

Aus dem Universitätsklinikum Halle, Department für Innere Medizin,
Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV,
Onkologie, Hämatologie und Hämostaseologie,
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll

**Struktur-Effekt-Analysen neuer
Cisplatinconjugate unter spezieller
Berücksichtigung der Cisplatinresistenz bei
Keimzelltumoren**

Dissertation

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

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

von Timo Behlendorf
geboren am 18.05.1978 in Mainz

Gutachter:
Prof. Hans-Joachim Schmoll
Prof. Hans Heynemann
PD Dr. Dr. med. Friedemann Honecker

verteidigt am 14.02.2012

Referat

Keimzelltumore sind die häufigste Krebserkrankung junger Männer. Die Heilungsrate liegt seit Einführung der cisplatinhaltigen Kombinationschemotherapie bei insgesamt etwa 90%. Cisplatinresistenz schränkt das kurative Potential der Therapie von Keimzelltumoren sowie verschiedener anderer Krebsentitäten erheblich ein. Die Modifizierung des Cisplatinmoleküls stellt eine Möglichkeit zur Überwindung der Resistenzen dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zytotoxischen Effekte von 12 neuen Cisplatinkonjugaten mit aliphatischen Seitenketten unterschiedlicher Länge und Konjugation an ein Tetrahydropyranringsystem THP1-12 (*cis*-Dichloro(m-{n-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]Alkyl1}Alkyl2-diamino)platin(II)-Verbindungen; Alkyl1:-butyl/-hexyl/-octyl/-undecyl; Alkyl2:-ethan/-propan) untersucht. Zur qualitativen Erfassung der Apoptoseinduktion durch die Cisplatinkonjugate wurde der DNA-Fragmentierungs-Assay verwendet. Der Einfluss einer zytotoxischen Behandlung auf das Zellzyklusprofil wurde durchflusszytometrisch erfasst. Die Untersuchungen erfolgten an den beiden Keimzelltumorzelllinien H12.1 und 1411HP *in vitro*, wobei H12.1 primär cisplatinsempfindlich ist und 1411HP eine intrinsische Cisplatinresistenz aufweist. Die Zytotoxizitätsmessung erfolgte mit Hilfe des SRB-Assays. Es zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen der Länge der Seitenkette (Alkyl1) und der gefundenen Zytotoxizität, in dem die zytotoxische Potenz der Verbindungen mit zunehmender Länge der Seitenkette stieg. Zudem fand sich eine Abhängigkeit der Aktivität von der Art der Bindung am Ringsystem sowie des Ringsystems selbst (Alkyl2). Insbesondere die Substanz THP-12 (Alkyl1 = undecyl, Alkyl2 = propan) war besonders aktiv und zeigte keine Kreuzresistenz gegenüber Cisplatin. Als Mechanismus der Zelltodinduktion konnte Apoptose durch einen Sub-G1-Peak in der Durchflusszytometrie sowie typischer DNA-Fragmentierung mit 180 bp Fragmenten in der DNA-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Interessanterweise löste insbesondere die aktivste Verbindung THP-12 Apoptose deutlich schneller aus als Cisplatin. Im Gegensatz zu Cisplatin bildete sich kein typischer G2/M-Arrest nach THP-12 Behandlung aus, sondern die Zellen scheinen ohne Bezug zu einem Zellzykluskompartiment direkt Apoptose auszulösen. Als mögliche Faktoren für die Überwindung der Cisplatinresistenz durch die THP-Verbindung können eine erhöhte zelluläre Akkumulation in der Zelle, eine geänderte DNA-Bindung aufgrund der Molekülstruktur, fehlende Effektivität der zellulären DNA-Reparaturmechanismen oder ein DNA-unabhängiger Weg der Apoptoseinduktion diskutiert werden.

Behlendorf, Timo: Struktur-Effekt-Analysen neuer Cisplatinkonjugate unter spezieller Berücksichtigung der Cisplatinresistenz bei Keimzelltumoren
Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät,
Dissertation, 52 Seiten, 2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Keimzelltumoren	1
1.1.1.	Epidemiologie	1
1.1.2.	Entstehung von Keimzelltumoren	1
1.1.3.	Therapie von Hodentumoren	2
1.2.	Cisplatin	2
1.3.	Cisplatin-Resistenzmechanismen	5
1.3.1.	Nukleotid-Exzisions-Reparatur	5
1.3.2.	Mismatch Repair Pathway (MMR)	6
1.3.3.	Metallothionine und Glutathion	6
1.3.4.	Effluxmechanismen	6
1.3.5.	Oct3/4-Verlust	7
1.3.6.	Fehlende Caspase 9-Aktivierung	7
1.4.	Klinische Relevanz und Überwindungsstrategien	7
1.4.1.	Carriersysteme	8
1.5.	Andere Platinverbindungen	9
1.5.1.	Oxaliplatin und Carboplatin	9
1.5.2.	Picoplatin (AMD473, ZD0473, JM473, NX473)	9
1.5.3.	Satraplatin (JM216, BMS182751, BMY45594)	10
1.5.4.	BBR3464	10
1.5.5.	Bamet UD2	11
1.6.	Synthese der untersuchten Platinverbindungen	12
2.	Zielsetzung dieser Arbeit	13
3.	Material und Methoden	14
3.1.	Material	14
3.1.1.	Medien und Zusätze	14
3.1.2.	Zytostatika und untersuchte Platinverbindungen	14
3.1.3.	Reagenzien SRB-Zytotoxizitäts-Assay:	15
3.1.4.	Reagenzien Zellzyklus-Analyse:	15
3.1.5.	Reagenzien DNA-Fragmentierungs-Assay:	16
3.1.6.	Reagenzien Zellzyklus-Analyse:	16
3.2.	Geräte und Verbrauchsmittel	16
3.3.	Zelllinien	17
3.4.	Methoden	17
3.4.1.	Zellkultur	17
3.4.2.	Testsubstanzen und Verdünnungsreihen	17

3.4.3.	Zytotoxizitäts-Testung	18
3.4.4.	Sulforhodamin B-Zytotoxizitäts-Assay	18
3.5.	Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie	20
3.6.	DNA-Fragmentierungsnachweis	20
3.7.	Statistik	21
3.7.1.	SRB-Assay	21
3.7.2.	Zellzyklusanalysen	21
4.	Ergebnisse	22
4.1.	Einfluss des Ringsystems:	22
4.1.1.	H12.1	23
4.1.2.	1411HP	23
4.2.	Einfluss der Bindungsstelle am Ringsystem	24
4.2.1.	H12.1	25
4.2.2.	1411HP	25
4.3.	Einfluss der Länge der Seitenkette	26
4.3.1.	H12.1	26
4.3.2.	1411HP	26
4.4.	Vergleich der Zelllinie H12.1 mit der Zelllinie 1411HP	26
4.5.	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse	27
4.6.	Ergebnisse des DNA-Fragmentierungsassays	29
5.	Diskussion	30
5.1.	Carriersystem	31
5.2.	Struktur-Membran-Interaktion	32
5.3.	Struktur-DNA-Interaktion	33
5.4.	Probleme	33
5.5.	Ausblick	34
5.5.1.	Klärung der zellulären Aufnahme	34
5.5.2.	Grad der DNA-Platinierung durch THP-Komplexe	34
5.5.3.	Verbesserung der Löslichkeit	35
5.5.4.	Kombination mit anderen Zytostatika	35
5.5.5.	Testung in vivo, Ermittlung von Toxizitäten	35
5.5.6.	Klärung des Apoptosewegs	35
6.	Zusammenfassung	36
7.	Literatur	37

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A/B	ATP-abhängige Kupfertransporter 7 A/B
BAMET	<i>bile acid linked to metal</i>
Caspase	<i>cysteiny l aspartate specific protease</i>
CDDP	Cis-diammino-dichlor-platin (Cisplatin)
ChaPt	<i>cholic acid linked to platinum</i>
d	dies (Tag)
DACH	Diaminocyclohexan
DNA	<i>deoxy ribonucleic acid</i>
ERCC1	<i>excision repair cross-complementation group 1</i>
FKS	fetales Kälberserum
hCTR1	human copper transporter 1
i.d.R.	in der Regel
i.v.	intravenous
IC	<i>inhibitory concentration</i>
IGCCCG	<i>International Germ Cell Cancer Consensus Group</i>
K	Kalium
MMR	<i>mismatch Repair Pathway</i>
MRP	Multidrug Resistance Proteins
Na	Natrium
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
n.s.	nicht signifikant
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SRB	Sulforhodamin B
TCA	Trichloressigsäure
THP	Tetrahydropyran
XPF	<i>xeroderma pigmentosum complementation group F</i>

1. Einleitung

1.1. Keimzelltumoren

1.1.1. Epidemiologie

Keimzelltumore sind die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Männern zwischen 20 und 35 Jahren. Aktuell beträgt die Inzidenz 10,4/100.000 (Husman et al. 2010).

Stellten Keimzelltumoren vor Einführung der cisplatinhaltigen Therapieregime noch die häufigste Krebstodesursache in dieser Altersgruppe dar, liegt die Mortalität heute bei 0,3-0,4 Fällen pro 100 000 (Bertz et al. 2006; Schmoll et al. 2006). Beim Mann entwickelt sich in etwa 90-95% der Tumor primär im Hoden. Andererseits sind aufgrund des Descensus testis im Rahmen der Embryonalentwicklung aber auch primär extragonadale Manifestationen beispielsweise mediastinal oder retroperitoneal möglich.

Prädisponierende Faktoren für einen Keimzelltumor des Hodens sind ein Kryptorchismus bzw. Maldescensus testis sowie ein kontralateraler Hodentumor und das Auftreten von Hodentumoren in der Familie. Ebenso weisen Patienten mit gonadaler Dysgenese ein erhöhtes Risiko auf, an Keimzelltumoren zu erkranken (Forman et al. 1992; Dieckmann KP 2003; Schmoll et al. 2006).

1.1.2. Entstehung von Keimzelltumoren

Der Beginn einer malignen Entartung der primordialen Keimzelle wird aufgrund der Häufigkeitsverteilung der Keimzelltumoren bereits intrauterin bzw. perinatal vermutet (Lutzker and Barnard 1998).

Aus einer primordialen Keimzelle entsteht durch genetische Faktoren und Umwelteinflüsse sowie Veränderungen im Genom eine Krebsvorstufe, die testikuläre intraepitheliale Neoplasie (Schmoll et al. 2006).

Bei weiteren Veränderungen im Genom entstehen maligne Zellen i.S. eines Seminoms bzw. eines embryonalen Karzinoms. Dabei ist die Ausbildung eines Carcinoma in situ eine obligate Zwischenstufe. Das embryonale Karzinom kann, je nach Differenzierung in embryonales oder extraembryonales Gewebe, Teratome oder Chorion- und Dottersacktumore ausbilden (Heidenreich et al. 1998).

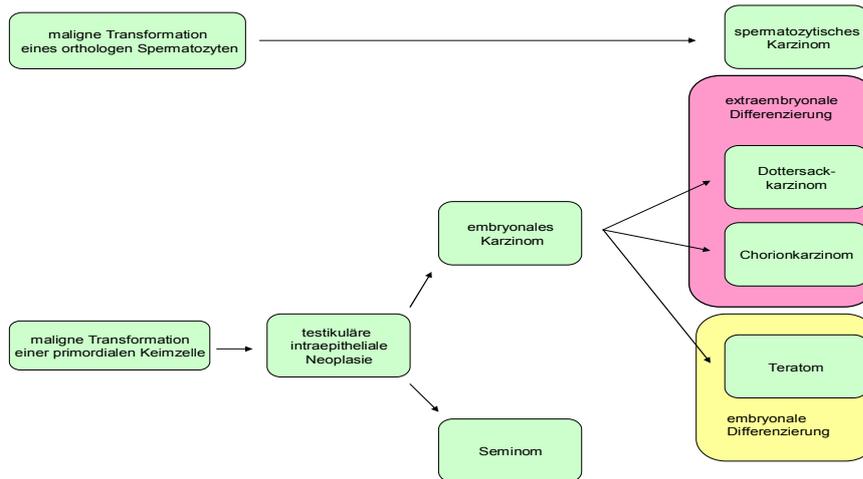


Abb. 1: Entstehung von Keimzelltumoren (modifiziert nach Wittekind 2008)

1.1.3. Therapie von Hodentumoren

Grundsätzlich wird die Therapie von Hodentumoren nach der Histologie (Seminom bzw. Nichtseminom) sowie der Risikoklassifikation nach IGCCCG stratifiziert. Hier kommen je nach Histologie, Risiko und Stadium die Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie in Frage.

Durch Einführung des Cisplatin als tragende Komponente der Chemotherapie konnte sowohl die Ansprechrate als auch die Heilungsrate dramatisch erhöht werden (Einhorn and Williams 1979). Die Heilungsrate des malignen Keimzelltumors liegt in frühen Stadien bei nahezu 100%, bei einer Gesamtheilungsrate von 90%. Die Prognose von Tumoren mit primärer oder erworbener Cisplatin-Resistenz ist deutlich schlechter (Schmoll et al. 2006), was die überragende Stellung des Cisplatin in der Therapie der Hodentumoren unterstreicht.

Gemäß Empfehlung der European Germ Cell Cancer Consensus Group wird aktuell eine Kombinationschemotherapie bestehend aus Cisplatin (i. d. R. 20 mg/m² i. v. als 30 min-Infusion d 1 bis d 5), Etoposid (100 mg/m² i. v. als 1 h-Infusion d 1 bis d 5) und Bleomycin (30 mg i. v. als Bolus d 1, d 8, d 15) als primäre Therapie des metastasierten testikulären Keimzelltumors angewandt; für Patienten mit guter Prognose werden 3 Zyklen Kombinationschemotherapie empfohlen, Patienten mit intermediärer bzw. schlechter Prognose sollten mit vier Zyklen behandelt werden. Liegen Kontraindikationen gegen Bleomycin vor, können alternativ bei guter Prognose vier Zyklen Cisplatin und Etoposid bzw. bei mittlerer und schlechter Prognose vier Zyklen PEI (CDDP, Etoposid, Ifosfamid) eingesetzt werden (Schmoll et al. 2006).

1.2. Cisplatin

Bereits Mitte des neunzehnten Jahrhunderts erstmalig synthetisiert, entdeckte Rosenberg 1965 die zytotoxische Wirkung des Cis-Diamino-Dichlorplatins (Cisplatin/CDDP) zunächst auf

Escherichia coli. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte die Untersuchung der antiproliferativen Wirkung auf Tumorzellen.

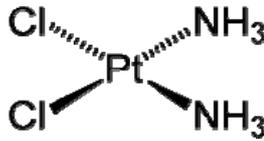


Abb. 2: Cisplatin (Cis-diamino-dichlor-Platin, CDDP)

Diese konnte in zahlreichen Tumorentitäten (Malignome von Blase, Ovar, Hoden sowie Malignome im Kopf-Hals-Bereich) nachgewiesen werden, was zum klinischen Einsatz des Cisplatin für die zytostatische Chemotherapie geführt hat (Sarna et al. 1980).

Die Wirkung des Cisplatin besteht in der Ausbildung von Intrastrang- und Interstrang-Läsionen durch Bindung an den Imidazolring der Purinbasen der DNA und einer daraus resultierenden Hemmung der Transkription der DNA mit der Folge der Hemmung der Zellteilung (Jordan and Carmo-Fonseca 2000). Insgesamt geht allerdings nur ca. 1 % des intrazellulären Cisplatin Bindungen mit der genomischen DNA ein (Bose 2002).

Dabei lassen sich 1,2-intrastrand d(GpG) cross-links (zwischen benachbarten Guaninen an der N⁷-Position) in ca. 50-65% und 1,2-intrastrand d(ApG) cross-links (zwischen Adenin und benachbartem Guanin in 5' zu 3'-Richtung) in ca. 25% nachweisen. Weniger als 10% der nachweisbaren Bindungen sind 1,3-intrastrand d(GpNpG) cross-links, interstrand cross-links und DNA-Pt-Protein cross-links (Pizarro and Sadler 2009).

Der überwiegende Anteil des intrazellulären Cisplatin platiniert meist im Sinne monofunktioneller Addukte andere intrazelluläre Strukturen wie mitochondriale DNA, RNA, Membranphospholipide, Membranphosphatidylserine der Zellmembranen und Mikrofilamente des Zytoskelettes. Der Stellenwert der Platinierung dieser anderen Zielstrukturen für die Apoptoseinduktion ist bislang nicht geklärt.

