

**Aus dem Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut  
für Klinische Pharmakologie (IKP) am Robert-Bosch-Krankenhaus  
(RBK) Stuttgart  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen  
Direktor: Professor Dr. M. Schwab**

**Mechanismen der intrinsischen Cisplatinhypersensitivität bei  
der testikulären Keimzelltumor-Linie NTERA-2D1**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Christiane Julia Alber  
geb. Markwardt  
aus Stuttgart  
2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwab

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. N. Blin

Meiner Familie

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Gen- und Proteinbezeichnungen .....</b>	<b>X</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Cisplatin .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1 Wirkung von Cisplatin .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Reparatur und deren Rolle für die Cisplatinsensitivität .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1 Nukleotid-Exzisions-Reparatur .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2 Mismatch Repair (MMR) .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.3 Fanconi/BRCA-Reparatur-Pathway .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Andere Mechanismen der Cisplatinhypersensitivität .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Rolle der Apoptoseregulation für die Sensitivität gegenüber Cisplatin .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4.1 Extrinsischer Weg .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.2 Intrinsischer Weg .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.3 Die Familie der BCL-2-Proteine .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.4 Vom DNA-Schaden zur Apoptose .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Die Rolle von p53 .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5.1 p53 als Transkriptionsfaktor .....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.2 Transkriptionsunabhängige Funktionen von p53 .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.3 Die Funktion von p53 abhängig von Lokalisation, Cofaktoren</b>	

und Promotoren, der Art des zellulären Stresses sowie vom Zelltyp .....	16
1.6 Epigenetik .....	18
1.7 Fragestellung .....	20
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Zellkultur .....</b>	<b>22</b>
2.1.1 Kulturmedium und Zusätze .....	22
2.1.2 Verwendete Zelllinien .....	23
2.1.3 Zellkultur .....	23
2.1.4 Zellzahlbestimmung .....	24
2.1.5 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen .....	25
<b>2.2 Behandlung der Zellen .....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Kurzzeitdifferenzierung der NTERA-2D1 .....	25
2.2.2 Behandlung mit Cisplatin .....	26
2.2.3 Langzeitüberleben/Colony-Assays .....	26
2.2.4 Beeinflussung der DNA-Methylierung mittels 5-Aza-2'- desoxycytidin .....	27
2.2.5 Beeinflussung der DNA-Acetylierung mittels SAHA .....	27
2.2.6 Pifithrin- $\alpha$ .....	28
2.2.7 Pifithrin- $\mu$ .....	28
2.2.8 Inkubation mit antagonistischem FAS-Ligand .....	29

2.2.9 Inhibition der Caspase 8 .....	29
2.2.10 Inhibition der Caspasen mittels zVADfmk .....	30
2.3 Untersuchung der Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers .....	30
2.3.1 Nachweis früher Apoptose über Annexin V-Färbung .....	31
2.3.2 Nachweis später Apoptose/Nekrose über PI-Färbung .....	32
2.3.3 Nachweis des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials mittels TMRM .....	32
2.3.4 Nachweis von Zellviabilität mittels Calcein-AM .....	33
2.3.5 Zellvitalitätsnachweis durch MTT-Assay .....	33
2.4 Protein-Analyse .....	34
2.4.1 Gesamtproteinextraktion .....	34
2.4.2 Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE .....	35
2.4.3 Western-Blot .....	36
2.5 RNA-Interferenz .....	40
2.5.1 Übertragung von siRNA-Molekülen .....	40
2.6 Molekularbiologische Methoden .....	41
2.6.1 Isolation von Gesamt-RNA .....	41
2.6.2 Quantifizierung p53-abhängiger Zielgene über qRT-PCR .....	42
2.7 Messung der DNA-Platinierung mittels ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) .....	43
2.7.1 Aufreinigung und Fällung der DNA .....	44

2.7.2 Messung des Plattingehaltes .....	44
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 Charakterisierung der NTERA-2D1 .....</b>	<b>45</b>
3.1.1 Hypersensitivität .....	45
3.1.2 Dynamik der Apoptose .....	49
3.1.3 Acetylierung und Methylierung (Epigenetik) .....	50
3.1.4 Apoptoseweg über Caspasen .....	52
3.1.5 Verlust des mitochondrialen Membranpotentials .....	53
3.1.6 Keine Inhibition der Cisplatin-induzierten Apoptose in der NTERA-2D1 über antagonistischen FAS-Ligand .....	54
3.1.7 Keine Inhibition der Cisplatin-induzierten Apoptose in der NTERA-2D1 durch Caspase 8-Inhibitor .....	56
3.1.8 Die Rolle von p53 .....	57
Kein Schutz vor Cisplatin-induzierter Apoptose durch Pifithrin- $\alpha$ .....	57
Partielle Inhibition der Cisplatin-induzierten Apoptose in der NTERA-2D1 durch Pifithrin- $\mu$ .....	58
3.1.9 Suffiziente Reparatur .....	58
<b>3.2 Etablierung eines Modellsystems zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Hypersensitivität in NTERA-2D1-Zellen .....</b>	<b>60</b>
3.2.1 Verlust der Hypersensitivität .....	60
3.2.2 Langzeitüberleben .....	63

<b>3.2.3 Schadenserkennung, Reparatur und Apoptose .....</b>	<b>64</b>
Vermehrte Induktion von NOXA in NTERA-2D1 .....	64
Kein Unterschied in der Aktivierung von ATM .....	66
Kein Unterschied in der Schadenserkennung durch XPA und XPC .....	67
Fehlende Regulation von p21 .....	68
<b>3.2.4 p53 .....</b>	<b>69</b>
Spätere Induktion und Aktivierung von p53 in NTERA-2D1+RA .....	70
Keine Unterschiede im Protein-Gehalt der p53-Cofaktoren ASPP2 und iASPP, ASPP1-Gehalt jedoch in der NTERA-2D1 höher als in der NTERA-2D1+RA.....	71
Partielle Inhibierung der Hypersensitivität durch <i>ASPP1</i> -siRNA .....	72
<b>3.3 Prestwick-Library .....</b>	<b>73</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>76</b>
<b>4.1 Verwendetes Modellsystem .....</b>	<b>77</b>
<b>4.2 Sensitivität .....</b>	<b>80</b>
<b>4.3 Mechanismen des Zelltodes .....</b>	<b>83</b>
<b>4.4 Reparatur .....</b>	<b>85</b>
<b>4.5 Die Rolle von p53 .....</b>	<b>88</b>

4.6 Wiederherstellung des hypersensitiven Charakters der NTERA-2D1+RA durch Vorbehandlung mit Substanzen der Prestwick-Library ..	95
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>120</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>163</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
as	“antisense”
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related
BrdU	2-Bromo-5-desoxyuridin
BSA	bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CHK1	Checkpoint-Kinase 1
CHK2	Checkpoint-Kinase 2
Cisplatin	<i>cis</i> -Diaminodichloroplatinum (II)
C-terminal	Carboxy-terminal
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	“fluorescence activated cell sorter“
FCS	Foetal Bovine Serum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	forwardscatter
g	Erdbeschleunigung
G	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GI <sub>50</sub>	growth inhibition, Konzentration, die zu einer 50%-igen Hemmung der Zellproliferation führt
h	Stunde
HEPES	(2-(4-Hydroxyethyl)-1-piperazinyloxy)ethansulfonsäure
hIL3	humanes Interleukin-3
IgG	Immunglobulin G

kDa	Kilo Dalton
LC	LightCycler
m	Milli-
mt	mutiert
M	Molar (mol/l)
Mdm2	murine double minute 2
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	messenger RNA
μ	Micro-
N-terminal	Amino-terminal
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	“polymerase chain reaction“
PI	Propidiumiodid
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
s	“sense“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
SEM	Mittelabweichung ( <i>standard error of means</i> )
siRNA	short interfering RNA
SSC	sidescatter
TBST	tris buffered saline plus Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGCT	testicular germ cell line tumor
TMRM	Tetramethylrhodaminmethylester Perchlorat
u.a.	unter anderem
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
wt	Wildtyp

z.B.

zum Beispiel

**Gen- und Proteinbezeichnungen**

Genname und Synonyme	in dieser Arbeit verwendete Genbezeichnung	Proteinname und Synonyme	in dieser Arbeit verwendeter Proteinname	UniProt Nummer
<i>AIFM1</i> <i>AIF</i> <i>PDCD8</i>	<i>AIFM1</i>	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial  Programmed cell death protein 8	AIF	O95831
<i>ATM</i>	<i>ATM</i>	Serine-protein kinase ATM  Ataxia telangiectasia mutated	ATM	Q13315
<i>ATR</i> <i>FRP1</i>	<i>ATR</i>	Serine/threonine-protein kinase ATR  Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein  FRAP-related protein 1	ATR	Q13535
<i>APAF1</i> <i>KIAA0413</i>	<i>APAF1</i>	Apoptotic protease-activating factor 1  Short name: APAF1	APAF1	O14727
<i>BAD</i> <i>BBC6</i> <i>BCL2L8</i>	<i>BAD</i>	Bcl2 antagonist of cell death Short name: BAD  Bcl-2-binding component 6  Bcl-2-like protein 8 Short name: Bcl2-L-8	BAD	Q92934

		Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter		
<i>BAK1</i> <i>BAK</i> <i>BCL2L7</i> <i>CDN1</i>	<i>BAK1</i>	Bcl-2 homologous antagonist/killer  Apoptosis regulator BAK  Bcl-2-like protein 7  Short name: Bcl2-L-7	BAK	Q16611
<i>BAX</i> <i>BCL2L4</i>	<i>BAX</i>	Apoptosis regulator BAX  Bcl-2-like protein 4  Short name: Bcl2-L-4	BAX	Q07812
<i>BBC3</i> <i>PUMA</i>	<i>BBC3</i>	Bcl-2-binding component 3  JFY-1  p53 up-regulated modulator of apoptosis	PUMA	Q9BXH1
<i>BCL2</i>	<i>BCL2</i>	Apoptosis regulator Bcl-2	BCL-2	P10415
<i>BCL2L1</i> <i>BCL2L</i> <i>BCLX</i>	<i>BCL2L1</i>	Bcl-2-like protein 1  Short name: Bcl2-L-1  Apoptosis regulator Bcl-X	BCL-X	Q07817
<i>BCL2L11</i> <i>BIM</i>	<i>BCL2L11</i>	Bcl-2-like protein 11  Short name: Bcl2-	BIM	O43521

		L-11 Bcl2-interacting mediator of cell deat		
<i>BID</i>	<i>BID</i>	BH3-interacting domain death agonist  p22 BID  Short name: BID	BID	P55957
<i>BIRC5</i> <i>API4</i> <i>IAP4</i>	<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 5  Apoptosis inhibitor 4  Apoptosis inhibitor survivin	SURVIVIN	O15392
<i>CCNH</i>	<i>CCNH</i>	Cyclin-H  MO15-associated protein  p34  p37	Bezeichnung des TFIIH- Transkriptionsfakto r-Komplexes: TFIIH	P51946
<i>CDK7</i> <i>MO15</i>	<i>CDK7</i>	Cyclin-dependent kinase 7  39 kDa protein kinase  CAK1  CDK-activating kinase  Short name: CAK  Cell division protein kinase 7  STK1  TFIIH basal		P50613

		transcription factor complex kinase subunit p39 Mo15		
<i>CDKN1A</i> <i>CAP20</i> <i>CDKN1</i> <i>CIP1</i> <i>MDA6</i> <i>PIC1</i> <i>SDI1</i> <i>WAF1</i>	<i>CDKN1A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1  CDK-interacting protein 1 Melanoma differentiation-associated protein 6  Short name: MDA-6  p21	p21	P38936
<i>CDKN2A</i> <i>CDKN2</i> <i>MLM</i>	<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoform 4  p14ARF  p19ARF	CDKN2A	Q8N726
<i>CHEK1</i> <i>CHK1</i>	<i>CHEK1</i>	Serine/threonine-protein kinase Chk1	CHK1	O14757
<i>CHEK2</i> <i>CHK2</i> <i>RAD53</i>	<i>CHEK2</i>	Serine/threonine-protein kinase Chk2  Cds1	CHK2	O96017
<i>DIABLO</i> <i>SMAC</i>	<i>DIABLO</i>	Diablo homolog, mitochondrial  Direct IAP-binding protein with low pI  Second mitochondria-derived activator of caspase  Short name: Smac	SMAC	Q9NR28
<i>DNMT3B</i>	<i>DNMT3B</i>	DNA (cytosine-5)-	DNA-Methyltransferase	Q9UBC3

		<p>methyltransferase 3B</p> <p>Short name: Dnmt3b</p> <p>DNA methyltransferase HsaIIIB</p> <p>Short name: DNA MTase HsaIIIB</p> <p>Short name: M.HsaIIIB</p>	3B	
<i>ERCC1</i>	<i>ERCC1</i>	DNA excision repair protein ERCC-1	ERCC1	P07992
<i>ERCC2</i> <i>XPD</i> <i>XPDC</i>	<i>ERCC2</i>	<p>TFIIH basal transcription factor complex helicase XPD subunit</p> <p>Basic transcription factor 2 80 kDa subunit</p> <p>Short name: BTF2 p80</p> <p>CXPD</p> <p>DNA excision repair protein ERCC-2</p> <p>DNA repair protein complementing XP-D cells</p> <p>TFIIH basal transcription factor complex 80 kDa subunit</p>	Bezeichnung des TFIIH- Transkriptionsfakto r-Komplexes: TFIIH	P18074

		<p>Short name: TFIIH 80 kDa subunit</p> <p>Short name: TFIIH p80</p> <p>Xeroderma pigmentosum group D-complementing protein</p>	
<p><i>ERCC3</i> <i>XPB</i> <i>XPBC</i></p>	<p><i>ERCC3</i></p>	<p>TFIIH basal transcription factor complex helicase XPB subunit</p> <p>Basic transcription factor 2 89 kDa subunit</p> <p>Short name: BTF2 p89</p> <p>DNA excision repair protein ERCC-3</p> <p>DNA repair protein complementing XP-B cells</p> <p>TFIIH basal transcription factor complex 89 kDa subunit</p> <p>Short name: TFIIH 89 kDa subunit</p> <p>Short name: TFIIH p89</p> <p>Xeroderma</p>	<p>P19447</p>

		pigmentosum group B- complementing protein		
<i>ERCC4</i> <i>ERCC11</i> <i>XPF</i>	<i>ERCC4</i>	DNA repair endonuclease XPF  DNA excision repair protein ERCC-4  DNA repair protein complementing XP-F cells  Xeroderma pigmentosum group F- complementing protein	ERCC4/XPF	Q92889
<i>ERCC5</i> <i>ERCM2</i> <i>XPG</i> <i>XPGC</i>	<i>ERCC5</i>	DNA repair protein complementing XP-G cells  DNA excision repair protein ERCC-5  Xeroderma pigmentosum group G- complementing protein	ERCC5/XPG	P28715
<i>FADD</i> <i>MORT1</i> <i>GIG3</i>	<i>FADD</i>	Protein FADD  FAS-associated death domain protein  FAS-associating death domain- containing protein  Growth-inhibiting gene 3 protein	FADD	Q13158

		Mediator of receptor induced toxicity		
<i>FANCD2</i> <i>FACD</i>	<i>FANCD2</i>	Fanconi anemia group D2 protein  Short name: Protein FACD2	FANCD2	Q9BXW9
<i>FAS</i> <i>APT1</i> <i>FAS1</i> <i>TNFRSF6</i>	<i>FAS</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6  Apo-1 antigen Apoptosis-mediating surface antigen FAS  FASLG receptor  CD_antigen=CD95	FAS	P25445
<i>FASLG</i> <i>APT1LG1</i> <i>CD95L</i> <i>FASL</i> <i>TNFSF6</i>	<i>FASLG</i>	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6  Apoptosis antigen ligand Short name: APTL  CD95 ligand Short name: CD95-L  Fas antigen ligand Short name: Fas ligand  CD_antigen=CD178	FAS-Ligand	P48023
<i>FOXO3</i> <i>FKHRL1</i> <i>FOXO3A</i>	<i>FOXO3</i>	Forkhead box protein O3  AF6q21 protein	FOXO3	O43524

		Forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1		
<i>GADD45A</i> <i>DDIT1</i> <i>GADD45</i>	<i>GADD45A</i>	Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha  DNA damage-inducible transcript 1 protein  Short name: DDIT-1	GADD45a	P24522
<i>GAPDH</i> <i>GAPD</i> <i>CDABP0047</i> <i>OK/SW-cl.12</i>	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  Short name: GAPDH  Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH	GAPDH	P04406
<i>GTF2H1</i> <i>BTF2</i>	<i>GTF2H1</i>	General transcription factor IIIH subunit 1  Basic transcription factor 2 62 kDa subunit  Short name: BTF2 p62  General transcription factor IIIH polypeptide 1  TFIIH basal transcription factor complex p62 subunit	Bezeichnung des TFIIH-Transkriptionsfaktor-Komplexes: TFIIH	P32780

<i>GTF2H2</i> <i>BTF2P44</i>	<i>GTF2H2</i>	<p>General transcription factor IIIH subunit 2</p> <p>Basic transcription factor 2 44 kDa subunit</p> <p>Short name: BTF2 p44 General transcription factor IIIH polypeptide 2</p> <p>TFIIH basal transcription factor complex p44 subunit</p>		Q13888
<i>GTF2H3</i>	<i>GTF2H3</i>	<p>General transcription factor IIIH subunit 3</p> <p>Basic transcription factor 2 34 kDa subunit</p> <p>Short name: BTF2 p34</p> <p>General transcription factor IIIH polypeptide 3</p> <p>TFIIH basal transcription factor complex p34 subunit</p>		Q13889
<i>GTF2H4</i>	<i>GTF2H4</i>	<p>General transcription factor IIIH subunit 4</p>		Q92759

		<p>Basic transcription factor 2 52 kDa subunit</p> <p>Short name: BTF2 p52</p> <p>General transcription factor IIIH polypeptide 4</p> <p>TFIIH basal transcription factor complex p52 subunit</p>		
<i>HMGB1</i> <i>HMG1</i>	<i>HMGB1</i>	<p>High mobility group protein B1</p> <p>High mobility group protein 1</p> <p>Short name: HMG-1</p>	HMG-1	P09429
<i>KHDRBS1</i> <i>SAM68</i>	<i>KHDRBS1</i>	<p>KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1</p> <p>GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62</p> <p>Src-associated in mitosis 68 kDa protein</p> <p>Short name: Sam68</p> <p>p21 Ras GTPase-activating protein-associated p62</p>	SAM68	Q07666

		p68		
<i>MAPK14</i> <i>CSBP</i> <i>CSBP1</i> <i>CSBP2</i> <i>CSPB1</i> <i>MXI2</i>	<i>MAPK14</i>	Mitogen-activated protein kinase 14 Short name=MAP kinase 14  Short name: MAPK 14  Cytokine suppressive anti-inflammatory drug-binding protein  Short name: CSAID-binding protein  Short name: CSBP  MAP kinase MXI2  MAX-interacting protein 2  Mitogen-activated protein kinase p38 alpha  Short name: MAP kinase p38 alpha  SAPK2A	p38 $\alpha$	Q16539
<i>MCL1</i> <i>BCL2L3</i>	<i>MCL1</i>	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1  Bcl-2-like protein 3  Short name: Bcl2-L-3	MCL-1	Q07820

		Bcl-2-related protein EAT/mcl1 mcl1/EAT		
<i>MDM2</i>	<i>MDM2</i>	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 Double minute 2 protein Short name: Hdm2 Oncoprotein Mdm2 p53-binding protein Mdm2	MDM2	Q00987
<i>MDM4</i> <i>MDMX</i>	<i>MDM4</i>	Protein Mdm4 Double minute 4 protein Mdm2-like p53-binding protein Protein Mdmx p53-binding protein Mdm4	MDMX	O15151
<i>MLH1</i> <i>COCA2</i>	<i>MLH1</i>	DNA mismatch repair protein Mlh1 MutL protein homolog 1	MLH1	P40692
<i>MNAT1</i> <i>CAP35</i> <i>MAT1</i> <i>RNF66</i>	<i>MNAT1</i>	CDK-activating kinase assembly factor MAT1 CDK7/cyclin-H assembly factor Cyclin-G1-interacting protein	Bezeichnung des TFIIH-Transkriptionsfaktor-Komplexes: TFIIH	P51948

		Menage a trios RING finger protein 66 RING finger protein MAT1 p35 p36		
<i>MSH2</i>	<i>MSH2</i>	DNA mismatch repair protein Msh2  Short name: hMSH2  MutS protein homolog 2	MSH2	P43246
<i>MYC</i> <i>BHLHE39</i>	<i>MYC</i>	Myc proto-oncogene protein  Class E basic helix-loop-helix protein 39  Short name: bHLHe39  Proto-oncogene c-Myc  Transcription factor p64	c-Myc	P01106
<i>NANOG</i>	<i>NANOG</i>	Homeobox protein NANOG  Homeobox transcription factor Nanog  Short name: hNanog	NANOG	Q9H9S0
<i>PMAIP1</i> <i>NOXA</i>	<i>PMAIP1</i>	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	NOXA	Q13794

		<p>Short name: PMA-induced protein 1</p> <p>Immediate-early- response protein APR</p> <p>Protein Noxa</p>		
<p><i>POU5F1</i> <i>OCT3</i> <i>OCT4</i> <i>OTF3</i></p>	<i>POU5F1</i>	<p>POU domain, class 5, transcription factor 1</p> <p>Octamer-binding protein 3</p> <p>Short name: Oct- 3</p> <p>Octamer-binding protein 4</p> <p>Short name: Oct- 4</p> <p>Octamer-binding transcription factor 3</p> <p>Short name: OTF- 3</p>	OCT-4	Q01860
<p><i>PPP1R13L</i> <i>IASPP</i> <i>NKIP1</i> <i>PPP1R13BL</i> <i>RAI</i></p>	<i>iASPP</i>	<p>RelA-associated inhibitor</p> <p>Inhibitor of ASPP protein</p> <p>Short name: Protein iASPP</p> <p>NFkB-interacting protein 1</p> <p>PPP1R13B-like protein</p>	iASPP	Q8WUF5
<i>PPP1R13B</i>	<i>ASPP1</i>	Apoptosis-	ASPP1	Q96KQ4

<i>ASPP1</i> <i>KIAA0771</i>		stimulating of p53 protein 1  Protein phosphatase 1 regulatory subunit 13B		
<i>RAD23B</i>	<i>RAD23B</i>	UV excision repair protein RAD23 homolog B  Short name: HR23B  Short name: hHR23B  XP-C repair-complementing complex 58 kDa protein  Short name: p58	HR23B	P54727
<i>RPA1</i> <i>REPA1</i> <i>RPA70</i>	<i>RPA1</i>	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit  Short name: RP-A p70  Replication factor A protein 1  Short name: RF-A protein 1  Single-stranded DNA-binding protein	Bezeichnung des Proteinkomplexes: RPA	P27694
<i>RPA2</i> <i>REPA2</i> <i>RPA32</i> <i>RPA34</i>	<i>RPA2</i>	Replication protein A 32 kDa subunit  Short name: RP-A p32		P15927

		<p>Replication factor A protein 2</p> <p>Short name: RF-A protein 2</p> <p>Replication protein A 34 kDa subunit</p> <p>Short name: RP-A p34</p>		
<p><i>RPA3</i></p> <p><i>REPA3</i></p> <p><i>RPA14</i></p>	<i>RPA3</i>	<p>Replication protein A 14 kDa subunit</p> <p>Short name: RP-A p14</p> <p>Replication factor A protein 3</p> <p>Short name: RF-A protein 3</p>		P35244
<i>SOX2</i>	<i>SOX2</i>	Transcription factor SOX-2	SOX-2	P48431
<p><i>TP53</i></p> <p><i>P53</i></p>	<i>TP53</i>	<p>Cellular tumor antigen p53</p> <p>Antigen NY-CO-13</p> <p>Phosphoprotein p53</p> <p>Tumor suppressor p53</p>	p53	P04637
<p><i>TP53BP2</i></p> <p><i>ASPP2</i></p> <p><i>BBP</i></p>	<i>ASPP2</i>	<p>Apoptosis-stimulating of p53 protein 2</p> <p>Bcl2-binding protein</p> <p>Short name: Bbp</p> <p>Renal carcinoma antigen NY-REN-</p>	ASPP2	Q13625

		<p>51</p> <p>Tumor suppressor p53-binding protein 2</p> <p>Short name: 53BP2</p> <p>Short name: p53-binding protein 2</p> <p>Short name: p53BP2</p>		
<p><i>TP63</i></p> <p><i>KET</i></p> <p><i>P63</i></p> <p><i>P73H</i></p> <p><i>P73L</i></p> <p><i>TP73L</i></p>	<i>TP63</i>	<p>Tumor protein 63</p> <p>Short name: p63</p> <p>Chronic ulcerative stomatitis protein</p> <p>Short name: CUSP</p> <p>Keratinocyte transcription factor KET</p> <p>Transformation-related protein 63</p> <p>Short name: TP63</p> <p>Tumor protein p73-like</p> <p>Short name: p73L</p> <p>p40</p> <p>p51</p>	p63	Q9H3D4
<p><i>TP73</i></p> <p><i>P73</i></p>	<i>TP73</i>	<p>Tumor protein p73</p> <p>p53-like transcription factor</p>	p73	O15350

		p53-related protein		
<i>TNFSF10</i> <i>TRAIL</i> <i>APO2L</i>	<i>TNFSF10</i>	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10  Apo-2 ligand  Short name: Apo-2L  TNF-related apoptosis-inducing ligand  Short name: Protein TRAIL  CD_antigen: CD253	TRAIL	P50591
<i>XIAP</i> <i>API3</i> <i>BIRC4</i> <i>IAP3</i>	<i>XIAP</i>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 4  E3 ubiquitin-protein ligase XIAP  IAP-like protein  Short name: ILP  Short name: hILP  Inhibitor of apoptosis protein 3  Short name: IAP-3  Short name: hIAP-3  Short name:	XIAP	P98170

		<p>hIAP3</p> <p>X-linked inhibitor of apoptosis protein</p> <p>Short name: X-linked IAP</p>		
<p><i>XPA</i></p> <p><i>XPAC</i></p>	<i>XPA</i>	<p>DNA repair protein complementing XP-A cells</p> <p>Xeroderma pigmentosum group A-complementing protein</p>	XPA	P23025
<p><i>XPC</i></p> <p><i>XPCC</i></p>	<i>XPC</i>	<p>DNA repair protein complementing XP-C cells</p> <p>Xeroderma pigmentosum group C-complementing protein</p> <p>p125</p>	XPC	Q01831

## 1. Einleitung

Cisplatin wird seit vielen Jahren in der Therapie maligner Tumoren eingesetzt. Die ersten klinischen Studien zu der Substanz gab es bereits Anfang der 1970er. Hier zeigte sich die ausgeprägte zytotoxische Wirkung von Cisplatin (Rozenzweig et al 1977). Besonders erwähnenswert ist das extrem gute Ansprechen von embryonalen Keimzelltumoren, bei denen Cisplatin seit 1978 im Standardtherapieschema integriert ist (Jamieson et al 1999). Die Heilungsraten konnten hier auf über 90% gesteigert werden (Bosl et al 1997).

