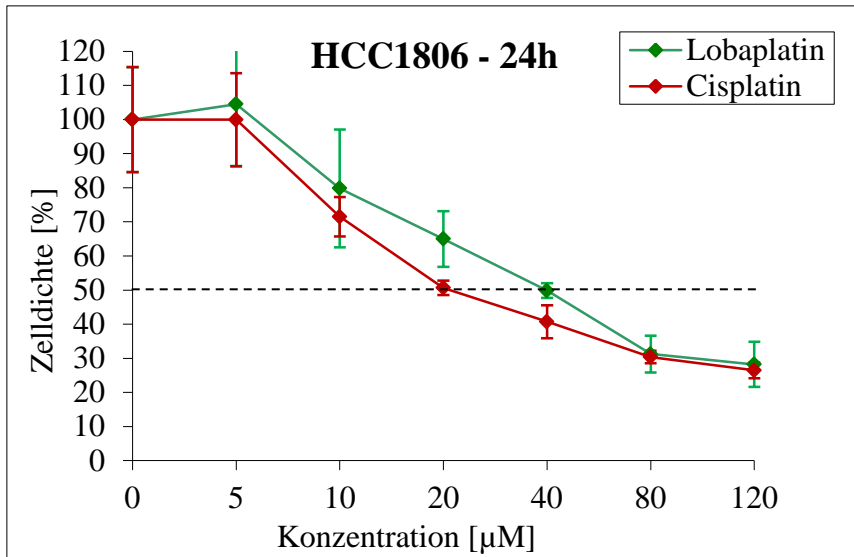
Die Identität der HCC1937 Zellen wurde überprüft. Die HCC1937 Zellen tragen im Exon 20 des BRCA1 Gens eine Einzelnukleotidinsertion: ein zusätzliches Cytosin an Position 5382. Diese Mutation ist spezifisch für diese Zelllinie. Der umgebende Genabschnitt im BRCA1 Gen der HCC1937 und der HCC1806 Zellen wurde sequenziert. Damit konnte das zusätzliche Cytosin im Genom der HCC1937 Zellen, jedoch nicht im Genom der HCC1806 Zellen dargestellt werden (Abb. 5).



[Abb. 5: Gensequenz aus dem BRCA1 Gen, bei HCC1937 mit 5382insC Mutation]

### 3.2 Zytotoxische Wirkung von Lobaplatin

Die drei Zelllinien HCC1806, HCC1937 und MCF7 wurden vergleichend mit Lobaplatin und Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen über 24, 48 und 72 h behandelt. Die zytotoxische Wirkung wurde im Kristallviolettassay ausgewertet und in Dosiswirkungskurven dargestellt (Abb. 6: exemplarisch für HCC1806). Die Konzentration, welche innerhalb der jeweiligen Wirkdauer 50% der Zellen tötete (LD50), wurde graphisch anhand der Dosiswirkungskurven geschätzt. Aus den geschätzten Werten von mindestens drei unabhängigen Versuchen wurden Mittelwert und Standardabweichung gebildet (Tab. 2). Es ergab sich für die HCC1806 und die HCC1937 Zellen jeweils eine etwa gleich starke bzw. gleich schwache Wirkung von Lobaplatin und Cisplatin. Diese Wirkung war sowohl dosis- als auch zeitabhängig.



[Abb. 6: Zytotoxische Wirkung von Lobaplatin und Cisplatin, über 24h, 48h und 72h an HCC1806 Zellen]

Der Effekt der Substanzen verstärkte sich deutlich mit zunehmender Konzentration einerseits und verlängerter Wirkdauer andererseits. Die HCC1937 Zellen zeigten insgesamt nur ein geringes Ansprechen auf Lobaplatin und Cisplatin. Im Vergleich zu den HCC1806 Zellen wurden für die HCC1937 Zellen fünf- bis zehnfach höhere LD50 Werte ermittelt.

Die MCF7 Zellen reagierten ebenfalls dosis- und zeitabhängig auf Lobaplatin und Cisplatin. Allerdings zeigte Lobaplatin gegenüber diesen Zellen eine deutlich stärkere Wirkung als Cisplatin. Nach 24 h war die Wirkung von Lobaplatin auf die MCF7 Zellen in etwa vergleichbar mit der Wirkung von Lobaplatin auf die HCC1806 Zellen, für Cisplatin ergaben sich etwa dreimal höhere LD50 Werte. Nach 48 h und 72 h nahm der zytotoxische Effekt von Lobaplatin zu, dies jedoch weniger deutlich, als gegenüber den HCC1806 und den HCC1937 Zellen. Der Effekt von Cisplatin nach 72 h konnte nicht eindeutig erfasst werden, da die LD50 mit bis zu 20 µM nicht erreicht wurde. Anscheinend verstärkte sich die Wirkung von Cisplatin nach mehr als 48 h kaum noch.

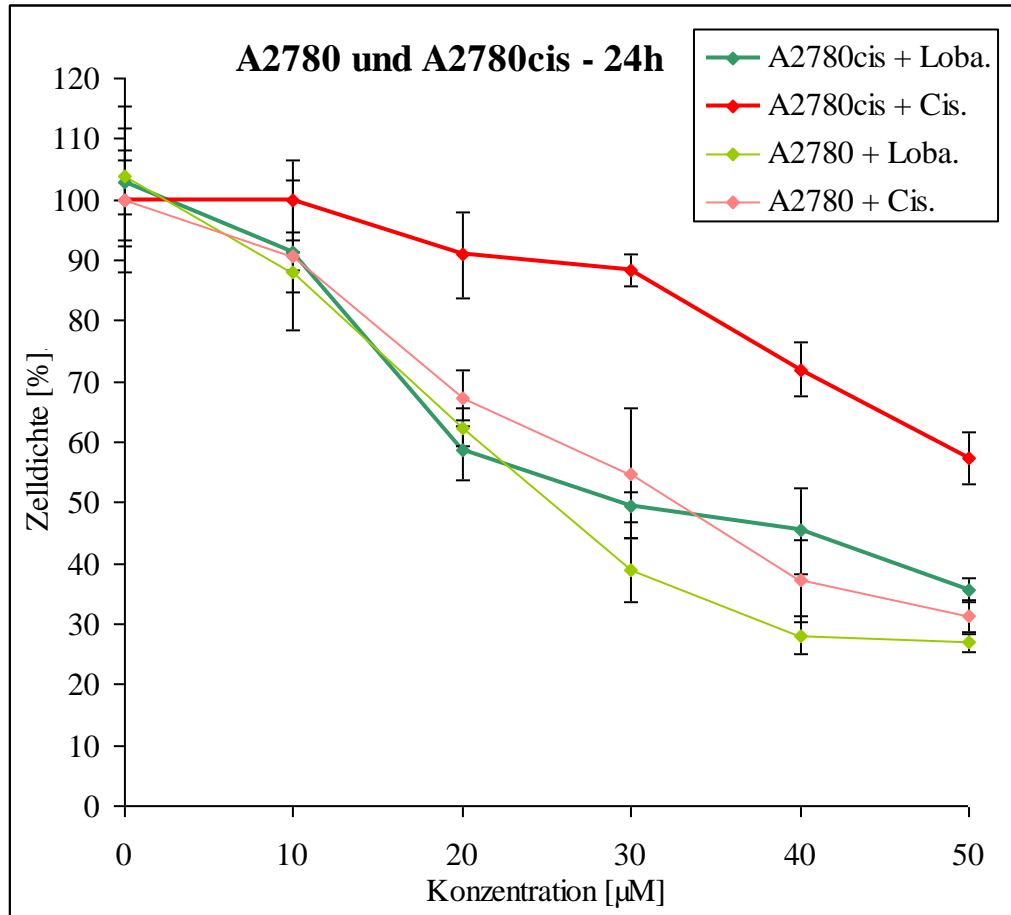
		<b>HCC1806</b>		<b>HCC1937</b>		<b>MCF7</b>	
		Loba.	Cis.	Loba.	Cis.	Loba.	Cis.
<b>LD50 (24 h)</b>	MW	24	25,4	190	188	18,5	63,4
	SD	8,1	10,42	29,44	45,25	2,06	15,44
<b>LD50 (48 h)</b>	MW	4,8	6,7	23,9	17,1	11,3	31
	SD	0,94	2,61	1,67	4,32	1,96	5,52
<b>LD50 (72 h)</b>	MW	1,4	2	13,6	11,9	5,2	>20
	SD	0,35	0,78	2,06	11,9	1,8	

[Tab. 2: LD50 von Lobaplatin und Cisplatin in µM. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung]

### 3.3 Behandlung cisplatinresistenter Zellen

Als Modell für eine Resistenz gegenüber Cisplatin wurden die cisplatinresistente Variante A2780cis und die cisplatin-sensitive Mutterzelllinie A2780 verwendet. Beide Zelllinien wurden über 24 h mit ansteigenden Konzentrationen von Lobaplatin und Cisplatin behandelt. Die cisplatin-sensitiven Zellen zeigten gegenüber Cisplatin und Lobaplatin jeweils ein ähnliches dosisabhängiges Ansprechen mit einer graphisch geschätzten LD50 von etwa 30 µM. Die Wirkung von Cisplatin auf die

cisplatinresistenten Zellen war deutlich abgeschwächt. Die Wirkung von Lobaplatin auf die resistenten Zellen entsprach etwa der Wirkung von Lobaplatin auf die sensitiven Zellen.



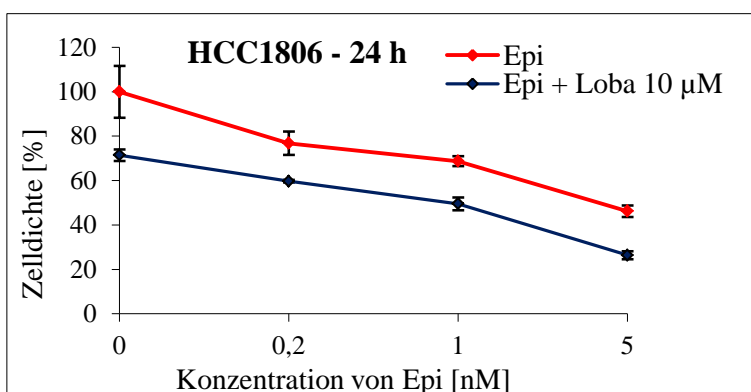
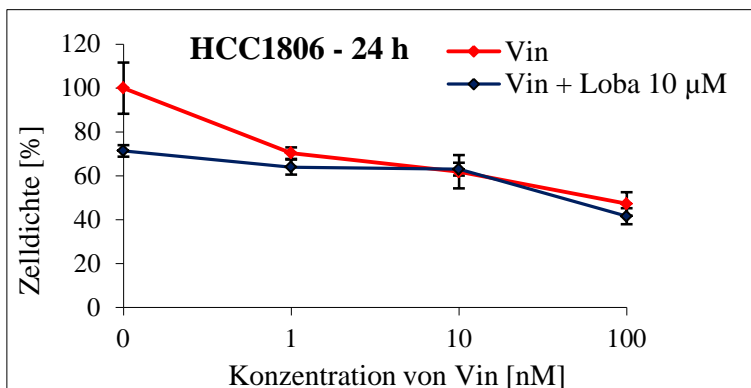
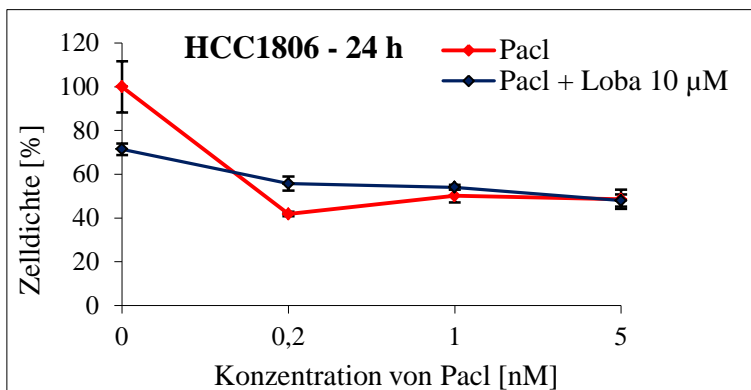
[Abb. 7: Zytotoxische Wirkung von Lobaplatin und Cisplatin auf cisplatin-sensitive (A2780) und cisplatinresistenten (A2780cis) Zellen]