Die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle erfolgt vorwiegend passiv durch Diffusion durch die Zellmembran sowie in geringerem Anteil aktiv mittels energieabhängiger Transportersysteme und erleichterter Diffusion durch Porenproteine in der Zellwand. Dabei spielt der Natrium-Gradient an der Zellmembran, aufgebaut durch die Na-K-ATPase, eine wichtige Rolle (Hall et al. 2008).

Durch Dissoziation der Chlorid-Ionen des Cisplatinmoleküls nach Aufnahme in die Zellen entsteht intrazellulär ein elektrophiles Molekül, das Bindungen mit DNA- und Proteinen eingeht und u.a. zu apoptoseinduzierenden DNA-Schäden führt.

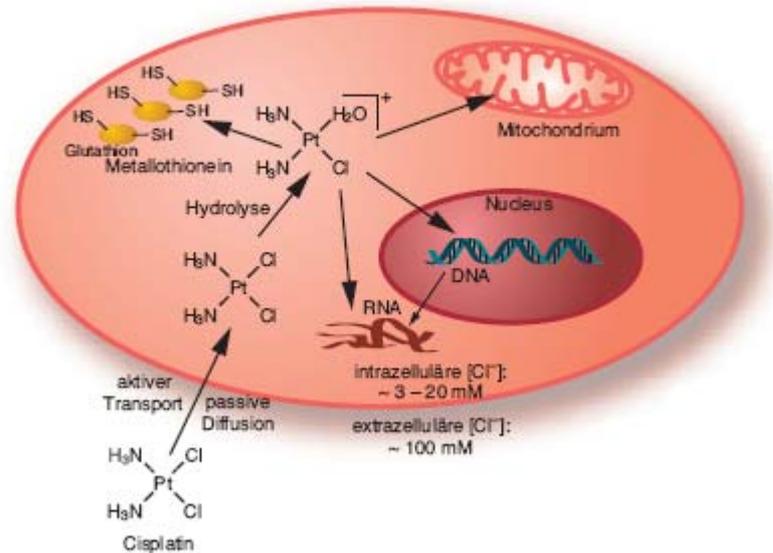


Abb. 3: Aufnahme und Aktivierung von Cisplatin (mod. nach Voigt (Voigt 2006))

Ein möglicher Weg zur Inaktivierung des Cisplatins erfolgt durch Reaktion mit zytoplasmatischen schwefelhaltigen Verbindungen wie Glutathion und Metallothioninen (Gately and Howell 1993; Koberle et al. 1999).

Pharmakokinetisch erfolgt nach intravenöser Gabe zu 90% die Bindung an Plasmaeiweiß.

Weiter unterliegt Cisplatin einer biphasischen Eliminationskinetik mit einer kurzen initialen und einer verzögerten terminalen Elimination mit vorwiegend renaler Ausscheidung (Voigt 2006).

Hauptnebenwirkungen des Cisplatins sind das ausgeprägte emetogene Potential sowie Nephro- und Ototoxizität und eine Myelotoxizität, die sich in einer trilineären Panzytopenie im Anschluss an die Chemotherapie zeigt.

In der klinischen Anwendung des Cisplatins ist die obligate prophylaktische Gabe eines Neurokinin 1-Rezeptor-Antagonisten als antiemetische Prophylaxe etabliert; eine Hyperhydrierung sowie die forcierte Diurese zur Nephroprotektion mittels Mannitol bzw. Furosemid ist fester Bestandteil jeder Chemotherapie mit Cisplatin (Schmoll et al. 2006; Rabik and Dolan 2007). Auch wenn deutliche Verbesserungen in der Supportivtherapie den klinischen Einsatz des Cisplatins sicherer und besser durchführbar gemacht haben, besteht dennoch das Risiko des Therapieabbruchs aufgrund der ausgeprägten unerwünschten Arzneimittelreaktionen und somit eine nicht optimale Behandlung von Patienten mit testikulären Keimzelltumoren (Jordan K. 2007).

Ein wesentliches Problem in der kurativen Therapie von Keimzelltumoren stellt u.a. die Entwicklung einer Cisplatinresistenz dar. Dies führt zu einer erheblichen Verschlechterung der kurativen Chance der meist jungen Männer mit Keimzelltumoren. Um dies zu verbessern, wurden u.a. neue Platinderivate mit zum Teil fehlender Kreuzresistenz gegenüber Cisplatin entwickelt.

1.3. Cisplatin-Resistenzmechanismen

Einen Überblick über die verschiedenen Resistenzmechanismen vermittelt Abb.4.

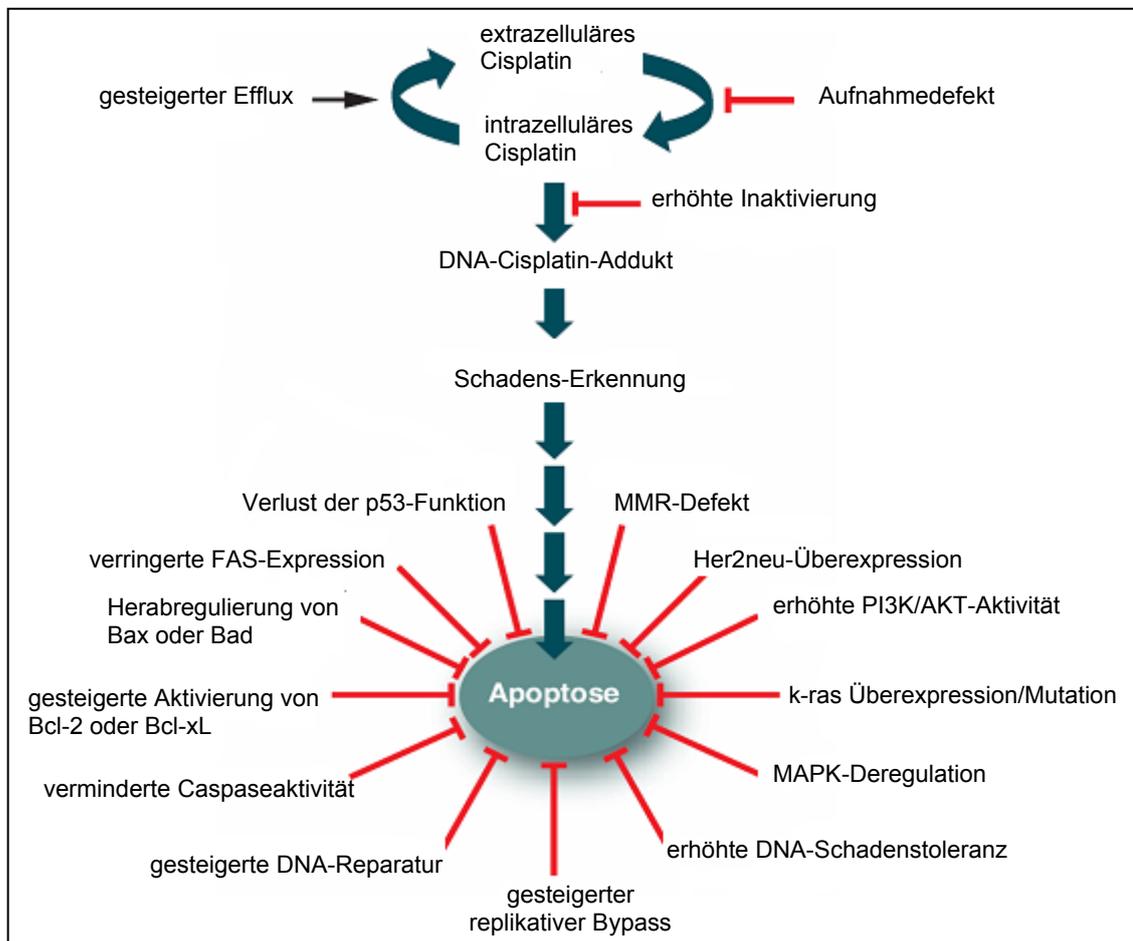


Abb. 4 : intra- und extranukleäre Mechanismen von Cisplatinresistenz (mod. nach Voigt 2006)

1.3.1. Nukleotid-Exzisions-Reparatur

In Keimzelltumoren konnte in vitro ein Mangel an ERCC1 (excision repair cross-complementation group 1) und XPF (xeroderma pigmentosum complementation group F) nachgewiesen werden (Welsh et al. 2004).

Diese Proteine sind verantwortlich für die Reparatur von DNA-Schäden, wie sie z.B. durch Cisplatinverbindungen verursacht werden. Dabei werden DNA-Läsionen, die zu Strukturveränderungen und Replikations- und Transkriptionsstörungen führen, zunächst markiert und in Folge durch ein Dimer aus ERCC1 und XPF exzidiert. Die DNA-Polymerase resynthetisiert die fehlende DNA-Sequenz; die ursprüngliche Struktur der DNA wird somit wiederhergestellt.

Liegt ein Mangel an ERCC1 und XPF vor, wie in cisplatinresistenten Keimzelltumoren nachgewiesen, findet die DNA-Reparatur nicht statt, es kommt zur Apoptose der Tumorzelle durch die durch Cisplatin induzierten DNA-Schäden (Koberle et al. 1999; Welsh et al. 2004).

Dies wird als eine Erklärung für die gute Cisplatinempfindlichkeit von Keimzelltumoren angesehen. Besteht kein Mangel an ERCC1 und XPF laufen die beschriebenen Reparaturvorgänge ab; die Tumorzelle umgeht die Apoptoseinduktion, Resistenz gegen Cisplatin tritt auf.

1.3.2. Mismatch Repair Pathway (MMR)

Dieses System beschreibt einen Mechanismus, der ebenfalls in der Lage ist, DNA-Schäden zu erkennen und zu reparieren. Dabei bindet das so genannte Mut-Protein an unpassende, falsche Basenpaarungen innerhalb der DNA und markiert diese. Daraufhin kommt es zu Ausbildung eines Komplexes des Mut-Proteins mit einem bislang unbekanntem Protein. Dieser Komplex entfernt die fehlerhafte Sequenz aus dem DNA-Strang. Durch die DNA-Polymerase erfolgt die Reparatur der exzidierten Sequenz (Martin et al. 2008).

Schäden an der DNA, die durch Cisplatin verursacht werden, werden durch das MMR-System erkannt (Aebi et al. 1996). Cisplatin interagiert aber mit dem MMR-System und verhindert eine vollständige Reparatur des verursachten Schadens, die mitotische Zellteilung wird inhibiert, es kommt zur Apoptose. Wird die Aktivität des MMR-Systems erhöht, entstehen mehr DNA-Brüche, die zur Apoptose führen. Ist die Aktivität des MMR-Systems hingegen vermindert, verringert sich so auch die Sensitivität der Tumorzelle gegenüber Cisplatin.

Als Ursache einer Resistenz gegen Cisplatin wird auch eine erhöhte Fehlertoleranz im MMR-System angesehen. Durch mangelnde Erkennung der Cisplatin-DNA-Addukte wird die Mitose trotz DNA-Schädigung durch Cisplatin fortgeführt, es kommt nicht zur Apoptose der Tumorzelle, also zur Cisplatinresistenz (Martin et al. 2008).

1.3.3. Metallothioneine und Glutathion

Die Sulfurgruppen von intrazellulärem Glutathion neutralisieren die reaktiven Gruppen des intrazellulären Cisplatin nach dessen hydrolytischer Spaltung. Glutathion bildet dadurch mit Cisplatin weniger toxische und besser wasserlösliche Komplexe, die durch transmembranäre Effluxtransporter (MRP2) aus der Zelle transportiert werden können und dadurch eine höhere Toleranz der Zelle gegenüber Cisplatin verursachen.

In cisplatinresistenten Tumorzellen konnte eine 13 – 50-fache Konzentration von intrazellulärem Glutathion im Vergleich zu cisplatinempfindlichen Zelllinien nachgewiesen werden (Godwin et al. 1992). Ergänzend zeigt die Erhöhung des intrazellulären Glutathions durch Behandlung der Zellen mit Monoethylglutathionester eine Zunahme der Cisplatinresistenz, eine Verringerung des Glutathions durch Behandlung der Zellen mit Buthioninsulfoximin eine Verringerung der Resistenz *in vitro* (Zhang et al. 2001).

1.3.4. Effluxmechanismen

Der intrazelluläre Cisplatingehalt steht in direktem Zusammenhang mit seiner zytotoxischen Wirkung (Gately and Howell 1993). *In vitro* konnte dieser Zusammenhang wiederholt

nachgewiesen werden (Andrews and Howell 1990; Perez et al. 1990; Gately and Howell 1993). Ebenfalls *in vitro* konnten aktive Effluxmechanismen durch die transmembranösen Kupfertransportproteine hCTR1, ATP7A und ATP7B, die die intrazelluläre Akkumulation von Cisplatin verringern, als Ursache einer Cisplatinresistenz nachgewiesen werden (Fujii et al. 1994; Katano et al. 2002; Kalayda et al. 2008).

Die so genannten „Multidrug Resistance Proteins“ (MRP) stellen eine Familie von mindestens 6 transmembranösen Transportproteinen dar. Sie transportieren intrazelluläre Zytostatika gebunden an Glutathion aus der Zelle hinaus und sind damit für Resistenzen verantwortlich. Insbesondere MRP2 ist in der Lage, an Glutathion gebundene lipophile Substanzen sowie auch im Kotransport mit Glutathion ungeladene Substanzen aus der Zelle zu transportieren und induziert dadurch eine höhere Cisplatinresistenz durch Verringerung des intrazellulären Cisplatingehaltes (Kool et al. 1997; Cui et al. 1999; Borst et al. 2000; Jedlitschky et al. 2006).

1.3.5. Oct3/4-Verlust

Zellen eines embryonalen Karzinoms exprimieren den embryonalen Transkriptionsfaktor Oct3/4, der mit einer hohen Sensibilität gegenüber cisplatinhaltiger Chemotherapie assoziiert ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von Oct3/4 durch Differenzierung der Zellen zur Entwicklung einer Cisplatinresistenz führte.

Es besteht Grund zur Annahme, dass aus einer initial cisplatinempfindlichen, Oct3/4 exprimierenden Zelllinie durch Applikation von Cisplatin cisplatinresistente, Oct3/4 negative Zellen selektioniert werden können (Müller et al. 2006).

1.3.6. Fehlende Caspase 9-Aktivierung

Die Apoptoseinduktion in cisplatinempfindlichen Keimzelltumorzelllinien erfolgt unter anderem durch Aktivierung der Caspase 9. Im Gegensatz dazu, konnte in cisplatinresistenten Keimzelltumorzellen ein Ausbleiben der Aktivierung der Caspase 9 nachgewiesen werden.

Eine Inhibition der Caspase 9 in primär cisplatinempfindlichen Zellen führt zu einer 3,3-fach höheren Toleranz gegenüber Cisplatin, weshalb Caspase 9 eine wesentliche Rolle in der Entstehung der Cisplatinresistenz zugeschrieben wird.

Bei Behandlung cisplatinresistenter Zellen führte eine Behandlung mit höheren Cisplatin Dosen ebenfalls zu einer Apoptoseinduktion, jedoch ohne Aktivierung der Caspase 9. Dies unterstützt die These einer Caspase 9-unabhängigen Apoptoseinduktion durch hohe Dosen von Cisplatin in cisplatinresistenten Keimzelltumoren (Müller et al. 2003).

1.4. Klinische Relevanz und Überwindungsstrategien

10-30% aller Keimzelltumore weisen eine intrinsische Cisplatinresistenz auf; es entwickelt sich ein Rezidiv nach Chemotherapie mit Cisplatin. Die Therapie solcher Tumore stellt eine besondere Herausforderung dar. Der Einsatz der Hochdosischemotherapie kann auch in diesen

Fällen in 30-50% der Patienten eine Heilung erreichen, führt diese nicht zur Heilung, verbleibt meist nur der Wechsel auf ein palliatives Therapiekonzept (Mayer et al. 2003).

Die Identifizierung neuer zytostatischer Substanzen zur Behandlung cisplatinresistenter Keimzelltumore kann die Chance auf Heilung für betroffene Patienten verbessern bzw. aufgrund eines veränderten Nebenwirkungsprofils die Therapie für den Patienten sicherer und länger durchführbar machen.

1.4.1. Carriersysteme

Die Erhöhung der intrazellulären Cisplatinkonzentration durch Carriersysteme stellt eine weitere Strategie zur Überwindung von Cisplatinresistenz dar. Da die extrazelluläre Konzentration in vivo nicht beliebig erhöht werden kann, werden spezifische Carriersysteme verwendet, die zu einer intrazellulären Akkumulation des anhängenden Liganden (hier: Cisplatin) führen.