Im Gegensatz zu der überwiegenden Mehrzahl maligner Erkrankungen weisen embryonale Keimzelltumore zumeist eine extreme Hypersensitivität gegenüber Cisplatin auf.

Allerdings gibt es auch in der Gruppe der embryonalen Keimzelltumore immer wieder Tumoren, die nicht oder schlecht auf Cisplatin ansprechen. Hierbei können diejenigen Tumore, die auf die Therapie primär nicht ansprechen von denen unterschieden werden, die im Verlauf der Therapie resistent werden oder auch resistente Rezidive von primär sensitiven Tumoren ausbilden. Eine genaue Kenntnis der molekularen Ursachen der Hypersensitivität auf der einen und der Resistenzmechanismen dieser Tumoren auf der anderen Seite ist für die Medizin von hohem Interesse, da die hieraus gewonnenen Erkenntnisse möglicherweise auf andere, wenig sensitive Tumoren übertragbar sind und so potentiell neue und gezielte Ansätze in der Tumorthherapie ermöglichen.

Von Interesse sind in diesem Zusammenhang u.a. folgende Fragestellungen:

1. Wie wirkt Cisplatin bei extrem sensitiven Tumoren im Vergleich zu solchen mit geringer Sensitivität?
  - Wie kann die Wirkung von Cisplatin gesteigert werden?
  - Kann eine gesteigerte Tumor-selektive Wirkung von Cisplatin erreicht werden?)
2. Was sind Resistenzmechanismen in primär (hyper-)sensitiven Tumoren?
  - Kann die Entstehung von Resistenzen verhindert bzw. medikamentös supprimiert werden?
  - Können bestehende Resistenzen medikamentös antagonisiert bzw. umgangen werden?

3. Welche Faktoren verleihen einem Tumor primäre Cisplatinresistenz bzw. eine nur geringe Sensitivität gegenüber der Substanz?

- Kann eine solche bestehende Resistenz umgangen werden? Können diese Tumoren durch (Vor-)Behandlung mit anderen Substanzen gegenüber Cisplatin (hyper)-sensitiviert werden?

4. Welche Eigenschaften zeichnen die Tumoren aus, die primär hypersensitiv auf Cisplatin sind?

- Können diese Eigenschaften in wenig sensitiven Tumoren induziert werden, um das Ansprechen auf Cisplatin zu verbessern bzw. eventuell die notwendige Dosis zu reduzieren und somit das Nebenwirkungsspektrum zu minimieren?

Die letzte Fragestellung soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

## **1.1 Cisplatin**

### **1.1.1 Wirkung von Cisplatin**

Der zytotoxische Effekt von Cisplatin beruht nach heutiger Kenntnis auf der Bildung von Platin-DNA-Addukten. Nach Aufnahme der Substanz in die Zelle über aktiven Transport und Diffusion (Perez 1998, Safaei 2006, Safaei et al 2005, Hall et al 2008) werden aufgrund des wässrigen, chloridionenarmen Milieus in der Zelle die Chloridliganden des Cisplatin-Komplexes gegen Wasser ausgetauscht. Das so entstandene Molekül kann an eine Vielzahl von in der Zelle vorkommenden Molekülen, wie z.B. Proteine, RNA und kleineren Thiol-assoziierten Molekülen wie Glutathion, Cystein und Methionin binden (Bellon 1991). Die zytotoxische Wirkung beruht jedoch hauptsächlich auf der Bildung von DNA-Platin-Addukten (ca. 1% des Cisplatin) (Gonzales 2001). Bevorzugt erfolgt die Bindung an die DNA über die N7-Position der Purinbasen. Zu unterscheiden sind Adduktbildungen innerhalb eines DNA-Stranges (intrastrand crosslinks) und solche, die zwei DNA-Stränge verbinden (interstrand crosslinks). Mit ca. 65% sind 1,2-intrastrand-Addukte zwischen 2 benachbarten

Guaninbasen das häufigste Addukt. Es folgt die Verbindung zwischen dem N-7 eines Guanins und dem N-7 eines benachbarten Adenins (25%). Weitere Intrastrand-Verbindungen sind Verbindungen zwischen 2 Guaninbasen, die nicht direkt benachbart liegen. Weiter gibt es die interstrand crosslinks sowie Platin als Bindeglied zwischen DNA und Proteinen (< 1%) und die (meist temporäre) Bildung von DNA-Mono-Addukten (Fichtinger-Schepman 1985, Fichtinger-Schepman 1987). Man geht derzeit davon aus, dass die Zytotoxizität von Cisplatin über die DNA-Adduktbildung vermittelt wird, obgleich der genaue Mechanismus der Wirkung noch nicht geklärt ist. Durch die Adduktbildung kommt es zu einer Konformationsänderung der DNA-Helix (Abknicken um 30-70°). Die Konformationsänderungen werden durch verschiedene Proteine erkannt, es folgt Inhibition der DNA-Synthese und Transkription, was Zellzyklusarrest und Apoptose nach sich zieht (Bellon et al 1991, Siddik 2003). Als ursächlich für eine extreme Sensitivität einer Zelle gegenüber Cisplatin sind verschiedene Mechanismen vorstellbar. Prinzipiell sind diese in 2 Gruppen einteilbar. Zum einen eine vermehrte Ansammlung von Cisplatin in der Zelle (vermehrte Aufnahme von Cisplatin in die Zelle bzw. ein verminderter Export) zum anderen eine höhere Wirksamkeit des Cisplatin aufgrund spezifischer Eigenschaften der Zelle (beispielsweise eine verminderte Detoxifikation von Cisplatin in der Zelle [z.B. über Gluthation], Veränderungen der Reparatur, eine verminderte Toleranz der Zelle gegenüber Platinaddukten oder eine sehr rasche Aktivierung proapoptotischer Signalwege) (Gottesman 2002, Kaufmann et al 2000, Lage et al 1999). Wahrscheinlich ist ein Zusammenkommen mehrerer der genannten Punkte.

Auf die für die vorliegende Arbeit relevanten Mechanismen in Bezug auf die Hypersensitivität einer Zelle gegenüber Cisplatin wird im Folgenden kurz eingegangen.

## **1.2 Reparatur und deren Rolle für die Cisplatinempfindlichkeit**

Von den bekannten DNA-Reparaturwegen sind zwei maßgeblich an der Reparatur der Cisplatin-DNA-Addukte beteiligt: Dies sind die Nukleotid-Exzisions-Reparatur und die Mismatch-Reparatur (Martin et al 2008).

### **1.2.1 Nukleotid-Exzisions-Reparatur**

Die Platin-DNA-Addukte werden hauptsächlich durch „Nukleotid-Exzisions-Reparatur“ (NER) repariert (Rabik et al 2007, Wang et al 2005, Helleday et al 2008). Es wurde gezeigt, dass Defekte in der NER zu Hypersensibilität gegenüber Cisplatin führen und spiegelverkehrt eine erhöhte Kapazität an NER Tumorzellen resistenter werden lässt. An der NER sind eine Vielzahl von Proteinen beteiligt (Friedberg et al 2001), wobei eine Veränderung der Spiegel der limitierenden Proteine ausreicht, um die Sensitivität der Zelle zu modulieren. Die NER lässt sich in 2 Subgruppen unterteilen, die globale Genom-Reparatur (GG-NER), welche Schäden des gesamten Genoms repariert und die Transkriptions-gekoppelte Reparatur („transcription coupled repair“, TC-NER), welche Läsionen, die die Transkription im aktuell zu transkribierenden DNA-Strang blockieren, schnell repariert (de Laat et al 1999, Hanawalt 2002). Generell wird nach Erkennung des DNA-Schadens (anhand der Konformationsänderung durch das Addukt) der Bereich, in dem die DNA-Schädigung lokalisiert ist, auf einer Länge von 22-32 Nukleotiden herausgeschnitten und dann durch DNA-Neusynthese aufgefüllt. Die Enden werden schließlich durch Ligasen verbunden. Der DNA-Schaden wird in den beiden Subwegen der NER durch verschiedene Proteine erkannt.

In der TC-NER erfolgt die Aktivierung der Reparatur über ein Blockieren der RNA-Polymerase II an der entwundenen Stelle der DNA (Svejstrup et al 2002). Im Verlauf werden Proteine wie die ERCC4/XPF-ERCC1-Endonuklease und XPA rekrutiert.

In der GG-NER ist das „DNA repair protein complementing XP-C cells“ (XPC), das zusammen mit HR23B einen stabilen Komplex bildet, für die Schadenserkennung verantwortlich. Dieser Komplex bindet an die Schadensstelle der DNA und rekrutiert dadurch den Transkriptionsfaktorkomplex TFIIH. Im weiteren Ablauf folgen

ERCC5/XPG, XPA-RPA-Komplex und ERCC4/XPF-ERCC1. Die Bedeutung der Expression einzelner Proteine der NER hinsichtlich Resistenz von Tumoren ist seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung, jedoch noch nicht abschließend geklärt. So zeigten Koeberle et al 1999, dass hochsensitive embryonale Keimzelltumorzellen sehr niedrige Spiegel von XPA und ERCC4/XPF-ERCC1 besitzen. Im Jahr 2008 zeigte dieselbe Gruppe (Koeberle et al 2008) jedoch, dass eine Erhöhung des Gehalt an XPA in Hodentumorzellen keine vermehrte Resistenz gegenüber Cisplatin oder UV-Strahlung mit sich bringt. Mehrere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen erhöhten Spiegeln an ERCC1 und Resistenz gegenüber Cisplatin in Zelllinien und primären Tumorzellen (Lee et al 1993, Dabholkar et al 1994, Yu et al 2000). So konnte *in vitro* in intrinsisch Cisplatin-resistenten Zelllinien durch Inhibierung von ERCC1 eine Sensibilisierung gegenüber Cisplatin gezeigt werden. Auch bei erworbenen Resistenzen kann ERCC1 eine Rolle spielen (Selvakumaran et al 2003, Ferry et al 2000).

Insgesamt scheint klar, dass die Kapazität der NER Einfluss auf die Cisplatinresistenz bzw. -sensitivität hat und zwar in dem Sinne, dass eine verminderte Reparaturkapazität mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cisplatin einhergeht.

### **1.2.2 Mismatch Repair (MMR)**

Im Unterschied zur NER, bei der eine verminderte Reparaturkapazität mit erhöhter Sensitivität der Tumorzellen einhergeht, ist beim MMR eine verminderte Reparaturkapazität mit Resistenz gegenüber Cisplatin assoziiert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass MMR vergeblich versucht, Cisplatin-Läsionen zu reparieren und infolge dessen proapoptotische Signale aktiviert (Vaisman et al 1998). So kommt es durch replikativen Bypass zur DNA-Synthese über die schadhafte Stelle hinweg. MMR erkennt den Schaden, und entfernt den neu synthetisierten Strang. Hierdurch kommt es zu Strangbrüchen und Läsionen, die den Zelltod initialisieren. Dies bedeutet, dass eine erhöhte MMR-Kapazität zu vermehrtem Zelltod führt. Ist das MMR defekt, kann sich die Zelle trotz DNA-Addukt weiter teilen. Ein erniedrigtes Level von am MMR beteiligten Proteinen wie MLH1 oder MSH2, die direkt an der Erkennung der

Platinaddukte beteiligt sind, führt demnach zu vermehrter Resistenz gegenüber Cisplatin (Siddik 2003). In Einklang hiermit scheint das MMR in der Mehrzahl der testikulären Keimzelltumore intakt zu sein (Mayer et al 2002).

### **1.2.3 Fanconi/BRCA-Reparatur-Pathway**

Der Fanconi/BRCA-Pathway ist an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt. Doppelstrangbrüche werden vor allem durch Bestrahlung aber auch durch DNA-verknüpfende Substanzen induziert (Wong et al 2003). Eine verminderte Expression des Fanconi/BRCA-Pathways scheint mit Cisplatinsensitivität einherzugehen (Taniguchi et al 2003). *In vitro* konnte in Ovarialkarzinomzellen gezeigt werden, dass eine Inhibierung des Fanconi/BRCA-Reparatur-Pathways mit einer vermehrten Sensitivität von Tumorzellen einhergeht, wohingegen die Restauration des Weges mit einer vermehrten Cisplatinresistenz assoziiert war (Taniguchi et al 2003). Chirnomas et al zeigten 2006, dass durch kleinmolekulare Inhibitoren des Fanconi/BRCA-Signalweges Ovarial- und Mammakarzinomzelllinien gegenüber Cisplatin sensitiviert werden können.

Es existiert eine Reihe weiterer Reparaturwege wie Basen-Exzisions-Reparatur, homologe Rekombination, nicht homologes *Endjoining*, die aber nach heutiger Kenntnis einen geringeren oder keinen Einfluss auf die Reparatur von Cisplatinaddukten und somit auf die Cisplatinsensitivität haben (Lainie et al 2008). Auf diese soll hier nicht näher eingegangen werden.

## **1.3 Andere Mechanismen der Cisplatinhypersensitivität**

Es sind eine Reihe weiterer Mechanismen beschrieben, die zu Hypersensitivität bzw. Resistenz von Tumoren gegenüber Cisplatin beitragen. Einige hiervon seien kurz erwähnt:

### „High mobility group“-Proteine (HMG-Proteine)

Die HMG-Proteine gehören ebenfalls zu den Proteinen der Schadenserkennung. Sie binden an die Platin-DNA-Addukte. Allerdings führen sie in der Folge nicht zur Reparatur des Schadens sondern schirmen die schadhafte Stellen gegenüber den Reparaturproteinen ab. So wurde in mehreren Studien gezeigt, dass eine Überexpression von HMG-1 zu einer vermehrten Cisplatin-Sensitivität in Tumoren führt (He et al 2000, Nagatani et al 2001).

### Transporter

Cisplatin gelangt über Diffusion aber auch über aktiven Transport in die Zelle, bzw. wird aktiv aus der Zelle transportiert. Beteiligt sind unter anderem Kupfertransporter. Ein vermehrter Import von Cisplatin führt hierbei zu einer erhöhten Sensitivität, ein vermehrter Export zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin (Siddik 2003, Choi et al 2006).

### Detoxifikation

Durch Bindung an Thiolassozierte Moleküle wie Glutathion (GSH) oder Metallthionin steht das intrazelluläre Cisplatin nicht mehr für eine DNA-Bindung zur Verfügung. Auf diesem Wege kann ein erhöhtes intrazelluläres GSH zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin führen (Siddik 2003).

## **1.4 Rolle der Apoptoseregulation für die Sensitivität gegenüber Cisplatin**

Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen Cisplatin-Sensitivität bzw. -Resistenz und einer veränderten Exekution der Apoptose aufzeigen. Als Apoptose bezeichnet man den programmierten und von Caspasen

abhängigen Zelltod. Im Unterschied hierzu gibt es Caspase-unabhängige Formen des programmierten Zelltodes. Hierzu gehört beispielsweise der Todesweg über AIF („Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial“) welcher aus dem Mitochondrium in den Nukleus transloziert und dort über Proteasen zur Fragmentation der DNA führt (Susin et al 2000, Cande et al 2002), sowie die klassische Nekrose. Weiter sind Übergangsformen zwischen programmiertem Zelltod und Nekrose bekannt, wie z.B. die Aponekrose (Formigli et al 2000, Sperandio et al 2000) oder Necroptose.

Der Vorgang der Apoptose ist ein exakt regulierter aktiver Prozess, bei dem die Zelle verschiedene, festgelegte Stadien bis zu ihrem Tod durchläuft. Auf molekularer Ebene spielt ein Teil der sogenannten Caspasen, die in ihrer Funktion Cystein-Aspartat-Proteasen sind, sowohl bei der Initialisierung als auch Ausführung der Apoptose eine wichtige Rolle (Launay et al 2005). Apoptoseinhibition erfolgt häufig über direkte oder indirekte Inhibierung von Caspasen. So konnte bei einigen Cisplatin-resistenten Zellenlinien beispielsweise eine verminderte Aktivierung der Caspasen 3, 8 und 9 nachgewiesen werden (Siddik 2003).

Die Caspasen werden nach ihrer Funktion unterteilt in sogenannte Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8 und 9) und Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7). Man unterscheidet bei der Aktivierung der Apoptose einen extrinsischen und einen instrinsischen Weg.

#### **1.4.1 Extrinsischer Weg**

Der extrinsische Apoptoseweg wird über membranständige Todesrezeptoren wie FAS (CD95, Apo-1), TNF-Rezeptor oder die Rezeptoren der TRAIL-Familie initiiert. Über die Bindung eines entsprechenden Liganden werden FADD („FAS associated death domain“) und Caspase 8 rekrutiert, die den „Death inducing signalling complex“ (DISC) bilden (Fan et al 2005). Ab hier gibt es zwei mögliche *downstream*-Pathways, von denen einer unabhängig vom Mitochondrium (sogenannte Typ-1-Zellen), der andere abhängig vom Mitochondrium ist (sogenannte Typ-2-Zellen). Im Mitochondrienabhängigen Weg wird relativ wenig DISC gebildet. Durch Caspase 8 wird BID aktiviert, welches nachfolgend als tBID (truncated BID) zum Mitochondrium transloziert und dort zum Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials mit

Cytochrom C-Verlust und letztendlich zu Aktivierung von Caspase 3 und Aktivierung der Todessubstrate führt. Im Mitochondrienunabhängigen Weg wird deutlich mehr DISC gebildet. Caspase 3 wird direkt durch Caspase 8 aktiviert, was letztendlich zum Zelltod führt (Seol et al 2001, Rossi et al 2003, Philchenkov 2004).

Als Folge einer Behandlung verschiedener Tumorzelllinien mit diversen Chemotherapeutika inklusive Cisplatin wurde eine Hochregulation des FAS-Rezeptors und die Induktion seines Liganden beobachtet (Fulda et al 1998, Fulda et al 2000, Muller et al 1997, Muller et al 1998). Spierings et al wiesen in einem Paper von 2003 darauf hin, dass ein Verlust des intakten FAS-Signal-Weges möglicherweise zu einer Resistenzbildung gegenüber Cisplatin in der embryonalen Keimzelltumorzelllinie NTERA-2D1 führt. In verschiedenen Zelllinien zeigt sich eine Assoziation von nicht funktionsfähiger Caspase 8 und Cisplatinresistenz (Liu et al 2009). In jüngerer Zeit wiesen einige Arbeitsgruppen auf einen Zusammenhang von Caspase 8-Mutation bzw. fehlender Aktivierung und Cisplatinresistenz in humanen Kopf- und Hals-Tumorzelllinie hin (Liu et al 2009, Toyozumi et al 2004, Kaneda et al 2006).

Allerdings scheint eine Caspase 8-Aktivierung durch Cisplatin in manchen Zellsystemen auch unabhängig von FAS/FAS-Ligand möglich zu sein (Siddik 2003).

#### **1.4.2 Intrinsischer Weg**

Der intrinsische Apoptoseweg wird durch verschiedene Stresssignale ausgelöst und vornehmlich durch die Mitglieder der BCL-2-Familie reguliert (s.u.) (Willis et al 2005). Zentrale Rolle dieses Weges spielt das Mitochondrium. Durch ein komplexes Zusammenspiel von BCL-2-Proteinen wird die Oligomerisierung von BAX und BAK initiiert und die äußere mitochondriale Membran geschädigt. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials führt zu Verlust von Cytochrom C. Dieses bindet an APAF1 („Apoptotic protease-activating factor 1“) und bildet zusammen mit Procaspase 9 und ATP das sogenannte Apoptosom (Hill et al 2003). Es folgt wiederum die Aktivierung der Effektorcaspasen (Youle and Strasser, 2008).

Mueller et al zeigten 2003 in der Cisplatin-resistenten testikulären Keimzelltumorzelllinie 1411HP eine mangelnde Aktivierung von Caspase 9, die in den

sensitiven Vergleichslinien 2102 EP und H12.1 normal war und propagierten eine erhöhte Aktivierungsschwelle der Apoptose durch die verminderte Caspase 9-Aktivierung.

### **1.4.3 Die Familie der BCL-2-Proteine**

Die Induktion von Zelltod im Zytoplasma wird v.a. durch Mitglieder der BCL-2-Familie reguliert. Die Klassifizierung erfolgt aufgrund der Anzahl BCL-2-homologer (BH) Domänen (es existieren 4 unterschiedliche Domänen, die mit BH1 bis BH4 bezeichnet werden) aus denen die Proteine bestehen, wobei BH3 immer vorhanden ist (Kelekar et al 1998). Die Proteine der BCL-2-Familie können in 3 Gruppen unterteilt werden. Die antiapoptotischen Proteine, die in ihrer Struktur dem BCL-2 stark ähneln (vier BH-Domänen) wie BCL-2, BCL-X oder auch MCL-1 (Philchenkov 2004). Die proapoptotischen Proteine BAX und BAK, die zur Gruppe der BH123-Proteine gehören, die alle drei BH-Domänen besitzen. Und die ebenfalls proapoptotischen BH3-only-Proteine, die nur eine BH3-Domäne besitzen. Diese können BAX und BAK direkt stimulieren (z.B. BIM („BCL-2-interacting mediator of cell death“ bzw. „BCL-2-like protein 11“) und tBID („truncated BH3-interacting domain death agonist“) oder an BH1234-Proteine binden und diese dadurch von ihren vorigen Bindungspartnern (BH123 oder BH3-only-Proteinen) trennen und so indirekt proapoptotisch wirken (NOXA, BAD und PUMA („p53 upregulated modulator of apoptosis“) (Kuwana et al 2002, Kroemer et al 2007).

Nach Aktivierung transloziert BAX zum Mitochondrium. Sowohl BAX als auch BAK oligomerisieren nach Aktivierung und bilden Poren in die äußere Mitochondrienmembran, es kommt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials („mitochondrial outer membrane permeabilization“, MOMP).

Das Verhältnis von pro- zu antiapoptotischen Proteinen (besonders auch von BCL-2 zu BAX) ist mitverantwortlich, wie sensibel eine Zelle auf Apoptosesignale reagiert (Reed 2006). So wurde gezeigt, dass Tumorzellen, die intrinsisch eine erhöhte Expression von BCL-2 besitzen, weniger sensitiv gegenüber Cisplatin induzierter Apoptose sind (Faivre et al 2003, Han et al 1999). Cisplatin kann in bestimmten Zellen BAX induzieren,

wodurch sich das Verhältnis BAX:BCL-2 zugunsten von BAX verschiebt und die Apoptose eingeleitet wird. (Siddik 2003). In Glioblastomzellen und der Mammakarzinomlinie MCF7 konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von BCL-X und BCL-2 den Zelltod begünstigen (Lytle et al 2004, Basma et al 2005). Wird hingegen proapoptotisches BAX erhöht, führt dies zu einer vermehrten Sensitivität gegenüber einer Vielzahl von Medikamenten, wie in Magenkarzinom- und Ovarialkarzinomzellen gezeigt wurde. (Strobel et al 1996, Kim et al 2001). In testikulären Keimzelltumoren konnte eine Assoziation zwischen funktionalem p53, einem hohen BAX:BCL-2-Quotienten und der Hypersensitivität der Zellen gegenüber Chemotherapeutika gezeigt werden. (Chresta et al 1996, Soini et al 1996, Heidenreich et al 1998).

Neben Apoptoseregulation über die BCL-2-Proteine existieren auch Regulationsmechanismen der Caspaseaktivität wie beispielsweise die Familie der IAPs („Inhibitor of Apoptosis Proteins“), zu denen unter anderem XIAP und SURVIVIN zählen, die die Apoptose verhindern indem sie die Aktivität von Caspase 3, 7 und 9 herabsetzen (Li et al 2000, Deveraux et al 1999, Roy et al 1997). Durch Herunterregulierung der Aktivität des *SURVIVIN*-Gens konnte beispielsweise in der Zungenkarzinomlinie Tca8113 sowie in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa ein erhöhte Chemosensitivität gegenüber Cisplatin erreicht werden (Xu et al 2007, Song et al 2006). Auch in Schilddrüsenkarzinomzellen scheint eine erhöhte Expression von Survivin mit verminderter Sensitivität gegenüber Cisplatin einherzugehen (Tirrò et al 2006). Das aus den Mitochondrien stammende SMAC wirkt hingegen proapoptotisch indem es die IAP-Proteine hemmt und somit deren inhibitorischen Effekt auf Caspase 3 und 9 hemmt (Leblanc 2003, Du et al 2000, Verhagen et al 2000, Yang et al 2006).