### 3.4 Kombinationen von Lobaplatin mit anderen Zytostatika

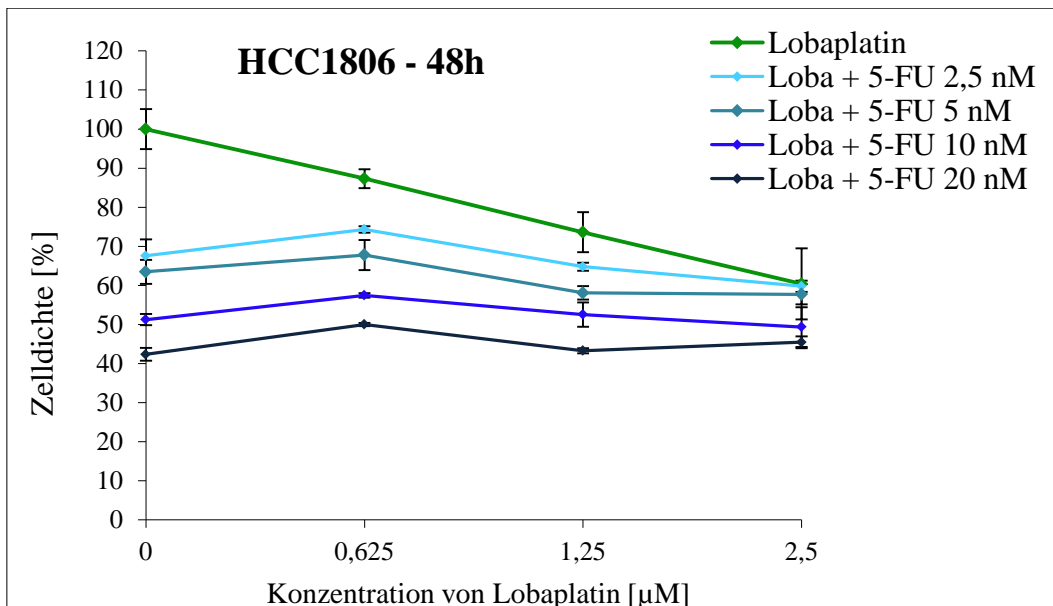
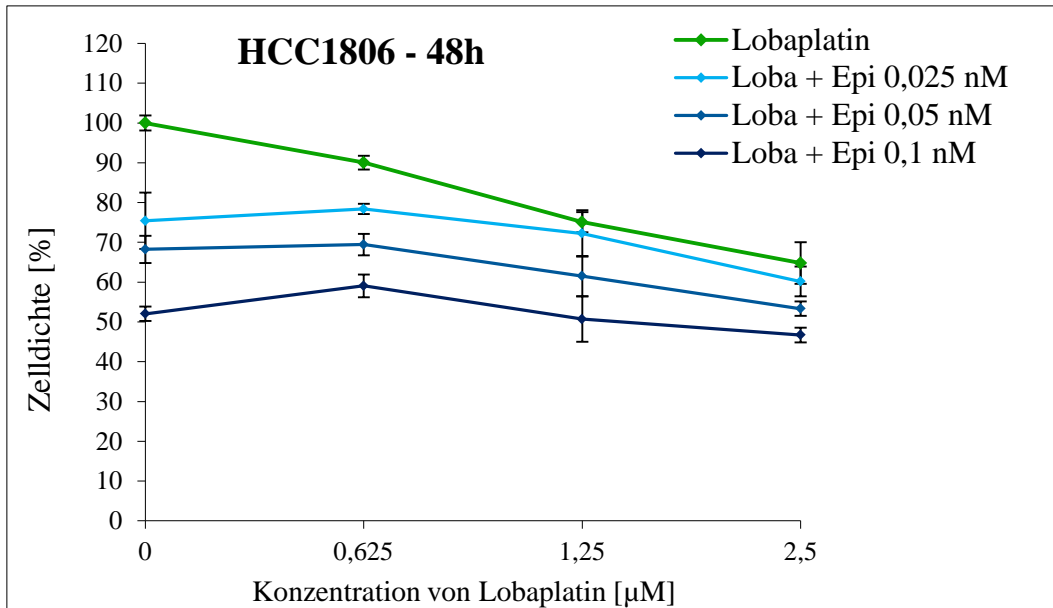
#### 3.4.1 Paclitaxel, Vinorelbin, Epirubicin und 5-Fluorouracil

In einzelnen Versuchen wurden verschiedene Kombinationen an den HCC1806 Zellen erprobt. Lobaplatin wurde über 24 und 48 h jeweils gemeinsam mit Paclitaxel, Vinorelbin, Epirubicin und 5-Fluorouracil verwendet. Alle diese Substanzen sind klassische Zytostatika in der Brustkrebstherapie und darum von besonderem Interesse. Mit Paclitaxel und Vinorelbin ergaben sich nach 24 h (Abb. 8) und nach 48 h keine erkennbaren additiven Effekte. Die zytotoxische Wirkung der Zytostatika alleine

unterschied sich nicht signifikant von der Wirkung in Kombination mit Lobaplatin. Die Kombination von Lobaplatin mit 5-Fluorouracil über 48 h (Abb. 9) und die Kombinationen von Lobaplatin mit Epirubicin über 24 h (Abb. 8) und über 48 h (Abb. 9) erbrachten jeweils eine Verschiebung nach unten und eine Abflachung der ursprünglichen Dosiswirkungskurven der einzelnen Substanzen. Möglicherweise entspricht dies einem subadditiven bis additiven Zusammenwirken der Zytostatika. Insgesamt haben diese Versuche nur Modellcharakter. Für die beschriebenen Kombinationsbehandlungen ließen sich keine eindeutigen Synergien nachweisen.



[Abb. 8: Zytotoxische Wirkung von Paclitaxel (Pacl), Vinorelbine (Vin) und Epirubicin (Epi) in Kombination mit Lobaplatin]



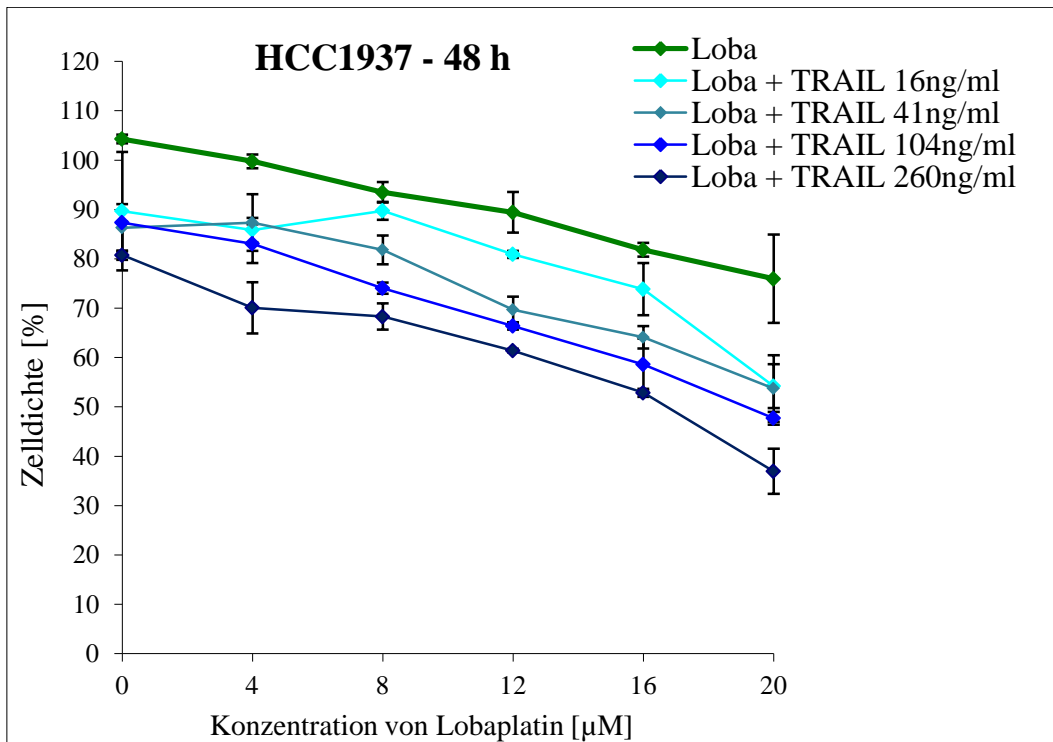
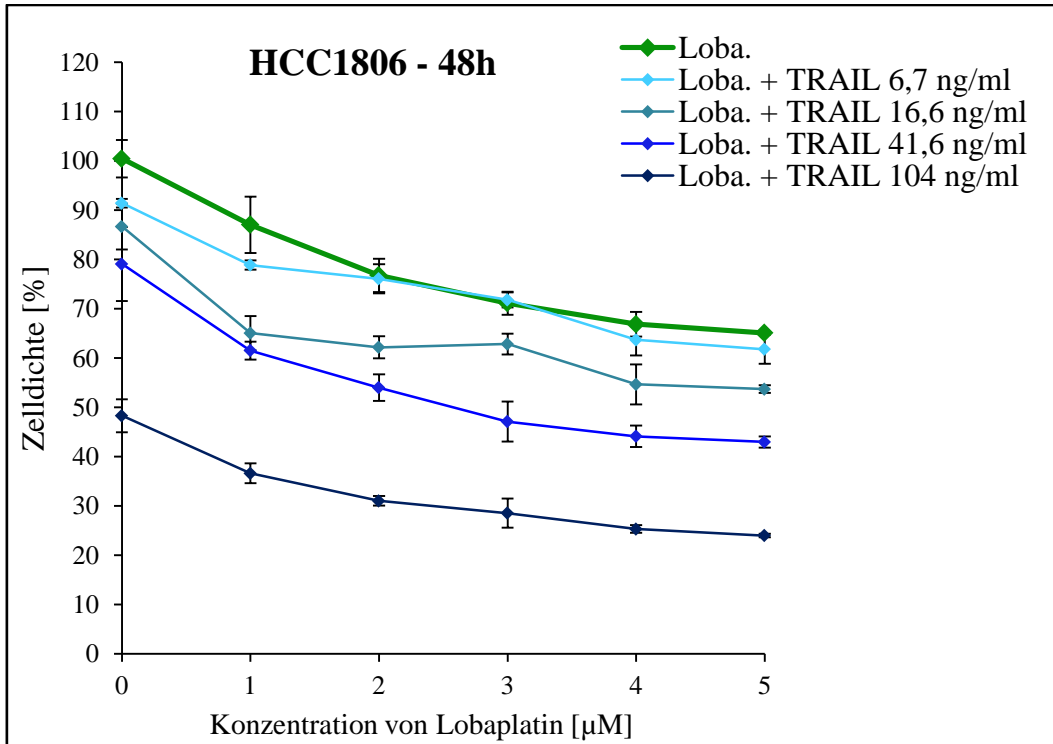
[Abb. 9: Zytotoxische Wirkung von Lobaplatin in Kombination mit Epirubicin und 5-Fluorouracil]

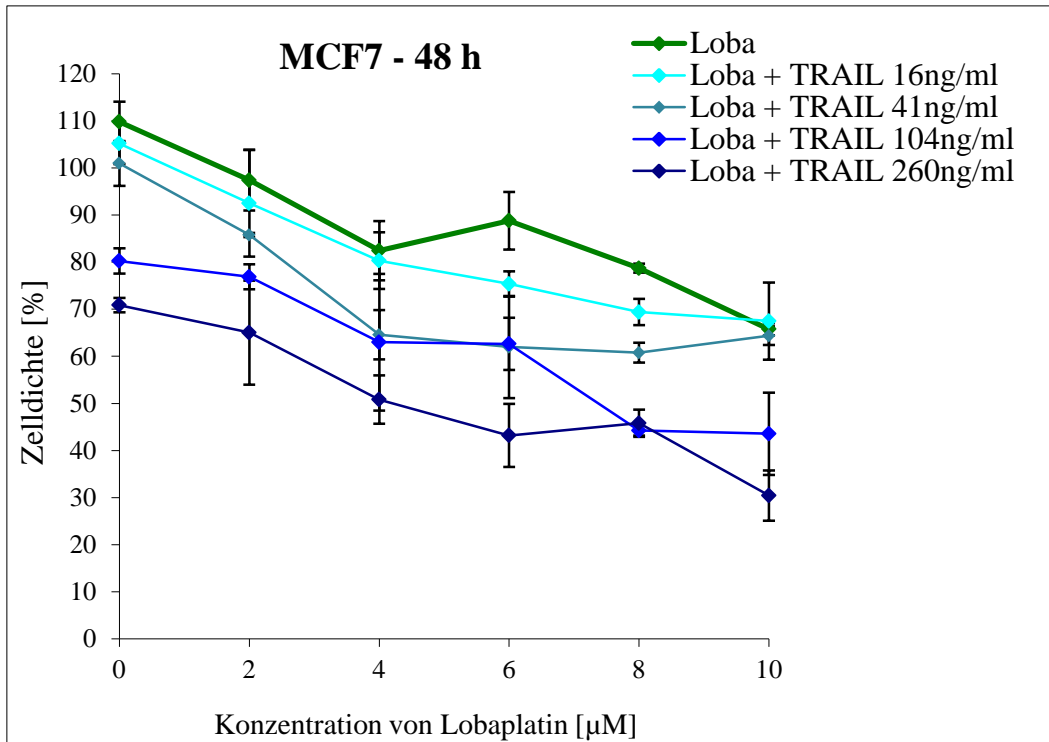
### 3.4.2 TRAIL

Die Kombination von Lobaplatin mit dem Todesliganden TRAIL (Tumor Necrosis Related Apoptosis Inducing Ligand) wurde an den drei Brustkrebszelllinien HCC1806, HCC1937 und MCF7 erprobt. Es wurden verschiedene Konzentrationen über 48 h verwendet. Der Todesligand alleine entfaltete gegenüber den HCC1806 Zellen die stärkste Wirkung mit einer LD50 von etwa 100 ng/ml nach 48 h. Die HCC1937 Zellen und die MCF7 Zellen zeigten ein deutlich schwächeres Ansprechen auf TRAIL mit 70 - 80 % Zellüberleben gegenüber einer Dosis von 260 ng/ml nach 48 h. Bei allen



Zelllinien ließen sich durch eine Kombination von Lobaplatin mit TRAIL stärkere Effekte erzielen, als durch Behandlung mit den einzelnen Zytostatika. Die Dosiswirkungskurven von Lobaplatin wurden durch Zugabe von TRAIL parallel nach unten verschoben. Dies lässt ein subadditives bis additives Zusammenwirken der beiden Substanzen gegenüber den verwendeten Zelllinien vermuten.