In vitro konnte für eine murine Leukämiezelllinie ein direkter Zusammenhang zwischen carrier-vermittelter Aufnahme und Zytotoxizität bei Behandlung der Zellen mit Cisplatin-Diaminocyclohexan (DACH) - Konjugaten nachgewiesen werden (Gibbons et al. 1990).

Der Zusammenhang zwischen Cisplatinkonzentration und Zytotoxizität konnte auch für cisplatinresistente Ovarialkarzinomzellen mit erworbener Resistenz sowie für eine Kolonkarzinomzelllinie mit intrinsischer Cisplatinresistenz nachgewiesen werden. Durch Verwendung eines Carriersystems aus Diaminocyclohexan konnte die Cisplatinresistenz in der cisplatinresistenten Ovarialkarzinomzelllinie überwunden werden, wogegen die Kolonkarzinomzelllinie eine Kreuzresistenz der DACH-Cisplatin-Verbindung zu Cisplatin aufwies. *Schmidt und Chaney* schließen daraus, dass nicht nur die zelluläre Aufnahme durch Carriersysteme erhöht wird, sondern dass auch andere intrazelluläre Mechanismen wie Inhibierung der Transkription und vermehrte Ausbildung von Interstrangverbindungen der DNA bzw. Konformationsänderungen der Substanz-DNA-Verbindungen durch die verwendeten Komplexe eine Rolle bei der Zytotoxizität durch Cisplatin Komplexe spielen (Schmidt and Chaney 1993).

Auch die Verringerung der Toxizität einer Therapie mit Cisplatin kann durch Konjugation an makromolekulare Liganden erreicht werden. Hierbei sind die beiden N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid-Konjugate AP-5280 und AP-5346 zu erwähnen. Für AP-5280 wurde in klinischen Phase I-Studien eine Toleranz für 10-30-fach höhere Dosen im Vergleich zu Cisplatin nachgewiesen. Dosislimitierend war in dieser Studie Erbrechen Grad 3 nach CTC. Typische Cisplatinnebenwirkungen wie Myelosuppression oder Nephrotoxizität waren minimal (Rademaker-Lakhai et al. 2004). Die strukturell ähnliche Substanz AP-5346 konnte in einer Phase I-Studie ebenfalls deutlich höher dosiert werden, als Cisplatin. Weitere Untersuchungen an Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren sowie Ovarialkarzinomrezidiven zeigten 2 partielle

Remissionen, 1 geringfügiges Ansprechen sowie 4 stabile Erkrankungen bei insgesamt 16 auswertbaren Patienten. Interessanterweise zeigte sich bei 2 Patienten mit cisplatinresistenten Ovarialkarzinomrezidiven eine partielle Remission, was die These unterstützt, dass makromolekulare Carrier Resistenzmechanismen in Tumorzellen umgehen können (Kelland 2007).

1.5. Andere Platinverbindungen

Ziel der Entwicklung neuer Platinverbindungen ist eine verbesserte Wirksamkeit, eine Reduktion der unerwünschten Arzneimittelwirkungen sowie die Überwindung von Cisplatinresistenzen.

1.5.1. Oxaliplatin und Carboplatin

Klinische Anwendung finden bereits Carboplatin (*cis*-Diammin(cyclobutan-1,1-dicarboxylato)platin(II)) sowie Oxaliplatin (*cis*-1*R*,2*R*-Cyclohexandiamino)-oxalatplatin(II)), die beide geringere bzw. andere unerwünschte Arzneimittelwirkungen als Cisplatin aufweisen.

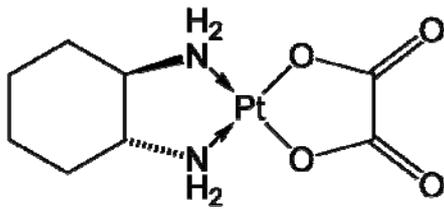


Abb. 5: Oxaliplatin

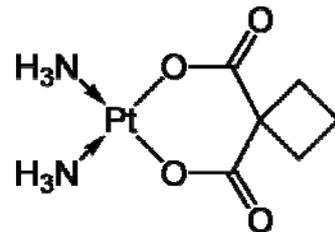


Abb. 6: Carboplatin

Häufig besteht allerdings eine Kreuzresistenz zwischen Carboplatin und Cisplatin. Oxaliplatin weist klinisch ein deutlich anderes Aktivitätsspektrum auf und wird u.a in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms eingesetzt (Pasetto et al. 2006).

Folgende Platinkomplexe befinden sich aktuell in der präklinischen und teilweise auch klinischen Prüfung.

1.5.2. Picoplatin (AMD473, ZD0473, JM473, NX473)

In dieser Verbindung konnte durch Austausch einer der Amingruppen des Cisplatin gegen einen methylsubstituierten Pyridinring eine sterische Hinderung des Cisplatinmoleküls erreicht werden. Durch Integration des Pyridinrings wurde eine sterische Abschirmung des Platinzentrums erreicht, was zu einer verlangsamten intrazellulären Detoxifikation durch Metallothionine und Glutathion führt.

Durch Verwendung des Ringsystems wurde die Lipophilie der Substanz erhöht, wodurch eine enterale Applikation möglich ist.

Nach Nachweis einer zytotoxischen Aktivität *in vitro* gegen Malignomzelllinien (Plasmozytom, Leukämie) (Wong and Giandomenico 1999), die der Aktivität von CDDP vergleichbar war, erfolgten klinische Phase I/II-Studien bei Blasen-, Ovarial-, Mamma-, Prostata- und Bronchialkarzinomen, in der auch *in vivo* eine antitumorale Aktivität nachgewiesen werden konnte (Kostova 2006; Eckardt et al. 2009).

Aktuell wird eine Phase III-Studie zur Wirksamkeit beim kleinzelligen Bronchialkarzinom durchgeführt.

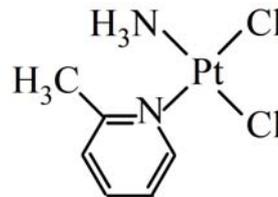


Abb. 7: Picoplatin, *cis*-Ammindichloro(2-methylpyridin)platin(II)

1.5.3. Satraplatin (JM216, BMS182751, BMY45594)

Aufgrund der hohen Beständigkeit dieses oktaedrischen Platin(IV)-Komplexes gegenüber Hydrolyse und Ligandensubstitution ist auch dieser Platinkomplex oral verfügbar.

In präklinischen Evaluierungen ließen sich mindestens 6 Platinkomponenten als Metaboliten der Ursprungssubstanz nachweisen. Von den nachgewiesenen Metaboliten stellt der Platin(II)-Komplex die Substanz mit der größten zytotoxischen Aktivität dar (Wong and Giandomenico 1999; Choy et al. 2008).

Phase-II-Studien konnten die Wirkung von Satraplatin bei Ovarial-, Kolon-, Mamma-, Zervix-, Prostata- und kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachweisen (Kelland 2007).

Eine Phase II-Studie zur Therapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms mit Prednisolon und Satraplatin ergab eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens durch Hinzugabe von Satraplatin gegenüber Prednisolon allein, eine Verlängerung des Gesamtüberlebens konnte jedoch nicht erreicht werden (Sternberg 2005).

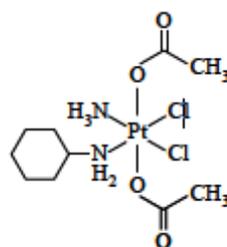


Abb. 8: Satraplatin, *cis*-Diacetatoammindichloro(cyclohexylamin)platin(IV)

1.5.4. BBR3464

BBR3464 ist eine Verbindung von 2 *trans*-Platineinheiten, die über eine aliphatische Platintetramineinheit verbunden sind.

Im Vergleich zu CDDP zeigt sich die Bildung von länger-kettigen Intra- und Interstrangverbindungen innerhalb der DNA. Diese Läsionen werden durch das NER-System nicht erkannt, was als Hauptsache für die zytotoxische Wirkung von BBR3464 angesehen wird (Perego et al. 1999; Wong and Giandomenico 1999). Die Apoptoseinduktion erfolgt über einen p53-unabhängigen Weg auch in primär cisplatinresistenten Zelllinien (Pratesi et al. 1999; Jakupec et al. 2003).

Die klinische Anwendung zeigt divergente Ergebnisse. Bei Pankreas-, Ovarial- und nichtkleinzelligem Bronchialkarzinomen sowie Melanomen konnte in Phase I/II-Studien eine Aktivität nachgewiesen werden (Kasparkova et al. 2002), in Phase II-Studien bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen und bei Magenkarzinomen ließ sich keine Wirksamkeit nachweisen (Jodrell et al. 2004; Hensing et al. 2006).

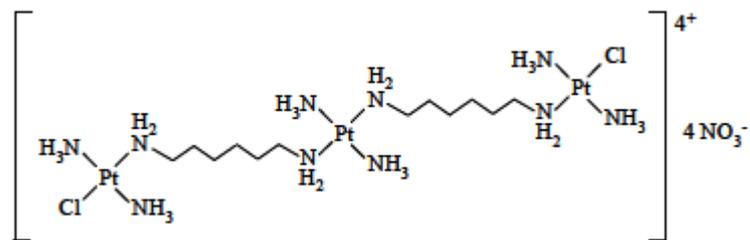


Abb. 9: BBR3464, *trans*-{Bis-[*trans*-diamminchloro- μ -(1,6-diaminohexan)platin(II)]}diamminplatin(II)nitrat

1.5.5. Bamet UD2

Durch Kopplung eines Platin(II)-Komplexes an 2 Moleküle Ursodesoxycholsäure wurde die Substanz Bamet UD2 entwickelt. Diese sogenannte Bamet- (bile acid linked to metal)-Verbindung weist eine erhöhte hepatische Aufnahme sowie durch erneute Absorption im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufs eine verlängerte Verweildauer im Organismus auf. Im Tiermodell zeigte Bamet UD2 eine Überwindung einer Cisplatinresistenz sowie eine erhöhte intrazelluläre Akkumulation. Durch die Konjugation an Gallensäuren ist eine orale Applikation möglich, unerwünschte Nebenwirkungen traten in geringerem Maße als bei Cisplatin auf (Dominguez et al. 2001).

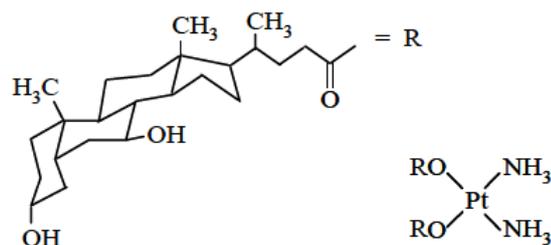


Abb. 10: Bamet-UD2, *cis*-Diamminbis(ursodesoxycholato)platin(II) ()

1.6. Synthese der untersuchten Platinverbindungen

Die Synthese von 12 neuen Platinverbindungen, in denen das Cisplatinmolekül über einen Kohlenstoff-Spacer mit unterschiedlicher Länge mit einem Tetrahydropyranring verbunden sind wurde durch die Arbeitsgruppe von Reinhard Paschke des Instituts für medizinische Chemie durchgeführt (Abb. 11).

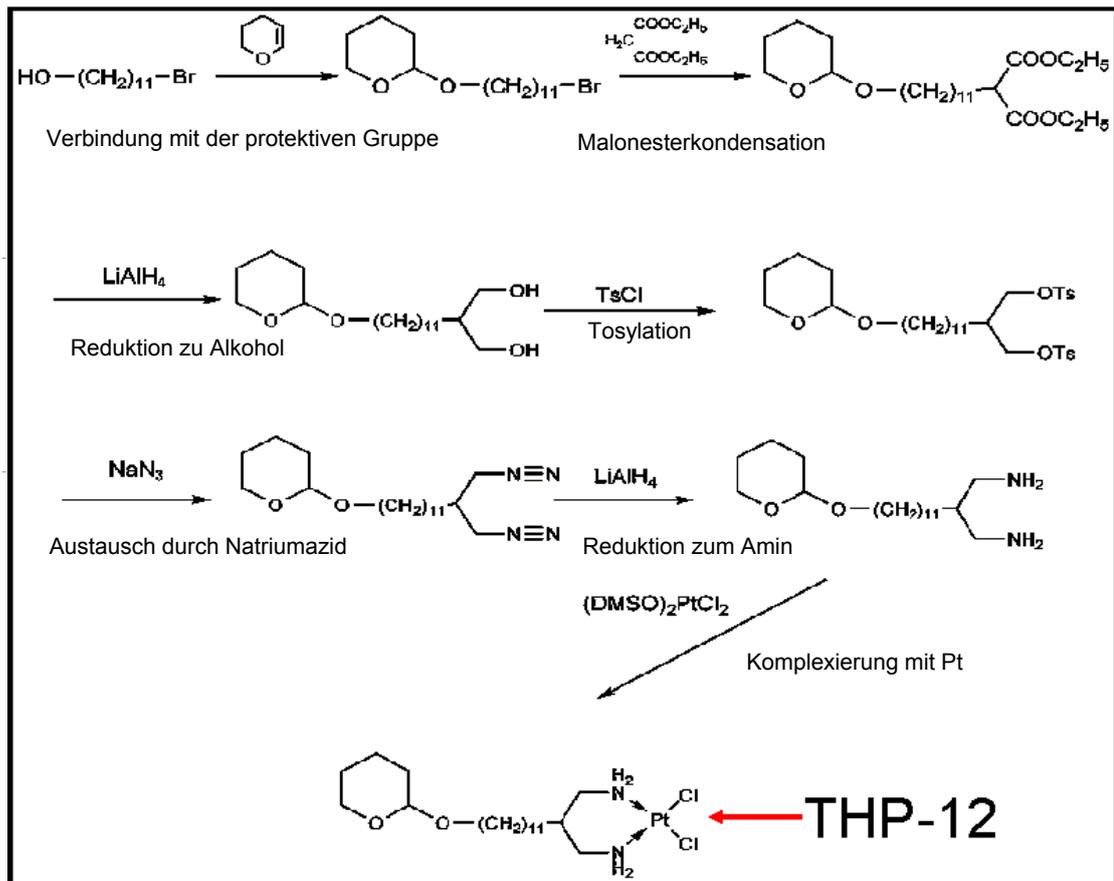


Abb. 11: Synthese von THP 12 (Abbildung: Reinhard Paschke)

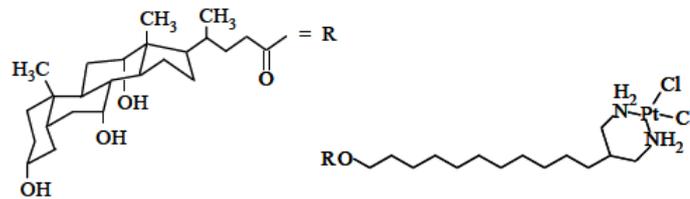


Abb. 12: ChAPt-11, *cis*-Dichloro[13-amino-12-(aminomethyl)tridecylcholato]platin(II)

Zusätzlich erfolgte die Synthese eines Gallensäuren-Cisplatinkonjugates, welches primär zur „targeted therapy“ des cholangiozellulären Karzinoms entwickelt und in Folge als *ChaPt11* durch die Arbeitsgruppe von Wieland Voigt et al. weiter untersucht wurde.

Es ließen sich hohe zytotoxische Aktivitäten in Zelllinien von Kopf-Hals-Tumoren sowie von cholangiozellulären Karzinomen nachweisen. Außerdem zeigte sich eine zytotoxische Aktivität sowohl in cisplatinresistenten als auch cisplatinempfindlichen Keimzelltumorzelllinien (Paschke 2000).

2. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Struktur-Effekt-Analyse von 12 neuen Cisplatinverbindungen THP-1-12 vom Dichloro(*n*-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)R₁)R₂-diaminoplatin(II)-Typ unter besonderer Berücksichtigung der Cisplatin-Resistenz im humanen Keimzelltumormodell.

Speziell sollte Folgendes untersucht werden:

1. der Einfluss der Länge der aliphatischen Seitenketten auf das zytotoxische Potential
2. der Einfluss des zur Konjugation der Seitenkette verwendeten Ringsystems auf das zytotoxische Potential
3. der Einfluss der Bindungsposition (N versus C-Bindung) auf das zytotoxische Potential
4. Testung der zytotoxischen Aktivität im Vergleich zu Cisplatin zum Ausschluss von Kreuzresistenzen
5. Charakterisierung der Zelltodinduktion und Perturbation des Zellzyklus im Vergleich zu Cisplatin

Auf dem Boden der erhobenen Daten sollte das optimale Cisplatin-Konjugat für die weitere präklinische Entwicklung identifiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Die verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, D), der Merck KG (Darmstadt, D) oder von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D) bezogen.