#### **1.4.4 Vom DNA-Schaden zur Apoptose**

In der Prozessierung eines DNA-Schadens steht an erster Stelle die Erkennung desselben. Als Folge der Schädigung gibt es dann für die betroffene Zelle prinzipiell 3 Möglichkeiten: Entweder sie repariert den Schaden (bzw. der Schaden wird toleriert), die Zelle geht in Seneszenz oder sie stirbt (Roos et al 2006). Als Folge von genotoxischem Stress oder DNA-Schädigung werden eine Reihe verschiedener

Erkennungsproteine und Proteinkinasen zu den geschädigten Stellen rekrutiert und vermitteln die Aktivierung weiterer Signalproteine. Beispiele sind ATM/CHK1, ATR/CHK2 oder MAPK wie p38 $\alpha$  die dann entweder Zellzyklusarrest (und Reparatur) oder Apoptose induzieren (Roos et al 2006, Abraham 2001, Sancar et al 2004). Der exakte Mechanismus, wie die initiale DNA-Schädigung durch Cisplatin letztendlich zum Zelltod führt ist noch nicht abschließend geklärt (Siddik 2003, Wang et al 2005). Da eine Vielzahl der embryonalen Keimzelltumoren *TP53*-Wildtyp exprimieren, wohingegen *TP53* in der überwiegenden Mehrheit aller Tumore mutiert ist, liegt der Gedanke nahe, dass *TP53* bei der Hypersensitivität der Keimzelltumoren eine Rolle spielen könnte. Allerdings ist die Datenlage hierzu nicht eindeutig. Allgemein wird ein Zusammenhang zwischen funktionalem p53 und der außergewöhnlichen Chemosensitivität von TGCT eher bestätigt. Einige Veröffentlichung weisen aber darauf hin, dass die Hypersensitivität embryonaler Keimzelltumore zumindest nicht ausschließlich an eine hohe Expression von funktionalem p53 gekoppelt zu sein scheint (Burger et al 1998, Kersemaekers et al 2002).

## 1.5 Die Rolle von p53

p53 besitzt eine Schlüsselrolle in der zellulären Antwort auf Stress und der Entscheidung, ob eine geschädigte Zelle überlebt oder in den Zelltod geht. *TP53* ist das bis heute wohl am besten untersuchte Tumorsuppressorgen. Entdeckt wurde es im Jahr 1979 (Lane et al 1979; Linzer et al 1979; DeLeo et al 1979). *TP53* ist in ca. 50% aller Tumoren durch somatische Mutationen inaktiviert, wobei TGCT mit sehr niedrigen Mutationsraten eine Ausnahme darstellen (Pietsch et al 2006, Kersemaekers et al 2002). Man geht davon aus, dass die Funktion von p53 in den übrigen Tumoren über andere Wege wie z.B. die erhöhte Expression von Antagonisten oder verminderte Expression von Co-Faktoren, gestört ist (Samuels-Lev et al 2001, Vogelstein et al 2000). In der ungestressten Zelle ist p53 vor allem durch Einfluss von MDM2 sehr kurzlebig und liegt dadurch in niedrigen Konzentrationen vor. MDM2 antagonisiert p53, indem es

einerseits seine transkriptionale Aktivität hemmt, andererseits in seiner Funktion als E3-Ligase den raschen proteasomalen Abbau von p53 induziert (Kubbutat et al 1997). Gleichzeitig induziert p53 die Expression von MDM2 wodurch ein negativer Feedbackmechanismus entsteht (Oliner et al 1993, Wu et al 1993). Durch externe oder interne Stresssignale (ausgelöst beispielsweise durch UV-Licht oder Zytostatika) wird die Akkumulation von aktivem p53 induziert. Dieses ist in der Folge an der Regulation von Zellzyklus, Induktion von DNA-Reparatur (Morris et al 1996, Tan et al 2002) und Zelltod (Lane 1992, Hartwell et al 1994) maßgeblich beteiligt. p53 kann hierbei auf unterschiedliche Weise wirken:

### 1.5.1 p53 als Transkriptionsfaktor

Durch verschiedene Modifikationen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Methylierung, Acetylierung oder Sumoylierung wird p53 in seiner Stabilität, DNA-Bindung und transkriptioneller Aktivität modifiziert (Gostissa et al 1999; Rodriguez et al 1999, Kruse et al 2009). Die Transkriptionsaktivität wird dabei bestimmt durch die DNA-Bindungsfähigkeit von p53, seine Lokalisation, die vorhandene Menge an p53 sowie die Bereitstellung der zur Transkription notwendigen Bestandteile (Liu et al 2006). p53 kann als Transkriptionsfaktor direkt an die Promotorregion seiner Zielgene binden und zu deren Suppression oder Aktivierung führen (Chipuk et al 2006). So reguliert p53 beispielsweise die Expression zellzyklusregulatorischer Gene wie *CDKN1A* (*p21*) oder *GADD45A*, proapoptotischer Gene wie *BAX*, *PMAIP1* (*NOXA*) und *BBC3* (*PUMA*) (Momad et al 2000, Lakin et al 1999, Oda et al 2000, Nakano et al 2001, Miyashita et al 1995) oder antiapoptotischer Gene wie *BCL2* und *BCL2L1* (*BCLX*) (Miyashita et al 1994, Sugars et al 2001). Es sind mittlerweile mehrere hundert Zielgene bekannt, die durch p53 (mit)reguliert werden (Cawley et al 2004).

Kerley-Hamilton et al zeigten 2005, dass unter Cisplatinbehandlung in der NTERA-2D1 unter anderem *FAS* und *CDKN1A* p53-abhängig induziert werden. Ebenso zeigte die Gruppe, dass durch Herunterregulation mittels si-RNA in derselben Zelllinie die Apoptose gesenkt und eine erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin erreicht werden konnte. Schmelz et al zeigten 2009 in TGCTs ebenfalls eine Hochregulation von

proapoptotischen Genen wie *FASLG*, *TNFSF10* und *BAX* sowie eine Herunterregulation von *BCL2* nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien.

### 1.5.2 Transkriptionsunabhängige Funktionen von p53

Nachdem man zunächst dachte, dass p53 seinen regulierenden Einfluss auf Zellzyklusarrest, Seneszenz und Zelltod ausschließlich als Transkriptionsfaktor entsprechender Zielgene ausüben kann, ist seit einigen Jahren bekannt, dass p53 auch eine transkriptionsunabhängige proapoptotische Aktivität besitzt (Moll et al 2005). Bei diesem Weg interagiert p53 nach Stress direkt mit den Proteinen der BCL-2-Familie (s.o.) am Mitochondrium und im Zytoplasma und aktiviert oder inhibiert sie. Es kommt zur Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP), in der Folge zur Freisetzung von Cytochrom C und Initialisierung der Todesmaschinerie. Dies ist die bislang schnellste bekannte p53-abhängige Induktion von Apoptose (Moll et al 2006, Marchenko et al 2000).

Die Translokation von p53 vom Zellkern ins Zytoplasma wird über verschiedene Mechanismen reguliert. Hier spielen unter anderem MDM2, FOXO3 sowie die Phosphorylierung von p53 an Serin 15 eine Rolle. So führt beispielsweise Phosphorylierung an Serin 15 zu Akkumulation von p53 im Zellkern (Li et al 2003, Zhang et Xiong 2001, You et al 2006). MDM2 führt im Zellkern zur Monoubiquitinierung von p53, wodurch dieses aus dem Zellkern exportiert wird (Li et al 2003, Marchenko et al 2007). Weiter scheint konstitutiv eine gewisse Menge an durch Multiubiquitinierung stabilisiertem p53 zytosolisch vorzuliegen, das durch Stress aktiviert wird (Marchenko et al 2007). Im Zytoplasma kann p53 auf unterschiedlichen Wegen zur Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran und somit zur Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung von Procaspase 3 mit nachfolgender Apoptose führen (Marchenko et al 2000). p53 interagiert nach Stress direkt mit BCL-2 und BCL-X wodurch diese neutralisiert werden. Hierdurch verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der proapoptotisch aktiven Mitglieder der BCL-2-Familie und es kommt zu MOMP. Weiter liegen proapoptotisches BAX und BAK, aber auch andere proapoptotische BCL-2-Proteine wie die BH-3-only-Proteine im Zytoplasma und der

Mitochondrienmembran normalerweise als Komplex zusammen mit BCL-X oder BCL-2 vor und sind durch diese Bindung inaktiv. p53 verdrängt aufgrund seiner höheren Affinität zu BCL-X/BCL-2 BAX und BAK aus der Bindung. Diese oligomerisieren und führen so zur Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran (Mihara et al 2003, Chipuk et al 2004, 2005). BAK kann neben oben geschildertem auch als Komplex mit MCL-1 in der äußeren Mitochondrienmembran vorliegen und ist dadurch inaktiv (Mihara et al 2003). p53 kann BAK direkt binden, so die Bindung an MCL-1 lösen und zur Oligomerisierung von BAK mit konsekutiver Porenbildung in der Mitochondrienmembran führen (Leu et al 2004, Willis et al 2005). Die beschriebenen Prozesse gehen sehr schnell vonstatten, sodass bereits wenige Minuten nach Stresssignal 70% des Cytochrom C ausgetreten sind (Mihara et al 2003, Leu et al 2004). Das Gebiet der transkriptionsunabhängigen Funktion und Apoptoseinduktion von p53 ist seit einigen Jahren Gegenstand der Forschung. In einigen malignen Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass Cisplatin eine rasche Translokation von p53 zum Mitochondrium induzieren kann, so beispielsweise in der HCT116, einer humanen Kolonkarzinomzelllinie (Bragado et al 2007). Sayan et al zeigten 2006 eine Caspase-abhängige Spaltung von p53 infolge von Cisplatinbehandlung, wobei die Spaltprodukte, die ähnlich den BH3-only Proteinen wirken, zum Mitochondrium translozierten und die mitochondriale Membran depolarisierten. Weiter konnte in sensitiven ovariellen Karzinomzelllinien eine Akkumulation von mitochondrialem p53 mit nachfolgender Induktion von Apoptose infolge von Cisplatinbehandlung gezeigt werden, in resistenten ovariellen Karzinomzelllinien blieb diese Zellantwort aus, so dass die Autoren eine Dysregulation speziell der mitochondrialen Antwort von p53 in Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinomzelllinien annehmen (Yang et al 2006). Die Bedeutung der direkten mitochondrialen Funktion von p53 für die Hypersensitivität von embryonalen Keimzelltumoren ist noch unklar. Unklar ist auch, inwieweit das Produkt von *mtTP53* in der Lage ist, seine proapoptotische Funktion am Mitochondrium auszuüben. So berichteten Tomita et al 2006, dass das Produkt von *mtTP53* nicht dazu in der Lage ist, an BCL-2 zu binden und so indirekt MOMP zu induzieren. Allerdings unterscheiden sich die Proteinprodukte verschiedener *TP53*-Polymorphismen bezüglich ihrer Effektivität, den Zelltod durch Translokation ans Mitochondrium auszulösen. So ist beispielsweise Arg72 effektiver als Pro72 (Dumont et al 2003). Allerdings weisen

Experimente in zellfreien Systemen darauf hin, dass das Produkt von missense mt*TP53* im Vergleich zu wt*TP53* an ungestressten, isolierten Mitochondrien keine Oligomerisation von BAK und BAX mit nachfolgendem MOMP induzieren kann (Vaseva et Moll 2009).

### **1.5.3 Die Funktion von p53 abhängig von Lokalisation, Cofaktoren und Promotoren, der Art des zellulären Stresses sowie vom Zelltyp**

Warum p53 in einer bestimmten Situation Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Zelltod induziert, ist noch nicht vollständig verstanden und derzeit noch Gegenstand der Forschung. Einige Ursachen sind das Expressionslevel von p53, die Art des Gewebes, die Art des Stresssignales sowie die Expression von Cofaktoren (Balint et Vousden, 2001, Unger et al 1999).

Wie bereits im oberen Abschnitt beschrieben existieren zahlreiche Modifikationsmöglichkeiten von p53, welche als Reaktion auf Stress beispielweise über Veränderung der Stabilität oder DNA-Affinität von p53 dessen Funktion verändern können (Appella et al 2001, Vousden 2002, Luo et al 2004, Gu et al 2004, Chuikov et al 2004, Bode et al 2004, Kruse et al 2008, Tang et al 2008). So werden je nach Art des zellulären Stresses und Gewebetyps unterschiedliche Gruppen von Zielgenen aktiviert bzw. supprimiert. Hierdurch lässt sich erklären, dass unterschiedliche Stimuli im selben Zelltyp Seneszenz, Zelltod oder auch Zellzyklusarrest auslösen können, bzw. dass verschiedene Zelltypen auf den gleichen Stimulus unterschiedlich antworten (Tovar et al 2006, Murray-Zmijewski et al 2008). So kann beispielsweise die Tumorsuppressorfunktion von p53 in einer bestimmten Zelle herabgesetzt sein, entweder durch eine vermehrte Aktivität seiner Antagonisten wie MDM2, MDMX oder eines antiapoptotischen Cofaktors wie iASPP (s.u.) oder aber durch eine verminderte Aktivität seiner Aktivatoren wie CDKN2A, ASPP1 oder ASPP2 (s.u.) (Murray-Zmijewski et al 2008, Beckermann et al 2010). Mittels Genexpressionsanalysen arbeiten einige Gruppen daran, die für TGCT spezifischen Genexpressionsmuster in Reaktion auf Stress zu eruieren und hieraus die für die Hypersensitivität dieser Tumoren verantwortlichen Pathways zu identifizieren (z.B. Duale et al 2007). Neben der Modifikation von p53

selbst existieren Cofaktoren, die die Funktion von p53 beeinflussen und regulieren. Über die Interaktion mit Cofaktoren wird beispielsweise die Affinität zu Promotoren beeinflusst, so dass je nach in der Zelle exprimierten Cofaktoren die Gruppe der durch p53 aktivierten bzw. supprimierten Zielgene unterschiedlich ausfällt (Rozenfeld-Granot et al 2002). c-Myc ist ein Beispiel eines derartigen Cofaktors. Dieses Protein verhindert einen durch entsprechenden Stress induzierten Zellzyklusarrest, indem es als Folge des Stresssignales an die proximale Promotorregion von *CDKN1A* rekrutiert wird. Hierdurch wird die *CDKN1A* (*p21*)-Induktion durch p53 verhindert, die Balance in dem Gleichgewicht Zellzyklusarrest-Zelltod verschiebt sich in Richtung Zelltod (Seoane et al 2002). Als weiteres Beispiel für Cofaktoren sei die Familie der oben bereits erwähnten „Apoptosis stimulating proteins of p53“ ("ASPP") genannt. Es handelt sich um 3 Proteine, ASPP1, ASPP2 und iASPP. ASPP1 und ASPP2 erhöhen nach Bindung an p53 dessen DNA-Affinität und damit die Fähigkeit, die Expression proapoptotischer Gene zu induzieren (Samuels-Lev et al 2001). iASPP hingegen inhibiert die p53 vermittelte Apoptose (Bergamaschi et al 2004). Da alle Mitglieder der "ASPP"-Familie dieselbe Bindungsstelle an p53 besetzen herrscht ein kompetitives Gleichgewicht. Weiter interagieren ASPP1, ASPP2 und iASPP auch mit den p53-Familienmitgliedern p63 und p73. Der intrazelluläre Abbau der "ASPP" erfolgt über Proteasomen. Die "ASPP" interagieren weiter mit einer Reihe von Bindungspartnern wie SAM68, (Thornton et al 2006) oder BCL-2 (Naumovsky et al 2000) und beeinflussen damit auch auf anderem Wege Apoptose bzw. Zellzyklusarrest. In einer Reihe von humanen Tumorzelllinien (HEPG-2, MCF-7 and A549) mit *wtTP53* wurde eine verminderte Expression von *ASPP1* und *ASPP2* gezeigt (Liu et al 2005). Samuels-Lev et al zeigten 2001 in primären Mammakarzinomzellen, die jeweils mit Normalgewebe derselben Patientin verglichen wurden, dass 60% bzw. 22,5% der *wtTP53*-Tumoren eine reduzierte *ASPP1*- bzw. *ASPP2*-Expression zeigten. In den *mtTP53*-Tumoren waren diese Anteile deutlich geringer. In einer jüngst veröffentlichten Studie wurde in HBV-assoziierten hepatozellulären primären Tumorzellen eine erhöhte Expression von *iASPP* gefunden (Lu et al 2010). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte kurz vorher, dass *ASPP1* und *ASPP2* in HBV-assoziierten hepatozellulären Tumoren herunterreguliert sind (Zhao et al 2010). Auch in *wtTP53*-Tumorzellen akuter Leukämien konnte eine erhöhte Expression von *iASPP* gefunden werden. Wurde die *iASPP*-Expression geblockt,

wurde vermehrt Apoptose durch Etoposid und Daunorubicin induziert (Liu et al 2009). Durch Herunterregulation von *ASPP1* und *2* konnte die durch DNA-störende Agenzien (Etoposid, UV-Strahlen und Cisplatin) ausgelöste Apoptose reduziert werden (Samuels-Lev et al 2001, Bergamaschi et al 2003). Zelllinien mit erhöhter Expression von *iASPP* waren gegenüber durch oben genannte Agenzien ausgelöste Apoptose resistenter als ihre Mutterlinien (Bergamaschi et al 2003). Interessant ist weiter, dass es in Tumoren *TP53*-Mutationen gibt, die beispielsweise die Aktivierung des Zellzyklusarrest induzieren können, jedoch nicht mehr, oder nur noch in reduzierter Form dazu in der Lage sind, Apoptose zu induzieren. Eine reduzierte Bindungsaffinität von *ASPP1* und *2* an der entsprechenden Sequenz von *TP53* kann hier eine mögliche Erklärung sein (Braithwaite et al 2006). Auch eine Inaktivierung bzw. Minderaktivierung von *ASPP1* und *2* durch veränderte Methylierung wird berichtet (Liu et al 2005).

## 1.6 Epigenetik

In den letzten Jahren rückte die Bedeutung der Epigenetik für die Tumorgenese weiter ins Zentrum der Forschung (Herman et al 2003). Der Begriff Epigenetik beschreibt eine Veränderung der Funktionalität der DNA ohne Veränderung der primären Sequenz. Dies geschieht durch Modifikationen wie DNA-Methylierung oder Histon-Acetylierung (Egger et al 2004) und spielt eine bedeutende Rolle in der Tumorentstehung (Baylin et al 2000).

Normalerweise hat die DNA-Methylierung wichtige Aufgaben in der Entwicklung, der Inaktivierung des X-Chromosoms oder auch der Inaktivierung parasitärer Elemente (Jaenisch et al 1997, Surani et al 1998, Bestor et al 2000). Die DNA-Methylierung erfolgt durch die Familie der DNA-Methyltransferasen (Bird et al 2002, Moss et al 2007). Tumorzellen weisen ein stark verändertes Methylierungsmuster auf (Feinberg et al 1983). So weisen manche Promotorregionen in Tumorzellen eine Hypermethylierung auf, die zusammen mit weiteren Veränderungen zu einer transkriptionellen Inaktivierung führt (Herman et al 2003, Bird et al 2002, Jaenisch et al 2003, Esteller et al 2001). Aber auch Hypomethylierung mit nachfolgender Aktivierung der

entsprechenden Gene ist in Tumorzellen beschrieben (Feinberg et al 2006, Piyathilake et al 2001, Piyathilake et al 2005, Galusca et al 2005, Soares et al 1999). Folge ist eine veränderte Aktivität von Genen, die beispielsweise in Zellzyklusarrest, Reparatur oder Apoptose involviert sind (Herman et al 2003). In einer Reihe von soliden und hämatopoetischen Tumoren konnte mittlerweile eine Hypermethylierung verschiedener Gene nachgewiesen werden (Suzuki et al 2004, Galm et al 2006).

Darüber hinaus wurden bestimmte Signaturen von hypermethylierten Promotoren für bestimmte Tumoren identifiziert, doch gibt es auch Gene, die generell in vielen Tumoren hypermethyliert und somit transkriptionell inaktiv sind (Costello et al 2000, Esteller et al 2001). Der Methylierungsstatus von TGCT wurde kürzlich untersucht. Es zeigte sich eine im Vergleich zu anderen soliden Tumoren deutlich differente Methylierungssignatur. So waren Seminome im Vergleich zu Nichtseminomen und somatischen Tumoren hypomethyliert, wobei die Nichtseminome ein bis dato einzigartiges Hypermethylierungsmuster aufwiesen (Koul et al 2002, Netto et al 2008). Die Hypermethylierung war mit Stilllegung der entsprechenden Gene assoziiert. Durch Behandlung mit Decitabine konnte die Genexpression reaktiviert werden. Die Autoren führen die veränderte Signatur auf die Stammzeleigenschaften der TGCT zurück. So ist bekannt, dass primordiale männliche Keimzellen während ihrer Entwicklung eine vollständige Auslöschung mit nachfolgender Neumethylierung der DNA vollziehen, die in Abhängigkeit von der DNA-Methyltransferase 3B stattfindet (Hajkova et al 2002). Die Phase des epigenetischen Umbaus in den Keimzellen ist nach heutigem Verständnis der Zeitraum, in dem TGCT entstehen (Chaganti et al 2000, Reik et al 2001). Je nachdem, ob der Tumor aus Zellen hervorgeht, deren Methylierung gelöscht ist oder deren neue Methylierung bereits stattgefunden hat, handelt es sich um unterschiedliche histologische Subgruppen der TGCT (Netto et al 2008).

AZA ist ein DNA-Methylierungsinhibitor, der für die Behandlung bestimmter maligner Erkrankungen wie der akuten myeloischen Leukämie bereits klinisch zugelassen ist. Der bislang am besten untersuchte Mechanismus der Antitumorwirkung von AZA beruht auf einer DNA-Demethylierung und als Folge Wiederepression spezifischer Tumorsuppressorgene (Jones et al 2007). Es gibt aber auch Studien, die eine von der DNA-Methylierung unabhängige Antitumorwirkung über ATM/ATR/p53-abhängige

Wege propagieren (Qin et al 2009, Juttermann et al 1994, Palii et al 2008, Hoglund et al 2009, Link et al 2008, Zhu et al 2004).

Kondensierte DNA liegt an Histonproteine gebunden vor. Je nachdem, ob Histone phosphoryliert, methyliert oder acetyliert sind, unterscheidet sich die Konformation der gebundenen DNA. Diese wiederum hat Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität und Genexpression (Lopez-Serra et al 2008, Strahl et al 2000). Acetylierte Histone führen zu einer transkriptionellen Aktivierung der entsprechenden Abschnitte, deacetylierte Histone zu einer Inaktivierung (Richards et al 2002). Die Histonacetylierung erfolgt durch Histonacetyltransferasen, die Deacetylierung durch Histondeacetylasen. Durch epigenetische Veränderungen kann eine Tumorzelle entscheidende Überlebensvorteile erlangen (Herman et al 2003, Egger et al 2004, Esteller et al 2002). In malignen Tumoren ist die DNA-Hypermethylierung oft vergesellschaftet mit vermehrtem Auftreten deacetylierter Histone und einem Stummschalten der entsprechenden Gene (Santini et al 2007). In embryonalen Stammzellen und embryonalen Karzinomen beispielsweise werden die stammzellspezifischen Transkriptionsfaktoren *POU5F1*, *SOX2* und *NANOG* exprimiert (Boyer et al 2005, Sperger et al 2003). Die Expression dieser Faktoren geht im Laufe der Differenzierung durch Mechanismen, die epigenetische Veränderungen implizieren, verloren (Nichols et al 1998). Eine vermehrte Aktivierung dieser Gene wird in niedrig differenzierten Tumoren mit schlechter Prognose beobachtet und eine vermehrte Expression in Vorläuferzellen kann zur malignen Transformation führen (Tanaka et al 2007, Chiou et al 2008, You et al 2009).

## 1.7 Fragestellung

Embryonale Keimzelltumoren besitzen eine ausgesprochene Hypersensitivität gegenüber Cisplatin. Der Mechanismus dieser Hypersensitivität ist bis heute nicht abschließend erklärt.

In der vorliegenden Arbeit soll anhand der embryonalen Keimzelltumormlinie NTERA-2D1 zunächst deren Sensitivität gegenüber Cisplatin gezeigt und der Weg des eingeleiteten Zelltodes charakterisiert werden. Weiter sollte die Frage beantwortet werden, ob tatsächlich, wie vielfach angenommen, eine verminderte DNA-Addukt-

Reparaturkapazität maßgeblich an der Hypersensitivität von embryonalen Keimzelltumoren gegenüber Cisplatin beteiligt ist.

In einem weiteren Schritt sollte ein geeignetes Modellsystem entwickelt werden, in dem die intrinsisch hypersensitive NTERA-2D1 mit einer Linie verglichen werden kann, deren Cisplatinempfindlichkeit pharmakologisch moduliert wurde. Anhand des Modellsystems sollte im Weiteren v.a. die Induktion von Proteinen, die für Reparatur, Apoptose und Zellzyklusarrest relevant sind, verglichen werden.

Im letzten Teil der Arbeit sollte versucht werden, ob durch Vorbehandlung der Modelllinie, die durch eine geringere Cisplatinempfindlichkeit charakterisiert ist, mit Substanzen einer Medikamenten-Library (Prestwick-Library) eine Hypersensitivität erreicht werden kann, die der NTERA-2D1-Grundlinie entspricht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zellkultur

#### 2.1.1 Kulturmedium und Zusätze

Alle verwendeten Zelllinien wurde in RPMI 1640 Medium mit unten aufgeführten Zusätzen kultiviert (folgende ml-Angaben beziehen sich auf 500ml RPMI 1640 Medium).

RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
10% (v/v) FCS („Foetal Bovine Serum“, hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum)	Gibco, Karlsruhe
0,1 g/l Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
10 mM HEPES (2-(4-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanolsulfonsäure), pH 7,4	Merck, Darmstadt
2 mM L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
1 mM Natriumpyruvat	Gibco, Karlsruhe
0,13 mM L-Asparagin Serva,	Heidelberg
0,05 mM $\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
3 ml 100 x nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin

Dem Medium der MCF 10A wurden folgende Zusätze beigefügt:

Humanes Interleukin-3	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
Humanes Insulin	Sigma
Humanes G-CSF („Granulocyte Colony Stimulating Factor“)	Roche, Mannheim

### 2.1.2 Verwendete Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

Name	Beschreibung, Herkunft	P53 Status
NTERA-2 D1	Embryonale Karzinomzelllinie LGC Standards, Germany	wt
MCF7	Mammakarzinomzelllinie ATCC American Type Culture Collection	wt

Die Sensitivität der Zelllinien NTERA-2D1, der mit RA vorbehandelten NTERA-2D1 und der Mammakarzinomlinie MCF7 gegenüber Cisplatin wurde verglichen mit einem Tumorzelllinienpanel bestehend aus 8 Mamma-, 8 Ovarial- und 2 Hodenkarzinomlinien sowie 5 CML-Linien. Im Einzelnen handelt es sich um folgende Zelllinien:

MCF7, MDA MB 361, MDA MB 157, MDA MB 134, MDA MB 175, MDA MB 330, OVCAR8, UACC 893, OVCAR5, SKOV3, H12.5, ADR RES, IGROV1, OVCAR4, OVCAR3, A2780, 2102EP, MDA MB 436, K562, LAMA84, BT20, Meg01, A549, H1299, NCI-H460, NCI-H23.

### 2.1.3 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unter sterilen Bedingungen kultiviert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeiten wurde die Zellzahl alle 2-3 Tage unter sterilen Bedingungen reduziert. Die adhärennten Zellen mussten dafür zunächst vom Boden der Zellkulturflasche gelöst werden. Nach Absaugen des Mediums wurden hierzu die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Im Anschluss wurden je nach Größe der Kulturflasche 1,5-5ml Trypsin/EDTA auf den Zellrasen gegeben und die Flaschen dann im Brutschrank max. 5min, bzw. bis sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst hatten, inkubiert. Die adhärennten Zellen wurden bei dichtem Zellrasen der Mutterflasche in der Regel im Verhältnis 1:10 weitergeführt. Bei allen Versuchen mit adhärennten Zellen wurden diese in entsprechender Zelldichte ausgesät, konnten sich über Nacht am Boden

des Kulturgefäßes absetzen und wurden am folgenden Tag entsprechend des Versuches behandelt.

Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> , 150cm <sup>2</sup> )	Corning, USA
Sterile Pipetten	Corning, USA
96-well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
15 ml Polypropylenröhrchen, konisch	Greiner Bio-One, Frickenhausen
50 ml Polypropylenröhrchen, konisch, FALCON	Becton Dickinson, USA
PBS (0,27M NaCl, 0,005 M KCl, 0,015 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 0,003M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Sterilbank <i>LaminAir HB2472</i>	Heraeus, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau

### 2.1.4 Zellzahlbestimmung

Wenn im Rahmen des Experimentes notwendig wurden Zellzahl und Viabilität mittels Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 90 µl Trypan-Blau-Lösung (Trypan-Blau 1:10 in PBS) mit 10µl Zellsuspension resuspendiert. Trypan-Blau wird bei lebenden Zellen über einen aktiven Transportmechanismus aus der Zelle eliminiert, so dass viable Zellen ungefärbt, tote Zellen gefärbt sind.

Bestimmung der Zellzahl:

Zellzahl / Anzahl der ausgezählten Großquadrate x Verdünnung x 10<sup>4</sup> = Zellzahl pro ml

Trypan Blau 0,5% (w/v)	Biochrom AG, Berlin
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Mikroskop	Zeiss, Jena

### 2.1.5 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

In Abständen von 3-4 Monaten wurden die in Kultur gehaltenen Zelllinien durch kryokonservierte Zellen ersetzt, um mögliche Veränderungen der Zellen durch Selektion in Kultur zu reduzieren. Die Zellen wurden in Flüssigstickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1-2 \times 10^6$  /ml in eiskaltem DMSO/FCS (1:10) aufgenommen und in Kryo-Röhrchen überführt. Dann wurden die Zellen in einer speziellen Einfrierbox über Nacht schrittweise zunächst auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Am nächsten Tag erfolgte die Umlagerung der Röhrchen in Flüssigstickstoff.

Zum Auftauen wurden die Kryo-Röhrchen unter leichtem Schwenken kurz im  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad angetaut und dann in 10ml Zellmedium aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen.

Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
1,8 ml CryoTube™	Nalgene Nunc International
5100 Cryo $1^{\circ}\text{C}$ Einfrierbox ‚Mr. Frosty‘	Nalgene Nunc International
Rottana/S Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen

## 2.2 Behandlung der Zellen

### 2.2.1 Kurzzeitdifferenzierung der NTERA-2D1

Für die Kurzzeitdifferenzierung mit RA wurden die NTERA-2D1 entsprechend dem anstehenden Experiment in Zellkulturflaschen verteilt. Nach dem Absetzen der Zellen am Flaschenboden wurde am folgenden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Dem Medium wurde hierbei RA  $2\mu\text{M}$  zugefügt. RA ist eine hochlichtempfindliche Substanz, so dass die Zellen dann durch Aluminium lichtgeschützt für 48h im Brutschrank kultiviert wurden. Die Zeitpunkte der Experimente wurden so gewählt, dass die Zellen direkt im Anschluss an die 48-stündige Kurzzeitdifferenzierung weiterverarbeitet wurden.

All-trans-Retinolsäure	Sigma Aldrich
------------------------	---------------

### 2.2.2 Behandlung mit Cisplatin

Die Behandlung mit Cisplatin (cis-Diaminodichloroplatinum (II)) erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit einer Konzentration von 10 $\mu$ M. Nach Inkubation mit Cisplatin wurden die Zellen je nach Versuchsaufbau entweder 2 mal mit PBS gewaschen und dann mit neuem Medium versorgt oder direkt in den entsprechenden Versuch eingebracht.

Cisplatin (1 mg/ml)	Apotheke Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart
---------------------	---

### 2.2.3 Langzeitüberleben/Colony-Assays

Für die Untersuchung des Langzeitüberlebens wurden die NTERA-2D1 bzw. NTERA-2D1+RA jeweils mit und ohne zVADfmk (50 $\mu$ M) 2,5 $\mu$ l auf 5ml verschiedenen Cisplatinkonzentrationen ausgesetzt. Nach 48h wurde das Cisplatinhaltige Medium mit PBS 2mal heruntergewaschen und durch normales Medium ersetzt. Die durch die überlebenden Zellen gebildeten Zellkolonien wurden an Tag 8 bzw. Tag 12 gezählt.

Die verwendeten Cisplatinkonzentrationen waren wie folgt: 2 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M, 0,25 $\mu$ M, 0,125 $\mu$ M, 0,0625 $\mu$ M, 0,03125 $\mu$ M, 0,015 $\mu$ M, 0 $\mu$ M. Die ausgesäte Zellzahl betrug 400 Zellen pro Flasche (25cm<sup>2</sup>) für die höchsten 3 Konzentrationen Cisplatin, für die niedrigeren Cisplatinkonzentrationen jeweils 100 Zellen pro Flasche.

Die Auszählung der Kolonien erfolgte am Mikroskop. Als Kolonie definiert wurde ein Zellklon von mindestens 20 Zellen.

zVADfmk	Bachem AG
Mikroskop	Zeiss Jena

Die Cisplatininkubation der folgenden Experimente betrat wenn nicht anders angegeben jeweils 16 Stunden. Die Apoptosemessung erfolgte via Annexinfärbung am Durchflusszytometer (s.u.).

#### **2.2.4 Beeinflussung der DNA-Methylierung mittels 5-Aza-2'-desoxycytidin**

Die Hypermethylierung regulatorischer DNA-Regionen führt zu einer transkriptionellen Repression betroffener Gene. 5-Aza-2'-Desoxycytidine ist ein DNA-Methyltransferaseinhibitor. Das Aza-Nukleosid wird als „falsches Cytidin“ während der Replikation bzw Transkription in die DNA bzw. RNA eingebaut. Hierdurch wird die DNA- bzw. RNA-Methyltransferase gehemmt und dadurch die betroffene Sequenz demethyliert, d.h. das entsprechende Gen reaktiviert. Auf diese Weise wird die Genexpression, Aktivierung und das Genesilencing beeinflusst und so beispielsweise Tumorsuppressorgene reaktiviert.

Die Zellen wurden mit 5-Aza-2'-Desoxycytidine in einer Konzentration von 1µM über 5 Tage vorinkubiert. Im Anschluss sollte Cisplatin 10µM zugegeben und nach 8 Stunden die Apoptose via Annexinfärbung gemessen werden.

5-Aza-2'-desoxycytidin	Sigma Aldrich
------------------------	---------------

#### **2.2.5 Beeinflussung der DNA-Acetylierung mittels SAHA**

SAHA (Suberoylanilide Hydroxamsäure) ist ein Histon-Deacetylaseinhibitor. Eine starke Acetylierung der Lysingruppen der Kernhistone verringert die positive Ladungsdichte derselben und führt somit zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur (geringere Anziehung zwischen Histon und DNA). Dieses sogenannte Euchromatin zieht eine vermehrte Transkription und Genexpression nach sich. Im Gegenteil bewirkt eine Deacetylierung eine stärkere Anziehung zwischen DNA und Histonen, eine dichtere Chromatinstruktur (Heterochromatin) und somit eine verminderte Genexpression. Weiter scheinen die lysinreichen n-terminalen Enden der Kernhistone als Erkennungsstelle für Transkriptionsfaktoren zu fungieren, die so die Expression einzelner Gene aktivieren oder deaktivieren können. Der Einsatz von Histon-

Deacetylaseinhibitoren soll zu einer Renormalisierung der aberranten Genexpressionsmuster in Tumorzellen führen.

Die Zellen wurden 2 Stunden mit SAHA 1 $\mu$ M vorinkubiert. Im Anschluss wurde Cisplatin 10 $\mu$ M zugegeben und nach 8 Stunden die Apoptose via Annexinfärbung gemessen

SAHA	Merck AG
------	----------

### 2.2.6 Pifithrin- $\alpha$

Pifithrin- $\alpha$  ist ein temporärer p53-Inhibitor, der die transkriptionelle Aktivität von p53 und damit die von p53 transkriptionsabhängige Apoptose blockiert, vermutlich über eine spezifische Hemmung von p53 nach Translokation in den Zellkern (Murphy et al 2004)

Die Zellen wurden 2 Stunden vor Behandlung mit Cisplatin mit PFT- $\alpha$  10 $\mu$ M vorinkubiert.

Die Apoptosemessung erfolgte 16 Stunden nach Cisplatinzugabe (10 $\mu$ M) via Annexin-Staining.

Pifithrin- $\alpha$	Sigma Aldrich
---------------------	---------------

### 2.2.7 Pifithrin- $\mu$

Auch Pifithrin- $\mu$  ist ein p53-Inhibitor, allerdings hemmt Pifithrin- $\mu$  spezifisch den mitochondrialen Weg von p53, indem es die Bindung von p53 ans Mitochondrium, BCL-2 und BCL-X hemmt. Die transkriptionelle Funktion von p53 wird hingegen nicht beeinflusst (Andrei et al 2007).

Die Zellen wurden 2h vor Behandlung mit Cisplatin mit PFT- $\mu$  10 $\mu$ M vorinkubiert.

Die Apoptosemessung erfolgte 16 Stunden nach Cisplatinzugabe (10 $\mu$ M) via Annexin-Staining.

Pifithrin- $\mu$	Sigma Aldrich
------------------	---------------

### 2.2.8 Inkubation mit antagonistischem FAS-Ligand

Es stehen für Laborzwecke sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirkende FAS-Liganden zu Verfügung. Beide FAS-Liganden binden an die FAS-Todesrezeptoren auf der Zellmembran. Hierdurch wird im Falle der agonistisch wirkenden Liganden der extrinsische Apoptoseweg induziert. Im Falle der antagonistischen Liganden wird der Rezeptor blockiert, ohne dass der extrinsische Apoptoseweg eingeleitet wird. Die Rezeptoren stehen somit aber auch für agonistische Liganden anderen Ursprungs nicht mehr zur Verfügung.

Die Zellen wurden 2h vor Cisplatinbehandlung (10µM) mit FAS-Ligand 3µl auf 5ml [30ng/µl] inkubiert, wobei ein Ansatz ohne Cisplatin, und je ein Ansatz mit Cisplatin +/- Cycloheximid 5µl auf 5ml [1µg/ml] Stammlsg] geführt wurde (wobei Cycloheximid die Antagonisierung der FAS-Wirkung durch Flice hemmen soll). Die Apoptosemessung erfolgte 16 Stunden nach Cisplatinzugabe via Annexinfärbung.

FAS-Ligand	Alexis
Cycloheximid	Sigma Aldrich

### 2.2.9 Inhibition der Caspase 8

Caspase 8 ist direkt an der Vermittlung des extrinsischen Apoptoseweges beteiligt. Über die Bindung eines entsprechenden Liganden an einen membranständigen Todesrezeptor (FAS bzw. CD95, TNF, TRAIL...) wird FADD („Fas associated death domain“) und Caspase 8 rekrutiert, die den „Death inducing signalling complex“ (DISC) bilden. Durch Inhibierung von Caspase 8 wird diese Rekrutierung und damit die Fortsetzung des Signalweges verhindert.

Die Zellen wurden 2h vor Cisplatinbehandlung (10µM) mit Caspase 8-Inhibitor 1µl/5mlM vorinkubiert. Die Apoptosemessung erfolgte 16 Stunden nach Cisplatinzugabe mittels Annexin-Staining.

Caspase 8-Inhibitor	BioVision
---------------------	-----------

### 2.2.10 Inhibition der Caspasen mittels zVADfmk

zVADfmk ist ein unspezifischer Caspase-Inhibitor, d.h. die Substanz blockiert alle Caspasen. Um die Caspaseabhängigkeit der Cisplatininduzierten Apoptose der NTERA-2D1 zu untersuchen, wurden die Zellen 2h mit zVADfmk 2 $\mu$ M vorinkubiert. Dann wurde Cisplatin 10 $\mu$ M zugegeben und nach 16h die Apoptose via Annexinmessung am Durchflusszytometer bestimmt.

zVADfmk	Bachem AG
---------	-----------

## 2.3 Untersuchung der Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers

Mit dem verwendeten Durchflusszytometer ist es möglich, zeitgleich 5 optische Parameter zu messen: Vorwärtsstreulicht (forwardscatter, FSC), Seitwärtsstreulicht (sidescatter, SSC) sowie drei verschiedene Fluoreszenzspektralbereiche (FL 1-3). Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Software CellQuest.

Fluorescence Activated Cell Analyzer ‚FACScan‘ <u>Laser:</u> 15 mW, 488 nm, luftgekühlter Argon-Ionen Laser <u>Detektoren/Filter:</u> 530 nm (FITC) 585 nm (PE/PI) 650 nm (dunkelrote Fluoreszenz)	Becton Dickinson, USA
CELLQuest™ Software	Becton Dickinson, USA

### 2.3.1 Nachweis früher Apoptose über Annexin V-Färbung

Die Apoptose ist durch eine zeitliche Abfolge bestimmter zellulärer Veränderungen charakterisiert. Typische Veränderungen der Zellmembran zeigen sich bereits in einem sehr frühen Stadium. Unter anderem kommt es hierbei zu einer Ausstülpung von Phosphatidylserin, einem Membranphospholipid, das in gesunden Zellen ausschließlich an der Zellinnenseite der Membran lokalisiert ist, an die Zellaußenseite. Der für die Annexin-Färbung verwendete Farbstoff Annexin V, ein ~ 35kD großes  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Phospholipid-Bindeprotein, besitzt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin. Fluoreszenzmarkiert (z.B. Fluoreszein-Isothiocyanat, FITC) ist er eine geeignete Sonde für apoptotische Zellen. Die am Durchflusszytometer als FITC-positiv gemessenen Zellen stellen also den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen in der untersuchten Zellpopulation dar. Die Färbung der Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Für jede Probe wurden ca.  $5 \times 10^5$  Zellen verwendet. Die Zellen wurden nach entsprechender Vorbehandlung analog zum Vorgehen in der Zellkultur abtrypsinisiert und pelletiert. Dann wurden die Proben jeweils einmal mit kaltem PBS und nachfolgend in Annexin V-Binderpuffer gewaschen und im Anschluss wiederum pelletiert. Die Proben wurden dann jeweils in 100 $\mu\text{l}$  Färbelösung (5% (v/v) Annexin V-FITC, 2,5% (v/v) Propidiumiodid (PI)-Lösung (Stammlösung: 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. 2,5% (v/v) Annexin V-Alexa) aufgenommen und für mindestens 10 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Vor Messung am Durchflusszytometer wurden die Proben mit Annexin V-Bindepuffer auf jeweils ca. 400-500 $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

Annexin V-FITC	BD PharMingen, USA
Annexin V-Alexa	Roche, Mannheim
Annexin V Bindepuffer (10x)	BD PharMingen, USA
Propidiumiodid Stammlösung (1mg/ml)	Sigma, Taufkirchen
PBS	Biochrom AG, Berlin

### 2.3.2 Nachweis später Apoptose/Nekrose über PI-Färbung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Annexinfärbung regelhaft mit einer PI-Färbung (pro Probe 2,5µl einer 50µg/ml PI-Färbelösung) kombiniert. PI ist ein Vitalfarbstoff, der nur in Zellen mit stark geschädigter Zellmembran eindringt. Dies ist der Fall in späten Stadien der Apoptose bzw. bei nekrotischen Zellen. Über die rote Fluoreszenz des PI-Farbstoffes können die spätapoptotischen und nekrotischen Zellen somit am Durchflusszytometer von den vitalen Zellen bzw. den Zellen in der frühen Apoptose unterschieden werden.

Propidiumiodid Stammlösung (1mg/ml)	Sigma, Taufkirchen
-------------------------------------	--------------------

### 2.3.3 Nachweis des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials mittels TMRM

Intakte Mitochondrien, das heißt, Mitochondrien mit intaktem Membranpotential, besitzen eine negative Ladung. Bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen, werden gespeicherte Anionen freigesetzt.

TMRM ist ein positiv geladener, nicht-toxischer Farbstoff. Aufgrund seiner Ladung lagert sich TMRM in die Membran gesunder Mitochondrien ein. Bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen kommt es zusammen mit der Freisetzung von Anionen auch zur Freisetzung von TMRM (Elmore et al 2004). Somit lassen sich Zellen mit intaktem von Zellen mit nicht intaktem mitochondrialem Membranpotential unterscheiden.

Die zu messenden Zellen wurde mit TMRM 50nM für 20min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen pelletiert, in PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

TMRM (Tetramethylrhodaminmethylester Perchlorat)	Molecular Probes, USA
--	-----------------------

### 2.3.4 Nachweis von Zellviabilität mittels Calcein-AM

Calcein-AM ist ein Derivat von Calcein und kann als ungeladenes Molekül in die Zelle gelangen. Dort wird das Calcein-AM durch Esterasen an lipophilen Gruppen metabolisiert. Ergebnis ist ein geladenes Molekül, das lange Zeit in der Zelle verbleibt und als Fluoreszenzfarbstoff genutzt werden kann. Für die Versuche wurde eine Calcein-AM-Stammlösung hergestellt (1,6mM), indem die Substanz in DMSO gelöst wurde. Eingesetzt wurde diese dann in eine Konzentration von 1,6µM. Eine positive Fluoreszenz ist Zeichen einer intakten inneren mitochondrialen Membran.

Calcein-AM	Molecular Probes, USA
------------	-----------------------

### 2.3.5 Zellvitalitätsnachweis durch MTT-Assay

Die Ermittlung der IC 50 durch Nachweis der Zellvitalität erfolgte mittels MTT-Assay (Mosmann et al 1983). Im verwendeten Protokoll werden lebende Zellen aufgrund ihrer mitochondrialen Stoffwechselaktivität von toten Zellen differenziert. Das Tertrazoliumsalz MTT wird durch eine mitochondriale Dehydrogenase zu dem violetten Formazanprodukt 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5 diphenylformazan reduziert. Der aktive Vorgang findet nur in viablen Zellen statt.

Für die Versuche wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen zwischen  $5 \times 10^3$  und  $7 \times 10^3$  Zellen pro Loch einer 96-well Platte über 48 Stunden kultiviert, wobei die adhärenen Zellen in normalem Medium ausgesät wurden und erst am Folgetag mit Cisplatin behandelt wurden. Für die Färbung wurden dann pro Loch 10µl MTT-Gebrauchslösung (10mg/ml MTT in PBS) zugegeben, für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, und anschließend je 90µl MTT-Lysepuffer (15% SDS in DMF-Wasser (1:1) gelöst; pH 4,5 mit HCl) zugegeben. Die Platten wurden über Nacht lichtgeschützt bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Färbung wurde bei einer Wellenlänge von 570nm photometrisch quantifiziert und mit Hilfe des Statistik Programms ‚GraphPad Prism 3.0‘ ausgewertet. Die verwendeten Cisplatinkonzentrationen waren 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 und 0µM.

Für die Versuche mit der Prestwick-Library wurden die Zellen über 2 Stunden mit den entsprechenden Substanzen aus der Library vorinkubiert. Dann erfolgte die Behandlung analog oben.

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid))	Sigma, Taufkirchen
ELISA-Reader ,Wallac‘	SLT Labinstruments, Crailsheim
GraphPad Prism 3.0 Software	GraphPad Software, USA

## 2.4. Protein-Analyse

### 2.4.1 Gesamtproteinextraktion

Die Zellen wurden wie oben beschrieben abtrypsiniert und dann bei 1000g, 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Pellets wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und hierbei in 1,5ml-Eppendorfgefäße überführt. Zum ersten Aufbrechen der Zellmembranen wurden die Zellpellets in Flüssigstickstoff schockgefroren und dann entweder direkt weiterverarbeitet oder bei –80°C gelagert.

Zur Weiterverarbeitung wurde die gefrorenen Zellpellets in 200–400µl 1 x Lämmli-puffer (62,5mM Tris/HCl, 20% (v/v) Glycerol, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 1% Bromphenolblau, pH 6,8) resuspendiert und 5min bei 97°C gekocht. Die Proben wurden dann mittels Ultraschall homogenisiert und die Zelltrümmer über 20min bei 8000g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und in entsprechender Menge (20-40µl pro Tasche) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Da bei der verwendeten Methode das im Lämmli-puffer enthaltene SDS keine quantitative Proteinbestimmung erlaubt, wurden bei den zu vergleichenden Proben gleiche Zellzahlen verwendet.

Ultraschall Homogenisator <i>Sonopuls HD200</i> <i>MS72</i> Mikrospritze aus Titan	Bandelin Elektronik, Berlin
---	-----------------------------

### 2.4.2 Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Entscheidend für die Auftrennung ist hierbei v.a. das Molekulargewicht. Je nach Molekulargewicht der untersuchten Proteine kann das Gel durch unterschiedliche Anteile Acrylamid und N,N'-Methylen-bis-Acrylamid für das entsprechende Molekulargewicht optimiert werden (s. Tabelle). Pro Tasche wurde ein Probenvolumen von 20-40µl aufgetragen (gleiche Menge innerhalb eines Versuches). Auf jedem Gel wurde ein Größenmarker mitgeführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer Vertikalelektrophoresekammer bei 7 mA pro Gel über Nacht. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 25mM Tris-Base, 0,2M Glycin und 1% SDS.

Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele:

	<b>4%-Sammelgel</b>	<b>5%-Trenngel</b>	<b>7,5%-Trenngel</b>
30% Acrylamid/Bis-Lösung	1,35 ml	4,2 ml	6,25 ml
H <sub>2</sub> O	6,1 ml	14,1 ml	12 ml
1,5 M Tris pH 8,8	-	6,22 ml	6,22 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml	-	-
10% SDS	100 µl	250 µl	250 µl
Temed	10 µl	25 µl	25 µl
10% APS	100 µl	250 µl	250 µl

	10%-Trenngel	12%-Trenngel
30% Acrylamid/Bis-Lösung	8,3 ml	9,95 ml
H <sub>2</sub> O	9,95 ml	8,3ml
1,5 M Tris pH 8,8	6,22 ml	6,22 ml
0,5 M Tris pH 6,8	-	-
10% SDS	250 µl	250 µl
Temed	25 µl	25 µl
10% APS	250 µl	250 µl

Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
TEMED	Roth, Karlsruhe
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
30% Acrylamid/Bis-Lösung (37, 5:1)	Bio-Rad, München
Molekulargewicht-Marker	cell signaling, USA
Vertikal-Elektrophoresekammer, Protean® II xi Cell	Bio-Rad, München

### 2.4.3 Western-Blot

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden elektro-phoretisch in einer Trans-Blot® Semi-Dry Transferkammer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Gel wurde hierzu auf die Membran aufgelegt und beides zwischen insgesamt 6 Schichten in Transferpuffer getränktem Filterpapier in die Transferkammer eingelegt. (Transferpuffer 0,025M Tris-HCl, 0,192M Glycin, 20% (v/v) Methanol, 1% (w/v) SDS). Für die Proteinübertragung wurde an die Kammer für 1,5 Stunden eine Spannung

von 15 V angelegt. Im Anschluss wurde die Membran in 1 x TBS (40g NaCl, 15g Tris, 1g KCl, pH 7,4; ad. 5000ml Aqua dest.) gewaschen und dann in Magermilchpulver 5% in TBST (1 x TBS mit 0,1% Tween-20) auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für 1-2 Stunden geblockt. Der Primärantikörper (s. Tabelle) wurde nach Angabe des Herstellers eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht.