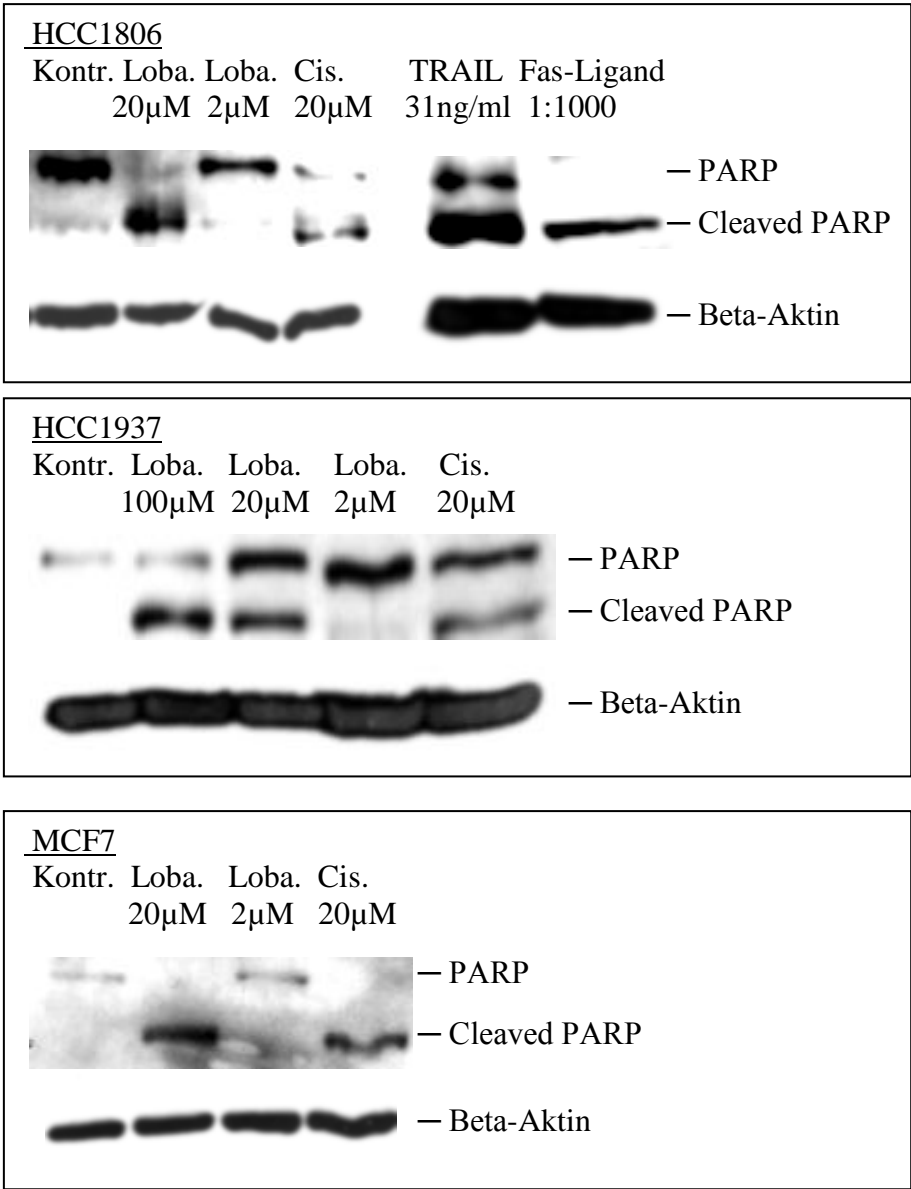


[Abb. 10: Zytotoxische Wirkung von Lobaplatin in Kombination mit TRAIL]

### 3.5 Wirkmechanismen von Lobaplatin

#### 3.5.1 Spaltung von PARP

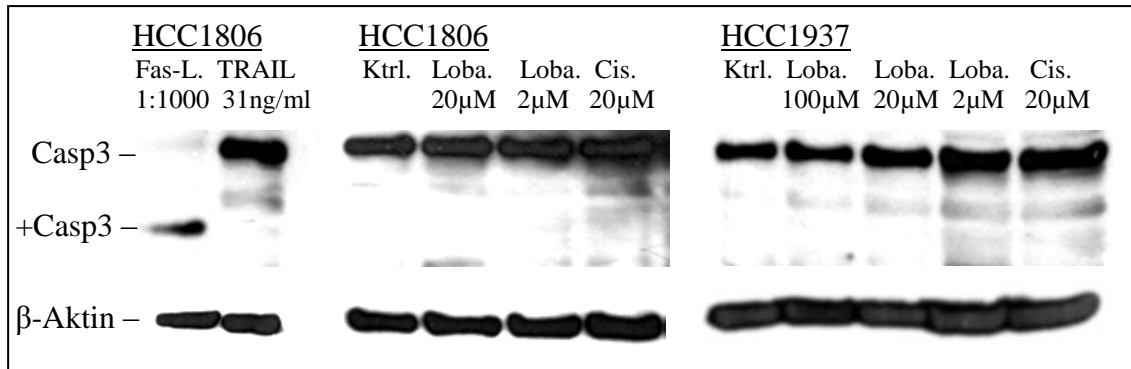
Die Spaltung der poly ADP Ribose Polymerase (PARP) wurde mittels Western Blot untersucht (Abb. 11). Die Zelllinien HCC1806, HCC1937 und MCF7 wurden über 24h mit Lobaplatin und Cisplatin vorbehandelt. Die apoptotisch wirksamen Substanzen TRAIL und Mega-Fas-Ligand dienen als Positivkontrolle. Die HCC1806 Zellen zeigten sowohl nach Behandlung mit TRAIL und Mega-Fas-Ligand als auch nach Behandlung mit 20 µM Lobaplatin bzw. 20 µM Cisplatin eine Proteinbande bei 89 kDa, entsprechend einem durch Caspasen inaktivierten PARP. Diese Bande fand sich auch bei den MCF7 und den HCC1937 Zellen nach Behandlung mit 20 µM Lobaplatin, bzw. 20 µM Cisplatin. Unbehandelte Zellen und mit einer niedrigen Dosis von 2 µM Lobaplatin behandelte Zellen wiesen allein eine Bande bei 116 kDa auf. Dies entspricht dem aktiven Zustand der Polymerase. Von den HCC1937 Zellen wurde schließlich noch eine weitere Probe untersucht. Diese wurde mit 100 µM Lobaplatin vorbehandelt und ergab im Vergleich zu den anderen Proben eine besonders kräftige Bande des 89 kDa PARP-Fragmentes. Dies könnte Ausdruck einer stärkeren Caspasenaktivierung durch höhere Konzentrationen von Lobaplatin sein.



[Abb. 11: PARP Western Blot]

**3.5.2 Apoptose und Nekroptose**

Die Aktivierung der Caspase 3 im Rahmen der klassischen Apoptose wurde ebenfalls mittels Western Blot untersucht (Abb. 12). Nach Vorbehandlung mit Lobaplatin und Cisplatin ließ sich mit dem verwendeten Antikörper bei allen drei Zelllinien nur die inaktive Caspase 3 darstellen. Allein nach Vorbehandlung mit Mega-Fas-Ligand zeigten die HCC1806 Zellen eine Bande bei 17 kDa, entsprechend der aktivierten Caspase.

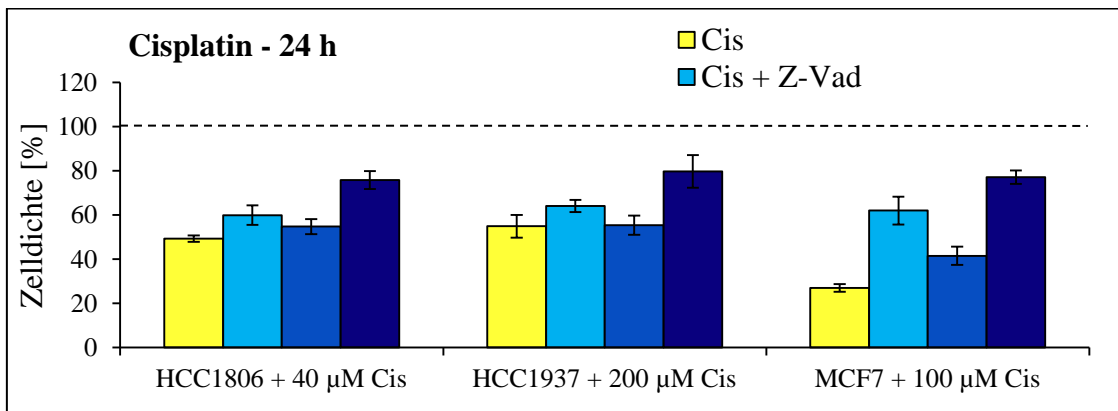
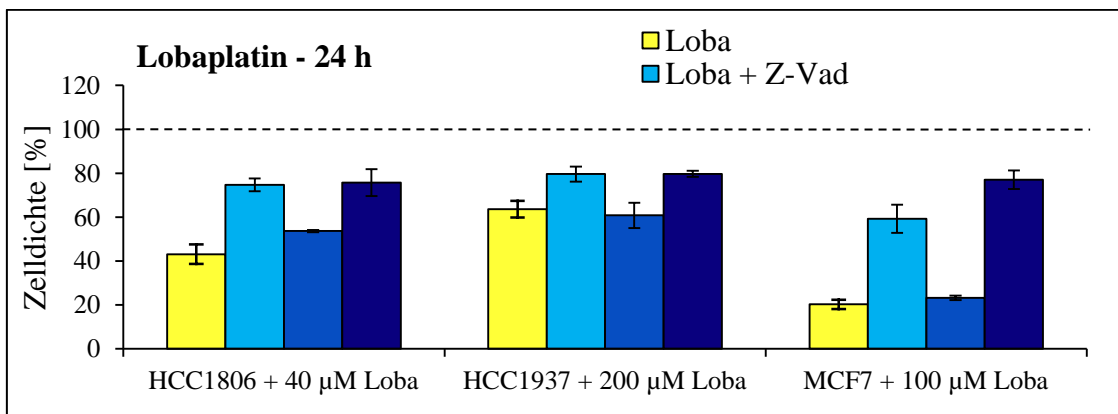
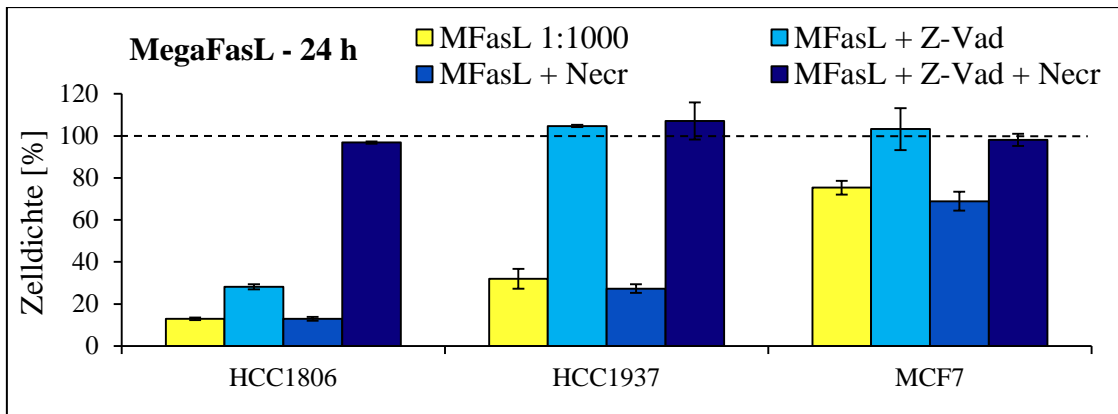
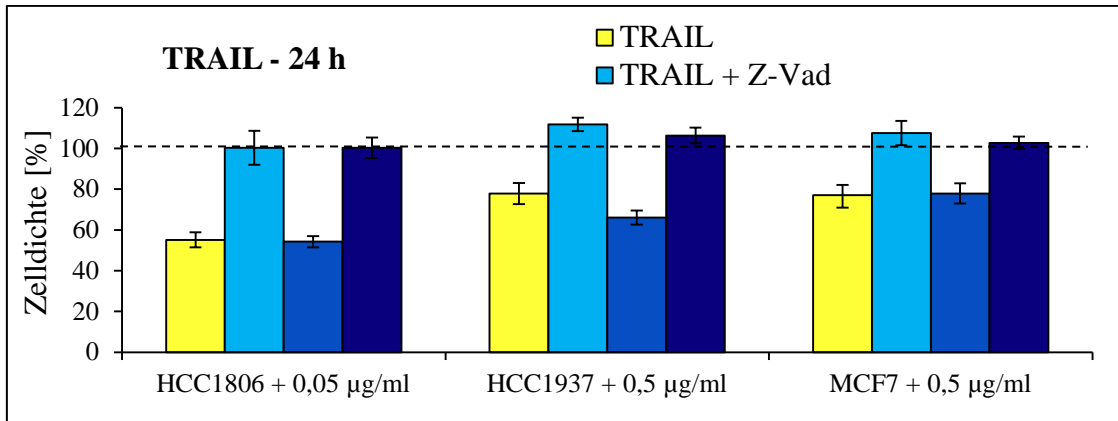


[Abb. 12: Caspase 3 Western Blot. Casp3 = inaktive Caspase 3, +Casp3 = aktive Caspase 3]

Darüberhinaus wurde geprüft, ob der Caspasen-Inhibitor Z-Vad und der Inhibitor der Necroptose, Necrostatin 1 den durch Lobaplatin bzw. Cisplatin induzierten Zelltod verhindern können. Die Zelllinien HCC1806, HCC1937 und MCF7 wurden für 24h mit den jeweils angegebenen Konzentrationen behandelt (Abb. 13). Z-Vad wurde in einer Konzentration von 30 µM und Necrostatin in einer Konzentration von 50 µM verwendet. Als Positivkontrollen wurden die Caspasen-aktivierenden Substanzen TRAIL und Mega-Fas-Ligand verwendet.