Abweichungen der Bezugsquelle sind gesondert angegeben.

3.1.1. Medien und Zusätze

RPMI-1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
DMEM (Low Glucose) mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
Fetales Kälberserum (FKS)	F Biochrom AG, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
Dulbeccos PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
Trypsin-EDTA 0,05 %/0,02 %	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D

3.1.2. Zytostatika und untersuchte Platinverbindungen

CDDP	<i>cis</i> -Diammindichloroplatin(II)	Sigma-Aldrich 20 mM (in DMF)
THP 1-12	siehe Tabelle	Paschke et al. 20 mM (in DMF)
ChaPt 11	<i>cis</i> -Dichloro[13-amino-12-(aminomethyl)tridecylcholato]platin(II)	Paschke et al. 20 mM (in DMF)

Die zu testenden Platinverbindungen sind in Abbildung 11 aufgeführt.

Die Substanzen 1-4 bestehen aus dem Cisplatingrundgerüst, das über ein Ethanmolekül zu einem Ring geschlossen wird. Am 4'-Stickstoffatom befindet sich eine aliphatische Seitenkette mit 4, 6, 8 oder 10 Kohlenstoffatomen.

Bei den Substanzen 5-8 ist das Cisplatinmolekül durch eine Propangruppe in ein Ringsystem eingebunden.

Die Bindungsstelle für die aliphatische Seitenkette mit 4, 6, 8 oder 10 Kohlenstoffatomen dieser 4 Substanzen befindet sich am N¹- Kohlenstoffatom.

Die Substanzen 9-12 bestehen wie die Substanzen 5-8 aus Cisplatin in einem Propan-Cisplatin-Ring. Allerdings sind die aliphatischen Seitenketten am 2'-Kohlenstoffatom gebunden.

Als dreizehnte Substanz wurde ein Konjugat von Cisplatin an Gallensäure (Cholic acid linked to Cisplatin, ChaPt11) untersucht.

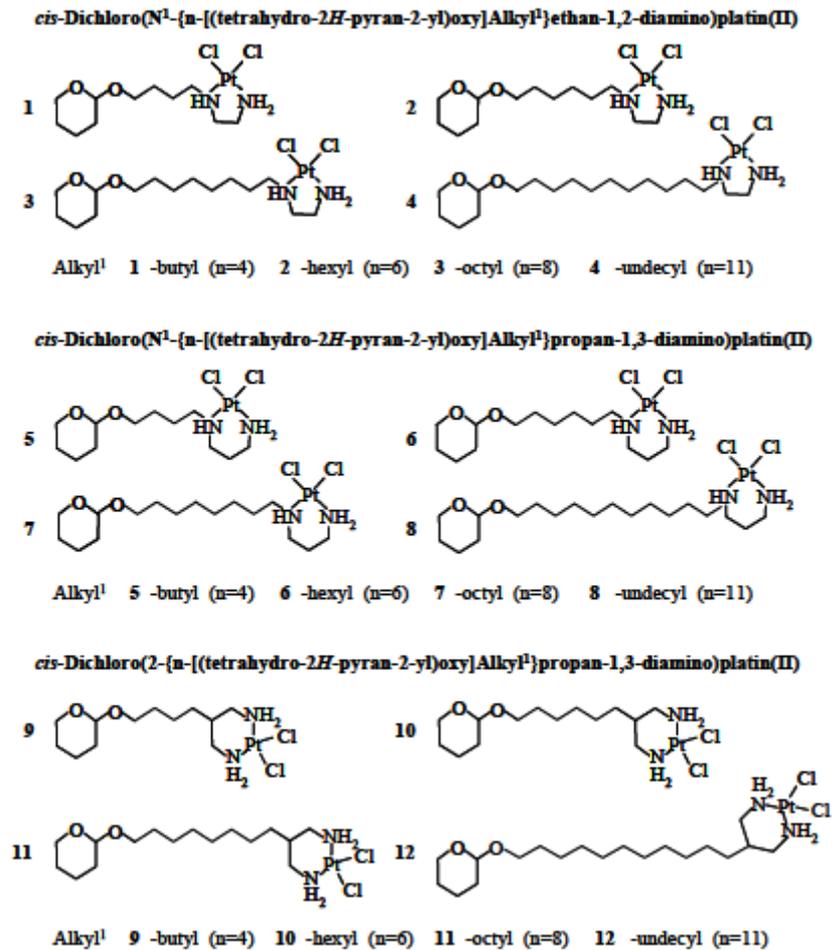


Abb. 13: THP-1 bis THP-12,

cis-Dichloro(m-{n-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]Alkyl¹}Alkyl²-diamino)platin(II)-Verbindungen (); Alkyl¹ -butyl/-hexyl/-octyl/-undecyl;
Alkyl² -ethan/-propan

3.1.3. Reagenzien SRB-Zytotoxizitäts-Assay:

Essigsäure 1 % (in A. dest.)

Sulforhodamin B (SRB)-Lösung 0,4 % (in Essigsäure 1 %)

Trichloressigsäure (TCA) 10 % (in A. dest.)

Tris-HCl 10 mM pH 10,0 (in A. dest.)

3.1.4. Reagenzien Zellzyklus-Analyse:

Ethanol 70 %

Färbe-Puffer:

- FKS 2 %

- Natriumazid 0,01 % (in PBS)

Propidiumiodid (PI) 1 mg/ml (in A. dest.)

RNAse A 1 mg/ml (in PBS)

Sigma-Aldrich

3.1.5. Reagenzien DNA-Fragmentierungs-Assay:

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

3.1.6. Reagenzien Zellzyklus-Analyse:

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

3.2. Geräte und Verbrauchsmittel

FACSCalibur (CellQuest Software)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Gelelektrophorese-Apparatur Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Thermoblock Uno II Biometra	Biotron Biomed.Analytik GmbH, Göttingen, D
Transilluminator Bio Doc Analyze	Biotron Biomed.Analytik GmbH, Göttingen, D
Mikroskope:	
- Axiovert 25 CA	Carl Zeiss AG, Jena, D
- Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Jena, D
Plattenlesegerät:	
- Spectra Rainbow SLT	Tecan LabInstruments GmbH, Crailsheim, D
Plattenwascher PW96 SLT	Tecan LabInstruments GmbH, Crailsheim, D

Zentrifugen:

- Biofuge fresco Heraeus Instruments, Hanau, D
- Labofuge 400 Heraeus Instruments, Hanau, D

3.3. Zelllinien

Die Untersuchungen erfolgten an zwei humanen Keimzelltumorzelllinien.

Zum einen die Zelllinie H12.1 (gemischtzelliger testikulärer Keimzelltumor mit Anteilen von Seminom, Chorionkarzinom, embryonalem Karzinom und Teratom) (Casper et al. 1987), zum anderen die Zelllinie 1411HP (gemischtzelliger Keimzelltumor mit Anteilen von embryonalem Karzinom, Teratom und Dottersacktumor, im Xenograftmodell auch Anteile von unreifem Teratom und spermatozytische Riesenzellen) (Vogelzang et al. 1985).

Bei der Zelllinie 1411HP liegt eine intrinsische Cisplatinresistenz vor (Vogelzang et al. 1985), H12.1 ist cisplatinsensibel (Casper et al. 1987).

Beide Zelllinien wachsen adhärent auf dem Boden des Kulturgefäßes.

3.4. Methoden

3.4.1. Zellkultur

Die Tumorzelllinien H12.1 und 1411HP wurden in RPMI 1640-Medium unter Zugabe von 10% FKS und 1% Streptomycin/Penicillin in Zellkulturflaschen im Brutschrank (37°C, 5%CO₂) kultiviert.

Für die Dauer einer Versuchsreihe wurde jeweils eine vorher hergestellte Charge des Nährmediums benutzt, um die Vergleichbarkeit über die gesamte Dauer der Versuchsreihe zu gewährleisten.

Der Wechsel des Nährmediums erfolgte bedarfsgemäß täglich; bei Erreichen von 90-100 % Konfluenz (in der Regel nach 2 Tagen) wurden die Zelllinien passagiert. Dazu erfolgte die Spülung der Zellschicht mit FKS-freiem RPMI1640-Medium, danach die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mit 1 ml Trypsinlösung. Die Zellzahl pro Milliliter wurde in der Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ermittelt und dann die entsprechende Menge Zellsuspension in die neue Flasche eingebracht (2 Mio. Zellen für H12.1 und 1411HP). Die verbleibende Zellsuspension stand für die Zytotoxizitätsassays zur Verfügung.

Lichtmikroskopisch erfolgte die tägliche Kontrolle des Zellwachstums sowie der Zelldichte in den Kulturflaschen.

3.4.2. Testsubstanzen und Verdünnungsreihen

Die Cisplatinconjugate THP-1-12 wurden in DMF gelöst und als Stammlösung mit 20mM bei 4 °C gelagert. Zur Herstellung der Substanzverdünnungen wurden entsprechende Volumina der

gelösten Farbstoffes in der Mikrotiterplatte bei 570 nm Wellenlänge und dem Proteingehalt der Probe und damit der Zellzahl (Skehan et al. 1990; Voigt 2005).

In der praktischen Durchführung wurde dabei zunächst entsprechend der Beschreibung von Voigt aus den 96-Loch-Platten TCA und eventueller Rückstand abgestorbener Zellen durch 5 Waschzyklen mit Aqua dest. in einem Plattenwaschgerät entfernt. Danach wurden 100µl SRB-Färbelösung 0,4 % (w/v) in 1 % Essigsäure aufgebracht und die Platten für 1 Stunde inkubiert. Anschließend erfolgten 5 Waschküchläge mit jeweils 100µl Essigsäure 1%, durch die nicht an Proteine gebundene Farbstoffreste entfernt wurden. Nach ausreichender Trocknung der Mikrotiterplatten konnte der an zelluläre Proteine gebundene SRB-Farbstoff mit Tris-Puffer gelöst werden; der Farbstoffgehalt des Tris-Puffers nach Lösung korreliert mit dem Anteil der fixierten Zellen im Well (Skehan et al. 1990).

Die photometrische Messung der optischen Dichte erfolgte im Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm.

Die Daten-Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel mit Hilfe eines entwickelten Spread-Sheets. Dabei wurde zunächst für jede Reihe bestehend aus den 8 identisch befüllten Wells ein arithmetischer Mittelwert errechnet. Abschließend wurde dann aus drei unabhängigen Versuchen ein Mittelwert je Datenpunkt mit Standardabweichung errechnet.

Die Erstellung der Graphiken und Errechnung der IC50-Konzentration, also der Konzentration der Substanz, die zu einer Reduktion des Zellwachstums um 50% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte, erfolgte mithilfe des Computerprogramms *SigmaPlot* auf Basis der Hill-Gleichung.

Diese nimmt einen sigmoiden Kurvenverlauf einer Dosiswirkungskurve an. Sie beschreibt den Kurvenverlauf mathematisch exakt unter Angabe der Konzentration eines Arzneimittels A und dem ausgelösten Effekt E auf der Basis des maximalen Effekts E_{max} .

Hill-Gleichung:

$$E/E_{max} = [A]^h / ([A]_{50}^h + [A]^h)$$

E: Effekt

E_{max} : maximaler Effekt

A: Medikament A

[A]: Konzentration des Medikamentes A

h: Hill-Koeffizient

$[A]_{50}$: Konzentration des Medikamentes A, das 50% des maximalen Effektes E_{max} hervorruft (entspricht dem IC50)

Aus den für jede Versuchsreihe bestimmten IC50-Werten wurden mithilfe von Microsoft Excel der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

3.5. Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie

Die verwendete Methode zur Quantifizierung der Zellzyklusfraktionen basierte auf der durchflusszytometrischen Bestimmung des DNA-Gehalts von Einzelzellen durch DNA-Färbung mittels Propidium-Iodid.

Dazu wurden jeweils die Zelllinien 1411HP und H12.1 mit der definierten IC90-Konzentration von Cisplatin (CDDP) und THP-12 entsprechend 30 μM CDDP bzw. 2,5 μM THP-12 für die Zelllinie H12.1 sowie 100 μM CDDP und 2,5 μM THP-12 für die Zelllinie 1411HP behandelt.

Adhärente Zellen wurden nach 8h, 24h, 48h und 72 h durch Trypsinierung vom Boden der Kulturflasche gelöst. Unbehandelte Kontrollen wurden 8h und 24h nach Beginn der Behandlung gewonnen. Für die Analyse wurden sowohl die gelösten adhärenen Zellen als auch die flottierenden Zellen aus dem Überstand der Kulturflasche verwendet.

Es erfolgte im Anschluss die Zentrifugation der Zellsuspension (5 min, 1300 U/min, Raumtemperatur) sowie eine erneute Suspension in PBS zur Reinigung der Zellen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurden die Zellen mit 2ml 70% Ethanol bei 4°C für mindestens 1h fixiert.

Nach erneuter Pelletierung (1500 U/min, 5min, RT) und anschließender Suspension mit 2 ml Färbepuffer (siehe 2.1.4) wurden die Zellen mit 80 μl 1mg/ml RNase für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit Propidiumiodid 1mg/ml (20 μg pro 1 ml Färbepuffer) unter Lichtausschluss bei 37°C für 30 Minuten. Die Analyse des DNA-Gehaltes der behandelten Zellen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messung der Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD) mit einer minimalen Zellzahl von 10.000 Zellen pro Messung. Dabei korreliert die gemessene Fluoreszenzintensität mit dem DNA-Gehalt der untersuchten Probe.

Die Zuordnung der untersuchten Zellen zur jeweiligen Zellzyklusphase ergibt sich aus dem unterschiedlichen DNA-Gehalt der Zelle während des Zellteilungszyklus (G0 und G1-Phase: 2n, S, G2- und M-Phase: 4n). Apoptotische Zellen zeigen aufgrund einer Fragmentierung der DNA nach Einleitung der Apoptose eine Abnahme des DNA-Gehaltes und es wird ein sogenannter SubG1-Peak nachweisbar.

Zur Kalibrierung der Methode und Zuordnung der Peaks ist im Vorfeld ein Test mit Hühnererythrozyten durchgeführt worden.

Die Quantifizierung der Zellzyklus-Phasen erfolgte mittels CellQuest (Becton Dickenson).

3.6. DNA-Fragmentierungsnachweis

Zum Nachweis von Apoptose mittels DNA-Fragmentierung-Assay wurden die Zelllinien H12.1 und 1411HP mit THP12 bzw. Cisplatin über 96h mit 3 μM CDDP bzw. 2,5 μM THP12 für die Zelllinie H12.1 und für die Zelllinie 1411HP mit 10 μM CDDP bzw. 2,5 μM THP12 inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die flottierenden Zellen entnommen, mit PBS gewaschen und bei 1300 Umdrehungen/min 5 min zentrifugiert.

Im Anschluss erfolgte die Lyse der DNA mittels DNA-Lyse-Puffer (je 40 µl pro 1 Million Zellen) für 20 min auf Eis sowie der RNA durch Behandlung mit 10 mg/ml RNase A (je 15 µl pro 1 Million Zellen) bei 37 °C für 2 h und der Proteine durch Behandlung mit 20 mg/ml Proteinase K (je 15 µl pro 1 Million Zellen) bei 50 °C über Nacht (Thermoblock Uno II).

Die Auftrennung der Proben erfolgte nach Hinzugabe von DNA-Beladungspuffer in einem zweiprozentigen Agarose-Gel in TAE-Puffer bei 100V (SubCell GT). Die Visualisierung erfolgte durch Inkubation des Gels in 0,5µg/ml Ethidiumbromidlösung für 30 min, einem Waschschrift für 20 min mit Aqua dest. sowie anschließender Auswertung mittels UV-Licht (Transilluminator BioDoc Analyze).

3.7. Statistik

3.7.1. SRB-Assay

Die mathematische Berechnung der IC50-Werte der Einzelversuche erfolgte mit Hilfe des Programmes *SigmaPlot* auf der Basis der Hill-Gleichung. Aus den IC50-Werten von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Versuchsreihen wurde die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung mit Hilfe von *Microsoft Excel durchgeführt*.

Unterschiede von IC50-Werten der einzelnen Platin-Konjugate wurden mithilfe des Student's T-Test auf Signifikanz untersucht.