#### Verwendete Primär-Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
p21	Maus, IgG1 SX118	BD, Pharmingen	1:1000
MDM2	Maus, IgG1, Klon2A10	zur Verfügung gestellt von A.J. Levine	1:10000
p53	Maus, IgG1 Pab 240	Santa Cruz, Heidelberg	1:250
phospho-p53 (Ser15)	Maus, IgG1, Klon 16G8	Santa Cruz, Heidelberg	1:500
AIF	Maus, IgG <sub>2b</sub> , Klon Pab 240	Santa Cruz, Heidelberg	1:250
ATM	Kaninchen, IgG, Klon D2E2	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
phospho-ATM (Ser1981)	Maus, IgG, Klon 10.H11.E12	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
p38 $\alpha$	Kaninchen, polyclonal	Cell Signaling	1 ;1000
XPA Ab-1 (clone12F5)	Maus, IgG <sub>2a</sub> , Klon 12F5	Thermo Scientific	2 $\mu$ g/10 $\mu$ l daraus 10 $\mu$ l /ml
XPC	Kaninchen, polyclonal, H-300	Santa Cruz	1 :500
CHK1	Maus, IgG1, 2G1D5	Cell Signaling	1:1000
CHK2 (Thr68)	Kaninchen, polyclonal	Cell Signaling	1:1000

FANCD2	Kaninchen, polyclonal, H-300	Santa Cruz	1:500
BAX	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
NOXA (FL-103)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	1:500
PUMA	Kaninchen, polyclonal	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
ASPP1	Kaninchen, polyclonal	Cell Signaling Technology, USA Abcam	1:500
53BP2/ASPP2	Kaninchen, polyclonal	Abcam	1:300
iASPP	Kaninchen, polyclonal	Abcam	1:1000
anti-GAPDH	Maus, IgG, 6C5	Biodesign, USA	1:30000
anti- $\beta$ -Aktin	Maus, Klon AC-15	Sigma, Steinheim	1:5000

Nach Inkubation wurde der überschüssige Primärantikörper in 3 Waschschrinen (je 15 Minuten schwenken in TBST) von der Membran gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde je nach Herkunft des Primärantikörpers ein Peroxidase (POD)-konjugierter anti-Kaninchen, anti-Ziege- oder anti-Maus-Antikörper eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in Magermilchpulver 5% in TBST für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

#### Verwendete Sekundär-Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
anti-Kaninchen-IgG- POD	Ziege, IgG (H+L)	Cell Signaling Technology, USA	1:2000
anti-Maus-IgG-POD	Ziege, IgG (H+L)	Cell Signaling Technology, USA	1:2000

Der nicht gebundene Sekundärantikörper wurde im Anschluss mit TBST heruntergewaschen (4x15min Schwenken bei Raumtemperatur). Die Detektion erfolgte über Chemielumineszenz. Hierzu wurde das Reagenz „SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate“ nach Herstellerangaben eingesetzt und das emittierte Licht durch Exposition der Membran gegen einen speziellen Röntgenfilm, der im Anschluss entwickelt wurde, quantifiziert.

Die densitometrische Auswertung erfolgte über das Programm AIDA (*advanced image data analyzer*), Version 2.31.

Nitrocellulose Transblot Membran	A.Hartenstein
Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Filterpapier ‚Gel-Blotting Papier‘	Schleicher & Schuell, Dassel
Western Blocking Reagent	Roche, Mannheim
Albumin, from bovine serum	Sigma
Skim milk powder	Fluka
Autoradiographie Kassette	Amersham Biosciences, Freiburg
‚Lumi-Film‘, Chemiluminescent Detection Film	Roche, Mannheim
‚SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate‘	Pierce Biotechnology, USA
‚LAS-1000‘, Luminescent imager Analyzer with electronically cooled CCD camera System	Fujifilm, Medical Systems, USA
Advanced image data analyzer (AIDA 2.31)	Raytest, Straubenhardt

Für die Beladungskontrolle (Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase (GAPDH) oder  $\beta$ -Aktin) oder die Untersuchung weiterer Proteine auf derselben Membran wurden die gebundenen Antikörper in einer Strippinglösung (SDS-Mercaptoethanol-Strippinglösung (62,5mM Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 100mM Mercaptoethanol; pH 6,7) für 20min bei 52°C heruntergewaschen. Die Membranen wurden dann in 1xTBST gewaschen, bis kein Mercaptoethanolgeruch mehr wahrzunehmen war und dann erneut mit einem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Das weitere Procedere entsprach dem oben beschriebenen.

## 2.5 RNA-Interferenz

Über RNA-Interferenz (RNAi) wurde durch Einbringen von siRNA („short interfering RNA“) in die Zellen spezifische Zielgene in ihrer Expression gehemmt (Mittal et al 2004).

### 2.5.1 Übertragung von siRNA-Molekülen

Verwendet wurden siRNA-Molekülen der Firma Dharmacon (Thermo Scientific). Zur negativ-Kontrolle wurde ein Non-targeting Control-Pool verwendet.

siRNA Accel SMARTpool Human PP1R13B #E-010492-00 5nmol	Thermo Scientific
siRNA Accell Control Pool Non-targeting #D-001910-10-05 5nmol	Thermo Scientific

Für die 100 $\mu$ M Stammlösung wurde die siRNA jeweils in 50 $\mu$ l sterilem, RNase freiem Wasser (Quiagen) resuspendiert und gelöst. Die NTERA-2D1 wurden mit 7500

Zellen/Loch in 96-Well-Platten in RPMI/10%FCS ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium gegen Accell delivery Medium+0,5% FCS ausgetauscht und für 10min in den Brutschrank gestellt. Im Folgenden wurde das Medium erneut ausgetauscht. Pro Loch wurden 100µL siRNA cont Medium (1250µl Accell+12,5µl Wasser, 1250µl Accell+12,5µl contr si, 1250µl Accell+12,5µl ASPP1si verwendet. Nach insgesamt 56 Stunden wurde in 4 Löcher (bei insgesamt je 12 Ansätzen) 5µM Cisplatin zugegeben. Nach weiteren 16 Stunden erfolgte bei dem einen Teil der Ansätze die Annexinfärbung mit nachfolgender Apoptosemessung am Durchflusszytometer (es wurden jeweils die Zellen von 3 Löchern gepoolt). Aus einem weiteren Teil der Ansätze wurden die Zellen zur RNA-Extraktion gepoolt (je 4 Löcher ohne Cisplatin). Weiter wurde eine Zellviabilitätsanalyse mittels MTT-Verfahren durchgeführt.

#### Verwendete siRNA-Moleküle

Name	Sequenz
ASPP1 si Smart Pool 01	GCACACAGCGCCUAAAUA
Smart Pool 02	GAACAAAGGUGUGGCGUAU
Smart Pool 04	CCACACCACCUAAGAAUUA
Smart Pool 17	UGAACAAAGGUGUGGCGUA

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Gesamt RNA wurde mithilfe des RNeasy®-Minikits nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

RNeasy®-Minikit	Quiagen, Hilden
-----------------	-----------------

### 2.6.2 Quantifizierung p53-abhängiger Zielgene über qRT-PCR

Zur Durchführung der qRT-PCR wurde isolierte RNA zunächst nach Anleitung des Herstellers unter Verwendung des SuperScript III kits in cDNA umgeschrieben.

Für die quantitative Analyse wurden Primer verwendet, die an die zu bestimmende DNA binden. Im Weiteren wurde die Light-Cycler-Methode angewandt. Pro LightCycler-Kapillare wurde zum PCR-Ansatz (s. unten) 2µl (500ng) unbekannte DNA oder Standard-DNA pipettiert. Diese wurden im LightCycler-Karusell 5sec. zentrifugiert (3000rpm). Im Anschluss wurde das Karussell in den LightCycler gestellt und das Programm gestartet.

#### Verwendete Primer

Primer	Sequenz
<i>ASPP1</i> -sense	5'-GAAATGAACGTCCCATACCC-3'
<i>ASPP1</i> -antisense	5'-TTTCAGCAGACAGATTGCC-3'
<i>CDKN1A (p21)</i> -sense	5'-GGCAGACCAGCATGACAGATT-3'
<i>CDKN1A (p21)</i> -antisense	5'-GCGGATTAGGGCTTCCTCTT-3'
<i>BAX</i> -sense	5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGT-3'
<i>BAX</i> -antisense	5'-ACAAACATGGTCACGGTCTGC-3'

#### PCR-Reaktionsmix

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	1 Ansatz [µl]
5x PCR-Puffer		1 x	2
dNTPs	2,5 mM	250 µM	1
Primer <i>sense</i>	10 µM	0,5 µM	0,5
Primer <i>anti sense</i>	10 µM	0,5 µM	0,5
MgCl <sub>2</sub>	55 mM	30 mM	0,6
BSA	0,1 %	0,01 %	1
SYBR Green	1:2000		0,5
Tag Pol	5 U/µl	0,75 U	0,15
H <sub>2</sub> O			Add. 8µl

LightCycler	Roche, Mannheim
LightCycler Capillaries	Roche, Mannheim

## 2.7 Messung der DNA-Platinierung mittels ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry)

Bei der ICP-MS wird die zu untersuchende Probe zunächst atomarisiert. Die Atome werden dann im Massenspektrometer ihrer Masse nach aufgetrennt und detektiert. Die Nachweisgrenze für Platin mit dieser Methode liegt bei der Größenordnung 1ng/l. Aufgrund der extremen Empfindlichkeit dieser Methode ist sie heute Standard beispielsweise in geochemischen Messungen von Platinbelastung in Umweltstäuben o.ä..

Bezüglich der Reparaturkapazität betrachtet wurden die NTERA-2D1, die NTERA-2D1 deren Apoptose durch die Vorbehandlung mit dem Caspaseinhibitor zVADfmk verhindert wurde sowie die MCF7 als Vergleichslinie. Die Zellen wurden mit Cisplatin 30µM für 2h inkubiert. Dann wurde das Cisplatinhaltige Medium abgeschüttet, der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen mit neuem Medium versetzt und nach dem angegebenen Zeitraum geerntet. Die Ernte der Zellen erfolgte zu den Zeitpunkten 0h, 2h, 8h, 16h, 24h nach Cisplatinpuls. Die mit zVADfmk behandelten Zellen wurden 2h vor Cisplatinpuls mit zVADfmk 2µM vorbehandelt. Auch dem neuen Medium (nach herunterwaschen des Cisplatinhaltigen Mediums) wurde zVADfmk in der gleichen Konzentration zugesetzt.

Bei den mit zVADfmk behandelten NTERA-2D1 wurden in den weiteren Schritten nur die lebenden Zellen weiterverwendet, da die toten Zellen für Einschätzung der Reparaturfähigkeit keinen Nutzen bringen. Pro Zeitpunkt wurden 5 150cm<sup>2</sup>-große Zellkulturflaschen mit dichtem Zellrasen verwendet.

Die entsprechend behandelten Zellen wurden wie oben beschrieben abtrysiniert und dann bei 1000g für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Pellets wurden 2mal mit PBS gewaschen und hierbei in 2ml-Eppendorfgefäße überführt. Die Zellpellets wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

### **2.7.1 Aufreinigung und Fällung der DNA**

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Maxi Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

Die Messung des DNA-Gehaltes der Proben erfolgte mithilfe des NanoDrop® Spektrophotometers. Zur Weiterverarbeitung wurden dann jeweils vom DNA-Gehalt her äquivalente Mengen der einzelnen Proben verwendet, so dass ab diesem Zeitpunkt jede Probe gleichen DNA-Gehalt besitzt.

Zum Fällern der aufgereinigten DNA wurde das weiter verwendete Volumen der eluierten DNA mit 1/10 Volumen 3M NaAc pH 5,2n und 2 Volumina EtOH gevortext in Eppendorfgläsern und dann über Nacht bei  $-20^{\circ}$  stehen gelassen. Am folgenden Tag wurden die Proben 10min bei 14 000rpm Raumtemperatur zentrifugiert, die Pellets im Anschluss mit 0,5-1ml 70% EtOH resuspendiert und erneut 10min bei 13 000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und Eppendorfgläser noch einige Zeit stehen gelassen, damit das restliche Ethanol vollständig verdunsten konnte.

### **2.7.2 Messung des Platingehaltes**

Die aus den obigen Schritten erhaltenen DNA-Pellets wurden in 200 $\mu$ L 65%iger, reinsten HNO<sub>3</sub> (mit einem max. Platingehalt von 0,0005%) Fa. Merck aufgenommen, in Gewindeflaschen mit Silikon/Teflon Dichtung von der Fa. Chromatographie Service überführt und 1,5 Stunden im Heizblock bei 96°C erhitzt um mögliche noch bestehende Strukturen aufzubrechen.

Der Platingehalt der DNA-Proben wurde mittels ICP-MS am Geowissenschaftlichen Zentrum der Universität Göttingen gemessen.

### 3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen der intrinsischen Hypersensitivität der embryonalen Keimzelltumorklinie NTERA-2D1 gegenüber Cisplatin. Zu diesem Zweck sollte zunächst die Sensitivität der Zelle und der Weg des Cisplatin-induzierten Zelltodes charakterisiert werden. Weiter sollten anhand eines zu diesem Zwecke etablierten Zellmodells mögliche Ursachen der Hypersensitivität untersucht werden.

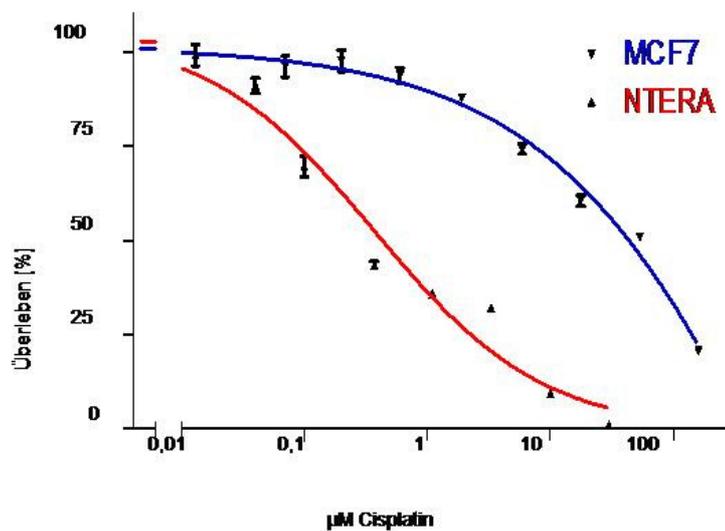
#### 3.1 Charakterisierung der NTERA-2D1

Der folgende Abschnitt befasst sich mit den zelllinienspezifischen Eigenschaften der NTERA-2D1, die in Hinblick auf den Fokus der vorliegenden Arbeit wichtig erscheinen.

##### 3.1.1 Hypersensitivität

Die NTERA-2D1 ist als extrem sensitive embryonale Keimzelltumorklinie bekannt, die pluripotente Eigenschaften besitzt (Sperger et al 2003). Im vorliegenden Experiment wurde die NTERA-2D1 im Vergleich zu der deutlich resistenteren Mammakarzinomlinie MCF7 hinsichtlich ihrer Cisplatinsensitivität untersucht. Die MCF7 wurde zunächst als Vergleichsline gewählt, weil sie, ebenso wie die NTERA-2D1, *TP53* in seiner wild-typ-Form exprimiert. Um die Cisplatinkonzentration, bei der eine halbmaximale Inhibition der Zellviabilität beobachtet wird (IC<sub>50</sub>), von NTERA-2D1 und MCF7 bestimmen zu können, wurden MTTs (s. M&M) mit einer Cisplatin-Konzentrationsreihe angefertigt, die von 0 (Kontrolle) bis 300 µM Cisplatin ging.

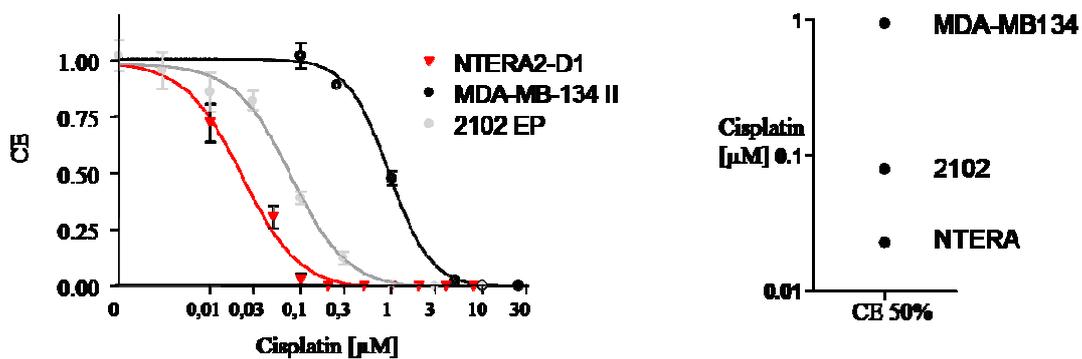
Aus Abb.1 geht für die NTERA-2D1 eine IC<sub>50</sub> von 0,37 $\mu$ M Cisplatin, für die MCF7 von 43,6 $\mu$ M Cisplatin hervor. Die NTERA-2D1 ist demnach in den durchgeführten Experimenten um Faktor 116 sensitiver als die MCF7.



**Abb.1: Vergleich der Sensitivität der NTERA-2D1 und der MCF7.** Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen (0-300 $\mu$ M) behandelt. Nach 48 Stunden wurde die Zellviabilität mittels MTT-Analyse bestimmt. Es wurde je mindestens 3 unabhängige Versuche angesetzt und ausgewertet. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus technischen Triplikaten ( $\pm$ SEM) eines repräsentativen Experiments.

Um die Cisplatinsensitivität hinsichtlich der Fähigkeit der behandelten Zellen, Kolonien zu bilden, zu untersuchen, wurde die NTERA-2D1 mit verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen über 48h behandelt. 12 Tage später wurden die gebildeten Kolonien ausgezählt. Als Vergleichslinien wurden ein weitere embryonale

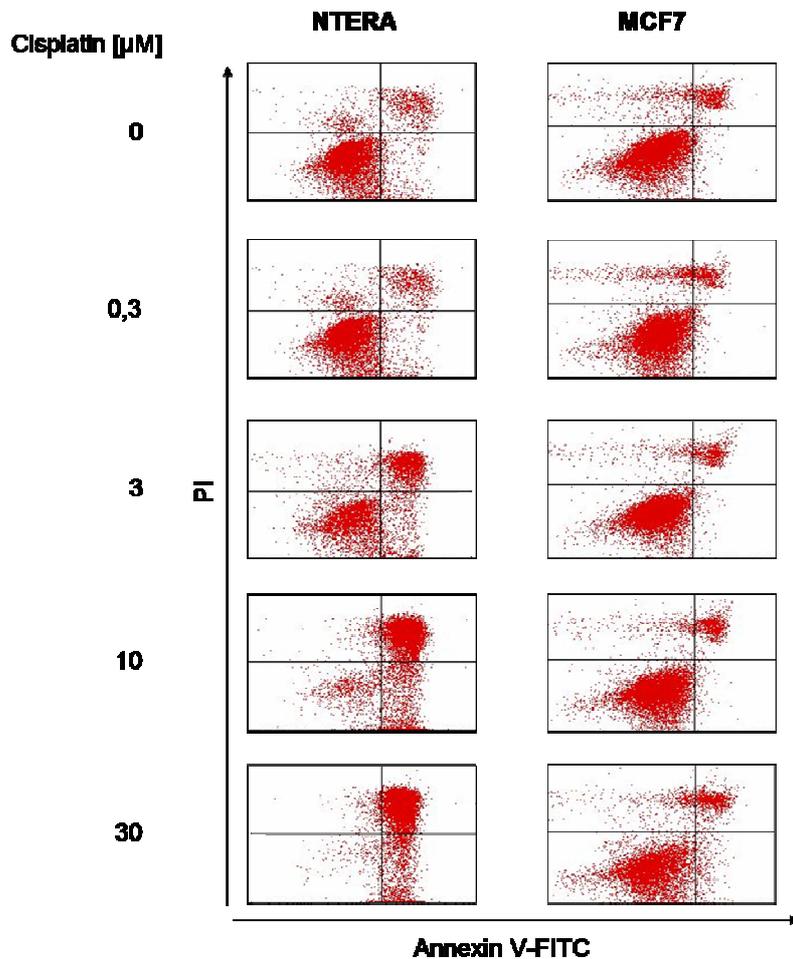
Keimzelltumormlinie (2102EP) und eine Mammakarzinomlinie (MDA MB 134 II) herangezogen. Es zeigt sich, dass die Fähigkeit zur Koloniebildung in beiden Keimzelltumormlinien deutlich unterhalb derer der MDA MB 134 II liegt, wobei die NTERA-2D1 im Vergleich zur 2102EP noch deutlich weniger Kolonien bilden kann (Abb.2).



**Abb.2: Fähigkeit zur Zellkoloniebildung der NERA-2D1, 2102EP und MDA MB 134 II.** Die Zellen wurden über 48 Stunden mit verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen kultiviert. Anschließend wurde eine definierte Zellzahl (400 Zellen bei den 4 höchsten Cisplatin-Konzentration, bei allen anderen Konzentrationen 100 Zellen) ausgesät. Nach 12 Tagen wurden die gebildeten Kolonien gezählt. In der linken Abbildung ist die Cisplatin-Konzentration gegen die *Cloning Efficiency* (CE) der jeweiligen Zelllinie aufgetragen. In der rechten Abbildung repräsentiert jeder Punkt die Cisplatin-Konzentration, bei der eine *Cloning Efficiency* (CE) von 50% erreicht wird, wobei auf der y-Achse die Cisplatin-Konzentration aufgetragen ist.

Zur weiteren Charakterisierung der Sensitivität wurden beide Zelllinien mit unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen (0, 0,3, 3, 10 und 30µM) behandelt und nach 16h die Apoptose mittels Annexin- und PI-Färbung bestimmt (s. M&M). In Abb.3 wird ersichtlich, dass die NTERA-2D1 bei einer 16stündigen Behandlung mit 3µM Cisplatin bereits zu einem beträchtlichen Maß Apoptose induziert. Wurde eine höhere Cisplatin-Dosis von 10µM gewählt, waren nach diesem Zeitraum nahezu alle NTERA-2D1 apoptotisch. Dagegen zeigte die MCF7 bis zu einer Dosierung von 10µM

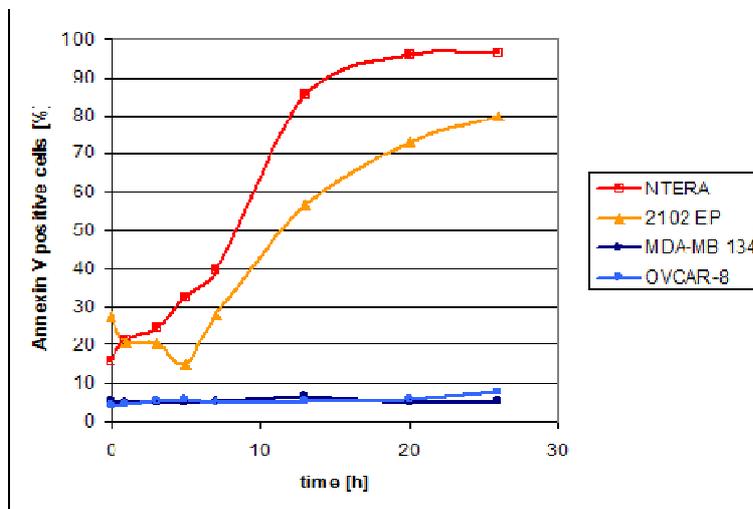
Cisplatin über 16h keine Anzeichen von Apoptose. Die Zellen dieser Linie begannen erst ab einer Dosis von 30 $\mu$ M Cisplatin in einem sehr geringen Ausmaß in Apoptose zu gehen.



**Abb.3: NTERA-2D1 ist deutlich sensibler als die Mammkarzinomzelllinie MCF7.** Beide Zelllinien wurden mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen (0-30 $\mu$ M) behandelt. Nach 16 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen abgelöst, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert.

### 3.1.2 Dynamik der Apoptose

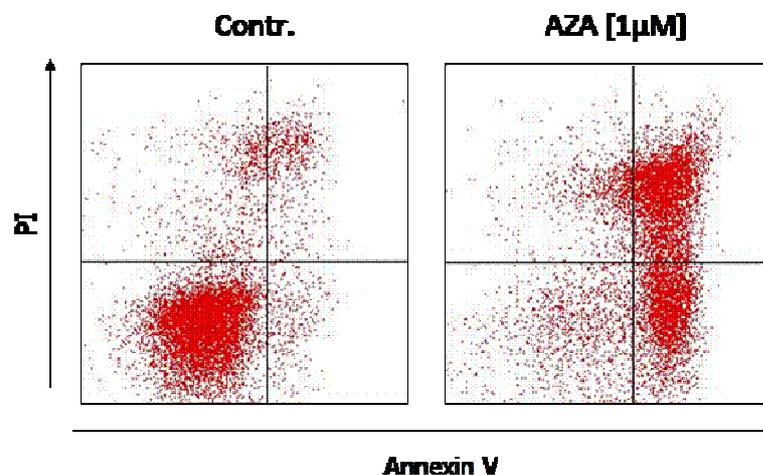
Im Folgenden sollte die zeitliche Dynamik der Apoptose der NTERA-2D1 betrachtet werden, die Frage also, wie schnell die NTERA-2D1 auf die Cisplatingabe hin Zelltod induziert. Hierzu wurde eine Zeitreihe durchgeführt. Die Zellen wurden mit  $10\mu\text{M}$  Cisplatin für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Zum Zeitpunkt 0, 2, 4, 6, 8, 13, 20 und 26h wurde die Apoptose mittels Annexinfärbung (s. M&M) bestimmt. Abb.4 zeigt, dass die NTERA-2D1 (diesmal im Vergleich mit einer weiteren embryonalen Keimzelltumorzelllinie (2102EP), einer Mamma- (MDA MB 134) und einer Ovarial-Carcinomlinie (OVCAR-8)) nicht nur, wie oben gezeigt, bei sehr geringen Cisplatinindosierungen Zelltod einleitet, sondern der Apoptoseprozess auch sehr rasch eingeleitet wird. Nach 13h sind 86% der NTERA-2D1 tot, bis 20h nähert sich der Wert an 100% an. Die zweite embryonale Keimzelltumorzelllinie 2102 EP reagiert zwar auch deutlich sensibler auf die Cisplatinbehandlung als die beiden anderen Vergleichslinien, jedoch nicht in dem Maße hypersensitiv wie die NTERA-2D1.