Gegenüber TRAIL zeigten die drei Zelllinien ein einheitliches Verhalten: Der Caspaseninhibitor hob die Wirkung des Todesliganden vollständig auf, das Necrostatin konnte die Zellen hingegen nicht schützen. Ebenso verhinderte der Caspaseninhibitor auch den zytotoxischen Effekt des Mega-Fas-Liganden gegenüber den HCC1937 und den MCF7 Zellen, während Necrostatin wiederum keinen Einfluß hatte. Interessanterweise konnten Caspaseninhibitor und Necrostatin jeweils einzeln die Wirkung des Mega-Fas-Liganden gegenüber den HCC1806 Zellen nicht maßgeblich verändern. Erst die Kombination aus Caspaseninhibitor und Necrostatin bot den Zellen einen vollständigen Schutz. Damit ist anzunehmen, dass die zytotoxische Wirkung des Mega-Fas-Liganden bei den HCC1806 Zellen, anders als bei den beiden anderen verwendeten Zelllinien nicht nur Caspasen vermittelt ist.

Necrostatin allein veränderte auch die Wirkung von Lobaplatin und Cisplatin an den verwendeten Zelllinien nicht signifikant. Die beiden triplenegativen Zelllinien zeigten nach Vorbehandlung mit Caspaseninhibitor gegenüber den Platinderivaten ein verbessertes Überleben mit einer Zunahme der Zelldichte um 10-25 %, jedoch konnte der Caspaseninhibitor die Zellen nicht vollständig schützen.



[Abb. 13: Lobaplatin, Cisplatin, TRAIL und MegaFasLigand mit Caspaseninhibitor Z-Vad und Necroptose-Inhibitor Necrostatin. ----- Hilfslinie bei 100 % Zelldichte]

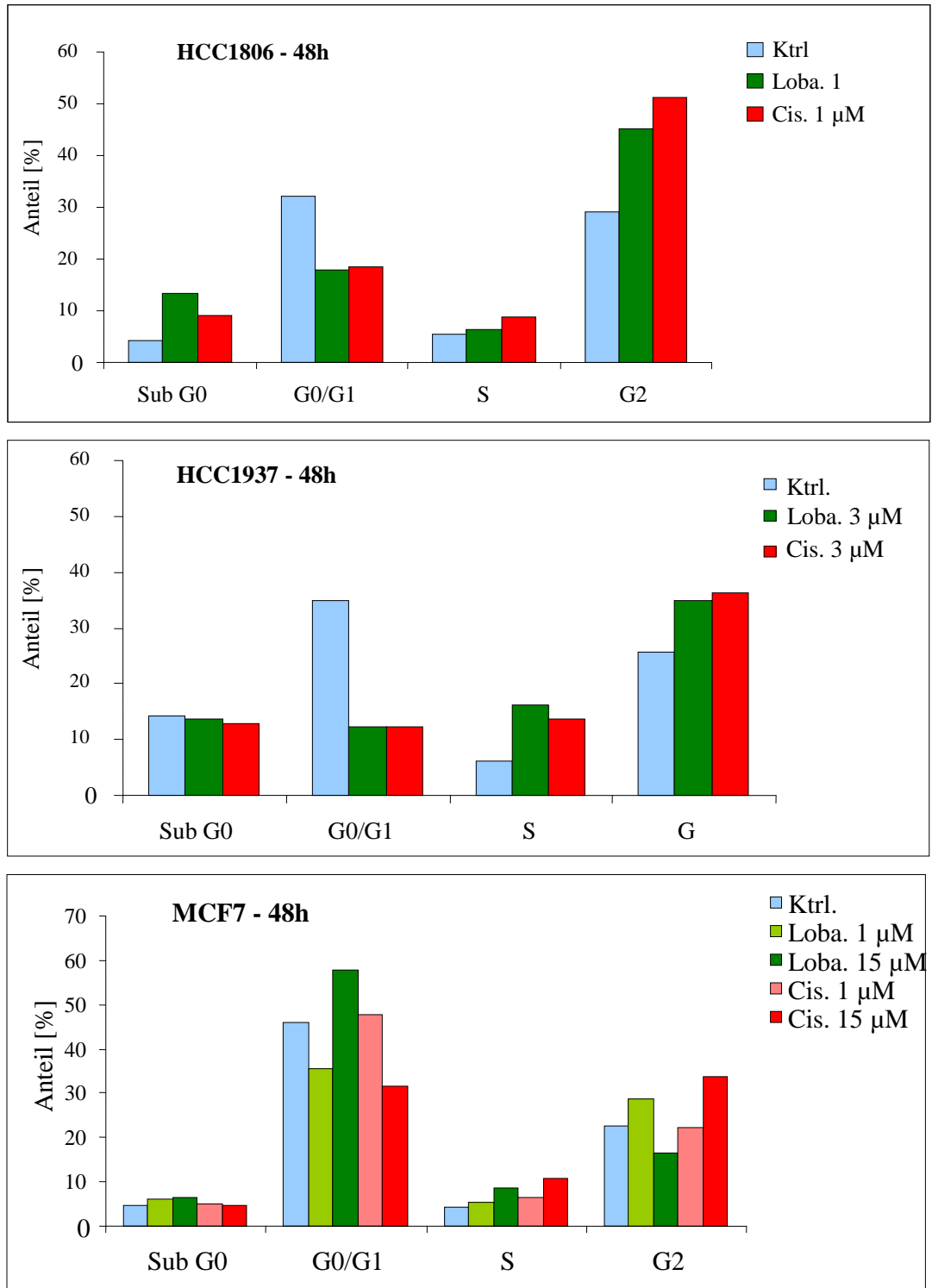
Der schützende Effekt wurde teilweise durch die Kombination von Caspaseninhibitor und Necrostatin verstärkt. Dies traf insbesondere gegenüber Cisplatin zu. Die MCF7 Zellen wurden insgesamt durch den Caspaseninhibitor besser, wenn auch nicht vollständig vor der Wirkung der Platinderivate geschützt und zeigten gleichfalls nach Vorbehandlung mit beiden Inhibitoren ein noch besseres Überleben. Diese Ergebnisse zeigen, dass Z-VAD-sensitive Proteasen an der zytotoxischen Wirkung der Platinderivate beteiligt sind, auch wenn sich die Aktivierung der Caspasen im Western Blot nicht nachweisen ließ. Allerdings müssen neben der klassischen Apoptose über die Caspasen-Aktivierung noch andere Mechanismen durch Lobaplatin und Cisplatin in Gang gesetzt werden. Diese Mechanismen werden weder durch den Caspaseninhibitoren noch durch das Necrostatin oder eine Kombination der beiden Inhibitoren vollständig blockiert.

### **3.5.3 Veränderungen des Zellzyklus**

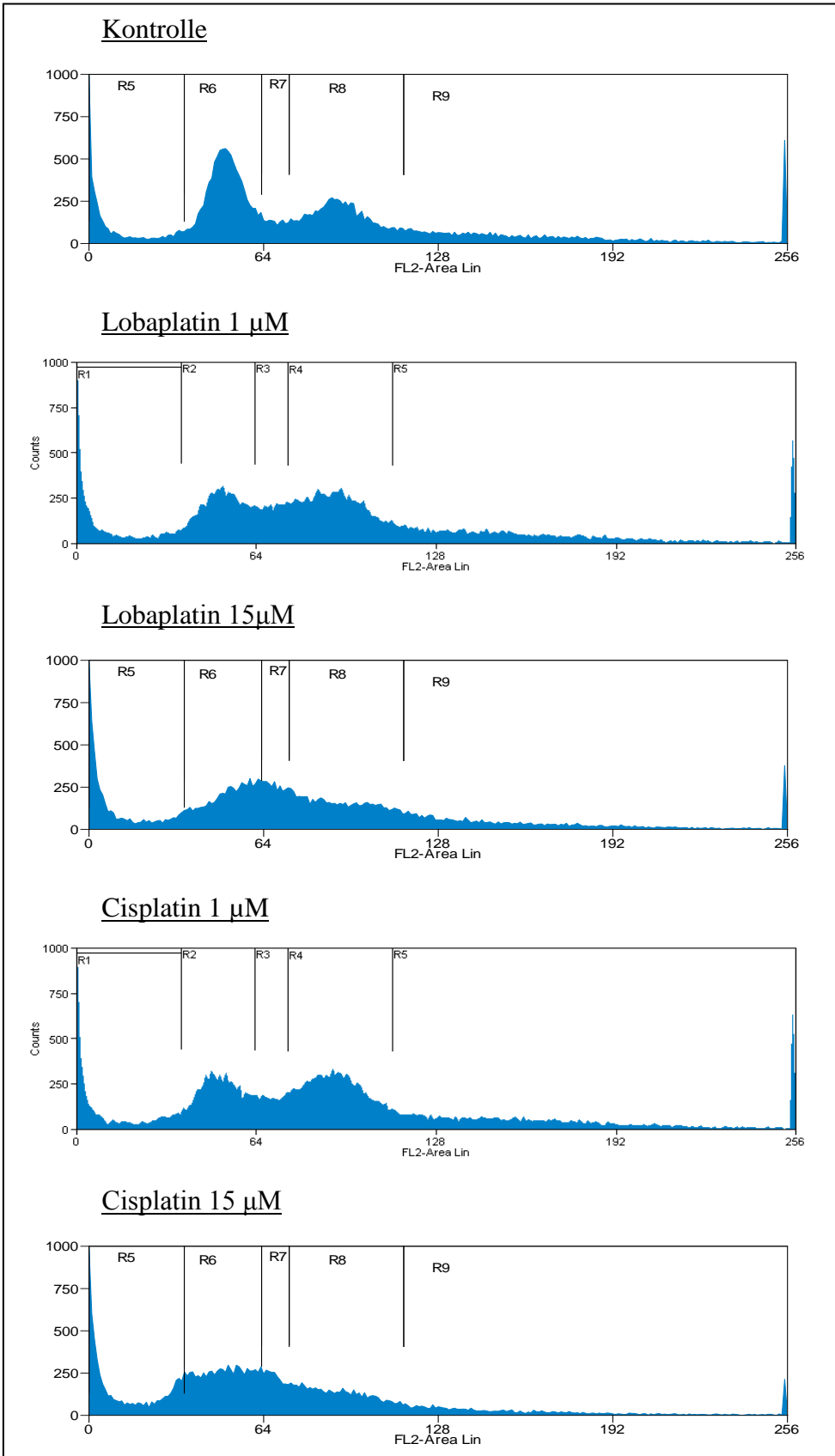
Mittels Propidiumjodidfärbung und durchflusszytometrischer Analyse wurde der Zellzyklus untersucht. Die drei Zelllinien wurden über 48 h mit Lobaplatin bzw. Cisplatin behandelt. Es wurde jeweils bestimmt, wie viele Zellen sich in welcher Phase des Zellzyklus befanden. Die Peaks, welche der G0/G1-Phase und der G2-Phase entsprachen, und die dazwischen befindliche S-Phase wurden per Hand mittels Balken eingegrenzt und zugeordnet. Die beobachteten Veränderungen des Zellzyklus bestätigten sich bei dreimaliger Wiederholung der Versuche. Die Ergebnisse wurden in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 14).

Unbehandelt zeigten die drei Zelllinien eine ähnliche Verteilung: die meisten Zellen befanden sich in der G0/G1-Phase, den zweitgrößten Anteil hatte die G2-Phase. Nur wenige Zellen befanden sich in der Sub-G0-Phase oder der S-Phase. Die Sub-G0-Gruppe wird als der apoptotische Anteil der Zellen verstanden. Die Behandlung mit den Platinderivaten erbrachte allerdings nahezu keine Zunahme an Zellen in der Sub-G0-Phase. Damit ließ sich die Induktion der Apoptose durch Lobaplatin und Cisplatin in diesem Versuch nicht nachweisen.

Die MCF7 Zellen zeigten bei Behandlung mit 1  $\mu$ M Lobaplatin eine Abnahme der G0/G1-Phase und eine Zunahme der G2-Phase. Nach Behandlung mit 15  $\mu$ M Lobaplatin – das entspricht etwa der LD50 (48 h) – finden sich hingegen mehr Zellen in



[Abb. 14: Veränderungen des Zellzyklus nach Behandlung mit Lobaplatin bzw. Cisplatin]



[Abb.15: Zellzyklusanalyse der HCC1937 Zellen, 48h vorbehandelt]



der G0/G1-Phase und weniger Zellen in der G2-Phase. Die Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Cisplatin erbrachte keine Veränderungen am Zellzyklus. Hier bestätigte sich der Eindruck, dass die MCF7 Zellen auf Cisplatin deutlich schwächer ansprechen, als auf Lobaplatin. Nach Behandlung mit 15  $\mu\text{M}$  Cisplatin fanden sich deutlich weniger Zellen in der G0/G1-Phase und dafür mehr Zellen in der S- und der G2-Phase.