3.7.2. Zellzyklusanalysen

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden jeweils drei Mal durchgeführt. Mit Hilfe von *Microsoft Excel* wurde die Berechnung des Mittelwertes sowie der Standardabweichung durchgeführt.

4. Ergebnisse

Lichtmikroskopisch lässt sich die zytotoxische Wirkung durch vermehrtes Auftreten flottierender Zellen feststellen. Durch Absterben der Zellen am Boden des Kulturgefäßes verlieren diese ihre adhärenen Wachstumseigenschaften, was unter dem Mikroskop durch vermehrtes Auftreten von Zellen im Überstand sichtbar wurde. In Abbildung 15 zeigt sich nach Behandlung der Zelllinien H12.1 (Cisplatin-sensibel) und 1411 HP (Cisplatin-resistent) mit äquimolaren Dosen an Cisplatin deutlich der Unterschied in ihrer Sensitivität gegenüber Cisplatin. Erst nach einer Verdreifachung der Konzentration auf 10µM CDDP ist ein ähnliches Verhalten der Zelllinie 1411 HP im Vergleich zur Zelllinie H12.1 zu beobachten (Abb.15).

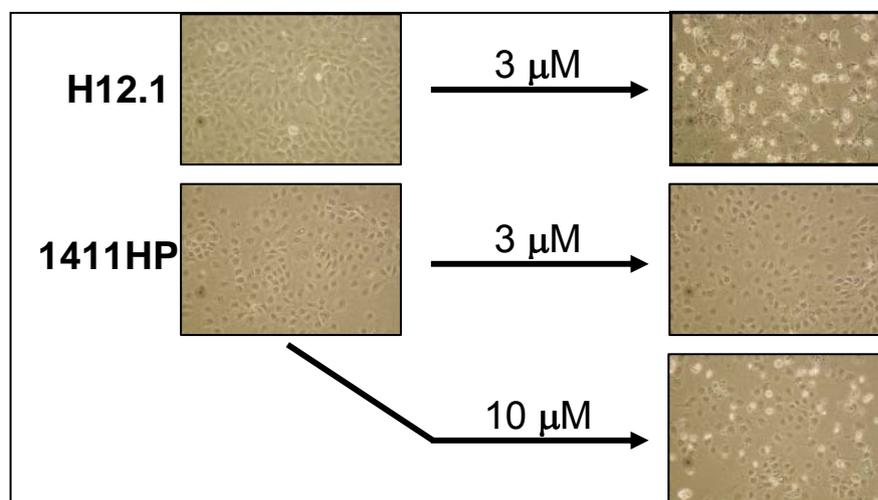


Abb. 15: Bildung von flottierenden Zellen bei Behandlung mit IC90-Konzentrationen von CDDP

Die Charakterisierung der Testsubstanzen unter dem Aspekt der Kohlenstoff-Spacer-Länge, dem Einfluss des Ringsystems sowie der Art der Kopplung fanden an beiden verwendeten Zelllinien parallel statt und werden im Folgenden gegliedert nach diesen Aspekten dargestellt.

4.1. Einfluss des Ringsystems:

Die Substanzen THP 1-4 enthalten Cisplatin in Verbindung mit einer Ethyl-Gruppe, die Substanzen 5-12 auf der Basis eines Propylgruppe (siehe Abb. 11, Material und Methoden).

Um den Einfluss des unterschiedlichen Ringsystems auf die zytotoxische Wirkung der Substanzen zu untersuchen, wurden die Zelllinien H12.1 und 1411HP mit diesen Substanzen inkubiert und die zytotoxischen Effekte mit dem SRB-Assay analysiert. Im Folgenden sind die Versuche nach Zelllinie gegliedert aufgeführt.

4.1.1. H12.1

Vergleicht man die über eine Butylgruppe konjugierten Substanzen THP 1 und 5 stellen sich keine signifikant unterschiedlichen IC50-Werte dar ($p=0,36$).

Für Substanzen mit 6 Kohlenstoffatomen (THP 2 und 6) ergeben sich IC50-Werte von $12,96\mu\text{M}$ und $10,6\mu\text{M/l}$; eine Signifikanz wird nicht erreicht ($p=0,36$).

Für THP 3 und 7 (jeweils 8 Kohlenstoffatome) ergibt sich ein signifikant niedrigerer IC50 für THP 7 im Vergleich zu THP 3 ($p=0,01$).

Für THP 4 und 8 liegt die IC50-Konzentration für THP 8 zwar tendenziell niedriger, Signifikanz wird aber nicht erreicht ($p=0,06$).

Der horizontale Vergleich der Substanzen mit jeweils gleicher Seitenkettenlänge zeigt überwiegend einen geringeren IC50-Wert für Substanzen (und somit eine höhere zytotoxische Aktivität), bei denen die Stickstoffatome des Cisplatinmoleküls mit einem Propanmolekül verbunden sind.

Aufgrund der Bindung der Seitenkette am Kohlenstoffatom der Propylgruppe kann ein Vergleich mit den Substanzen THP 9-12 hier nicht angestellt werden.

4.1.2. 1411HP

Für die Zelllinie 1411HP können keine eindeutigen Unterschiede der Zytotoxizität in Bezug auf das verwendete Ringsystem festgestellt werden.

Im Vergleich von THP 1 und 5 (4 Kohlenstoffatome der Seitenkette) ergibt sich für die Zelllinie 1411HP ein signifikant niedriger IC50-Wert für THP 5 ($p=0,006$) im Vergleich zu THP 1.

Im Vergleich von THP 2 und 6 (Seitenketten jeweils mit 6 Kohlenstoffatomen), ist tendenziell ein niedrigerer IC50 für THP 6 erkennbar, allerdings sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar ($p=0,053$).

THP 3 und 7 (Seitenkette mit 8 Kohlenstoffatomen) weisen signifikante Unterschiede der Toxizität zugunsten von THP 7 (Propylgruppe) in Abhängigkeit vom verwendeten ringbildenden Molekül auf ($p=0,0005$).

Die Substanzen mit 10 Kohlenstoffatomen der Seitenkette, THP 4 und 8 weisen in Bezug auf die verwendete Propyl- oder Ethylgruppe keine signifikanten Unterschiede auf.

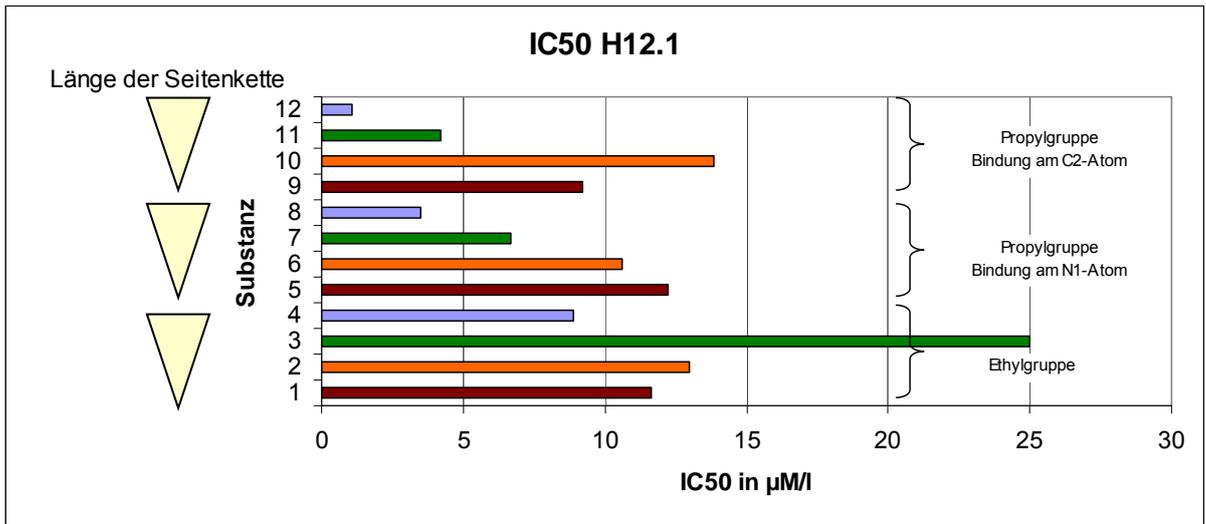


Abb. 16: IC50 H12.1

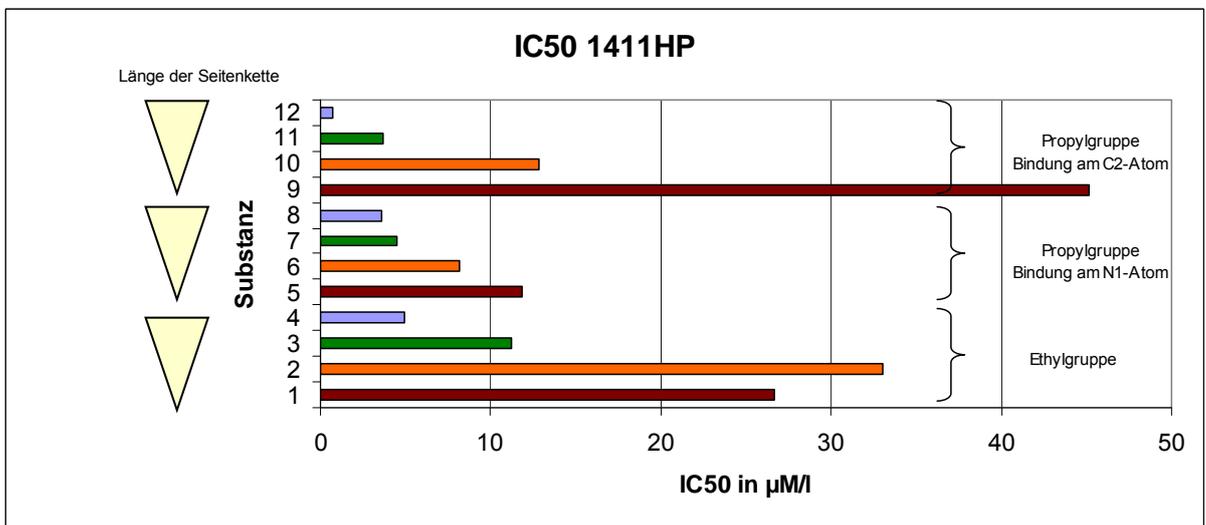


Abb. 17: IC50 1411HP

Hierbei wird deutlich, dass Substanzen gleicher Seitenkettenlänge Unterschiede in ihrer zytotoxischen Aktivität in Abhängigkeit vom verwendeten Ethyl- oder Propylgruppe aufweisen. Die Substanzen mit Propylgruppe im Ringsystem zeigen insgesamt eine höhere Zytotoxizität im Vergleich mit den Substanzen, die über eine Ethylgruppe verfügen.

4.2. Einfluss der Bindungsstelle am Ringsystem

Um den Einfluss der Bindungsstelle am Ringssystem auf die zytotoxische Aktivität der einzelnen Cisplatin-Konjugate zu testen, wurden die Zelllinien H12.1 und 1411HP mit den jeweils korrespondierenden Cisplatin-Konjugaten inkubiert. Die Ergebnisse sind für die verwendeten Zelllinien erneut getrennt dargestellt.

4.2.1. H12.1

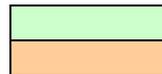
Verglichen wurden die Substanzen mit Bindung der aliphatischen Seitenkette an das N¹-Kohlenstoffatom (Substanz THP 5,6,7,8) mit den Substanzen mit Bindung der aliphatischen Seitenkette am 2'-Kohlenstoffatom der Propylgruppe (Substanz THP 9,10,11,12). Es konnte insgesamt in der Zelllinie H12.1 eine höhere zytotoxische Aktivität für die Substanzen 9,10,11,12, bei denen die aliphatische Seitenkette am 2'-Kohlenstoffatom der Propylgruppe konjugiert ist, nachgewiesen werden.

Ein statistisch signifikanter Unterschied des IC₅₀ lässt sich hierbei allerdings nur für THP 8 und 12 ($p=0,0006$) nachweisen.

Tabelle 1: Einfluss des Bindungsatoms zum Cisplatinmolekül/H12.1

Seitenkettenlänge	Substanz	IC ₅₀	Substanz	IC ₅₀	
4	5	12,2	9	9,23	n.s.
6	6	10,6	10	13,86	n.s.
8	7	6,7	11	4,21	n.s.
10	8	3,5	12	1,08	$p=0,0006$

Bindung am N¹-Stickstoffatom
 Bindung am 2'-Kohlenstoffatom



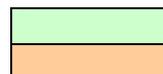
4.2.2. 1411HP

Für die Zelllinie 1411HP lassen sich signifikante Unterschiede der Zytotoxizität für THP 5 und 9 sowie für THP 8 und 12 nachweisen ($p=0,03$ bzw. $p=0,002$). Hierbei zeigt sich ein signifikant niedrigerer IC₅₀-Wert für THP 12 im Vergleich zu THP 8 ($p=0,002$). Bei THP 5 und 9 besteht jedoch ein signifikant niedrigerer IC₅₀ für die butylgruppen-konjugierte Substanz 5. Hierbei fällt jedoch der deutlich höhere IC₅₀-Wert für THP 9 auf, der auf eine nahezu fehlende Wirksamkeit der Substanz in der Zelllinie 1411HP hinweist.

Tabelle 2: Einfluss des Bindungsatoms zum Cisplatinmolekül/1411HP

C-Atome	Substanz	IC ₅₀	Substanz	IC ₅₀	
4	5	11,9	9	45,2	$p=0,03$
6	6	8,1	10	12,9	n.s.
8	7	4,5	11	3,7	n.s.
10	8	3,6	12	0,7	$p=0,002$

Bindung am N¹-Stickstoffatom
 Bindung am 2'-Kohlenstoffatom



4.3. Einfluss der Länge der Seitenkette

4.3.1. H12.1

Mit zunehmender Länge der Alkylkettenspacer-Länge der Platinkonjugate sinkt der IC50-Wert der Substanzen mit Propylgruppe für die Zelllinie H12.1.

Für die Substanzen mit Ethylgruppe ist dieser Zusammenhang in der Zelllinie H12.1 nicht nachweisbar.

Innerhalb der jeweiligen Gruppe mit gleicher Bindungsstelle am Cisplatinmolekül zeigt sich eine Zunahme der Zytotoxizität (entsprechend einem geringeren IC50-Wert) in Abhängigkeit von der Anzahl der Kohlenstoffatome der aliphatischen Seitenkette.

Signifikanz erreichen die Vergleiche von THP 1 zu THP 3 ($p=0,02$), THP 5 zu THP 7 ($p=0,03$) und THP 8 ($p=0,003$) sowie THP 9 zu THP 11 ($p=0,02$) und THP 12 ($p=0,01$).

Dabei ergibt sich jeweils ein niedrigerer IC50-Wert für die Verbindungen mit längerer Seitenkette.

4.3.2. 1411HP

Auch für die Zelllinie 1411HP lassen sich sinkende IC50-Werte mit Zunahme der Länge der Seitenkette nachweisen. Für Substanzen mit Propylgruppe zeigt sich mit Ausnahme des Vergleichs von THP 5 und 6 ein signifikanter Unterschied.

Eine Abnahme des IC50 mit zunehmender Länge der Seitenkette ergibt sich auch für THP 1-4, die über eine Ethylgruppe am Cisplatin verfügen. Signifikante Unterschiede lassen sich für den Vergleich von THP 1 zu THP 3 und THP 4 nachweisen ($p=0,01$ bzw. $0,0009$).

4.4. Vergleich der Zelllinie H12.1 mit der Zelllinie 1411HP

Im Vergleich der cisplatin-sensiblen Zelllinie H12.1 mit der cisplatin-resistenten Zelllinie 1411HP treten insbesondere in Abhängigkeit von der Länge der Seitenketten Unterschiede auf.

In Bezug auf die verwendeten Ringsysteme sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der zytotoxischen Aktivität auf die verschiedenen Zelllinien erkennbar; auch die Bindungsstelle der aliphatischen Seitenkette im Ringsystem lässt keine eindeutigen Unterschiede zwischen der cisplatin-sensiblen Zelllinie H12.1 und der cisplatin-resistenten Zelllinie 1411HP erkennen.

Die 13. untersuchte Substanz, ChaPt, weist bei beiden Zelllinien eine zytotoxische Aktivität auf, deren IC50-Konzentration über der jeweiligen IC50-Konzentration des Cisplatin liegt ($p=0,0003$ bzw. $0,01$).

Auffällig hierbei ist der niedrigere IC50 für die Zelllinie 1411HP, die eine primäre Cisplatinresistenz aufweist ($p=0,0009$). Damit besteht für ChaPt im molaren Vergleich insgesamt keine Kreuzresistenz mit Cisplatin.