**Abb.4: Rasche Apoptoseinduktion in der NTERA-2D1.** Die Zellen wurden jeweils mit  $10\mu\text{M}$  Cisplatin behandelt und nach unterschiedlichen Zeiten (0, 2, 4, 6, 8, 13, 20 und 26h) die Apoptose via Annexin-Färbung und Messung am Durchflusszytometer bestimmt. In der Abbildung ist der prozentuale Anteil toter Zellen zu definierten Zeitpunkten zu sehen.

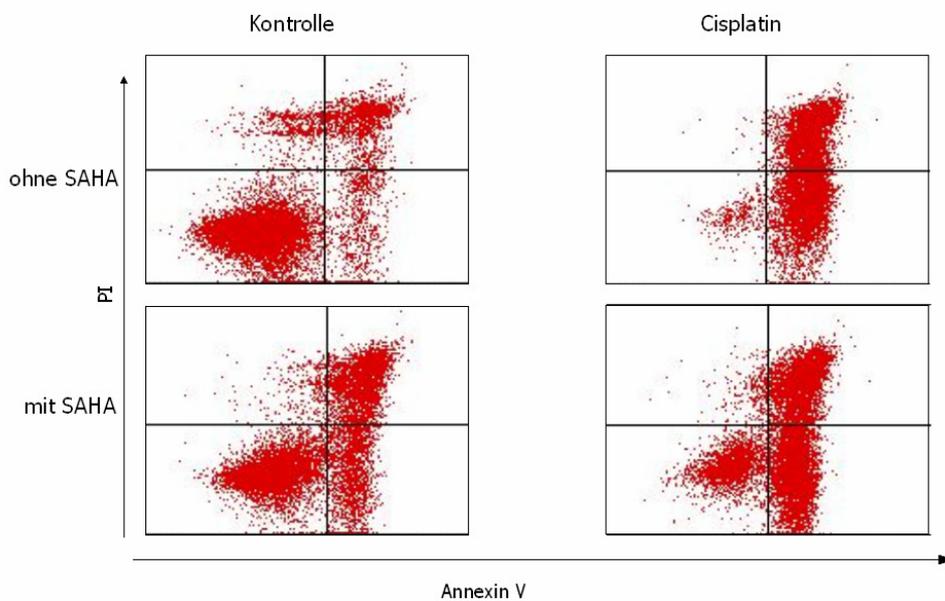
### 3.1.3 Acetylierung und Methylierung (Epigenetik)

Die Aktivität von Genen und Ausstattung von Proteinen einer Zelle kann durch veränderte Acetylierung der Histone sowie Methylierung der DNA stark differieren. Vor allem in Tumorzellen scheint sich das Acetylierungs- und Methylierungsmuster deutlich von dem normaler Zellen zu unterscheiden (reviewed von Berdasco et al 2010 Berdasco et al 2010). Dies kann entscheidende Auswirkungen auf das Verhalten einer Zelle haben. Durch AZA bzw. SAHA sollten Methylierung und Deacetylierung gehemmt werden. Um der Frage nachzugehen, ob Veränderungen in der Acetylierung ursächlich für die Hypersensitivität der NTERA-2D1 sind, wurden die NTERA-2D1-Zellen mit dem Methyltransferaseinhibitor 5-Aza-2'-Desoxycytidine (AZA) 5 Tage vorinkubiert bevor die Giftung mit Cisplatin 10 $\mu$ M folgten sollte. Die Apoptose wurde mittels Annexin/PI-Färbung bestimmt. Aus Abb.5 ist ersichtlich, dass die Zellen bereits durch AZA alleine nahezu 100%ig apoptotisch waren, so dass eine weitere Behandlung mit Cisplatin nicht erfolgte.



**Abb.5: Per se Toxizität von AZA auf die NTERA-2D1.** Die Zellen wurden mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin in einer Konzentration von 1 $\mu$ M über 5 Tage inkubiert. Theoretisch hätte im Anschluss eine 8stündige Behandlung der Zellen mit 10 $\mu$ M Cisplatin erfolgen sollen. Da nahezu alle Zellen bereits die Vorbehandlung nicht überlebten, erfolgte zur Quantifizierung des AZA-induzierten Zelltodes die Färbung mit Annexin V-FITC mit anschließender Messung der Annexin-positiven Zellen am Durchflußzytometer.

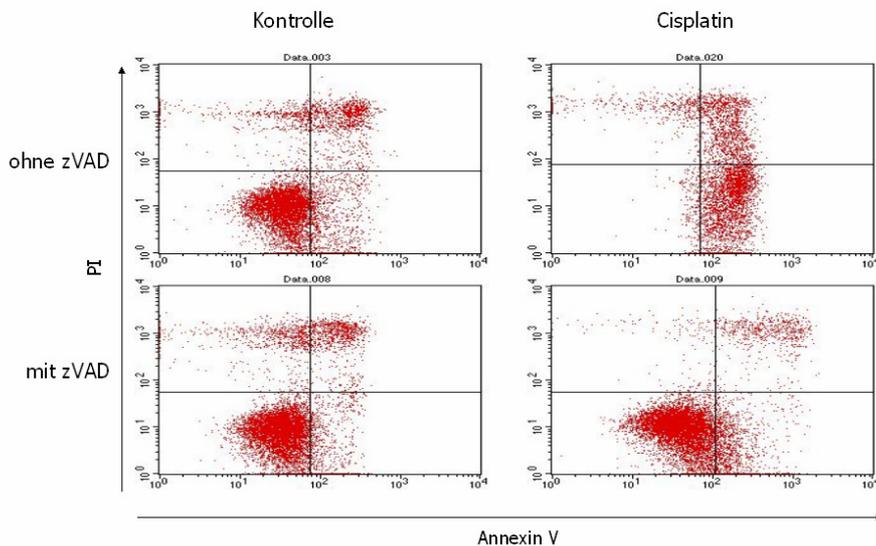
Um einen möglichen Zusammenhang von Acetylierung und Hypersensitivität zu untersuchen, wurden die Zellen mit SAHA (Suberoylanilide Hydroxamsäure), einem Histon-Deacetylaseinhibitor, ebenfalls für 2h vorbehandelt und im Anschluss mit Cisplatin 10 $\mu$ M vergiftet. Die Apoptosemessung erfolgte nach 16h mittels Annexinfärbung. In Abb.6 ist ersichtlich, dass der veränderte Acetylierungszustand einen Effekt auf das Überleben der Zellen hat. Die mit SAHA vorbehandelten Zellen waren nach Cisplatinbehandlung zu 20% viabel, wohingegen bei den nicht vorbehandelten Zellen nur 6% Annexin/PI-negativ waren.



**Abb.6: Geringer Einfluss von SAHA auf die Cisplatinsensitivität.** Die Zellen wurden mit dem Histon-Deacetylaseinhibitor Suberoylanilide Hydroxamsäure in einer Konzentration von 1 $\mu$ M über 2 Stunden vorinkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 10 $\mu$ M Cisplatin. Nach 8 Stunden erfolgte die Färbung mit Annexin V-FITC mit anschließender Messung der Annexin-positiven Zellen am Durchflußzytometer.

### 3.1.4 Apoptoseweg über Caspasen

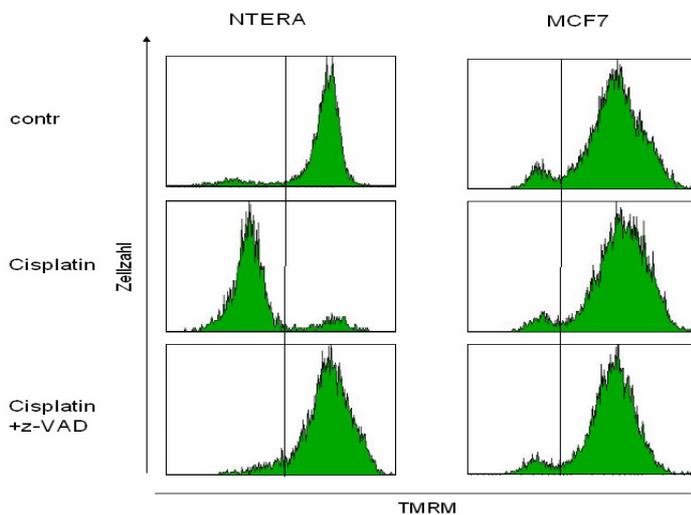
Um zu prüfen, ob es sich bei dem Cisplatin-induzierten Zelltod der NTERA-2D1 um einen Caspaseabhängigen Mechanismus handelt, wurde die NTERA-2D1 mit zVADfmk, einem Breitband-Caspasen-Inhibitor, vorbehandelt. 2h später wurde Cisplatin zugegeben und die Apoptose nach 16h gemessen. In Abb.7 ist zu sehen, dass durch die Vorbehandlung mit zVADfmk die Apoptose komplett verhindert werden konnte.



**Abb.7: zVADfmk hemmt den Cisplatin-induzierten Zelltod.** Die Zellen wurden mit dem Breitband-Caspase-Inhibitor zVADfmk in einer Konzentration von 50µM über 2 Stunden vorinkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 10µM Cisplatin. Nach 16 Stunden wurden die Zellen mit Annexin V-FITC gefärbt und anschließender die Annexin-positiven Zellen am Durchflußzytometer gemessen.

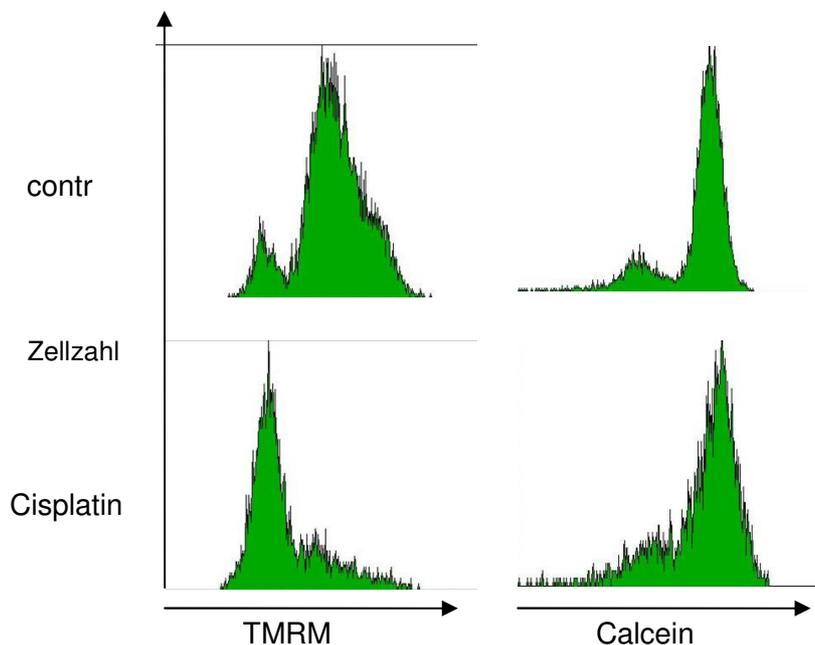
### 3.1.5 Verlust des mitochondrialen Membranpotentials

In der TMRM-Färbung (Messung 16h nach Behandlung der Zellen 10 $\mu$ M mit Cisplatin) wird deutlich, dass in der Kontrolle, also der nicht mit Cisplatin behandelten NTERA-2D1, wie erwartet das mitochondriale Membranpotential intakt ist, also eine TMRM-Fluoreszenz sichtbar wird. Die mit Cisplatin vergifteten NTERA-2D1-Zellen zeigen hingegen keine TMRM-Fluoreszenz und damit einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Hierbei handelt es sich um einen Nachweis der Zerstörung der äußeren mitochondrialen Membran, da TMRM nur im mitochondrialen Intermembranraum polarisierter Mitochondrien akkumuliert. Wird die NTERA-2D1 mit zVADfmk vorbehandelt, sieht man wiederum eine Fluoreszenz, das mitochondriale Membranpotential bleibt also trotz Behandlung mit Cisplatin intakt. In der MCF7 sieht man dagegen, dass das mitochondriale Membranpotential sowohl bei der Kontrolle als auch bei den Cisplatin-behandelten bzw. Cisplatin mit zVADfmk plus Cisplatin behandelten Zellen intakt bleibt (Abb.8).



**Abb.8: Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in der NTERA-2D1 nach Cisplatinbehandlung** Ein Teil der Zellen wurde 2 Stunden vor der Cisplatinzugabe (10 $\mu$ M) mit dem Caspaseinhibitor zVADfmk inkubiert. Nach 16 Stunden folgten die Färbung mit TMRM und die Messung der Zellen am Durchflusszytometer.

Zur Differenzierung, ob nur die äußere oder die äußere und die innere mitochondriale Membran zerstört werden, erfolgte weiter die Analyse der Zellen mittels Calcein-AM-Färbung. In Abb.9 sieht man, dass es in der NTERA-2D1 nach Cisplatinbehandlung zu einer Abnahme der TMRM-Fluoreszenz kommt. In der Calceinfärbung zeigt sich dagegen kein Unterschied zwischen Cisplatin-behandelten und unbehandelten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die innere mitochondriale Membran auch nach Cisplatinbehandlung intakt bleibt.

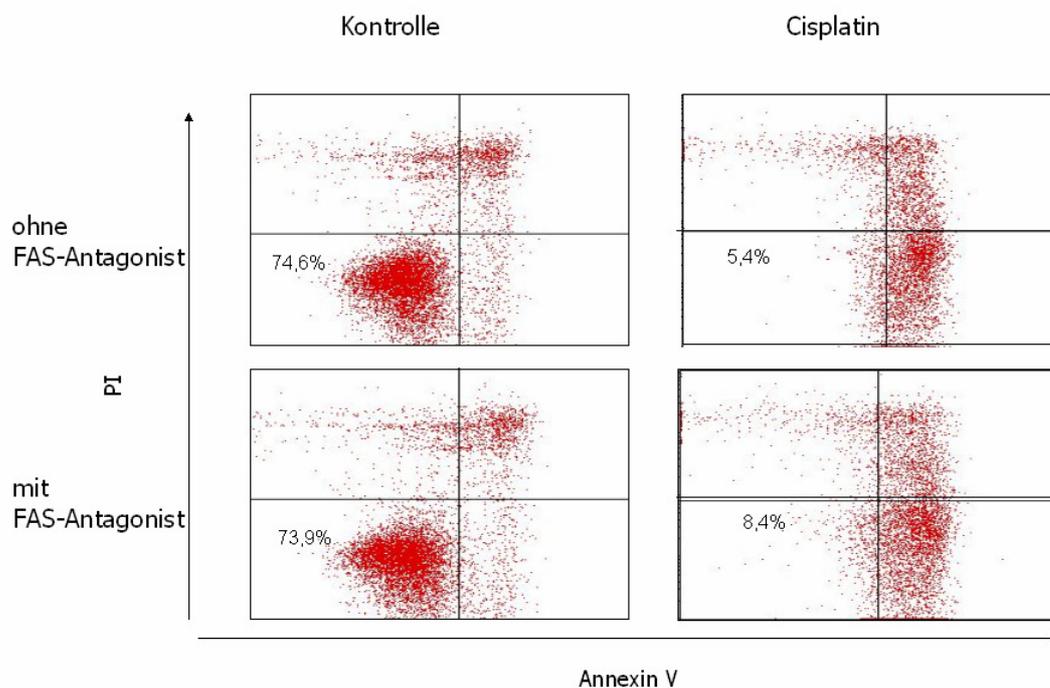


**Abb.9: TMRM-Verlust, aber kein Calcein-Verlust nach Cisplatinbehandlung.** Die Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von Cisplatin für 16h kultiviert und anschließend mit TMRM bzw. mit Calcein-AM (in einer Konzentration von 1,6 $\mu$ M) gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer.

### 3.1.6 Keine Inhibition der Cisplatin-induzierten Apoptose in der NTERA-2D1 über antagonistischen FAS-Ligand

Um eine eventuelle Beteiligung des extrinsischen Apoptoseweges aufzuzeigen (beispielsweise im Sinne einer Autostimulierung über vermehrte Bildung von CD95), wurden die NTERA-2D1 mit antagonistischem FAS-Ligand (+/-Cycloheximid) +/-

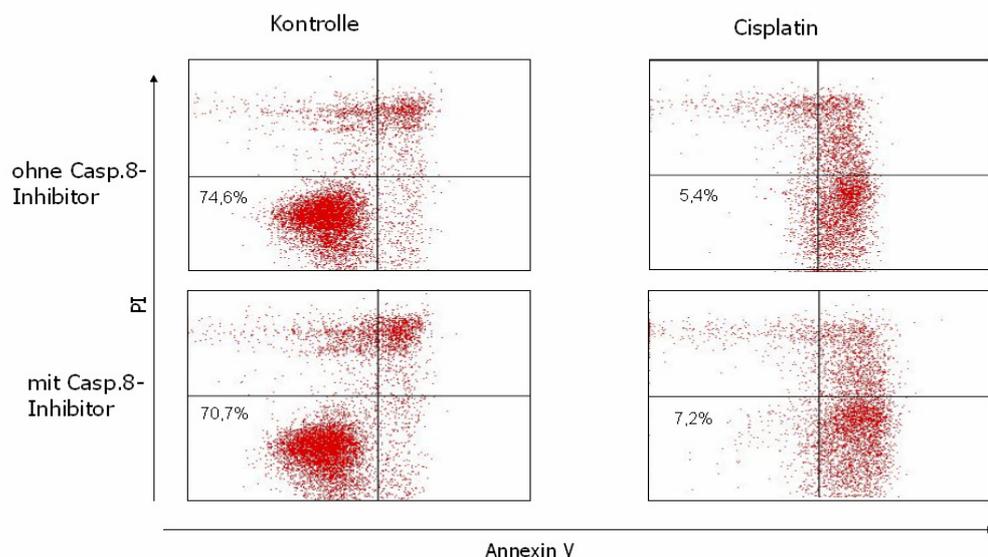
Cisplatin inkubiert. Der antagonistische FAS-Ligand bindet an den FAS-Rezeptor, ohne diesen zu aktivieren und blockiert somit die Bindungsstelle für agonistische Bindungspartner. Bei einer Abhängigkeit der Cisplatin-induzierten Apoptose von FAS-aktivierten Todesrezeptoren wäre also zu erwarten, dass der Prozentsatz apoptotischer Zellen bei den mit Cisplatin und FAS-Ligand behandelten NTERA-2D1 deutlich niedriger ist, als bei den nur mit Cisplatin behandelten Zellen. Die NTERA-2D1 wurden 2h vor Cisplatinbehandlung mit FAS-Ligand vorinkubiert. Es folgte die Behandlung mit Cisplatin 10 $\mu$ M über 16h. Die Messung der Apoptose erfolgte über Annexinfärbung. Wie in Abb.10 ersichtlich unterscheidet sich der Anteil apoptotischer bzw. viabler Zellen in den beiden Proben nicht voneinander.



**Abb.10: Die Behandlung mit FAS-Antagonist hat keinen Einfluss auf die Apoptose.** Die Zellen wurden mit FAS-Ligand (3 $\mu$ l/5ml) über 2 Stunden vorinkubiert. Es folgte die Zugabe von Cisplatin (10 $\mu$ M) und nach 16 Stunden die Annexinfärbung und Analyse am Durchflusszytometer.

### 3.1.7 Keine Inhibition der Cisplatin-induzierten Apoptose in der NTERA-2D1 durch Caspase 8-Inhibitor

Nach Bindung eines entsprechenden Liganden an seinen membranständigen Todesrezeptor (z.B. FAS, TRAIL) werden Caspase 8 und FADD („*Fas associated death domain*“) rekrutiert, die den „*Death inducing signalling complex*“ (DISC) bilden. Caspase 8 ist also ein sehr weit oben an der Kaskade der extrinsischen Apoptose beteiligtes Protein. Bei Beteiligung des extrinsischen Apoptoseweges an der Cisplatin-induzierten Apoptose sollte demnach die Vorbehandlung der Zellen mit einem Caspase 8-Inhibitor die durch Cisplatinbehandlung induzierte Apoptose zumindest partiell verhindern. Die NTERA-2D1 wurden 2h vor Cisplatinbehandlung mit Caspase 8-Inhibitor vorinkubiert. Es folgte die Behandlung mit Cisplatin in einer Konzentration von 10µM über 16h. Die Analyse der Apoptose erfolgte durch Annexinfärbung. In Abb.11 sieht man, dass der Caspase 8-Inhibitor keinen Einfluss auf das Ausmaß der Apoptose hat. Der extrinsische Apoptoseweg scheint demnach in den hier untersuchten Zellen keine Rolle in der Hypersensitivität gegenüber Cisplatin zu spielen.



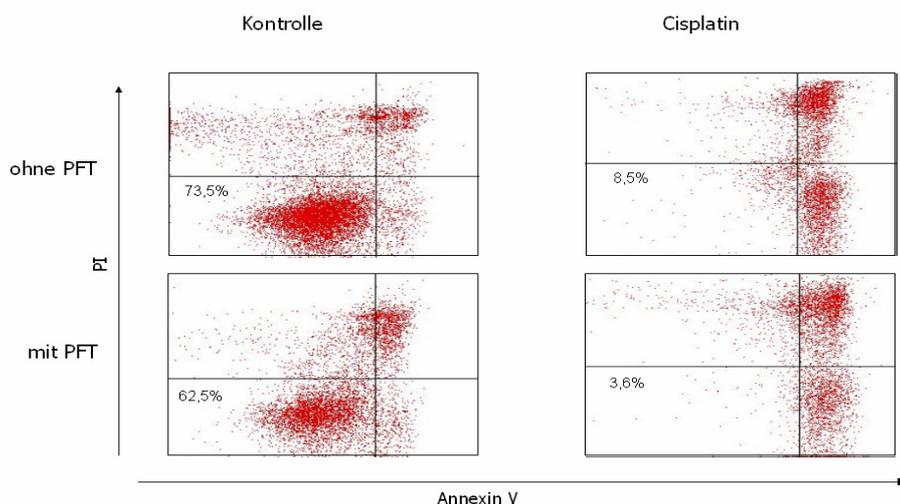
**Abb.11: Kein Einfluss von Caspase 8-Inhibitor auf das Überleben der NTERA-2D1.** Die Zellen wurden mit Caspase 8-Inhibitor (1µl/5ml) für 2 Stunden vorinkubiert. Es folgte die Behandlung mit 10µM Cisplatin. Nach 16 Stunden wurde eine Annexinfärbung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer.

### 3.1.8 Die Rolle von p53

Die Bedeutung des Wildtypstatus *TP53* für die ausgeprägte Sensitivität von embryonalen Keimzelltumoren gegenüber Cisplatin wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Kerley-Hamilton et al 2005, Schmelz et al 2009, di Pietro et al 2005, Buger et al 1999). Um die Rolle von p53 im vorhandenen Zellsystem zu untersuchen, wurden die Zellen vor Behandlung mit Cisplatin mit Pifithrin- $\alpha$  bzw. Pifithrin- $\mu$  behandelt und die Apoptose via Annexinfärbung untersucht. Beide Pifithrine sind p53-Antagonisten, die p53 allerdings in unterschiedlichen Bereichen hemmen. Pifithrin- $\alpha$  antagonisiert die transkriptionelle Aktivität von p53 im Zellkern, Pifithrin- $\mu$  hemmt die p53-Wirkung am Mitochondrium (s.o.), so dass eine Differenzierung der Bedeutung der transkriptionellen *versus* der nicht-transkriptionellen Funktion von p53 erfolgen kann.

#### Keine Schutz vor Cisplatin-induzierter Apoptose durch Pifithrin- $\alpha$

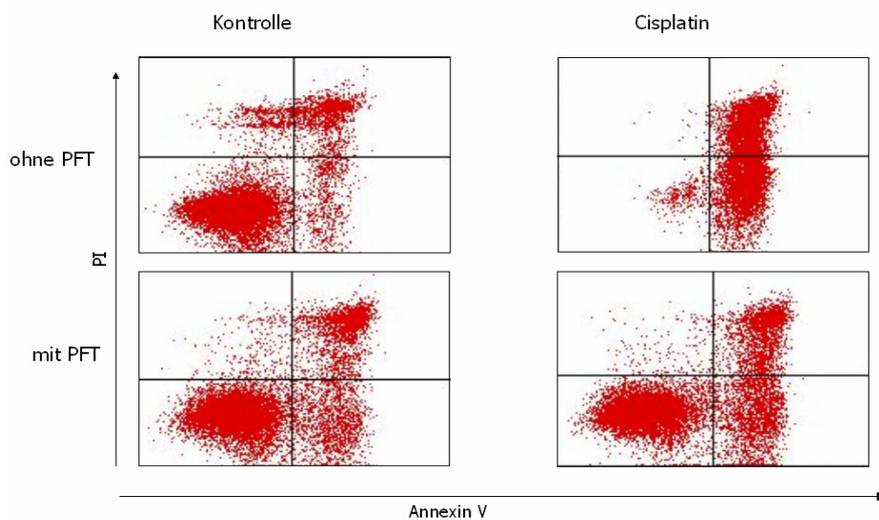
2h nach Pifithrin- $\alpha$ -Zusatz wurden die Zellen mit 10 $\mu$ M Cisplatin behandelt und die Apoptose nach 16h via Annexin-Färbung gemessen. Die Vorbehandlung mit Pifithrin- $\alpha$  schützt die Zellen nicht vor dem Cisplatin-induziertem Zelltod (Abb.12).