Lobaplatin und Cisplatin führten in identischen Konzentrationen bei den HCC1806-Zellen und den HCC1937-Zellen jeweils zu sehr ähnlichen Veränderungen des Zellzyklus. Abb. 15 zeigt die lineare Darstellung des Zellzyklus der HCC1937-Zellen, unbehandelt und nach Vorbehandlung mit niedrigen und mit hohen Konzentrationen von Lobaplatin und Cisplatin. Dabei entspricht dem ersten Peak in der Kontrollgruppe die G0/G1-Phase, dem zweiten Peak entspricht die G2-Phase. Nach Behandlung mit den Platinderivaten in niedriger Konzentration fällt der erste Peak deutlich ab, während sich der zweite Peak verbreitert. Es befinden sich mehr Zellen in der G2-Phase und weniger Zellen in der G0/G1-Phase. Die Graphiken erwecken den Eindruck, dass auch der Anteil an Zellen in der S-Phase zunimmt. Der Abschnitt zwischen den beiden Peaks, welcher der S-Phase entspricht, lässt sich jedoch nicht eindeutig abgrenzen. Die HCC1806-Zellen zeigten nach Behandlung mit Lobaplatin und Cisplatin in niedriger Konzentration ebenfalls eine deutliche Abnahme der G0/G1-Phase zugunsten der G2-Phase. Nach Behandlung mit 15  $\mu\text{M}$  Lobaplatin bzw. 15  $\mu\text{M}$  Cisplatin entstand bei den beiden triplenegativen Zelllinien HCC1806 und HCC1937 ein Zellzyklus, in dem sich einzelne Peaks nicht mehr eindeutig erfassen ließen. Auch mit dem hierfür üblichen Auswertungsprogramm ModFit konnten die Zellzyklusphasen nicht sinnvoll identifiziert werden. Es ist zu vermuten, dass die Platinderivate in höheren Konzentrationen starke DNA-Schäden induzieren und somit die klassische Anordnung des Zellzyklus zunichte machen. In Abb. 15 findet sich ein verbreiteter und zugleich abgeflachter erster Peak, der in einen deutlich geschrumpften zweiten Peak übergeht. Ähnliche Veränderung zeigen auch die HCC1806-Zellen. Möglicherweise entspricht dies einer Abnahme der G2-Phase und Zunahme der G0/G1-Phase.

#### **4 Diskussion**

Das triple-negative Mammakarzinom ist Hormonrezeptor- und HER2 negativ. Es hat eine ungünstigere Prognose, als Hormonrezeptorpositive Tumoren [9-16]. Das triple-negative Karzinom eignet sich weder für eine gezielte endokrine Therapie, noch für die Behandlung mit dem HER-2/neu Antikörper Trastuzumab. Die Patientinnen sind neben der Operation und Bestrahlung auf eine systemische Therapie mit geeigneten Zytostatika angewiesen. Von der zytostatischen Therapie werden eine starke Antitumor-Wirkung und anhaltende Vermeidung von Resistenzen bei möglichst geringen Nebenwirkungen gefordert. Platinhaltige Therapieregime werden in klinischen Studien eingesetzt, da Cisplatin derzeit zu den wirksamsten Zytostatika zählt. Einige Autoren fassen die Ergebnisse von Untersuchungen am fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinom zusammen [43-46]. Vorbehandelte Patientinnen sprechen dabei kaum auf Cisplatin und seine Derivate an. Die Monotherapie mit Cisplatin erbringt nur in sehr hohen Dosen eine nennenswerte Aktivität. Die Kombinationstherapie klassischer Brustkrebstherapeutika mit Cisplatin oder Carboplatin führt bei nicht vorbehandelten Patientinnen überwiegend zu guten Erfolgen. Triple-negative Tumoren zeigen im Vergleich zu nicht triple-negativen Tumoren ein besseres Ansprechen auf Cisplatin und Carboplatin [47-49], aber auch auf Zytostatika im Allgemeinen [18, 50, 51]. Platinhaltige Kombinationen haben beim fortgeschrittenen und beim triple-negativen Mammakarzinom eine gute, aber nicht eindeutig bessere Wirkung, als andere Kombinationsregime [43, 46, 48, 52, 53]. Der Anteil, den die einzelnen Kombinationspartner zu der Gesamtwirkung beitragen, lässt sich nur schwer ermessen. Überlegungen zum Gebrauch platinhaltiger Substanzen beim Mammakarzinom stehen die gravierenden Nebenwirkungen, insbesondere von Cisplatin entgegen. Cisplatin hat viele unerwünschte Wirkungen und keinen nachweisbaren Benefit bei der Behandlung von Brustkrebs. Es findet in den gegenwärtigen Leitlinien keine Erwähnung [4]. Smith et al. [43] empfahlen deshalb schon 1992 die Suche nach geeigneten nebenwirkungsarmen Platinderivaten zur Behandlung des fortgeschrittenen Mammakarzinoms. Lobaplatin wurde 1989 von Schumacher et al synthetisiert [26] und zeichnet sich durch ein günstiges Nebenwirkungsprofil aus [30-40]. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Lobaplatin an zwei triple-negativen und einer hormonrezeptor-positiven Brustkrebszelllinie untersucht.

Um die beiden triple-negativen Zelllinien eindeutig voneinander zu unterscheiden, wurde ein Ausschnitt aus der genomischen DNA sequenziert. Eine spezifische Mutation im BRCA1 Gen wurde nur bei den HCC1937 Zellen, nicht jedoch bei den HCC1806 Zellen nachgewiesen. Tomlinson et al [54] charakterisierten 1998 die HCC1937 Zelllinie und beschrieben die entsprechende Insertion im Exon 20 des BRCA1 Gens sowie weitere genetische Veränderungen. Sie stellten fest, dass das p53 Gen der Zellen ebenfalls mutiert ist. In unseren Versuchen konnte bei den beiden triple-negativen Zelllinien kein aktives intaktes p53 Gen nachgewiesen werden. Nur die MCF7 Zellen zeigten eine messbare Aktivität des p53 Gens. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit bereits beschriebenen p53 Gen-Mutationen bei HCC1806 und HCC1937 Zellen, bzw. dem beschriebenen p53 Wildtypstatus der MCF7 Zellen [54, 55]. Das p53 Gen ist vermutlich das bekannteste Tumorsuppressorgen überhaupt. Verschiedene Formen von zellulärem Stress, insbesondere DNA-Schäden, führen zu einer p53-Aktivierung. In der Folge kommt es zum Zellzyklusarrest, bei irreparablen DNA-Schäden wird die Apoptose eingeleitet. 20 – 35 % aller Mammakarzinome tragen ein mutiertes p53-Gen [54, 56]. Lobaplatin und Cisplatin wirken vermutlich hauptsächlich über die Bildung von DNA-Querverbindungen und die daraus resultierende Schädigung der DNA [22, 23, 56]. Ein Zusammenhang zwischen dem p53-Status der verwendeten Zelllinien und der Sensitivität der Zelllinien gegenüber Lobaplatin und Cisplatin wäre denkbar. Um dieser Frage genauer nachzugehen, könnte man in die HCC1937 und HCC1806 Zellen ein induzierbares (z.B. temperaturabhängiges) p53-Gen einbringen. Die Transfektion mit einem Wildtyp p53-Gen ist hingegen problematisch, da eine hohe p53-Aktivität zum Zellteilungsarrest führen kann [57]. Anschließend ließe sich die zytotoxische Wirkung von Lobaplatin und Cisplatin auf die Zellen mit induzierbarem Gen einerseits und mutiertem Gen andererseits direkt vergleichen. In der Literatur werden solche Studien erwähnt. Dabei sprachen Zellen mit einem transferierten p53 Gen besser auf Cisplatin an [58, 59]. In anderen Untersuchungen führte hingegen der Verlust des funktionierenden p53 Gens zu einer stärkeren Zytotoxizität von Cisplatin und zunehmender Nekrose [60, 61]. Hier könnte ein p53 vermittelter Arrest des Zellzyklus die Zellen geschützt haben (s.u.). Verschiedene in vitro und in vivo Studien kommen somit zu widersprüchlichen Ergebnissen [62-64]. Die Kenntnis von vorhandenen p53-Mutationen ist deshalb interessant, erlaubt jedoch bislang keine

Vorhersagen über die Wirkung von platinhaltigen Substanzen oder anderen DNA-schädigenden Zytostatika.

Ein wichtiges Anliegen unserer Versuche war es, das Ansprechen der drei Brustkrebszelllinien auf Lobaplatin und Cisplatin zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden anhand von Kristallviolettassays LD50 Werte über 24 h, 48 h und 72 h ermittelt. Lobaplatin zeigte eine ähnliche Antitumor-Aktivität wie Cisplatin und war gegenüber den MCF7 Zellen sogar um das dreifache stärker wirksam als Cisplatin. Dies bestätigt die Ergebnisse zweier Studien von 1990 und 1993 an verschiedenen Zelllinien, die Lobaplatin jeweils eine sehr gute, dem Cisplatin vergleichbare Wirksamkeit *in vitro* bescheinigten [28, 29]. In unseren Versuchen zeigten die MCF7 Zellen nur ein schwaches Ansprechen auf Cisplatin. Die ermittelten LD50 Werte waren drei- bis fünfmal höher als entsprechende Werte, die für diese Zelllinie in der Literatur angegeben werden [65-68]. Anstelle des Kristallviolettassays verwendeten die Autoren andere Methoden (SRB Assay, MTT Assay), um die Zytotoxizität von Cisplatin zu messen. Dies allein kann aber die erheblich unterschiedlichen Werte nicht erklären. Vermutlich haben die von uns verwendeten MCF7 Zellen bereits eine Resistenz gegenüber Cisplatin entwickelt, entweder durch Mutationen oder durch andere Anpassungsvorgänge. Für die beiden triple-negativen Zelllinien liegen bisher keine Vergleichswerte vor. Insgesamt kann man sagen, dass Lobaplatin gegenüber den verwendeten Zelllinien etwa genauso wirksam ist, wie Cisplatin. Darüberhinaus sprechen die besagten Cisplatin-resistenten MCF7 Zellen auf Lobaplatin deutlich besser an, als auf Cisplatin. Lobaplatin weist in diesen Zellen keine komplette Kreuzresistenz zu Cisplatin auf. Dies bestätigte sich auch in Untersuchungen an der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 und ihrer Variante A2780cis. Die A2780cis Zellen wurden im Voraus ansteigenden Konzentrationen von Cisplatin ausgesetzt, bis sie eine zunehmende Resistenz gegen Cisplatin entwickelt haben. Sie eignen sich als Modell, um Platinderivate auf eine mögliche Kreuzresistenz zu Cisplatin zu testen. In unseren Versuchen wirkte Lobaplatin etwa gleich gut auf die sensitiven und die resistenten Zellen, während Cisplatin gegenüber den resistenten Zellen deutlich schwächer wirksam war. Harstrick et al [29] beobachteten in ihren Untersuchungen, dass Lobaplatin gegenüber resistenten A2780cis ebenfalls, wenn auch abgeschwächt wirksam war. Sie deuteten dies als Fehlen einer kompletten Kreuzresistenz. Weitere *in vitro* Studien

konnten Lobaplatin ebenfalls eine gute Aktivität an verschiedenen, allerdings nicht an allen verwendeten Zelllinien mit bekannter Cisplatinresistenz nachweisen [28, 69, 70]. Voegeli et al [28] erzielten gute Erfolge auch in einem cisplatinresistenten Mausmodell. Vermutlich kann Lobaplatin einen Teil der vielfältigen Mechanismen umgehen, die an der Resistenz von Krebszellen gegenüber Cisplatin beteiligt sind. Eine genauere Untersuchung dieser Mechanismen wäre äußerst interessant, würde aber den Rahmen dieser Arbeit überschreiten. Leider erbrachte Lobaplatin in klinischen Studien an Patienten mit cisplatinresistenten Tumoren nur eine minimale Wirkung [33, 35]. Diese Studien beziehen sich jedoch auf fortgeschrittene, stark vorbehandelte Tumoren, die auf jegliche zytostatische Therapie zumeist kaum noch ansprechen. Zusammenfassend zeigt Lobaplatin eine gute Aktivität gegenüber verschiedenen cisplatinresistenten Zelllinien und am cisplatinresistenten Mausmodell, wenngleich sich dies in klinischen Studien bisher nicht bestätigt hat.

In der Behandlung vieler bösartiger Tumoren werden mittlerweile Kombinationen verschiedener Zytostatika verwendet. Die Gesamtwirkung mehrerer Substanzen ist einer Monotherapie mit nur einem Agens zumeist überlegen. Die Konzentrationen der einzelnen Zytostatika können reduziert werden. Dadurch lässt sich die Rate an unerwünschten Nebenwirkungen verringern. In dieser Arbeit wurden verschiedene Zytostatika mit Lobaplatin kombiniert. Verwendet wurden Paclitaxel, Epirubicin, 5-Fluorouracil, Vinorelbin sowie der Todesligand TRAIL. Paclitaxel ist ein Taxan, Epirubicin ein Anthrazyklin, 5-Fluorouracil ein Antimetabolit und Vinorelbin ein Vinkaalkaloid. Diese vier erstgenannten Substanzen finden häufige Verwendung in der Brustkrebstherapie. Eine in-vitro Studie von 1997 an zwei Zelllinien ergab für Cisplatin wie auch Lobaplatin in der Kombination mit 5-Fluorouracil eine gute Wirksamkeit. Die beiden Platinderivate unterschieden sich nicht hinsichtlich des Zusammenwirkens mit Fluorouracil [71]. Wir haben Lobaplatin in Kombinationen mit den einzelnen Zytostatika über 24 und 48 h an der triple-negativen Zelllinie HCC1806 erprobt. Leider ergab sich in dem kleinen Rahmen der Versuche kein Nachweis für eine Synergie der Substanzen. Allerdings beweisen die Ergebnisse umgekehrt auch nicht, dass die getesteten Zytostatika zu Synergien nicht fähig sind. Gegenüber verschiedenen Zelllinien, unter veränderten Bedingungen oder in verschiedenen Anwendungen z. B. nacheinander, getrennt und über unterschiedlich lange Inkubationszeiten zeigen

Kombinationen mehrerer Zytostatika in in-vitro Studien häufig ein sehr unterschiedliches Verhalten. Damit ergibt sich eine Vielzahl möglicher Versuchsanordnungen, die an dieser Stelle angedacht, jedoch nicht ausgeführt wurden, da sie von der eigentlichen Arbeit fort und ins Uferlose zu führen drohten.