Die Substanz mit der höchsten zytotoxischen Aktivität gegenüber der cisplatinresistenten Zelllinie 1411HP ist Substanz THP12 mit einem IC₅₀ von 0,73µM (±0,26), der sogar unterhalb des IC₅₀ für Cisplatin für die cisplatin-sensible Zelllinie H12.1 liegt. Damit liegt im Vergleich mit dem sensitiven Modells ebenfalls keine Cisplatin-Kreuzresistenz für THP-12 vor.

Die Untersuchung der cisplatin-sensiblen Zelllinie H12.1 erbrachte den niedrigsten IC₅₀-Wert für Cisplatin, was für diese Zelllinie somit das höchste zytotoxische Potential der untersuchten Substanzen aufweist.

Eine Übersicht über die korrespondierenden Untersuchungen an beiden Zelllinien gibt Abb. 18.

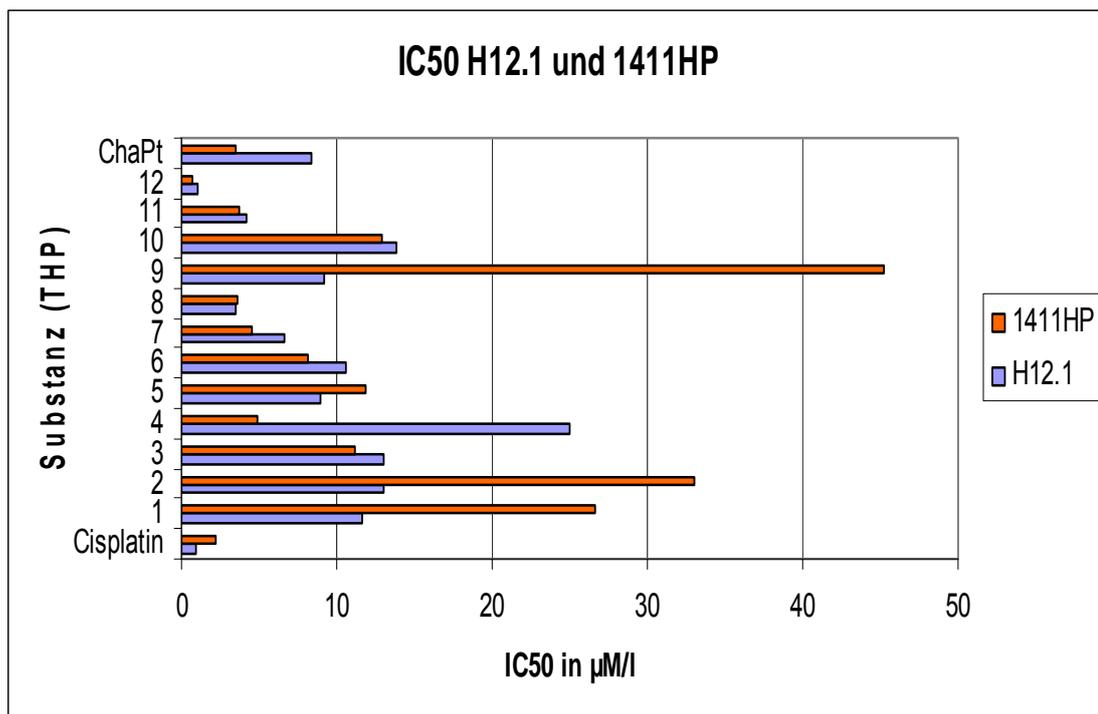


Abb. 18: IC₅₀ für THP 1-12, CDDP und ChaPt 11 für H12.1 und 1411HP

4.5. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse

Im Gegensatz zu Cisplatin, das in der cisplatin-sensiblen Zelllinie zu charakteristischen Verschiebungen des Zellzyklus über G₁-, G₂/M- und S-Phase zur SubG₁-Phase führt, induziert eine Behandlung mit THP-12 einen direkten Übergang in die SubG₁-Phase, was bereits nach 8h nachweisbar ist. Es kommt nach Behandlung mit THP-12 bei beiden untersuchten Zelllinien nicht zu einer Verschiebung des Zellzyklus, wie er durch Cisplatin induziert wird, sondern zu einer direkten Apoptoseinduktion (entspricht Zellen in der SubG₁-Phase).

Die Behandlung der cisplatin-sensiblen Zelllinie H12.1 mit 30µM CDDP führt innerhalb von 8h zu einem Anstieg auf 44,8% Zellen in der G₁-Phase. Nach 24h kommt es dann zu einer Akkumulation von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (51% der Zellen). Nach 48 h ist ein

Anstieg der Zellen in der SubG1-Phase auf 37,1% feststellbar, die apoptotischen Zellen entspricht. Im Verlauf kommt es weiter zu einer Zunahme der Zellen in der SubG1-Phase; nach 72h befinden sich 44,8% der Zellen in der SubG1-Phase. Dabei zeigen sich die Zellen in der G2/M-Phase nahezu über die gesamte Dauer des Versuchs stabil bei etwa 22% der Zellen. Hier lässt sich eine Arretierung der Zellen in dieser Phase nachweisen, was einem G2/M-Arrest vor Übergang in die Apoptose entspricht.

Im Gegensatz dazu führt die Behandlung der cisplatinresistenten Zelllinie 1411HP mit 100 μ M CDDP nicht zu einem Anstieg der Zellen in G1-Phase. Auch kommt es zu keiner Akkumulation in der S-Phase; nur 31,7% der behandelten Zellen befinden sich nach 24h in der S-Phase, in unbehandelten Zellen sind 33,6% in S-Phase nachweisbar. Nach 48 bzw. 72h lässt sich ein Anstieg der Zellen in der SubG1-Phase auf 45 bzw. 56% feststellen.

Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit Substanz 12 bei der cisplatin-sensiblen Zelllinie H12.1 nach 24h direkt zur Zunahme der SubG1-Phasen-Population (41% nach 24h), eine temporäre Anreicherung der Zellen in S- und G1-Phase kann nicht nachgewiesen werden. Auch der G2/M-Arrest, wie er unter CDDP nachweisbar ist, stellt sich nicht dar. Es kommt zu einem deutlichen Abfall der Zellen in G2/M-Phase auf Werte unter 10% nach 48h.

Für die cisplatinresistente Zelllinie 1411HP ist dieser direkte Übergang noch deutlicher ausgeprägt; nach 24h befinden sich bereits 75% der Zellen in der SubG1-Phase, der Anteil der Zellen in G2/M-Phase fällt nach 24h bereits unter 10%, nach 72h sind 83% der Zellen in die SubG1-Phase übergetreten. Eine vorherige Akkumulation in der S- oder G1-Phase ist ebenfalls nicht nachweisbar. Eine zusammenfassende Darstellung der Zellzyklen für beide Zelllinien zeigt Abb. 19.

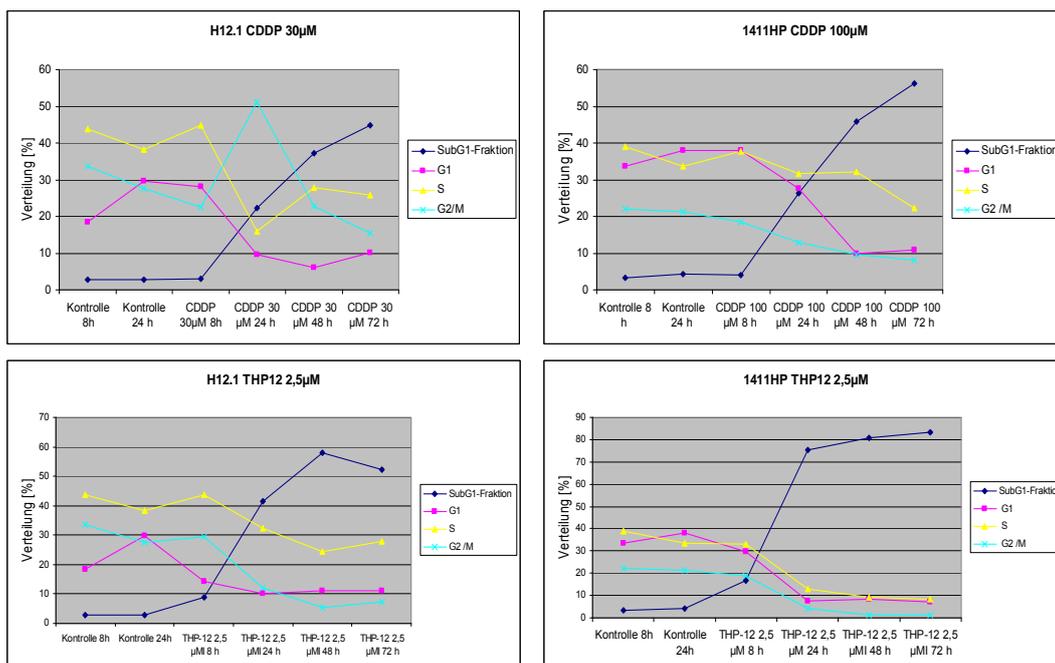


Abb. 19: Zellzyklen unter CDDP und THP 12 für die Zelllinien H12.1 und 1411HP

4.6. Ergebnisse des DNA-Fragmentierungsassays

Zur Klärung der Frage der Art der Zelltod-Induktion durch THP-12 wurde eine DNA-Gelelektrophorese zum Nachweis von Apoptose durchgeführt. Insbesondere aufgrund der deutlich höheren Geschwindigkeit der Zelltod-Induktion stellte sich die Frage, ob THP-12 zu einer spezifischen Induktion von Zelltod durch Apoptose führt oder ob das schnelle Absterben der behandelten Zellen Hinweis geben könnte auf die Induktion von Tumorzellnekrose. Mittels DNA-Fragmentierungsassay ließ sich sowohl für Cisplatin als auch für THP 12 in beiden Zelllinien eine DNA-Fragmentierung nachweisen. Somit kann von Apoptoseinduktion durch beide untersuchten Substanzen ausgegangen werden. Ein repräsentatives Beispiel von insgesamt drei durchgeführten Versuchen zeigt Abb. 20.

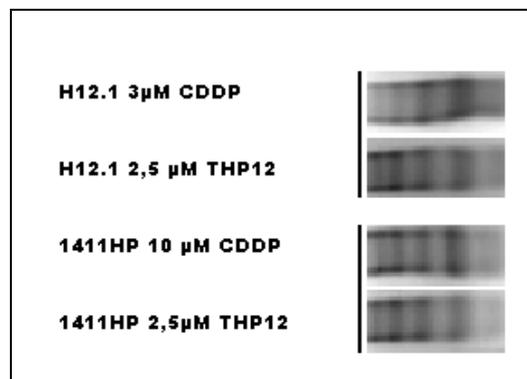


Abb. 20: DNA-Fragmentierung nach 24 h Inkubation

5. Diskussion

Testikuläre Keimzelltumore sind der häufigste Tumor des jungen Mannes im Alter zwischen 25 und 45 Jahren. Im Jahr 2006 erkrankten etwa 4960 Männer an einem testikulären Keimzelltumor, die Sterberate liegt bei etwa 0,3 Todesfällen pro 100.000. Ende 2006 lebten etwa 22.800 Männer mit Keimzelltumoren in Deutschland. Insgesamt betrachtet gehört der testikuläre Keimzelltumor mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 95% zu den prognostisch günstigen Krebserkrankungen. Durch die Einführung des Cisplatin in der Therapie des Hodenkarzinoms konnte die Mortalität deutlich gesenkt werden, obwohl die Inzidenz in der westlichen Welt eher zunehmend ist (Husman 2010). Aktuell liegen die Heilungsraten für Keimzelltumore bei etwa 80%. Bei etwa 20% der Betroffenen kann mit einer konventionellen, platinhaltigen Chemotherapie keine Heilung erreicht werden; es kommt zum Progress der Erkrankung unter Chemotherapie bzw. zu einem Rezidiv der Erkrankung.

In diesen Fällen ist zwar eine Heilung durch Einsatz einer hochdosierten Chemotherapie mit Stammzellsupport möglich, die Heilungschancen sind jedoch geringer als bei initial cisplatinempfindlichen Tumoren (Schmoll et al. 2006).

Klinische Einschränkungen bei der Durchführbarkeit erfährt die Chemotherapie mit Cisplatin durch die teilweise starken unerwünschten Arzneimittelwirkungen des Cisplatin.

Aufgrund seines hohen emetogenen Potentials ist die antiemetische Prophylaxe mit Steroid, Serotoninantagonist und Neurokinin-1-Inhibitor supportivtherapeutisch obligat (Jordan et al. 2007). Auch die ausgeprägte Nephrotoxizität erfordert eine entsprechende prophylaktische Hyperhydratation sowie bedarfsgemäße Diuretikatherapie des Patienten unter Cisplatintherapie (Hensley et al. 2009).

Die Entwicklung neuer Platinderivate hat zum Ziel, mögliche Cisplatinresistenzen zu durchbrechen, eine bessere klinische Verträglichkeit der Chemotherapie zu erreichen und das Spektrum der behandelbaren Erkrankungen zu erweitern.

Obwohl Keimzelltumore eine der Tumorentitäten mit den besten kurativen Therapieoptionen durch Chemotherapie darstellt, sind die Therapieoptionen bei cisplatinrefraktären Keimzelltumoren ungleich geringer. Zahlreiche klinische Therapiekonzepte inklusive der Hochdosistherapie führten hier zu einer Erhöhung der Ansprechrate und der Heilungsrate dieser Patienten mit primär cisplatinrefraktären oder sekundär cisplatinresistenten Tumoren, die Ansprechrate dieser Tumore liegt insgesamt jedoch nur im Bereich von 11-30% z.B. in Bezug auf taxanhaltige Protokolle (Bokemeyer et al. 1999). Um diesen, meist jungen Patienten weitere Therapieoptionen anbieten zu können muss die weitere Entwicklung und klinische Etablierung neuer Substanzen zur Therapie cisplatinrefraktärer Keimzelltumoren gefordert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte die Untersuchung zwölf neuer Platinverbindungen auf ihr zytotoxisches Potential sowie eine Analyse der ausgelösten

Zellzyklusveränderungen der Platinkonjugate im Vergleich zu Cisplatin sowohl an einer primär cisplatinempfindlichen Keimzelltumorzelllinie als auch an einer primär cisplatinresistenten Keimzelltumorzelllinie.

Cisplatin führt in der cisplatinempfindlichen Zelllinie H12.1 zu einer charakteristischen Veränderung im Ablauf des Zellzyklus. Durch Behandlung mit Cisplatin gehen die Zellen aus der G2/M-Phase über G1- und S-Phase schließlich in die SubG1-Phase über, die einer DNA-Fragmentierung bei Apoptose entspricht. Dieser Ablauf lässt sich für die cisplatinresistente Zelllinie 1411HP so nicht nachweisen.

Die Analyse des Zellzyklus nach Therapie mit THP 12 ergibt sowohl für 1411HP als auch für H12.1 einen direkten und schnellen Übergang in die SubG1-Phase. Dieser Phasenwechsel ist bereits nach 8h stärker nachweisbar als bei Behandlung mit Cisplatin und steigt nach 24h und 48h weiter an. Bereits aus den Zytotoxizitätsassays war ersichtlich, dass die neuen Platinverbindungen mit aliphatischer Seitenkette die primäre Cisplatinresistenz der Zelllinie 1411HP zu überwinden vermögen.

Die Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie zeigt, dass die Apoptoseinduktion durch die neuen Platinkomplexe sehr rasch und unter Überwindung der primären Cisplatinresistenz stattfindet. Es kommt zu keiner Verschiebung bzw. Geschwindigkeitsänderung des Zellzyklus der behandelten Zellen, vielmehr tritt eine direkte Apoptoseinduktion ein.

5.1. Carriersysteme

Als mögliche Erklärung für die Überwindung der Cisplatinresistenz und der schnellen Apoptoseinduktion ohne Verschiebung der Zellzykluskompartimente kann ein spezifisches Carriersystem angesehen werden, das zu einer raschen intrazellulären Akkumulation der THP-Verbindungen führt.

Für HeLa-Zellen sowie für Lymphomzellen konnte eine zelluläre Aufnahme zytostatischer Phospholipidverbindungen sowohl durch direkte Membraninteraktion der untersuchten Substanzen sowie auch durch Dynamin-abhängige aktive Endozytose über einen Carrier nachgewiesen werden (Van Der Luit et al. 2003).