**Abb.12: Kein Schutz vor Apoptose durch Pifithrin- $\alpha$ .** Die Zellen wurden 2 Stunden vor Cisplatinbehandlung (10 $\mu$ M über 16 Stunden) mit Pifithrin- $\alpha$  10 $\mu$ M vorinkubiert. Die Auswertung erfolgte nach Annexinfärbung am Durchflusszytometer.

### Partielle Inhibition der Cisplatin-induzierten Apoptose in der NTERA-2D1 durch Pifithrin- $\mu$

Der Versuchsaufbau war idem zu Pifithrin- $\alpha$ . In Abb.13 ist zu erkennen, dass die mit Pifithrin- $\mu$  vorbehandelten Zellen deutlich weniger sensitiv auf Cisplatin reagieren als die nicht vorbehandelten NTERA-2D1. Eine Hemmung des mitochondrialen p53 reduziert also die Cisplatin-induzierte Apoptose in den vorliegenden Zellen.

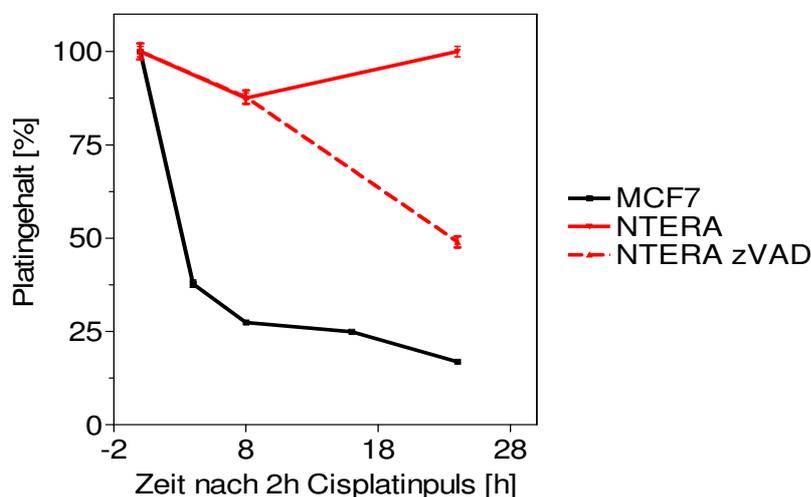


**Abb.13: Schutz vor Apoptose durch Pifithrin- $\mu$ .** Die Zellen wurden 2 Stunden vor Cisplatinbehandlung (10 $\mu$ M über 16 Stunden) mit Pifithrin- $\mu$  (10 $\mu$ M) vorinkubiert. Die Auswertung erfolgte nach Annexinfärbung am Durchflusszytometer.

### 3.1.9 Suffiziente Reparatur

Es ist eine weit verbreitete Annahme, dass die extreme Hypersensitivität der NTERA-2D1 zumindest mit verursacht ist durch eine herabgesetzte Fähigkeit dieser Zelle, die durch die Platin-DNA-Bindung entstandenen Schäden zu reparieren und die Platin-Addukte erfolgreich von der DNA zu entfernen. Aufgrund der schnellen Einleitung des Todesprozesses in der NTERA-2D1 (s. Abb.4) stellte sich hier die Frage, inwieweit die NTERA-2D1 über ein suffizientes Reparatursystem für die entsprechenden Schäden verfügt, bzw. ob keine oder eine verminderte Reparatur stattfindet, weil die Zellen

sterben, bevor sie reparieren können. Zu diesem Zwecke wurde die NTERA-2D1, die durch Vorbehandlung mit dem Caspaseinhibitor zVADfmk an der Apoptose gehinderte NTERA-2D1 sowie die MCF7 als Vergleichslinie auf ihre DNA-Reparatur-Effizienz untersucht. Gemessen wurde der Platingehalt der Gesamt-DNA zu den angegebenen Zeitpunkten nach Cisplatinpulsbehandlung. Ein Abnehmen des Platingehaltes entspricht der Entfernung von Platin von der DNA, also der Reparatur von DNA-Platin-Addukten. In Abb.14 ist zu erkennen, dass die MCF7 sehr rasch Platin von der DNA entfernt, also eine ausgesprochen gute Reparaturkapazität für DNA-Platin-Addukte besitzt. Bei der NTERA-2D1, die nicht mit zVADfmk behandelt ist, sinkt der Platingehalt der DNA zunächst leicht, beginnt aber nach 8h wieder zuzunehmen. Diese erneute Platingehaltzunahme entspricht am wahrscheinlichsten der erneuten Platin-DNA-Adduktbildung bei sterbenden Zellen. Die NTERA-2D1, die mit zVADfmk vorbehandelt wurde, zeigt zu Beginn eine mit der nicht vorbehandelten NTERA-2D1 idente Verminderung des Platingehaltes. Im weiteren Verlauf nimmt aber der Gehalt an Platin in der am Leben erhaltenen NTERA-2D1 weiter deutlich ab. Die NTERA-2D1 repariert also die DNA-Platin-Addukte, auch wenn das Ausmaß der Reparatur geringer bzw. zumindest langsamer ist, als das der MCF7.



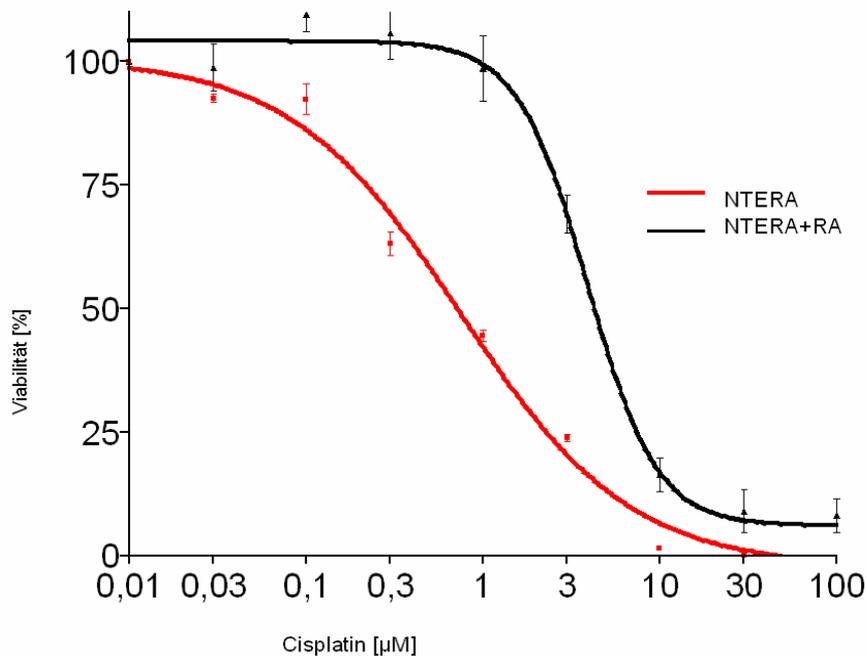
**Abb.14: Zeitkinetik der Cisplatin-DNA-Addukt-Reparatur.** Ein Ansatz der NTERA-2D1 wurde mit dem Breitband-Caspase-Inhibitor zVADfmk (zVAD) für 2 Stunden vorinkubiert. Alle Zellen wurden mit 30 $\mu$ M Cisplatin für 2 Stunden behandelt. Dann erfolgte die Kultivierung in Cisplatin-freiem Medium und die Ernte der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 2, 8, 16, 24h). Aus den Zellen wurde die DNA aufgereinigt und der Platingehalt mittels ICP-MS bestimmt.

## **3.2 Etablierung eines Modellsystem zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Hypersensitivität in NTERA-2D1 Zellen**

Die Ursachen der Hypersensitivität von embryonalen Keimzelltumorzellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen wurden bis dato in der Regel durch den Vergleich mit resistenten Zellen untersucht (Usanova et al 2010, Perry et al 2009, Noel et al 2008). Diese Resistenzen wurden erzeugt durch einen langandauernden Selektionsprozess, bei dem die Zellen allmählich durch langsame Steigerung der Konzentration an das Zytostatikum gewöhnt wurden. Dieser nicht kontrollierbare Selektionsprozess hat den Nachteil, dass Resistenzen durch sehr unterschiedliche Mechanismen erzeugt werden können. In vorliegender Arbeit wurde deshalb ein Modellsystem gewählt, bei dem die intrinsische Hypersensitivität gegenüber Cisplatin durch Kurzzeitdifferenzierung teilweise verloren geht. Dies ist bei der pluripotenten NTERA-2D1 durch Behandlung mit All-trans-Retinolsäure (ATRA = RA = *Retinoic Acid*) möglich (Sperger et al 2003, Paquet-Durand et al 2003, Moasser et al 1994). In diesem Modellsystem wurde zunächst eine geeignete Behandlungsdauer mit RA ermittelt. Diese sollte zum einen möglichst kurz sein, um möglichst geringe Unterschiede der Zellen zu erreichen. Andererseits sollte die Behandlung einen eindeutigen Sensitivitätsunterschied erzeugen. Eine 48stündige Inkubation erwies sich als günstig. Der so erzeugte Sensitivitätsunterschied lag bei ca. einer log-Stufe. Im Weiteren wurden einige für Schadenserkennung, Reparatur und Apoptose wichtige Proteine sowie p53 vergleichend in beiden Zelllinien im Westernblot untersucht.

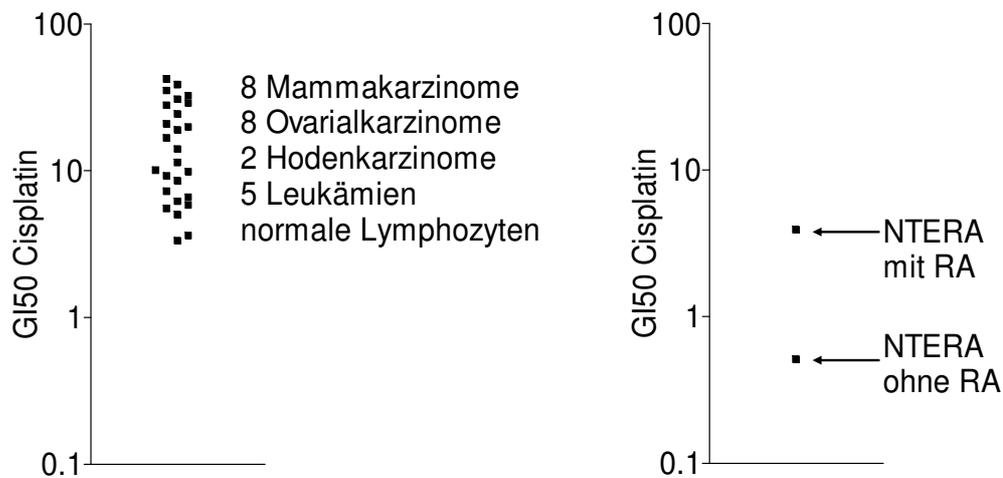
### **3.2.1 Verlust der Hypersensitivität**

Um die Unterschiede in der Sensitivität der NTERA-2D1 und der NTERA-2D1+RA zu untersuchen, wurden zunächst MTT-Analysen mit beiden Ansätzen durchgeführt. In Abb.15 sieht man deutlich den Sensitivitätsunterschied der beiden Ansätze (entspricht ca. einer log-Stufe).



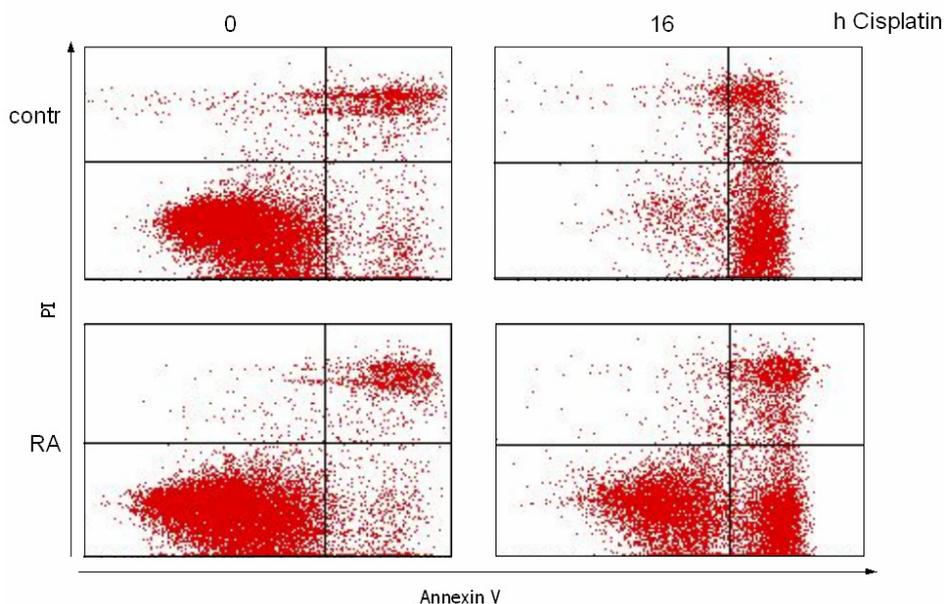
**Abb.15: Unterschiedliche Sensitivität der NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA im MTT.** Die NTERA-2D1+RA wurde 48h mit All-trans-Retinolsäure (RA) kultiviert. Es folgte die Kultivierung der NTERA-2D1 und der NTERA-2D1+RA in Anwesenheit verschiedener Cisplatinkonzentrationen (0-300µM) über 48h und die Auswertung der Zellviabilität mittels MTT-Analyse.

Um die Sensitivität der NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA im Vergleich zu anderen Zelllinien einschätzen zu können, wurden MTTs mit oben verwendeter Cisplatinkonzentrationsreihe mit einem Zelllinienpanel bestehend aus Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten sowie Normalzellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind als halbmaximale Wachstumshemmung (GI50) der einzelnen Zelllinien in Abb.16 dargestellt. Man sieht, dass die NTERA-2D1 deutlich sensibler ist, als das Vergleichspanel. Die NTERA-2D1+RA befindet sich im oberen Sensitivitätsbereich des Panels.



**Abb.16: NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA im Sensitivitätsvergleich zu einem Zelllinienpanel.** Die NTERA-2D1+RA wurde 48h mit All-trans-Retinolsäure kultiviert. Es folgte die Kultivierung aller Zelllinien in Anwesenheit verschiedener Cisplatinkonzentrationen (0-300 $\mu$ M) über 48h und die Auswertung der Zellviabilität mittels MTT-Analyse. Jeder Punkt entspricht hierbei der Cisplatinkonzentration, die das Zellwachstum zu 50% inhibiert (GI50).

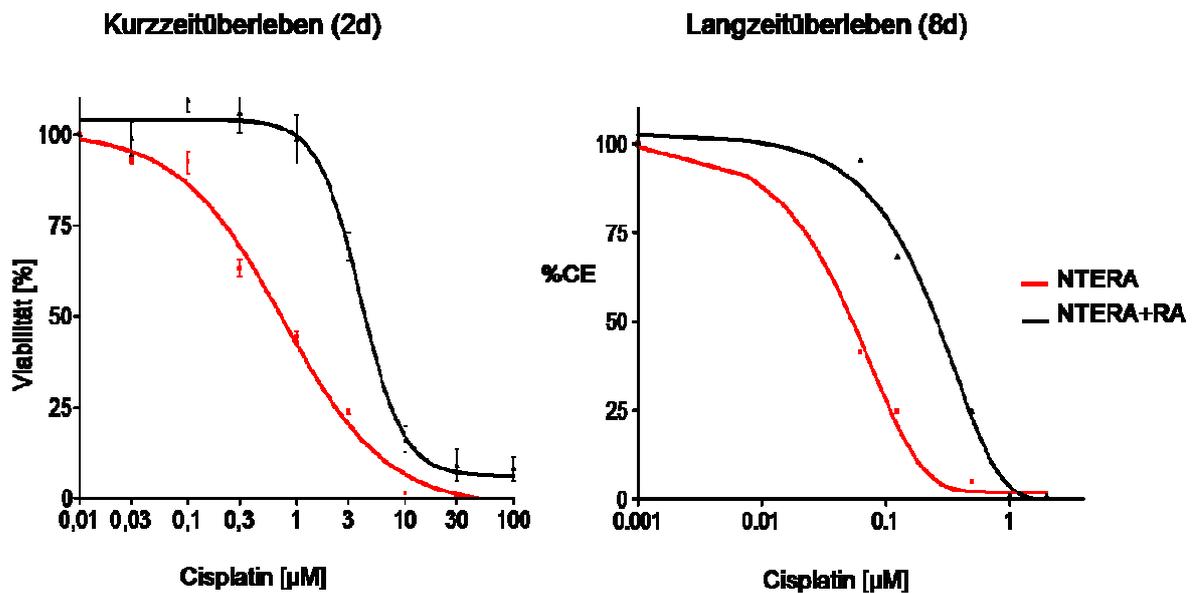
Um Unterschiede in der Apoptose von NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA zu untersuchen, wurden direkt nach der Kurzzeitdifferenzierung der NTERA-2D1 mit RA über 48h die NTERA-2D1+RA sowie die nicht mit RA behandelten NTERA-2D1 jeweils mit 10 $\mu$ M Cisplatin kultiviert. Die Apoptosemessung erfolgte nach 16h via Annexinfärbung. In Abb.17 ist die deutlich Minderung der Hypersensitivität der NTERA-2D1 durch die RA-Behandlung ersichtlich.



**Abb.17: Kurzzeitdifferenzierung der NTERA-2D1 mit Retinolsäure.** Die NTERA-2D1 wurde über 48h in Anwesenheit von All-trans-Retinolsäure  $2\mu\text{M}$  kultiviert und im Anschluss mit Cisplatin ( $10\mu\text{M}$ ) über 16 Stunden behandelt. Die Auswertung erfolgte nach Annexinfärbung am Durchflusszytometer.

### 3.2.2 Langzeitüberleben

Um zu zeigen, ob es sich bei der verminderten Sensitivität um einen reinen Effekt der Zeitverschiebung (im Sinne einer zwar bei gleichen Dosen, aber später eintretenden Apoptose) handelt oder ob der Sensitivitätsunterschied zwischen NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA ein zeitunabhängiger Unterschied ist, wurden Colonyassays angefertigt, die das Langzeitüberleben der NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA nach Cisplatinbehandlung in einer Konzentrationsreihe ( $2\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}$ ,  $0,5\mu\text{M}$ ,  $0,25\mu\text{M}$ ,  $0,125\mu\text{M}$ ,  $0,0625\mu\text{M}$ ,  $0,03125\mu\text{M}$ ,  $0,015\mu\text{M}$  und  $0\mu\text{M}$ ) nach 8 Tagen zeigt (s. M&M). Vergleichend wurde die Viabilität des MTT-Assays (48 Stunden) herangezogen. Es zeigte sich, dass die NTERA-2D1+RA verglichen mit der NTERA-2D1 eine erhöhte Kapazität zum Bilden von Kolonien hat (Abb.18).

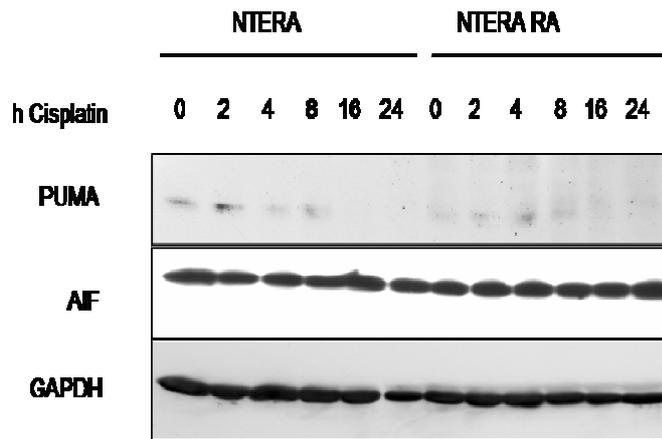


**Abb.18: Kurz- und Langzeitüberleben der NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA.** Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Cisplatinkonzentrationen behandelt. In der linken Abbildung erfolgte nach 48h die Messung der Zellviabilität in der MTT-Analyse. In der rechten Abbildung wurden die Zellen mit unterschiedlichen Cisplatinkonzentrationen über 48h behandelt. Nach 8 Tagen wurden die gebildeten Zellkolonien (CE, *Cloning efficiency*) am Mikroskop ausgezählt.

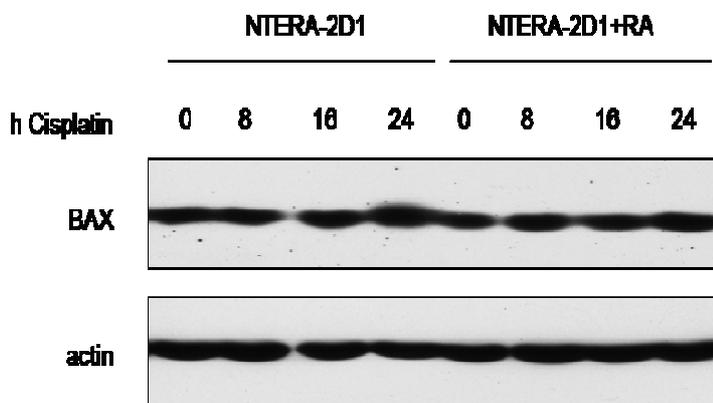
### 3.2.3 Schadenserkennung, Reparatur und Apoptose

#### Vermehrte Induktion von NOXA in NTERA-2D1

Im Weiteren wurde eine Reihe an Proteinen, die für Schadenserkennung, Reparatur, Apoptose sowie p53-Funktion relevant sind, in den beiden Ansätzen (NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA) hinsichtlich ihrer Expression vergleichend im Westernblot untersucht. Zunächst wurden einige wichtige pro- bzw. antiapoptotischen Proteine betrachtet. Hierzu wurden beide Ansätze mit Cisplatin 10 $\mu\text{M}$  für 0, 2, 4, 8, 16 und 24h inkubiert und die entsprechenden Proteine im Anschluss im Westernblot quantifiziert. Weder bei PUMA noch bei dem proapoptotischen BAX gab es einen Unterschied in der Expression, ebenso war AIF unbeeinflusst (Abb.19 und 20).

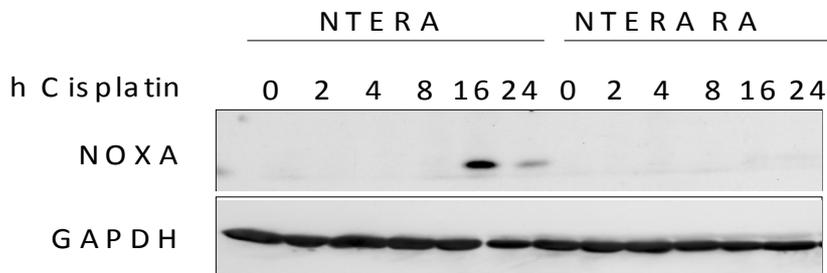


**Abb 19: Weder bei PUMA noch bei AIF zeigen sich Expressionsunterschiede.** Die Zellen wurden mit Cisplatin 10 $\mu$ M über unterschiedliche Zeiträume behandelt (0, 2, 4, 8, 16, 24 Stunden). Anschließend wurden die Zellen pelletiert und das Gesamtlisat extrahiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression der angegebenen Proteine untersucht. Als Beladungskontrolle diente GAPDH.



**Abb 20: Kein Expressionsunterschied von BAX in NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA.** Die Zellen wurden mit Cisplatin 10 $\mu$ M über unterschiedliche Zeiträume behandelt (0, 8, 16, 24 Stunden). Anschließend wurden die Zellen pelletiert und das Gesamtlisat extrahiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression der angegebenen Proteine untersucht. Als Beladungskontrolle diente  $\beta$ -Actin.

Das proapoptotische NOXA wurde jedoch auf Cisplatinreiz in der NTERA-2D1 deutlich höher exprimiert, als in der NTERA-2D1+RA (Abb.21).

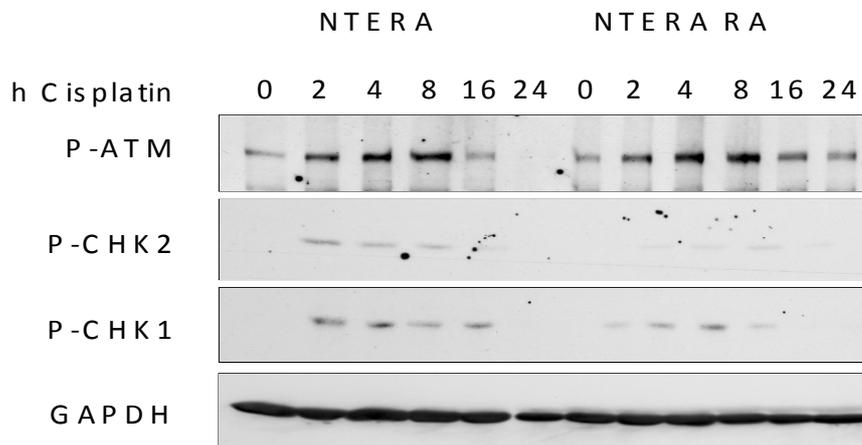


**Abb.21: NOXA wird nur in der NTERA-2D1 nach Cisplatinbehandlung exprimiert.** Die Zellen wurden mit Cisplatin 10 $\mu$ M über unterschiedliche Zeiträume behandelt (0, 2, 4, 8, 16, 24 Stunden). Anschließend wurden die Zellen pelletiert und das Gesamtlysate extrahiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression der angegebenen Proteine untersucht. Als Beladungskontrolle diente GAPDH.