1995 wurde ein neues Mitglied aus der Familie der humanen Tumornekrosefaktoren identifiziert und charakterisiert, der TNF-related apoptosis-Inducing ligand TRAIL [72]. TRAIL kann über spezielle Rezeptoren den programmierten Zelltod, die Apoptose einleiten [73]. Der Ligand richtet sich vorwiegend gegen entartete Zellen und induziert im gesunden Körpergewebe anscheinend keinen Zelltod [72, 74-76]. Möglicherweise ist TRAIL Bestandteil der körpereigenen Tumorabwehr. Die gezielte Antitumoraktivität und ein Minimum an Nebenwirkungen machen TRAIL zu einem äußerst attraktiven Medikament für die systemische Krebstherapie. Die Konzerne Genentech und Amgen produzieren rekombinantes humanes TRAIL unter dem Namen Dulanermin für den klinischen Gebrauch. Derzeit wird Dulanermin in Kombinationsregimen mit anderen Zytostatika in Phase I und Phase II Studien erprobt. Es zeigt bereits erste gute Ergebnisse und weist keine therapiebeschränkenden Nebenwirkungen auf [77, 78]. Zahlreiche in-vitro Studien beschäftigen sich mit der Suche nach Substanzen, die die Wirkung von TRAIL verstärken, bzw. die Tumorzellen für die Wirkung des Todesliganden sensitivieren. Hierfür scheinen Platinderivate mit ihrem DNA schädigenden und die Apoptose befördernden Effekt sehr geeignet. Synergien von Cisplatin und TRAIL konnten an verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden [79-89]. Durch die Vorbehandlung mit Cisplatin werden in den Tumorzellen vermehrt Caspasen aktiviert und TRAIL-Rezeptoren hochreguliert. Teilweise ist die Kombination von Cisplatin und TRAIL in der Lage, Resistenzen gegenüber TRAIL zu überwinden und dessen Wirksamkeit in resistenten Zellen wiederherzustellen [79-81, 87]. In unseren Versuchen haben wir gezeigt, dass auch Lobaplatin die Wirkung von TRAIL verstärken kann. TRAIL alleine war gegenüber der HCC1806 Zelllinie am wirksamsten. Die Wirkung des Todesliganden auf die HCC1937 und MCF7 Zellen war schwach und bestätigte entsprechende Versuchsergebnisse von Keane et al [90]. In den drei verwendeten Brustkrebszelllinien wurden durch die Kombination von Lobaplatin und TRAIL stärkere Effekte erzielt, als durch die Einzelsubstanzen. Eine additive Synergie von Lobaplatin und TRAIL konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, da wir auf

entsprechende Untersuchungen verzichtet haben. Zur Beurteilung von Synergien eignen sich verschiedene Methoden, wie z.B. die Darstellung der Dosiswirkung in einem Isobologramm [91]. Eine ausführliche Testung der Kombinationen von Lobaplatin mit TRAIL und anderen Zytostatika wäre wünschenswert.

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkungsweise von Lobaplatin hinterfragt. Platinderivate führen in erster Linie über eine Schädigung der DNA zum Zelltod. Seit der Entwicklung von Cisplatin vor 30 Jahren sind Forscher bemüht, den genauen Hergang zu erfassen, der sich von der Platinaufnahme in die Zellen bis hin zum Zelltod abspielt. Ein wesentlicher Endpunkt ist die Aktivierung der Caspasen [24, 92, 93]. Diese Enzyme aktivieren sich in einer Kaskade gegenseitig und führen den programmierten Zelltod, die Apoptose herbei. Zu diesem Zweck spalten die Caspasen verschiedene intrazelluläre Proteine. Die Caspasen 3 und 7 spalten unter anderem die Poly- (ADP-Ribose-) Polymerase PARP [94, 95]. Die gespaltenen PARP-Fragmente lassen sich mittels Western Blot nachweisen und eignen sich als indirekter Marker für Caspasenaktivierung und Apoptose. Wir konnten nach Inkubation mit Lobaplatin bzw. Cisplatin in den verwendeten Brustkrebszelllinien das gespaltene PARP nachweisen und damit zeigen, dass Caspasen (insbesondere die Caspase 3) an der zytotoxischen Wirkung von Lobaplatin und Cisplatin beteiligt sind. Leider gelang es nicht, die aktivierte Caspase 3 der HCC1806 und HCC1937 Zellen direkt im Western Blot darzustellen. Dies ist möglicherweise auf Mängel des spezifischen Antikörpers oder auf Fehler bei der Durchführung des Western Blots zurückzuführen. Bei der MCF7 Zelllinie sind hingegen eine Deletion im Exon 3 des Caspase-3 Gens und eine fehlende Caspase-3 Expression bekannt [96]. Der Begriff „Apoptose“ zur Bezeichnung des programmierten, kontrollierten Zelltodes wurde 1972 von Kerr et al eingeführt [97]. Man stellte der Apoptose die Nekrose als spontanen unkontrollierten Tod gegenüber und definierte diese beiden gegensätzlichen Todesarten anhand von bestimmten Veränderungen und Vorgängen in der Zelle, wie z.B. der Aktivierung von Caspasen im Rahmen der Apoptose. Inzwischen hat sich das Bild gewandelt. Es wurde gezeigt, dass aktivierte Caspasen nicht in jedem Fall den Zelltod herbeiführen, sondern auch an nicht-tödlichen Abläufen in der Zelle beteiligt sind [98, 99]. Das Nomenclature Committee on Cell Death [100] weist darauf hin, dass demnach die Caspasenaktivierung und die Spaltung von PARP nicht geeignet sind, die Apoptose zu definieren. Man könne beides

jedoch hinzuziehen, um die Apoptose zu diagnostizieren. Die Nekrose andererseits wird durchaus nicht mehr als völlig unkontrolliertes Geschehen verstanden. Wenn Caspasen blockiert werden, können Todesliganden wie z.B. TRAIL und der Fas-Ligand statt der Apoptose die Nekrose auslösen [100, 101]. Degterev et al [101] gaben diesem regulierten Zelltod mit den Charakterzügen der Nekrose den Namen Nekroptose. Hitomi et al [102] identifizierten verschiedene Schritte, die an der Regulierung der Nekroptose beteiligt sind. Sogenannte Necrostatine wurden entdeckt, die die RIP1 Kinase hemmen und die Nekroptose verhindern [101-104]. In der vorliegenden Arbeit interessierte uns die Bedeutung der Caspasen-abhängigen Apoptose und der Nekroptose für den Platin-induzierten Zelltod. Es wurde geprüft, wie weit der Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk und der Inhibitor der Nekroptose, Necrostatin 1 die zytotoxische Wirkung von Lobaplatin und Cisplatin aufheben. Bei der Betrachtung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass zVAD-fmk nicht nur ein breites Spektrum an Caspasen, sondern darüberhinaus auch andere Enzyme blockiert [100]. Neben der Caspasenaktivierung werden vermutlich weitere Prozesse in der Zelle durch zVAD-fmk gestört. Es zeigte sich, dass zVAD-fmk die Zellen nur unvollständig vor dem Platin-induzierten Zelltod schützen konnte. Necrostatin 1 allein schützte die Zellen überhaupt nicht. Gemeinsam führten die Inhibitoren zu einem zusätzlich verbesserten Überleben aller drei mit Cisplatin behandelten Zelllinien und der mit Lobaplatin behandelten MCF7 Zelllinie. Die zytotoxischen Effekte von Lobaplatin und Cisplatin werden somit durch die gemeinsame Wirkung der beiden Inhibitoren in unterschiedlichem Ausmaß gehemmt. Die Versuche zeigen jedoch, dass zVAD-fmk- (sowie Necrostatin-) empfindliche und -unempfindliche Wege an der zytotoxischen Wirkung beider Substanzen beteiligt sind, wobei sich die unterschiedlichen Signalwege komplementieren können und daher in Abwesenheit von Inhibitoren zumindest partiell redundant sind. Dies deckt sich mit Beschreibungen aus der Literatur, denen zu Folge die Cisplatin-induzierte Apoptose teilweise unempfindlich gegen zVAD-fmk bzw. unabhängig von Caspasen verläuft [105, 106]. Es wäre sicherlich interessant, weitere nekrotische und apoptotische Vorgänge in den Zellen nachzuweisen, um Apoptose, Nekrose und evt. Nekroptose besser trennen zu können. Vielleicht wird man unter anderem auch die Wirkungsweise von Platinderivaten besser verstehen, sobald über



regulierten und unregulierten Zelltod und die Rolle der Caspasen bei der ganzen Angelegenheit etwas mehr Klarheit besteht.

Noch bevor Zellen auf diese oder jene Weise sterben, haben sie Gelegenheit, innezuhalten und das Ausmaß einer möglichen Zellschädigung zu prüfen. Man teilt das alltägliche Leben der Zellen, den Zellzyklus, in verschiedene Phasen ein. In der S-Phase findet die Replikation bzw. Verdopplung der DNA statt, in der M-Phase kommt es zur Zellteilung. Die S-Phase folgt nach Abschluss der G1-Phase und wird von der G2-Phase abgelöst, die schließlich in die M-Phase übergeht. Am Übergang der einzelnen Phasen kann es zum Zellzyklusarrest kommen, wenn z.B. die Zell-DNA beschädigt ist. Die Zellen können daraufhin entweder ihre Erbinformation reparieren oder aber in die Apoptose gehen. Wir haben mittels Propidiumjodidfärbung und Durchflusszytometrie untersucht, wie Lobaplatin und Cisplatin den Zellzyklus verändern und blockieren. Die Zellen wurden jeweils für 48 h behandelt. Die beiden triple-negativen Zelllinien reagierten auf eine niedrigdosierte Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Lobaplatin oder Cisplatin jeweils mit einem Arrest in der G2-Phase. Nach Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  Lobaplatin bzw. Cisplatin war der Zellzyklus nicht mehr eindeutig beurteilbar, da er seine klassische Morphologie verloren hatte. Es erschien jedoch so, als ob sich die meisten Zellen in der G0/G1 Phase befänden (s. S --). Die MCF7 Zellen zeigten nach Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Lobaplatin ebenfalls einen G2-Arrest und nach Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  Lobaplatin eine eindeutige Blockade in der G0/G1-Phase, während sie auf Cisplatin deutlich schwächer reagierten und erst nach Behandlung mit 15  $\mu\text{M}$  Cisplatin eine Blockade in der G2-Phase aufwiesen. Dies steht im Einklang mit einem Artikel von Gümüs et al [65], die nach Behandlung der MCF7 Zelllinie mit 20  $\mu\text{M}$  Cisplatin über 72 h, also in etwas höherer Konzentration über eine längere Wirkdauer, ebenfalls einen G2-Arrest beobachteten. Zu den platinbedingten Zellzyklusveränderungen der beiden triple-negativen Zelllinien liegt bisher keine Veröffentlichung zum Vergleich vor. Hingegen finden die verwendeten Methoden entschiedene Kritik: Vaisman et al [107] weisen darauf hin, dass sich die S-Phase nach einfacher Propidiumjodid-Färbung nicht von den übrigen Zellzyklus-Phasen abgrenzen lässt und in entsprechenden Studien unterschätzt wird. Erst durch eine zusätzliche Bromodesoxyuridin (BrdU)-Markierung der Zellen tritt die S-Phase in ihrem wahren Umfang deutlich zu Tage. Dann wird auch ein Arrest in der S-Phase sichtbar. In der vorliegenden Arbeit wurde keine BrdU-Markierung

verwendet. Für die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus gebräuchliche Computerprogramme (ModFit) waren auf unsere Daten nicht anwendbar. Folglich haben unsere Versuchsergebnisse nur eine begrenzte Aussagekraft. Die beobachteten Tendenzen, nämlich zunächst ein platinbedingter G2-Arrest und in hohen Konzentrationen ein zunehmender G1-Arrest, finden dennoch breite Unterstützung in der Literatur. Die meisten Autoren beschreiben nach Cisplatinbehandlung unterschiedlicher Krebszelllinien *in vitro* eine Verzögerung des Zellzyklus in der S-Phase [93, 107, 110-113] und eine Blockade in der G2-Phase, die mit steigender Platinkonzentration irreversibel wird [65, 93, 107-114 u.a.]. Teilweise kommt es nach Behandlung mit hochdosiertem Cisplatin zu einer Blockade in der G0/G1-Phase [93, 107, 111-113, 115]. Die Bedeutung der Zellzyklusveränderungen wird unterschiedlich interpretiert. Siddik et al [93] weisen auf verschiedene Studien hin, die durch eine Ausschaltung des G2-Arrests die Zytotoxizität von Cisplatin steigern konnten. Die Autoren schließen daraus, dass ein Zellzyklusarrest die Zellen vor der Apoptose schützt. Dies gilt natürlich nur, solange platininduzierte DNA-Schäden reparabel sind. Der Zellzyklusarrest führt entweder zur Reparatur der vorhandenen Schäden oder zum Zelltod, und kann damit die Wirkung von Cisplatin einerseits abschwächen, andererseits verstärken, ähnlich wie auch das intakte p53 Gen die Zellen schützt, oder ins Verderben führt, indem es ja Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose mitverwaltet (s.o.). Zellzyklusveränderungen und Zelltod sind auf eine komplizierte Weise miteinander verstrickt und von der Schwere der Zellschäden, bzw. zusätzlichen Schäden z.B. durch andere Zytostatika, der Versorgungslage (Medium, Temperatur etc.) und dem vorhandenen Rüstzeug (p53 u.a.) abhängig. Insgesamt machen unsere Untersuchungen und auch der gegenwärtige Stand der Forschung deutlich, dass Lobaplatin und Cisplatin zwar immer dieselbe Prügel austeilen - DNA-Querverbindungen und Strangbrüche -, jede Zelllinie damit jedoch nach ihrem Vermögen etwas anders umgeht.