Die von *van der Luit et al.* untersuchten Substanzen weisen ähnlich zu den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen aliphatische Seitenketten mit 18-22 C-Atomen auf, allerdings ohne den für die THP-Verbindungen charakteristischen Tetrahydropyranring.

Dominguez et al. konnten in ihren Versuchen mit BAMET-Komplexen ebenfalls eine carriervermittelte Endozytose, unabhängig von den natriumabhängigen spezifischen Gallensäuretransportern, in Leberkarzinomzellen nachweisen. Die Aufnahme der BAMET-Verbindungen stellte sich geringer als die Aufnahme von Gallensäuren, aber stärker als die Aufnahme von Cisplatin dar, was für das Vorliegen eines weiteren Carriersystems in

Hepatozyten spricht. Es existieren Hinweise darauf, dass dieses Carriersystem der Familie der organischen Anionentransporter-Polypeptide angehört (Dominguez, Macias et al. 2001).

Auch aktive Exozytose der Zytostatika kann zu einer verminderten Apoptoseinduktion in cisplatinresistenten Tumorzellen führen. In cisplatinresistenten Leberkarzinomzellen konnte ein erhöhter Efflux von Cisplatin durch die MRP2-Efflux-Pumpe gezeigt werden, wohingegen die untersuchten BAMET-Verbindungen nicht durch dieses Effluxsystem erfasst wurden. Dies führte zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration der BAMET-Substanzen und einer zytotoxischen Aktivität auch bei cisplatinresistenten Tumorzelllinien (Monte et al. 2005).

Für Keimzelltumore sind solche spezifische Carriermechanismen bislang nicht untersucht, stellen aber eine mögliche Erklärung für die rasche Apoptoseinduktion durch THP dar. Weitere Untersuchungen der THP-Substanzen in der Arbeitsgruppe von Voigt *et al.* zeigten neben der zellzyklusunabhängigen Apoptoseinduktion einen von der DNA-Platinierung unabhängigen Weg zur Induktion der Apoptose. Hierbei ließ sich trotz verminderter Ausbildung von DNA-Platin-Addukten eine Zytotoxizität auch in primär cisplatinresistenten Tumorzellen reproduzieren. Dieser Weg der Apoptoseinduktion unterscheidet sich insofern von der Apoptoseinduktion durch Cisplatin, als dieser nicht zu einer verstärkten p53-Aktivität führt. Auch eine Caspasenaktivierung, wie sie durch Cisplatin hervorgerufen werden kann, ließ sich für THP12 nicht nachweisen. Ergänzend zeigte sich eine massive intrazelluläre Freisetzung von Kalzium sowie die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle, was die These eines alternativen, DNA-unabhängigen Mechanismus der Apoptoseinduktion unterstützt (Dietrich et al. 2008).

5.2. Struktur-Membran-Interaktion

Ein weiterer Erklärungsansatz für die rasche Apoptoseinduktion durch THP12 ist eine erhöhte intrazelluläre Akkumulation durch passiven Transport in die Zelle.

In Anlehnung an die Versuche von van de Luit *et al.*, die neben spezifischen Transportmolekülen auch einen passiven, transmembranären Transport (*bilayer „flipping“*) der untersuchten Phospholipide nachweisen konnten, ist ein passiver Transport von THP12 vorstellbar.

In den Versuchen von van de Luit *et al.* ließ sich zeigen, dass nur bei intakter Zellmembran eine dynamin-abhängige intrazelluläre Akkumulation der zytostatischen Phospholipide nachweisbar war.

Nach Zugabe von Monensin, einer Substanz, die zu einer Änderung des Membranelektropotentials sowie des Membran-pH-Wertes der Basalmembran führt, ergab sich ein Abfall der aufgenommenen Substanzmenge der zytostatischen Phospholipide um mehr als 50% (Tartakoff 1983; Van Der Luit, Budde et al. 2003).

Aufgrund der aliphatischen Seitenkette liegt im Vergleich zu Cisplatin eine deutlich höhere Lipophilie der THP-Verbindungen vor, die eine passive, transmembranäre Aufnahme ermöglichen könnte.

5.3. Struktur-DNA-Interaktion

Ein weiterer Ansatz, die zytotoxische Wirkung der THP-Verbindungen zu erklären, ist eine vermehrte DNA-Platinierung im Vergleich zu Cisplatin.

Aber auch strukturelle Unterschiede der Platinderivate ändern ihr zytotoxisches Verhalten. Für Carboplatin wurde nachgewiesen, dass eine langsamere Aufnahme in die Zelle sowie der (im Vergleich zu Cisplatin) stabilisierte Ligand zu einer verringerten Toxizität der Substanz bei ähnlicher zytostatischer Aktivität führt (Knox et al. 1986).

Für Oxaliplatin lassen sich trotz vergleichbarer zytostatischer Aktivität und teilweise ausbleibender Kreuzresistenz zu Cisplatin im Vergleich zu Cisplatin geringere Mengen der DNA-Platinierung nachweisen. Eine mögliche Ursache für die dennoch bestehende zytostatische Aktivität wird in der unterschiedlichen Beugung der DNA-Doppelhelix durch die beiden Zytostatika gesehen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von Oxaliplatin zu einer Beugung der DNA um 31° führte, wogegen die Cisplatinaddukte eine Beugung von 22° aufweisen (Wu et al. 2007). Die unterschiedliche Reaktion der zellulären Proteine auf die sich so unterscheidenden Addukte stellt eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Wirkungs- und Nebenwirkungsspektren von Cisplatin und Oxaliplatin dar (Pizarro and Sadler 2009).

Eine weitere Möglichkeit für die Entwicklung einer Cisplatinresistenz stellt das Umgehen der DNA-Reparaturmechanismen dar. Bei Bindung des multinukleären Platinkomplexes BBR3464 an die DNA entstehen im Gegensatz zu Cisplatinaddukten keine ausgeprägten Formänderungen der DNA wie Schlaufen oder Entspiralisierungen. Aufgrund des Fehlens dieser Veränderungen stellt der BBR3463-DNA-Komplex ein ungeeignetes Substrat für die DNA-Schäden reparierenden Proteine wie NER und HMG dar, die Reparaturmechanismen werden nicht aktiv, es kommt zur Apoptoseinduktion in den Tumorzellen (Ohndorf et al. 1999).

Inwieweit eine ähnliche fehlende Strukturveränderung durch die untersuchten THP-Substanzen verursacht wird, war nicht Inhalt der vorliegenden Arbeit.

5.4. Probleme

Probleme in der Anwendung der THP-Verbindungen ergaben sich vor allem durch die schlechte Löslichkeit der Verbindungen in wässriger Lösung. Als Ursache kann die zunehmende Lipophilie der Substanzen mit wachsender Länge der Seitenketten vermutet werden. Eine

Hinzugabe eines entsprechenden Lösungsmittels wurde bislang nicht untersucht, stellt aber eine Option zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit der THP-Komplexe dar.

5.5. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit charakterisieren die untersuchten Platinkomplexe als mögliche Option zur Überwindung der Chemotherapieresistenz von Keimzelltumoren.

Die Behandlung mit THP 12 führt zu einer Apoptoseinduktion in cisplatin-sensiblen und cisplatin-resistenten Keimzelltumorzelllinien. Hierbei konnte durch die durchflusszytometrischen Untersuchungen eine rasche und zellzyklusunabhängige Apoptoseinduktion gezeigt werden; die Apoptoseinduktion konnte durch den DNA-Fragmentierungsassay von Nekroseprozessen abgegrenzt werden.

Es ergeben sich folgende Fragen in Bezug auf den klinischen Einsatz der untersuchten Verbindungen:

5.5.1. Klärung der zellulären Aufnahme

Zur Klärung der Aufnahmeprozesse in die Zelle muss eine genauere Untersuchung des Membranverhaltens der THP-Komplexe erfolgen. Auch die Frage der Dissoziation im chloridarmen Intrazellulärraum kann zwar angenommen, jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht bewiesen werden. Ob die Überwindung der Cisplatinresistenz durch eine höhere intrazelluläre Konzentration von THP12 im Vergleich zu Cisplatin erreicht wird, oder ob ein höheres Potential zur DNA-Schädigung vorliegt, kann bislang nicht definiert werden.

Interessant ist auch die Frage nach Carriermolekülen, die zu einer intrazellulären Akkumulation von THP12 führen bzw. ob Carriermoleküle wie hCTR1, ATP7A, ATP7B und MRP2, die durch Ausschluss von intrazellulärem Cisplatin zu einer Resistenzentwicklung beitragen, THP 12 ebenfalls als Substrat verwenden können.

5.5.2. Grad der DNA-Platinierung durch THP-Komplexe

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen einen zellzyklusunabhängigen Weg der Apoptoseinduktion, der durch die untersuchten Substanzen ausgelöst wird. Zu klären ist die Frage, ob durch die spezielle Struktur der THP-Verbindungen eine höhere Rate der DNA-Platinierung erreicht werden kann bzw. ob durch die molekularen Wechselwirkungen ein geänderter Einfluss auf die DNA-Doppelhelix mit daraus resultierender Konformationsänderung existiert. Hierzu könnten die Bestimmung der DNA-Platinierung sowie ultrastrukturelle Untersuchungen des DNA-THP-Adduktes Aufschlüsse liefern.

5.5.3. Verbesserung der Löslichkeit

In der praktischen Anwendung der THP-Komplexe zeigte sich mit steigender Zahl der Kohlenstoffatome eine schlechtere Löslichkeit der Substanzen in Wasser. THP 12 löste sich beispielsweise erst nach Erwärmung der Substanz im Wasserbad auf 37°C sowie längerfristiger Durchmischung der Substanzprobe.

Inwieweit die Zugabe eines entsprechenden Lösungsvermittlers (Macrogol, Polysorbat), wie sie z.B. auch für Taxane verwendet werden, zu einer besseren Wasserlöslichkeit der Substanzen führt, wurde bislang nicht untersucht.

Allerdings eröffnet sich durch die höhere Lipophilie der Substanz in Analogie zu Pico- und Satraplatin die Möglichkeit der oralen Applikation. Hierzu wurden bislang keine Untersuchungen durchgeführt.

5.5.4. Kombination mit anderen Zytostatika

In der onkologischen Therapie existieren Substanzen, die in Monotherapie keine überzeugenden zytostatischen Eigenschaften besitzen, in Kombination mit anderen Zytostatika jedoch zu einer Erhöhung der Ansprechrate bei bestimmten Tumoren führen. Kombinationsversuche mit den THP-Verbindungen sind eine weitere Möglichkeit, deren klinisches Einsatzspektrum zu definieren.

5.5.5. Testung in vivo, Ermittlung von Toxizitäten

Vielversprechende zytostatische Eigenschaften neuer Substanzen *in vitro* sind nicht das einzige Kriterium, diese weiter klinisch zu erproben. Die Evaluation möglicher unerwünschter Nebenwirkungen ist obligater Bestandteil der Arzneimittelentwicklung. Inwieweit ein klinisch akzeptables Nebenwirkungsprofil vorliegt, muss zunächst durch *in vivo* Testung am Tiermodell nachgewiesen werden. Hierzu existieren bereits Xenograftmodelle von Keimzelltumoren in Nacktmäusen, die zur Evaluation der Akuttoxizität der Substanzen geeignet erscheinen.

5.5.6. Klärung des Apoptosewegs

Im Gegensatz zu cisplatininduzierter Apoptose tritt nach Behandlung mit THP12 eine deutlich schnellere und zellzyklusunabhängige Apoptoseinduktion ein.

Die Ursachen für diesen raschen Mechanismus sind bislang nicht erklärt. Möglich hierbei ist eine Apoptoseinduktion durch Affektion weiterer Zielstrukturen neben der DNA bzw. Apoptoseinduktion auf einem bislang nicht bekannten, DNA-unabhängigem, alternativen Weg.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit erfolgte die Struktur-Effekt-Analyse 12 neuer Cisplatinverbindungen.

Hierzu wurde eine Zytotoxizitätsmessung mittels Sulforhodamin B -Assay in einer cisplatin-sensiblen und einer cisplatin-resistenten humanen Keimzelltumorzelllinie durchgeführt.

In diesen Versuchen konnte eine Zytotoxizität der untersuchten Substanzen nachgewiesen werden, die mit der Bindungsstelle des Cisplatinmoleküls sowie der Länge der aliphatischen Seitenkette korreliert. Diese Zytotoxizität konnte auch in der cisplatin-resistenten Zelllinie 1411HP nachgewiesen werden.

Im Anschluss erfolgte die Charakterisierung des zytotoxischen Effekts, der durch die aktivste Substanz, THP 12, ausgelöst wurde, im Vergleich zu Cisplatin.

Im DNA-Fragmentierungsassay konnte eine für die Apoptose charakteristische DNA-Fragmentierung nach Behandlung mit THP 12 nachgewiesen werden. Nekrotische Prozesse konnten somit als Ursache für die zytotoxische Wirkung von THP12 weitgehend ausgeschlossen werden.

Der Einfluss der Behandlung mit THP 12 auf den Zellzyklus wurde mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusanalyse ermittelt. Im Gegensatz zur Apoptoseinduktion durch Cisplatin, die zu einem Zellzyklusarrest mit Übergang der untersuchten Zellen zunächst in die G1-, später G2/M-Phase vor der Apoptose führt, erfolgt die durch THP 12 ausgelöste Zytotoxizität durch direkten und schnellen Übergang der Tumorzellen in die SubG1-Phase, die der Apoptose entspricht.

Hierbei konnte eine deutlich schnellere Apoptoseinduktion im Vergleich zu Cisplatin ohne Einfluss auf den Zellzyklus nachgewiesen werden.

Mögliche Ursachen für diese schnelle Apoptoseinduktion auch in cisplatin-resistenten Keimzelltumorzelllinien sind, im Vergleich zu Cisplatin, eine vermehrte zelluläre Aufnahme, eine erhöhte DNA-Bindung oder eine Konformationsänderung der gebildeten DNA-THP12-Addukte oder ein DNA-unabhängiger Weg der Apoptoseinduktion.

7. Literatur

- Aebi, S.,Kurdi-Haidar, B.,Gordon, R.,Cenni, B.,Zheng, H.,Fink, D.,Christen, R. D.,Boland, C. R.,Koi, M.,Fishel, R. and Howell, S. B. (1996). Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 56(13): 3087-90.
- Andrews, P. A. and Howell, S. B. (1990). Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells* 2(2): 35-43.
- Bertz, J.,Giersiepen, K.,Haberland, J. and Ziegler, H. (2006).5. "Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends." <http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=481>
- Bokemeyer, C.,Kollmannsberger, C.,Harstrick, A.,Beyer, J.,Gerl, A.,Casper, J.,Metzner, B.,Hartmann, J. T.,Schmoll, H. J. and Kanz, L. (1999). Treatment of patients with cisplatin-refractory testicular germ-cell cancer. German Testicular Cancer Study Group (GTCSG). *Int J Cancer* 83(6): 848-51.
- Borst, P.,Evers, R.,Kool, M. and Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92(16): 1295-302.
- Bose, R. N. (2002). Biomolecular targets for platinum antitumor drugs. *Mini Rev Med Chem* 2(2): 103-11.
- Casper, J.,Schmoll, H. J.,Schnaidt, U. and Fonatsch, C. (1987). Cell lines of human germinal cancer. *Int J Androl* 10(1): 105-13.
- Choy, H.,Park, C. and Yao, M. (2008). Current status and future prospects for satraplatin, an oral platinum analogue. *Clin Cancer Res* 14(6): 1633-8.
- Cui, Y.,Konig, J.,Buchholz, J. K.,Spring, H.,Leier, I. and Keppler, D. (1999). Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 55(5): 929-37.
- Dieckmann KP, Pichlmeier U (2003). Epidemiologie der testikulären Keimzelltumoren. *Onkologie* 9: 943-954.
- Dietrich A, Mueller T, Paschke R, Kalinowski B, Behlendorf T, Reipsch F, Fruehauf A, Schmoll HJ, Kloft C, Voigt W. 2-(4-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-undecyl)-propane-1,3-diamminedichloroplatinum(II): a novel platinum compound that overcomes cisplatin resistance and induces apoptosis by mechanisms different from that of cisplatin (2008) *Med Chem*. 51(17):5413-22
- Dominguez, M. F.,Macias, R. I.,Izco-Basurko, I.,de La Fuente, A.,Pascual, M. J.,Criado, J. M.,Monte, M. J.,Yajeya, J. and Marin, J. J. (2001). Low in vivo toxicity of a novel cisplatin-ursodeoxycholic derivative (Bamet-UD2) with enhanced cytostatic activity versus liver tumors. *J Pharmacol Exp Ther* 297(3): 1106-12.
- Eckardt, J. R.,Bentsion, D. L.,Lipatov, O. N.,Polyakov, I. S.,Mackintosh, F. R.,Karlin, D. A.,Baker, G. S. and Breitz, H. B. (2009). Phase II study of picoplatin as second-line therapy for patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 27(12): 2046-51.
- Einhorn, L. H. and Williams, S. D. (1979). The role of cis-platinum in solid-tumor therapy. *N Engl J Med* 300(6): 289-91.