## 5 Zusammenfassung

Das triple-negative Mammakarzinom ist Hormonrezeptor- und HER2 negativ und mit einer ungünstigen Prognose verbunden. Triple-negative Patientinnen sind unempfindlich gegen die endokrine Therapie und den HER-2/neu Antikörper Trastuzumab und deshalb auf die zytostatische Chemotherapie angewiesen. Lobaplatin ist ein Platinderivat mit wenigen Nebenwirkungen und guter Antitumorwirkung *in vitro* und deshalb möglicherweise auch für die Behandlung triple-negativer Tumoren geeignet.

Für die vorliegende Arbeit haben wir zwei triple-negative und eine klassische Brustkrebszelllinie verwendet. Die beiden triple-negativen Zelllinien wurden anhand einer vorbeschriebenen Mutation identifiziert, um eine Verwechslung auszuschließen. Die Aktivität des p53 Gens wurde in allen drei Zelllinien überprüft, ein aktives p53 Gen jedoch nur in der hormonrezeptor-positiven MCF7 Zelllinie nachgewiesen. Ein Zusammenhang zwischen p53 Status und Ansprechen der Zellen auf Lobaplatin oder Cisplatin konnte nicht belegt werden.

Wir haben die zytotoxische Wirkung von Lobaplatin und Cisplatin verglichen. Lobaplatin war in unseren Untersuchungen ähnlich wirksam wie Cisplatin und bei der Behandlung der MCF7 Zelllinie und einer Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinomzelllinie sogar dem Cisplatin überlegen. Lobaplatin wies in diesen Zellen keine komplette Kreuzresistenz zu Cisplatin auf.

In einem nächsten Schritt wurden unterschiedliche Zytostatika mit Lobaplatin kombiniert. Additive Synergien zwischen den einzelnen Substanzen konnten nicht bewiesen werden, jedoch war ein gutes Zusammenwirken von Lobaplatin und dem in der klinischen Erprobung befindlichen Todesliganden TRAIL zu erkennen.

Mittels Nachweis von Spaltprodukten haben wir gezeigt, dass Lobaplatin und Cisplatin eine Aktivierung von Caspasen bewirken. Die aktivierte Caspase 3 konnte allerdings nicht dargestellt werden. Die Begriffe Apoptose und Nekroptose wurden diskutiert und eine Beteiligung beider Prozesse an der Wirkung von Lobaplatin und Cisplatin nachgewiesen. Veränderungen des Zellzyklus wurden untersucht. Die beiden Platinderivate führten zu einem Arrest in der G2-Phase und in höheren Konzentrationen

teilweise zu einem G1-Arrest. Insgesamt sind an der zytotoxischen Wirkung von Lobaplatin und Cisplatin und der Entscheidung über Leben oder Tod viele wichtige Mechanismen in wechselnder Rangfolge beteiligt.

In unseren Versuchen an zwei triple-negativen und einer klassischen Brustkrebszelllinie erweist sich Lobaplatin als ebenbürtiger Nachfahre des Cisplatin mit einer vergleichbaren Zytotoxizität, weniger schwerwiegenden Nebenwirkungen und der Fähigkeit, vorhandene Cisplatinresistenzen teilweise zu umgehen. Lobaplatin verspricht darüber hinaus in Kombination mit anderen Zytostatika interessante therapeutische Perspektiven, die bisher nur unzureichend erprobt sind.

## **6 Literaturverzeichnis**

### **1. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg).**

Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends.

6. überarbeitete Auflage. Berlin, 2008.

### **2. Robert-Koch-Institut (Hrsg).**

Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 25 Brustkrebs.

Berlin, 2005.

### **3. Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn.**

Sterbefälle für die häufigsten Todesursachen (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) ab 1998. Region: Deutschland. Alter: Alle Altersgruppen. Geschlecht: Weiblich. Top: 10. Vergleichsgruppe: 2007.

[www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de)

### **4. Informationszentrum für Standards in der Onkologie (ISTO), Deutsche Krebsgesellschaft e.V.**

Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.

1. Aktualisierung. München, 2008.

### **5. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ.**

Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005.

Ann Oncol. 2005;16:1569-1583.

### **6. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF.**

American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:118-145.

**7. Diaz LK, Cryns VL, Symmans WF, Sneige N.**

Triple Negative Breast Carcinoma and the Basal Phenotype: From Expression Profiling to Clinical Practice.

*Adv Anat Pathol.* 2007;14:419–430.

**8. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D.**

Molecular portraits of human breast tumours.

*Nature.* 2000;406:747–752.

**9. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V.**

Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype : A population-based study from the California cancer Registry.

*Cancer.* 2007;109:1721-1728.

**10. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC.**

Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study.

*JAMA.* 2006;295:2492-2502.

**11. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO.**

Prognostic Markers in Triple-Negative Breast Cancer.

*Cancer.* 2007;109:25-32.

**12. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN.**

Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival.

Clin Med Res. 2009;7:4-13.

**13. Kaplan HG, Malmgren JA, Atwood M.**

T1N0 Triple Negative Breast Cancer: Risk of Recurrence and Adjuvant Chemotherapy.

Breast J. 2009;15:454-460.

**14. Kaplan HG, Malmgren JA.**

Impact of Triple Negative Phenotype on Breast Cancer Prognosis.

Breast J. 2008;14:456-463.

**15. Umemura S, Takekoshi S, Suzuki Y, Saitoh Y, Tokuda Y, Osamura RY.**

Estrogen receptor-negative and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer tissue have the highest Ki-67 labeling index and EGFR expression: gene amplification does not contribute to EGFR expression.

Oncol Rep. 2005;14:337-343.

**16. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA.**

Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence.

Clin Cancer Res. 2007;13:4429-4434.

**17. Cleator S, Heller W, Coombes RC.**

Triple-negative breast cancer: therapeutic options.

Lancet Oncol. 2007;8:235-244.

**18. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM.**

The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes.

Clin Cancer Res. 2007;13:2329-2334.

**19. List of clinical trials involving triple negative patients.**

[www.tnbcfoundation.org/clinicaltrials.htm](http://www.tnbcfoundation.org/clinicaltrials.htm)

**20. Lebowitz D, Canetta R.**

Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: an Historical Perspective and an Update.

Eur J Cancer. 1998;34:1522-1534.

**21. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T.**

Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode.

Nature. 1965;205:698-699.

**22. Eastman A.**

Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. Biochemistry. 1986;25:3912-3915.

**23. Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J.**

Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation.

Biochemistry. 1985;24:707-713.

**24. Wang D, Lippard SJ.**

Cellular processing of platinum anticancer drugs.

Nat Rev Drug Discov. 2005;4:307-320.

**25. Voigt W, Dietrich A, Schmoll HJ.**

Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz. Cisplatin und seine Analoga.

Pharmazie in unserer Zeit. 2006;35:134-143.



**26. Schumacher W, Respondek J, Engel J, Hitzel-Zerrahn F, Voegeli R, Pohl J, Hilgard P.**

Synthesis and pharmacological activity of cyclobutane-platinum (II) complexes.

22. Hauptversammlung / Gesellschaft Deutscher Chemiker. VCH, Weinheim.

1989, S. 163.

**27. Aeterna Zentaris.**

Lobaplatin Product Sheet.

[www.aeternazentaris.com](http://www.aeternazentaris.com)

**28. Voegeli R, Schumacher W, Engel J, Respondek J, Hilgard P.**

D-19466, a new cyclobutane-platinum complex with antitumor activity.

J Cancer Res Clin Oncol. 1990;116:439-442.

**29. Harstrick A, Bokemeyer C, Scharnofkse M, Hapke G, Reile D, Schmoll HJ.**

Preclinical activity of a new platinum analogue, lobaplatin, in cisplatin-sensitive and -resistant human testicular, ovarian, and gastric carcinoma cell lines.

Cancer Chemother Pharmacol. 1993;33:43-47.

**30. Gietema JA, Guchelaar HJ, de Vries EG, Aulenbacher P, Sleijfer DT, Mulder NH.**

A phase I study of lobaplatin (D-19466) administered by 72 h continuous infusion.

Anticancer Drugs. 1993;4:51-55.

**31. Gietema JA, de Vries EG, Sleijfer DT, Willemse PH, Guchelaar HJ, Uges DR, Aulenbacher P, Voegeli R, Mulder NH.**

A phase I study of 1,2-diamminomethyl-cyclobutane-platinum (II)-lactate (D-19466; lobaplatin) administered daily for 5 days.

Br J Cancer. 1993;67:396-401.

**32. Gietema JA, Veldhuis GJ, Guchelaar HJ, Willemse PH, Uges DR, Cats A, Boonstra H, van der Graaf WT, Sleijfer DT, de Vries EG, Mulder NH.**

Phase II and pharmacokinetic study of lobaplatin in patients with relapsed ovarian cancer.

Br J Cancer. 1995;71:1302-1307.

**33. Degardin M, Armand JP, Chevallier B, Cappelaere P, Lentz MA, David M, Roché H.**

A clinical screening cooperative group phase II evaluation of lobaplatin (ASTA D-19466) in advanced head and neck cancer.

Invest New Drugs. 1995;13:253-255.

**34. Sternberg CN, de Mulder P, Fossa S, Kaye S, Roberts T, Pawinsky A, Daamen S.**

Lobaplatin in advanced urothelial tract tumors. The Genitourinary Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC).

Ann Oncol. 1997;8:695-696.

**35. Kavanagh JJ, Edwards CL, Freedman RS, Finnegan MB, Balat O, Tresukosol D, Burk K, Loechner S, Hord M, Franklin JL, Kudelka AP.**

A trial of lobaplatin (D-19466) in platinum-resistant ovarian cancer.

Gynecol Oncol. 1995;58:106-109.

**36. Jung P, Bachmann P, Burk K, Jakse G.**

Lobaplatin in combination with methotrexate and vinblastine in patients with transitional cell carcinoma of the urinary tract--a pilot phase I/(II) study.

Eur J Cancer. 1995;31:1891-1892.

**37. Fiebig HH, Henß H, Mross K, Meyberg F, Aulenbacher P, Burk K, Queißer W.**

Phase I Clinical Trial of Lobaplatin (D-19466) after Intravenous Bolus Injection.

Onkologie. 1994;17:142-148.

**38. Fiebig HH, Henß H, Pawet I, Gatzemeier U, Manegold C, Edler L, Berde W.**

Phase II Clinical Trial of Lobaplatin (D-19466) in Pretreated Patients with Small-Cell Lung Cancer.

Onkologie. 1996;19:328-332.

**39. Schmoll HJ, Kohne CH, Papageorgiou E, Luft S, Harstrick A, Bachmann P, Hilgard P, Schubert U.**

Single agent lobaplatin is active in patients with esophageal squamous cell carcinoma.

Proc Am Soc Clin Oncol. 1995;14:201.

**40. Manegold C, Drings P, Gatzemeier U, Pawel J, Fiebig HH, Queißer W, Edler L.**

Lobaplatin (D-19466) in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Trial of the Association for Medical Oncology (AIO) Phase II Study Group.

Onkologie. 1996;19:248-251.

**41. Welink J, Boven E, Vermorken JB, Gall HE, van der Vijgh WJ.**

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lobaplatin (D-19466) in patients with advanced solid tumors, including patients with impaired renal or liver function.

Clin Cancer Res. 1999;5:2349-2358.

**42. Kroupis C, Christopoulos K, Devetzoglou M, Tsiagas I, Lianidou ES.**

Asymmetric real-time PCR detection of BRCA1 5382insC mutation by melting curve analysis in the LightCycler.

Clin Chim Acta. 2008;390:141-144.

**43. Smith IE, Talbot DC.**

Cisplatin and its analogues in the treatment of advanced breast cancer: a review.

Br J Cancer. 1992;65:787-793.

**44. Martín M.**

Platinum compounds in the treatment of advanced breast cancer.

Clin Breast Cancer. 2001;2:190-208.

**45. Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ.**

Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status.

Cancer Treatment Reviews. 2004;4:53-81.

**46. Carrick S, Gherzi D, Wilcken N, Simes J.**

Platinum containing regimens for metastatic breast cancer (Review).

The Cochrane Library. 2008, Issue 4.

**47. Frasci G, D'Aiuto G, Comella P, Thomas R, Botti G, Di Bonito M, De Rosa V, Iodice G, Rubulotta MR, Comella G; Southern Italy Cooperative Oncology Group (SICOG).**

Weekly cisplatin, epirubicin, and paclitaxel with granulocyte colony-stimulating factor support vs triweekly epirubicin and paclitaxel in locally advanced breast cancer: final analysis of a sicog phase III study.

Br J Cancer. 2006;95:1005-1012.

**48. Sirohi B, Arnedos M, Popat S, Ashley S, Nerurkar A, Walsh G, Johnston S, Smith IE.**

Platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer.

Ann Oncol. 2008;19:1847-1852.

**49. Sikov WM, Dizon DS, Strenger R, Legare RD, Theall KP, Graves TA, Gass JS, Kennedy TA, Fenton MA.**

Frequent pathologic complete responses in aggressive stages II to III breast cancers with every-4-week carboplatin and weekly paclitaxel with or without trastuzumab: a Brown University Oncology Group Study.

J Clin Oncol. 2009;27:4693-4700.

**50. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, Pruneri G, Gentilini O, Veronesi P, Gelber RD, Curigliano G, Torrises R, Luini A, Intra M, Galimberti V, Renne G, Nolè F, Peruzzotti G, Goldhirsch A.**

Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment.

Clin Cancer Res. 2004;10:6622-6628.

**51. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Pusztai L.**

Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer.

J Clin Oncol. 2008;26:1275-1281.

**52. Torrisi R, Balduzzi A, Ghisini R, Rocca A, Bottiglieri L, Giovanardi F, Veronesi P, Luini A, Orlando L, Viale G, Goldhirsch A, Colleoni M.**

Tailored preoperative treatment of locally advanced triple negative (hormone receptor negative and HER2 negative) breast cancer with epirubicin, cisplatin, and infusional fluorouracil followed by weekly paclitaxel.

Cancer Chemother Pharmacol. 2008;62:667-672.

**53. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, Juul N, Leong CO, Calogrias D, Buraimoh A, Fatima A, Gelman RS, Ryan PD, Tung NM, De Nicolo A, Ganesan S, Miron A, Colin C, Sgroi DC, Ellisen LW, Winer EP, Garber JE.**

Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer.

J Clin Oncol. 2010;28:1145-1153.

**54. Tomlinson GE, Chen TT, Stastny VA, Virmani AK, Spillman MA, Tonk V, Blum JL, Schneider NR, Wistuba II, Shay JW, Minna JD, Gazdar AF.**

Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier.

Cancer Res. 1998;58:3237-3242.

**55. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G.**

p53 and breast cancer, an update.  
Endocr Relat Cancer. 2006;13:293-325.

**56. Gasco M, Shami S, Crook T.**

The p53 pathway in breast cancer.  
Breast Cancer Res. 2002;4:70-76.

**57. Trepel M, Groscurth P, Malipiero U, Gulbins E, Dichgans J, Weller M.**

Chemosensitivity of human malignant glioma: modulation by p53 gene transfer.  
J Neurooncol. 1998;39:19-32.

**58. Kanamori Y, Kigawa J, Minagawa Y, Irie T, Oishi T, Shimada M, Takahashi M, Nakamura T, Sato K, Terakawa N.**

A newly developed adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene increases sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II) in p53-deleted ovarian cancer cells.  
Eur J Cancer. 1998;34:1802-1806.

**59. Kigawa J, Sato S, Shimada M, Kanamori Y, Itamochi H, Terakawa N.**

Effect of p53 gene transfer and cisplatin in a peritonitis carcinomatosa model with p53-deficient ovarian cancer cells.  
Gynecol Oncol. 2002;84:210-215.

**60. Pestell KE, Hobbs SM, Titley JC, Kelland LR, Walton MI.**

Effect of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line.  
Mol Pharmacol. 2000;57:503-511.

**61. Fan S, Smith ML, Rivet DJ, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, Fornace AJ, O'Connor PM.**

Disruption of p53 Function Sensitizes Breast Cancer MCF-7 Cells to Cisplatin and Pentoxifylline.  
Cancer Res. 1995;55:1649-1654.

**62. Vekris A, Meynard D, Haaz MC, Bayssas M, Bonnet J, Robert J.**

Molecular determinants of the cytotoxicity of platinum compounds: the contribution of in silico research.

Cancer Res. 2004;64:356-362.

**63. Fan J, Bertino JR.**

Modulation of cisplatin cytotoxicity by p53: effect of p53-mediated apoptosis and DNA repair.

Mol Pharmacol. 1999;56:966-972.

**64. Barrett-Lee PJ.**

Growth factor signalling in clinical breast cancer and its impact on response to conventional therapies: a review of chemotherapy.

Endocr Relat Cancer. 2005;12 Suppl 1:125-133.

**65. Gümüş F, Eren G, Açıık L, Çelebi A, Öztürk F, Yılmaz S, Sağkan RI, Gür S, Özkul A, Elmalı A, Elerman Y.**

Synthesis, Cytotoxicity, and DNA Interactions of New Cisplatin Analogues Containing Substituted Benzimidazole Ligands.

J Med Chem. 2009;52:1345–1357.

**66. Serova M, Calvo F, Lokiec F, Koeppl F, Poindessous V, Larsen AK, Laar ES, Waters SJ, Cvitkovic E, Raymond E.**

Characterizations of irifolven cytotoxicity in combination with cisplatin and oxaliplatin in human colon, breast, and ovarian cancer cells.

Cancer Chemother Pharmacol. 2006;57:491-499.

**67. Lukyanova NY, Rusetskya NV, Tregubova NA, Chekhun VF.**

Molecular profile and cell cycle in MCF-7 cells resistant to cisplatin and doxorubicin.

Exp Oncol. 2009;31:87-91.

**68. Gao J, Liu YG, Zingaro RA.**

Cytotoxic activities, cellular uptake, gene regulation, and optical imaging of novel platinum(II) complexes.

Chem Res Toxicol. 2009;22:1705-1712.

**69. Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, de Vries EG.**

Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds.

Cancer Res. 1992;52:6885-6889.

**70. Wong E, Giandomenico CM.**

Current status of platinum-based antitumor drugs.

Chem Rev. 1999;99:2451-2466.

Invest New Drugs. 1995;13:253-255.

**71. Harstrick A, Vanhoefer U, Heidemann A, Druyen H, Wilke H, Seeber S.**

Drug interactions of 5-fluorouracil with either cisplatin or lobaplatin--a new, clinically active platinum analog in established human cancer cell lines.

Anticancer Drugs. 1997;8:391-395.

**72. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG.**

Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.

Immunity. 1995;3:673-682.

**73. Ashkenazi A, Dixit VM.**

Death receptors: signaling and modulation.

Science. 1998;281:1305-1308.

**74. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C,**



**Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH.**

Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand.

J Clin Invest. 1999;104:155-162.

**75. Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A.**

Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions.

Nat Med. 2001;7:383-5.

**76. Hao C, Song JH, Hsi B, Lewis J, Song DK, Petruk KC, Tyrrell DL, Kneteman NM.**

TRAIL inhibits tumor growth but is nontoxic to human hepatocytes in chimeric mice.

Cancer Res. 2004;64:8502-8506.

**77. Soria JC, Smit E, Khayat D, Besse B, Yang X, Hsu CP, Reese D, Wiezorek J, Blackhall F.**

Phase 1b Study of Dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in Combination With Paclitaxel, Carboplatin, and Bevacizumab in Patients With Advanced Non-Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer.

J Clin Oncol. 2010 Feb 16. [Epub ahead of print]

**78. Oldenhuis CN, Stegehuis JH, Walenkamp AM, de Jong S, de Vries EG.**

Targeting TRAIL death receptors.

Curr Opin Pharmacol. 2008;8:433-439.

**79. Cuello M, Ettenberg SA, Nau MM, Lipkowitz S.**

Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells.

Gynecol Oncol. 2001;81:380-390.

**80. Lacour S, Hammann A, Wotawa A, Corcos L, Solary E, Dimanche-Boitrel MT.**  
Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis.

Cancer Res. 2001;61:1645-1651.

**81. Mizutani Y, Nakao M, Ogawa O, Yoshida O, Bonavida B, Miki T.**

Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand mediated apoptosis by cisplatin and carboplatin.

J Urol. 2001;165:263-270.

**82. Vignati S, Codegoni A, Polato F, Broggin M.**

Trail activity in human ovarian cancer cells: potentiation of the action of cytotoxic drugs.

Eur J Cancer. 2002;38:177-183.

**83. Siervo-Sassi RR, Marrangoni AM, Feng X, Naoumova N, Winans M, Edwards RP, Lokshin A.**

Physiological and molecular effects of Apo2L/TRAIL and cisplatin in ovarian carcinoma cell lines.

Cancer Lett. 2003;190:61-72.

**84. Arizono Y, Yoshikawa H, Naganuma H, Hamada Y, Nakajima Y, Tasaka K.**

A mechanism of resistance to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis of newly established glioma cell line and sensitisation to TRAIL by genotoxic agents.

Br J Cancer. 2003;88:298-306.

**85. Kim JH, Ajaz M, Lokshin A, Lee YJ.**

Role of antiapoptotic proteins in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and cisplatin-augmented apoptosis.

Clin Cancer Res. 2003;9:3134-3141.

**86. Kondo K, Yamasaki S, Inoue N, Sugie T, Teratani N, Kan T, Shimada Y.**

Prospective antitumor effects of the combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and cisplatin against esophageal squamous cell carcinoma.

Surg Today. 2006;36:966-974.

**87. Kondo K, Yamasaki S, Sugie T, Teratani N, Kan T, Imamura M, Shimada Y.**

Cisplatin-dependent upregulation of death receptors 4 and 5 augments induction of apoptosis by TNF-related apoptosis-inducing ligand against esophageal squamous cell carcinoma.

Int J Cancer. 2006;118:230-242

**88. Tsai WS, Yeow WS, Chua A, Reddy RM, Nguyen DM, Schrupp DS, Nguyen DM.**

Enhancement of Apo2L/TRAIL-mediated cytotoxicity in esophageal cancer cells by cisplatin.

Mol Cancer Ther. 2006;5:2977-2990.

**89. Woods DC, Alvarez C, Johnson AL.**

Cisplatin-mediated sensitivity to TRAIL-induced cell death in human granulosa tumor cells.

Gynecol Oncol. 2008;108:632-640.

**90. Keane MM, Etnenberg SA, Nau MM, Russell EK, Lipkowitz S.**

Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines.

Cancer Res. 1999;59:734-741.

**91. Berenbaum MC.**

What is synergy?

Pharmacol Rev. 1989;41:93-141.

**92. Konstantakou EG, Voutsinas GE, Karkoulis PK, Aravantinos G, Margaritis LH, Stravopodis DJ.**

Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses.

Int J Oncol. 2009;35:401-416.

**93. Siddik ZH.**

Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance.

Oncogene. 2003;22:7265-7279.

**94. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M.**

Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells.

J Biol Chem. 1999;274:22932-22940.

**95. Bharti AC, Takada Y, Aggarwal BB.**

PARP cleavage and caspase activity to assess chemosensitivity.

Methods Mol Med. 2005;111:69-78.

**96. Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG.**

Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis.

J Biol Chem. 1998;273:9357-9360.

**97. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.**

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer. 1972;26:239-257.

**98. Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C.**

Vital functions for lethal caspases.

Oncogene. 2005;24:5137-5148.

**99. Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams JM, Tavernarakis N, Penninger J, Madeo F, Kroemer G.**

No death without life: vital functions of apoptotic effectors.

Cell Death Differ. 2008;15:1113-1123.

**100. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009.**

Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.

Cell Death Differ. 2009;16:3-11.

**101. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J.**

Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury.

Nat Chem Biol. 2005;1:112-119.

**102. Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J.**

Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway.

Cell. 2008;135:1311-1323.

**103. Degterev A, Hitomi J, Gernscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J.**

Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins.

Nat Chem Biol. 2008;4:313-321.

**104. Xu X, Chua CC, Kong J, Kostrzewa RM, Kumaraguru U, Hamdy RC, Chua BH.**

Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells.

J Neurochem. 2007;103:2004-2014.

**105. Cummings BS, Kinsey GR, Bolchoz LJC, Schnellmann RG.**

Identification of caspase-independent apoptosis in epithelial and cancer cells.

J Pharmacol Exp Ther. 2004;310:126-134.

**106. Henkels KM, Turchi JJ.**

Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines.

Cancer Res. 1999;59:3077-3083.

**107. Vaisman A, Varchenko M, Said I, Chaney SG.**

Cell cycle changes associated with formation of Pt-DNA adducts in human ovarian carcinoma cells with different cisplatin sensitivity.

Cytometry. 1997;27:54-64.

**108. Eastman A**

The mechanism of action of cisplatin: From adducts to apoptosis.

Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug.

Basel, 1999;111-134.

**109. Sorenson CM, Eastman A**

Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells.

Cancer Res. 1988;48:6703-6707.

**110. Ormerod MG, Orr RM, Peacock JH.**

The role of apoptosis in cell killing by cisplatin—a flow cytometric study.

Br J Cancer. 1994;69:93-100.

**111. Bergerat JP, Barlogie B, Gohde W, Johnston DA, Drewinko B.**

In vitro cytokinetic response of human colon cancer cells to cis-dichlorodiammine-platinum(II).

Cancer Res. 1979;39:4356–4363.

**112. Jäckel M, Köpf-Maier P.**

Influence of cisplatin on cell-cycle progression in xenografted human head and neck carcinomas.

Cancer Chemother Pharmacol. 1991;27:464–471.

**113. Moran RE, Straus MJ.**

Effects of pulse and continuous intravenous infusion of cis-diamminedichloroplatinum on L1210 leukemia in vivo.

Cancer Res. 1981;41:4993–4996.

**114. Stordal B, Davey R.**

ERCC1 expression and RAD51B activity correlate with cell cycle response to platinum drug treatment not DNA repair

Cancer Chemother Pharmacol. 2009;63:661–672.

**115. Un F.**

G1 arrest induction represents a critical determinant for cisplatin cytotoxicity in G1 checkpoint-retaining human cancers.

Anti-Cancer Drugs. 2007;18:411–417.

## **Danksagung**

Mein aufrichtiger Dank gilt allen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Arnd Hönig für die Betreuung der Arbeit bedanken. Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf C. Bargou für seinen Einsatz als Koreferent. Ich danke Herrn PD Dr. Jörg Engel für die Bereitstellung von Lobaplatin. Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern der Nachwuchsforschergruppe an der Frauenklinik der Universität Würzburg für die Hilfe bei der Arbeit im Labor, ein fröhliches Miteinander und gute Ideen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Jörg Wischhusen, Leiter der Nachwuchsforschergruppe, für die stets zuverlässige und zügige Beratung und Unterstützung.

Ich möchte meinen Eltern herzlich dafür danken, dass sie mir das Studium und die Doktorarbeit ermöglicht haben. Meinen Geschwistern danke ich für allerlei lustige und aufmunternde E-Mails.