- Forman, D., Oliver, R. T., Brett, A. R., Marsh, S. G., Moses, J. H., Bodmer, J. G., Chilvers, C. E. and Pike, M. C. (1992). Familial testicular cancer: a report of the UK family register, estimation of risk and an HLA class 1 sib-pair analysis. *Br J Cancer* 65(2): 255-62.
- Fujii, R., Mutoh, M., Niwa, K., Yamada, K., Aikou, T., Nakagawa, M., Kuwano, M. and Akiyama, S. (1994). Active efflux system for cisplatin in cisplatin-resistant human KB cells. *Jpn J Cancer Res* 85(4): 426-33.
- Gately, D. P. and Howell, S. B. (1993). Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 67(6): 1171-6.
- Gibbons, G. R., Page, J. D., Mauldin, S. K., Husain, I. and Chaney, S. G. (1990). Role of carrier ligand in platinum resistance in L1210 cells. *Cancer Res* 50(20): 6497-501.
- Godwin, A. K., Meister, A., O'Dwyer, P. J., Huang, C. S., Hamilton, T. C. and Anderson, M. E. (1992). High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7): 3070-4.
- Hall, M. D., Okabe, M., Shen, D. W., Liang, X. J. and Gottesman, M. M. (2008). The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 495-535.
- Heidenreich, A., Kuczyk, M. and Albers, P. (1998). [Molecular pathogenesis and prognostic factors in testicular tumor]. *Urologe A* 37(6): 593-608.
- Hensing, T. A., Hanna, N. H., Gillenwater, H. H., Gabriella Camboni, M., Allievi, C. and Socinski, M. A. (2006). Phase II study of BBR 3464 as treatment in patients with sensitive or refractory small cell lung cancer. *Anticancer Drugs* 17(6): 697-704.
- Hensley, M. L., Hagerty, K. L., Kewalramani, T., Green, D. M., Meropol, N. J., Wasserman, T. H., Cohen, G. I., Emami, B., Gradishar, W. J., Mitchell, R. B., Thigpen, J. T., Trotti, A., 3rd, von Hoff, D. and Schuchter, L. M. (2009). American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. *J Clin Oncol* 27(1): 127-45.
- Husman G, Kaatsch P, Katalinic A (2010). *Krebs in Deutschland, 2005/2006, Häufigkeiten und Trends*. Berlin, Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.: 76-79.
- Husman, G., Kaatsch, P. and Katalinic, A. (2010). *Krebs in Deutschland, 2005/2006, Häufigkeiten und Trends*. Berlin, Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.: 76-79.
- Jakupec, M. A., Galanski, M. and Keppler, B. K. (2003). Tumour-inhibiting platinum complexes--state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 1-54.
- Jedlitschky, G., Hoffmann, U. and Kroemer, H. K. (2006). Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2(3): 351-66.
- Jodrell, D. I., Evans, T. R., Steward, W., Cameron, D., Prendiville, J., Aschele, C., Noberasco, C., Lind, M., Carmichael, J., Dobbs, N., Camboni, G., Gatti, B. and De Braud, F. (2004). Phase II studies of BBR3464, a novel tri-nuclear platinum complex, in patients with gastric or gastro-oesophageal adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 40(12): 1872-7.

- Jordan K., Behlendorf T., Schmoll H.-J. (2007). Adäquate Supportivtherapie beim Einsatz platinhaltiger Derivate: Nephro- und Neurotoxizität sicher beherrschen. Im Fokus Onkologie 06/2007.
- Jordan, K., Sippel, C. and Schmoll, H. J. (2007). Guidelines for antiemetic treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting: past, present, and future recommendations. *Oncologist* 12(9): 1143-50.
- Jordan, P. and Carmo-Fonseca, M. (2000). Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 57(8-9): 1229-35.
- Kalayda, G. V., Wagner, C. H., Buss, I., Reedijk, J. and Jaehde, U. (2008). Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer* 8: 175.
- Kasparkova, J., Zehulova, J., Farrell, N. and Brabec, V. (2002). DNA interstrand cross-links of the novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464. Conformation, recognition by high mobility group domain proteins, and nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 277(50): 48076-86.
- Katano, K., Kondo, A., Safaei, R., Holzer, A., Samimi, G., Mishima, M., Kuo, Y. M., Rochdi, M. and Howell, S. B. (2002). Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res* 62(22): 6559-65.
- Kelland, L. (2007). Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new analogues. Satraplatin and picoplatin. *Expert Opin Investig Drugs* 16(7): 1009-21.
- Knox, R. J., Friedlos, F., Lydall, D. A. and Roberts, J. J. (1986). Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res* 46(4 Pt 2): 1972-9.
- Koberle, B., Masters, J. R., Hartley, J. A. and Wood, R. D. (1999). Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol* 9(5): 273-6.
- Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., van Eijk, M. J., Juijn, J. A., Baas, F. and Borst, P. (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57(16): 3537-47.
- Kostova, I. (2006). Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 1(1): 1-22.
- Lutzker, S. G. and Barnard, N. J. (1998). Testicular germ cell tumors: molecular understanding and clinical implications. *Mol Med Today* 4(9): 404-11.
- Martin, L. P., Hamilton, T. C. and Schilder, R. J. (2008). Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 14(5): 1291-5.
- Mayer, F., Honecker, F., Looijenga, L. H. and Bokemeyer, C. (2003). Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors. *Ann Oncol* 14(6): 825-32.

- Monte, M. J., Ballesteros, M. R., Briz, O., Perez, M. J. and Marin, J. J. (2005). Proapoptotic effect on normal and tumor intestinal cells of cytostatic drugs with enterohepatic organotropism. *J Pharmacol Exp Ther* 315(1): 24-35.
- Mueller, T., Mueller, L. P., Luetzkendorf, J., Voigt, W., Simon, H. and Schmoll, H. J. (2006). Loss of Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells is associated with induction of cisplatin resistance. *Tumour Biol* 27(2): 71-83.
- Mueller, T., Voigt, W., Simon, H., Fruehauf, A., Bulankin, A., Grothey, A. and Schmoll, H. J. (2003). Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. *Cancer Res* 63(2): 513-21.
- Ohndorf, U. M., Rould, M. A., He, Q., Pabo, C. O. and Lippard, S. J. (1999). Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature* 399(6737): 708-12.
- Paschke, R., Kalbitz, J., Paetz, C (2000). Novel spacer linked bile acid-cisplatin compounds as a model for specific drug delivery, synthesis and characterization. *Inorg Chim Acta* 304: 241-249.
- Pasetto, L. M., D'Andrea, M. R., Brandes, A. A., Rossi, E. and Monfardini, S. (2006). The development of platinum compounds and their possible combination. *Crit Rev Oncol Hematol* 60(1): 59-75.
- Perego, P., Gatti, L., Caserini, C., Supino, R., Colangelo, D., Leone, R., Spinelli, S., Farrell, N. and Zunino, F. (1999). The cellular basis of the efficacy of the trinuclear platinum complex BBR 3464 against cisplatin-resistant cells. *J Inorg Biochem* 77(1-2): 59-64.
- Perez, R. P., Hamilton, T. C. and Ozols, R. F. (1990). Resistance to alkylating agents and cisplatin: insights from ovarian carcinoma model systems. *Pharmacol Ther* 48(1): 19-27.
- Pizarro, A. M. and Sadler, P. J. (2009). Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* 91(10): 1198-211.
- Pratesi, G., Perego, P., Polizzi, D., Righetti, S. C., Supino, R., Caserini, C., Manzotti, C., Giuliani, F. C., Pezzoni, G., Tognella, S., Spinelli, S., Farrell, N. and Zunino, F. (1999). A novel charged trinuclear platinum complex effective against cisplatin-resistant tumours: hypersensitivity of p53-mutant human tumour xenografts. *Br J Cancer* 80(12): 1912-9.
- Rabik, C. A. and Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33(1): 9-23.
- Rademaker-Lakhai, J. M., Terret, C., Howell, S. B., Baud, C. M., De Boer, R. F., Pluim, D., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. and Droz, J. P. (2004). A Phase I and pharmacological study of the platinum polymer AP5280 given as an intravenous infusion once every 3 weeks in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 10(10): 3386-95.
- Sarna, G., Skinner, D. G., Smith, R. B., Zigelboim, J., Goodnight, J. E. and Feig, S. (1980). cis-Diamminedichloroplatinum(II) alone and in combination in the treatment of testicular and other malignancies. *Cancer Treat Rep* 64(10-11): 1077-82.
- Schmidt, W. and Chaney, S. G. (1993). Role of carrier ligand in platinum resistance of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 53(4): 799-805.

- Schmoll H-J, Höffken K, Posinger K (2006). Kompendium Internistische Onkologie. Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82(13): 1107-12.
- Sternberg, C. N. (2005). Satraplatin in the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int* 96(7): 990-4.
- Tartakoff, A. M. (1983). Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell* 32(4): 1026-8.
- Van Der Luit, A. H., Budde, M., Verheij, M. and Van Blitterswijk, W. J. (2003). Different modes of internalization of apoptotic alkyl-lysophospholipid and cell-rescuing lysophosphatidylcholine. *Biochem J* 374(Pt 3): 747-53.
- Vogelzang, N. J., Bronson, D., Savino, D., Vessella, R. L. and Fraley, E. F. (1985). A human embryonal-yolk sac carcinoma model system in athymic mice. *Cancer* 55(11): 2584-93.
- Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med* 110: 39-48.
- Voigt, W. (2006). Cisplatin und seine Analoga. *Pharmazie unserer Zeit* 2: 134-140.
- Voigt, W.; Dietrich, A.; Schmoll, H.-J. (2006). Overview of development status and clinical action. Cisplatin and its analogues. *Pharm Unserer Zeit* 35 (2): 134-143.
- Welsh, C., Day, R., McGurk, C., Masters, J. R., Wood, R. D. and Koberle, B. (2004). Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer* 110(3): 352-61.
- Wittekind, C. (2008). Biologie und Pathologie von Keimzelltumoren des Hodens. *Onkologie* 14: 602-610.
- Wong, E. and Giandomenico, C. M. (1999). Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* 99(9): 2451-66.
- Wu, Y., Bhattacharyya, D., King, C. L., Baskerville-Abraham, I., Huh, S. H., Boysen, G., Swenberg, J. A., Temple, B., Campbell, S. L. and Chaney, S. G. (2007). Solution structures of a DNA dodecamer duplex with and without a cisplatin 1,2-d(GG) intrastrand cross-link: comparison with the same DNA duplex containing an oxaliplatin 1,2-d(GG) intrastrand cross-link. *Biochemistry* 46(22): 6477-87.
- Zhang, K., Chew, M., Yang, E. B., Wong, K. P. and Mack, P. (2001). Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms. *Mol Pharmacol* 59(4): 837-43.

Thesen

- 1) Maligne Keimzelltumore sind die häufigste Krebserkrankung bei Männern im Alter zwischen 20 und 35 Jahren.
- 2) Durch Einführung der cisplatinhaltigen Kombinationschemotherapie konnte die Gesamtheilungsrate auf ca.90% gesteigert werden.
- 3) Keimzelltumore mit Cisplatinresistenz (intrinsisch oder erworben) haben eine deutlich schlechtere Prognose.
- 4) Klinische Strategien zur Überwindung von Cisplatinresistenz bei Keimzelltumoren bestehen in Hochdosistherapie, Verwendung neuer Substanzen (z.B. Taxane) sowie aggressiverer Initialtherapie.
- 5) Zellbiologische Gründe für Cisplatinresistenz können eine verminderte intrazelluläre Akkumulation (durch verringerte Aufnahme bzw. vermehrte Inaktivierung intrazellulär), eine gesteigerte DNA-Reparaturfunktion oder ein gesteigerter replikativer Bypass sein.
- 6) Die untersuchten Cisplatinkomplexe mit aliphatischer Seitenkette und Tetrahydropyranring besitzen zytotoxische Effekte auf Keimzelltumore in vitro.
- 7) Durch Behandlung von Keimzelltumorzelllinien mit der Substanz THP12 wird Apoptose induziert.
- 8) Durch Behandlung mit THP12 kommt es im Gegensatz zur Behandlung mit Cisplatin zu keiner Verschiebung im Zellzyklus der behandelten Tumorzellen.
- 9) Die Apoptoseinduktion durch THP12 ist in cisplatinsensiblen und cisplatinresistenten Keimzelltumorzelllinien gleichermaßen nachweisbar. Es besteht keine Kreuzresistenz zu Cisplatin.
- 10) THP12 induziert Apoptose in vitro deutlich schneller als Cisplatin.
- 11) Mögliche Gründe für die Überwindung der Cisplatinresistenz durch THP12 sind eine geänderte Konformation der entstehenden THP12-DNA-Addukte, Verhinderung eines replikativen Bypass durch die eingefügte Seitenkette sowie die Induktion eines DNA-unabhängigen Apoptoseweges in der Tumorzelle.

Lebenslauf

Timo Behlendorf

Geburtsdatum: 18.05.1978

Geburtsort: Mainz

Privatadresse: Thomas-Müntzer-Platz 6
06114 Halle

E-Mail: timo.behlendorf@uk-halle.de

Berufliche Erfahrung am Universitätsklinikum Halle:

seit 11/2010 Stationsarzt Station I10, Klinik für Innere Medizin IV
12/08-10/2010 Stationsarzt Station I11, Klinik für Innere Medizin IV
04/08-10/08 Intensivstation I1, Klinik für Innere Medizin III
11/07-03/08 Assistenzarzt Station I10, Klinik für Innere Medizin IV
02/07-10/07 Zentrale Notaufnahme
07/05-02/07 Assistenzarzt Station I10, Klinik für Innere Medizin IV

Praktisches Jahr:

11/04 - 03/05 Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Halle
08/04 - 11/04 Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Halle
04/04 - 08/04 Klinik für Innere Medizin IV, Universitätsklinikum Halle

Ausbildung:

Mai 2005 3. Staatsexamen, Approbation als Arzt

10/98 – 05/05 Studium der Medizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/97 – 08/98 Zivildienst, Klinik für Innere Medizin II, Universität zu Köln
09/88 – 06/97 Gymnasium zu St.Katharinen, Oppenheim, Abitur
09/84 – 07/88 Astrid-Lindgren-Grundschule, Gau-Bischofsheim

Halle an der Saale, im Mai 2011

Timo Behlendorf

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter oder die Benutzung anderer als angegebener Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken, Daten und Konzepte sind unter Angabe der Autoren gekennzeichnet. Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit keine entgeltliche Hilfe in Anspruch genommen habe.

Halle an der Saale, im Mai 2011

Timo Behlendorf

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Weiterhin versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift in keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht habe. Ich stelle den Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens erstmalig an die Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Einen früheren Promotionsversuch meinerseits gab es nicht.

Halle an der Saale, im Mai 2011

Timo Behlendorf

Danksagung

Mein Dank gilt zu erst Herrn Prof. Dr. H.-J. Schmoll für die Überlassung des Themas und seinem stetigen Einsatz für unsere onkologischen Patienten, der die Basis für diese onkologische Forschungsarbeit ist.

PD Dr. Wieland Voigt danke ich für seine praktische Betreuung im Labor und bei Erstellung und Konzeption dieser Arbeit sowie für meine klinische, onkologische Ausbildung, die er maßgeblich geprägt hat.

Frau PD Dr. Karin Jordan danke ich für die anhaltende Motivation und das richtige Wort zur richtigen Zeit sowie für ihre fröhliche Menschlichkeit in der onkologischen Hochleistungsmedizin.

Dr. Thomas Müller, Dr. Andrea Dietrich, Heike Simon, Franziska Reipsch, Kathrin Neger und Dipl.-Biochem. Jana Lützkendorf danke ich für die vielen kleinen Handgriffe, die ich im Labor erst lernen musste und für Ihre Geduld, mir diese beizubringen sowie für ihre Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse.

Meiner Familie danke ich für viele kleine Hilfestellungen bei der Erstellung der Dissertation und ihre nicht abbreißende Unterstützung.