#### Kein Unterschied in der Aktivierung von ATM

ATM ist an der Erkennung vielfältiger DNA-Schäden beteiligt, klassischerweise handelt es sich dabei um Strangbrüche in der DNA (Übersicht in Kitagawa et al 2005). Allerdings wiesen Colton et al 2006 darauf hin, dass ATM auch durch die Cisplatin-induzierte NER aktiviert werden kann und hierzu funktionales XPC notwendig ist. In der Kaskade unterhalb von ATM bzw. ATR sind die Checkpointkinasen CHK1 bzw. CHK2. Sie sind mitverantwortlich für die Einleitung des Zellzyklusarrests und somit die Möglichkeit der Zelle, aufgetretene Schäden zu reparieren. Für die Erkennung von Cisplatin-DNA-Addukten wurde allerdings auch eine präferentielle Schadenserkennung durch den XPC-HR23B-Komplex und eine wichtige Bedeutung des Erkennungsproteins XPC für die Aktivierung von ATM und der nachfolgenden Zellantwort beschrieben (Trego et al 2006, Wang et al 2004). Für Abb.22 wurden die NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA mit 10 $\mu$ M Cisplatin für 0, 2, 4, 8, 16 und 24h inkubiert. Im Westernblot zeigte sich, dass es in der Aktivierung von ATM keine Unterschied zwischen der NTERA-2D1 und der NTERA-2D1+RA gibt. Bei der Aktivierung von

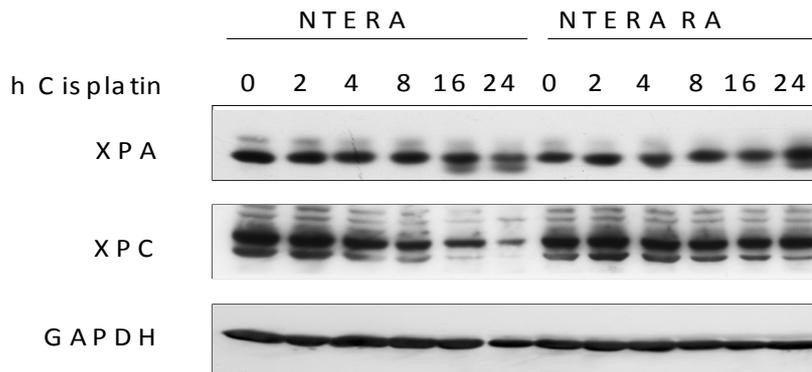
CHK1 zeigte sich allenfalls eine minimal erhöhte Induktion in der NTERA-2D1. Die Aktivierung von CHK2 nach Cisplatingabe ist dagegen nach Kurzzeitdifferenzierung deutlich vermindert im Vergleich zur undifferenzierten Linie.



**Abb.22: Induktion von ATM, CHK1 und CHK2 nach Cisplatinbehandlung.** Die Zellen wurden mit Cisplatin 10 $\mu$ M über unterschiedliche Zeiträume behandelt (0, 2, 4, 8, 16, 24 Stunden). Anschließend wurden die Zellen pelletiert und das Gesamtlysate extrahiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression der angegebenen Proteine untersucht. Die Beladung des Gels wurde durch Detektion von GAPDH gezeigt.

#### Kein Unterschied in der Schadenserkennung durch XPA und XPC

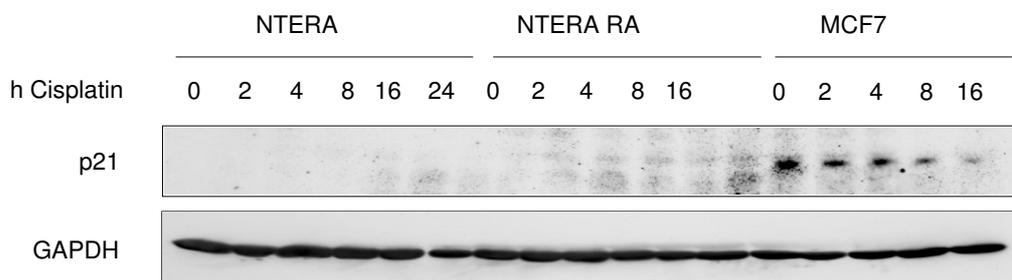
Eine sehr zentrale Rolle bei der Reparatur von Cisplatin-DNA-Addukten spielt die NER (Rabik et al 2007, Wang et al 2005, Helleday et al 2008). Um zu überprüfen, ob Unterschiede in der Ausstattung oder Induktion der an der NER beteiligten Proteine die Sensitivitätsdifferenz zwischen NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA begründen können, wurden die in der NER an der Schadenserkennung beteiligten Proteine XPC und XPA betrachtet. Hierzu wurden die Zellen wiederum mit 10 $\mu$ M Cisplatin für 0, 2, 4, 8, 16 und 24h inkubiert und der Gehalt an XPA und XPC im Westernblot quantifiziert. In Abb.23 zeigt sich, dass es keinen Unterschied in der Protein-Expression von XPA und XPC gibt.



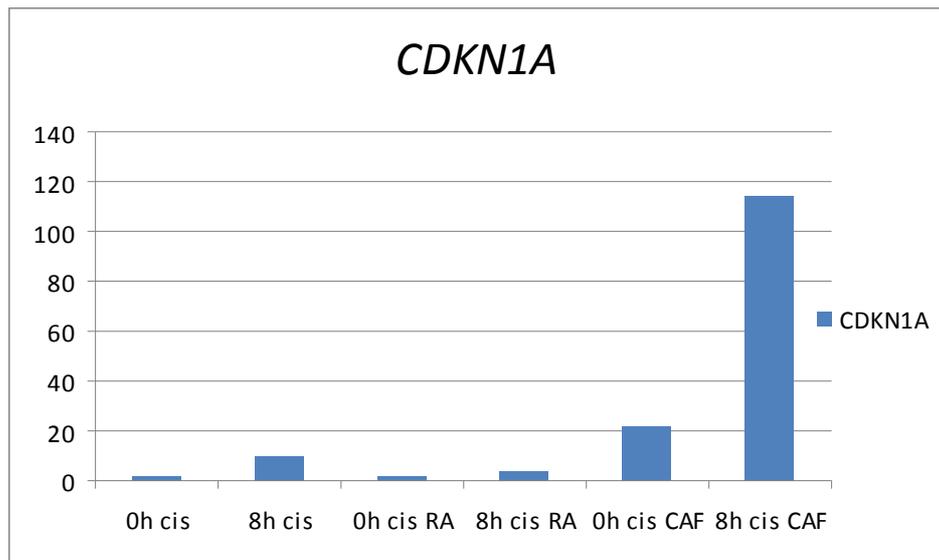
**Abb.23: Kein Unterschied in der Quantität der NER-Proteine XPA und XPC im Westernblot.** Die Zellen wurden mit Cisplatin  $10\mu\text{M}$  behandelt. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0, 2, 4, 8, 16, 24 Stunden) wurden die Zellen pelletiert und das Gesamtlisat extrahiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression der angegebenen Proteine untersucht. Die Beladung des Gels wurde durch Detektion von GAPDH gezeigt.

#### Fehlende Regulation von p21

In analogem Versuchsaufbau wurde im Westernblot eine mögliche differente Induktion von p21, dem Proteinprodukt des p53-Zielgens *CDKN1A*, das für Zellzyklusarrest und Reparatur mitverantwortlich ist, angeschaut. In der NTERA-2D1 ist keinerlei p21-Induktion zu erkennen. In der NTERA-2D1+RA zeigt sich eine extrem geringe Regulation von p21 (Abb.24). Dies bestätigte sich auch in der *CDKN1A*-mRNA-Expression (Abb.25).



**Abb.24: Keine p21-Induktion in der NTERA-2D1.** Die Zellen wurden mit Cisplatin  $10\mu\text{M}$  behandelt. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0, 2, 4, 8, 16, 24 Stunden) wurden die Zellen pelletiert und das Gesamtlisat extrahiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von p21 untersucht. Die Beladung des Gels wurde durch Detektion von GAPDH gezeigt.



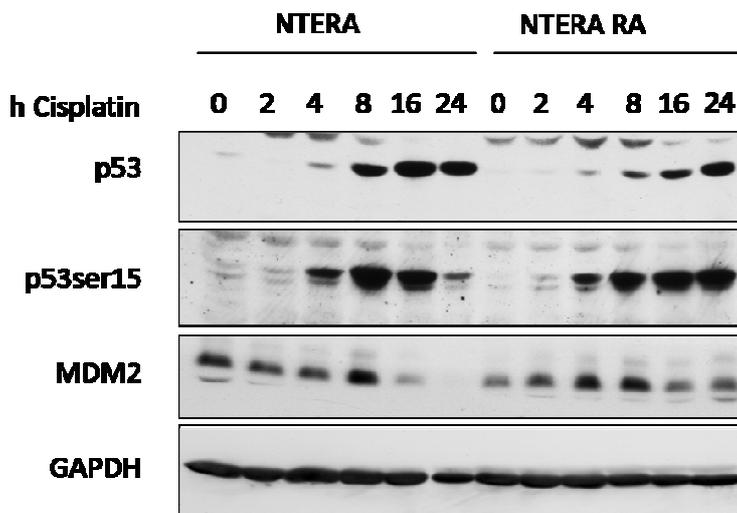
**Abb.25: mRNA-Expression von *CDKN1A* nach Cisplatinbehandlung.** Die Zellen wurden mit oder ohne Cisplatin für 8 Stunden inkubiert. Die Gesamt-RNA-Extraktion erfolgte mittels RNeasy-Minikit (Quiagen). Die *CDKN1A*-Expression wurde mit der LightCycler-Methode analysiert. Gezeigt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten. Die Werte zeigen die relative Expression in Bezug auf die unbehandelte NTERA-2D1. Als Vergleich ist in der Abbildung die Expression von *CDKN1A*-mRNA von Fibroblasten (*Cancer Associated Fibroblasts*; CAFs) gezeigt.

### 3.2.4 p53

Die Rolle von p53 bezüglich der Hypersensitivität embryonaler Keimzelltumore ist, wie oben bereits erwähnt, kontrovers, so dass im folgenden p53 sowie die Familie der ASPP-Proteine untersucht wurden.

### Spätere Induktion und Aktivierung von p53 in NTERA-2D1+RA

Um die Rolle von p53 in der Hypersensitivität der NTERA-2D1 zu untersuchen, sollte als nächstes gezeigt werden, ob der Sensitivitätsunterschied der NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA durch den Grad der Induktion oder Aktivierung von p53 zustande kommt. Hierzu wurden beide Zellen mit 10 $\mu$ M Cisplatin für 0, 2, 4, 8, 16 und 24h inkubiert und p53 und p53ser15 (an Stelle von Serin 15 phosphoryliertes und somit aktiviertes p53) im Anschluss im Westernblot quantifiziert. Hier zeigte sich, dass die Induktion und Aktivierung von p53 an Serin 15 deutlich rascher stattfindet als in der NTERA-2D1+RA. Bei beiden Zelllinien beginnt die Induktion von p53 nach 4 Stunden, bei der NTERA-2D1 steigt sie jedoch im Verlauf schneller an, als bei der NTERA-2D1+RA (Abb.26). In der Aktivierung und Phosphorylierung von p53 an Serin 15 zeigt sich initial kein signifikanter Unterschied, ab 16h nach Cisplatin-Behandlung nimmt aber bei der NTERA-2D1, am ehesten aufgrund Degradation apoptotischer Zellen, der Proteinanteil ab, während er bei der NTERA-2D1+RA während des untersuchten Zeitraums weiter langsam ansteigt. Ob der Gesamtanteil p53 sowie die an Serin 15 phosphorylierte Form in der NTERA-2D1+RA ebenso weit ansteigt, wie bei der NTERA-2D1 ist aus den untersuchten Zeitpunkten nicht ersichtlich. Im selben Versuch wurde auch MDM2, ein p53-Antagonist untersucht, da ein vermehrter Gehalt an MDM2 ein relatives Untergewicht von p53 verursachen könnte und damit im Resultat mit einem intrinsisch geringeren Gehalt von p53 vergleichbar wäre. Jedoch zeigt sich in beiden Zellreihen ein vergleichbarer MDM2-Gehalt (Abb.26).

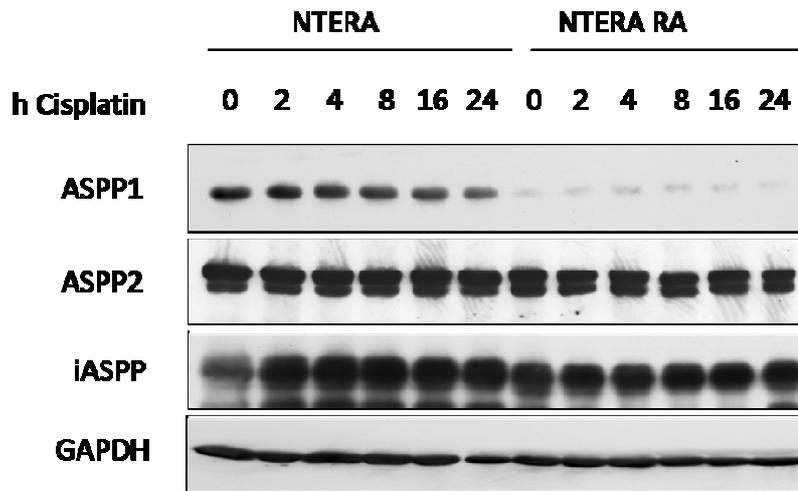


**Abb.26: Frühere Induktion und Aktivierung der NTERA-2D1 nach Cisplatinbehandlung.** Die Zellen wurden mit Cisplatin 10 $\mu$ M über unterschiedliche Zeiträume behandelt (0, 2, 4, 8, 16, 24 Stunden). Im Anschluss wurden die Zellen pelletiert und das Gesamtlysate extrahiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression der angegebenen Proteine untersucht. Die Beladung des Gels wurde durch Detektion von GAPDH gezeigt.

Keine Unterschiede im Protein-Gehalt der p53-Cofaktoren ASPP2 und iASPP, ASPP1-Gehalt jedoch in der NTERA-2D1 höher als in der NTERA-2D1+RA

Schreibt man *wtTP53* eine Bedeutung in der Cisplatinhypersensitivität der embryonalen Keimzelltumore zu, ist abgesehen von der Induktion und Aktivierung auch interessant, ob der Wirkgrad von p53 durch Cofaktoren verändert ist. Aus dieser Überlegung heraus wurden weiter die Funktion von p53 modulierenden Proteine der ASPP-Familie untersucht. Auch hier erfolgte die Behandlung der Zellen mit 10 $\mu$ M Cisplatin für 0, 2, 4, 8, 16 und 24h sowie die anschließende Quantifizierung mittels Westernblot.

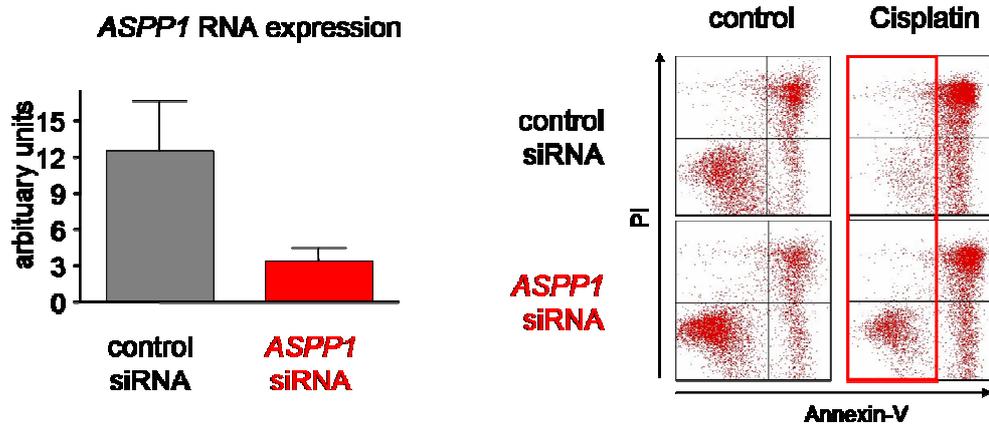
Abb.27 zeigt, dass es in der Expression von ASPP2 (lenkt die p53-Funktion in Richtung Apoptose durch bevorzugte Bindung an Promotoren proapoptischer p53-Targets) und iASPP (inhibiert p53 abhängige Apoptose) keinen Unterschied zwischen den Zelllinien gibt. Anders verhält es sich mit dem p53 ebenfalls in Richtung Apoptose lenkenden ASPP1. Dieses ist im vorliegenden Experiment in der hypersensitiven NTERA-2D1 deutlich stärker exprimiert als in der NTERA-2D1+RA.



**Abb.27: Vermehrter ASPP1-Gehalt in der NTERA-2D1.** Die Zellen wurden mit Cisplatin 10 $\mu$ M über unterschiedliche Zeiträume behandelt (0, 2, 4, 8, 16, 24 Stunden). Im Anschluss wurden die Zellen pelletiert und das Gesamtlysate extrahiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression der angegebenen Proteine untersucht. Als Beladungskontrolle diente GAPDH.

#### Partielle Inhibierung der Hypersensitivität durch *ASPP1*-siRNA

Um zu zeigen, dass die im Westernblot gezeigte Überexpression von ASPP1 in der NTERA-2D1 an der Hypersensitivität gegenüber Cisplatin beteiligt ist, wurden die Zellen mit *ASPP1*-siRNA transfiziert, um die *ASPP1*-Expression zu unterdrücken. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10 $\mu$ M Cisplatin behandelt und nach 16h die Apoptose via Annexinfärbung bestimmt. Da die Zellen sehr sensibel auf Behandlungen jedweder Art reagieren, wurden als Kontrolle die mit dem vom Hersteller mitgelieferten *non-targeting Control Pool* (Kontroll-siRNA) behandelte NTERA-2D1 mitgeführt, um einen nur durch die Behandlung erzielten Effekt auszumitteln. Abb.28 zeigt links die verminderte *ASPP1*-Expression in den mit siRNA behandelten NTERA-2D1, im rechten Teil der Abbildung die verminderte Apoptoseinduktion in den mit siRNA behandelten NTERA-2D1, jeweils im Vergleich zur Kontrolle.

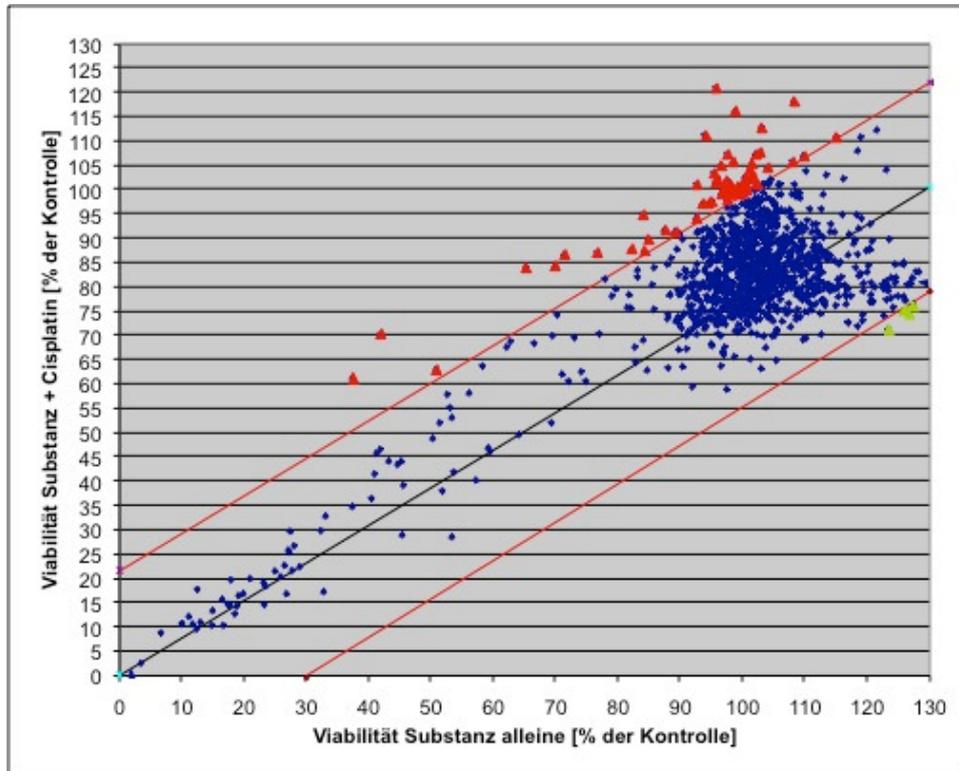


**Abb.28: Experimentelle Hemmung von *ASPP1* mittels RNA-Interferenz inhibiert partiell die Hypersensitivität der NTERA-2D1.** Die Zellen wurden mit *ASPP1*-siRNA laut Hersteller-Protokoll behandelt. In der linken Abbildung wurde die Gesamt-RNA isoliert und der Gehalt an *ASPP1*-RNA mittels qRT-PCR ermittelt. In der rechten Abbildung wurden die siRNA behandelten Zellen mit 5µM Cisplatin behandelt. Nach 16 Stunden erfolgte die Annexinfärbung und Auswertung am Durchflusszytometer.

### 3.3 Prestwick-Library

Die Prestwick-Library beinhaltet 1120 Substanzen auf 14 96-Well-Platten, welche klinische Zulassung in den verschiedensten Bereichen haben. In der vorliegenden Arbeit sollte ein Screening durchgeführt werden, ob eine der Substanzen im Stande ist, die durch die RA-Behandlung gewonnene relative Resistenz der NTERA-2D1+RA gegenüber Cisplatin aufzuheben und die ursprüngliche Hypersensitivität der NTERA-2D1 wiederherzustellen. Aus den 14 96-Well-Plates wurden zunächst 1:100 Verdünnungen Substanz-Medium (in 96-Well-Platten) hergestellt. Pro ursprünglicher Substanz-Platte wurden 4 MTT-Platten mit NTERA-2D1+RA ausgesät (6000 Zellen/Loch), von denen später jeweils 2 als Kontrolle nur mit den Substanzen behandelt wurden, 2 mit Substanzen und Cisplatin. Die Substanzen wurden 2h vor Cisplatin auf die Zellen gegeben. Die Messung erfolgte nach 48h. Das sonstige Procedere war gleich den zuvor beschriebenen MTTs (s. M&M). In Abb.29 sind die

zusammengefassten Daten dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die meisten der Substanzen keinen zusätzlichen Effekt zur Cisplatinbehandlung aufweisen, weder synergistisch noch protektiv. Einige der Substanzen wirken *per se* toxisch auf die NTERA-2D1+RA. Bei einigen wenigen Substanzen weisen die Zellen in Kombination mit Cisplatin eine über den reinen Cisplatineffekt verminderte Viabilität auf, dieser Effekt erreicht jedoch nicht das erhoffte Ausmaß. Diese Substanzen sind Glibenclamid, Fluphenazindihydrochlorid, Pramoxinhydrochlorid, Tiletaminhydrochlorid, Isometheptene mucate, Nomegestrolacetat und Letrozol. Eine Wiederherstellung der ursprünglichen Hypersensitivität der nicht mit RA behandelten NTERA-2D1 gegenüber Cisplatin wird jedoch mit keiner der verwendeten Substanzen erreicht. Die möglicherweise gegenüber Cisplatinbehandlung protektiven Substanzen sind Thioridazinhydrochlorid, Metronidazol, 'R(-)Apomorphinhydrochlorid hemihydrat, Cotinine, Zimelidindihydrochlorid monohydrat, Metolazon, Edrophoniumchlorid, Moroxidinhydrochlorid, Aciclovir, Diazoxid, Triprolidinhydrochlorid, Albendazol, Bupropionhydrochlorid, Rifampicin, Vigabatrin und andere (s. Tabelle 1 Anhang).



**Abb.29: Prestwick-Substanzbibliothek NTERA-2D1+RA.** Die NTERA-2D1 wurden 48 Stunden in Anwesenheit von RA kultiviert und dann mit 6000 Zellen/Loch auf 96-well-Plates ausgesät. Am Folgetag wurden pro Platte der Prestwick-Library 4 Platten der Zellen mit den Substanzen der Prestwick-Library behandelt. Nach 2 Stunden wurde zu 2 der Platten Cisplatin zugegeben. Nach 48 Stunden erfolgte die Auswertung mittels MTT-Test. Die Steigung der schwarzen Geraden zeigt die reine Cisplatinwirkung, die roten Linien entsprechend +/- zwei Standardabweichung. Die blauen Zeichen markieren Substanzen ohne Effekt in Kombination mit Cisplatin. Die roten Zeichen zeigen ein höheres Überleben der Zellen mit kombinierter Behandlung, die grünen Zeichen zeigen ein vermindertes Überleben der Zellen in der Kombinationsbehandlung Substanz+Cisplatin.

## 4. Diskussion

In der Behandlung bösartiger Tumore gibt es heute 3 Säulen, die Chirurgie, die Strahlentherapie und die Systemtherapie, welche sich wiederum zusammensetzt aus konventioneller Chemotherapie und Antikörpertherapie. Die beiden erstgenannten Therapieformen (Chirurgie und Strahlentherapie) haben den Vorteil, dass sie gezielt nur den Tumor schädigen bzw. dieser entfernt wird. Die Biologie des Tumors spielt hier derzeit eine untergeordnete oder gar keine Rolle. Die Antikörpertherapie ist eine sehr gezielte Therapie, die die Herkunft der Tumorzellen bzw. ihre Rezeptorausstattung (z.B. der CD20-Antikörper Rituximab in der Lymphomtherapie) oder veränderte Signalwege (z.B. der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie CML) ausnutzt. Bei der konventionellen Chemotherapie wird insgesamt eine überschaubare Gruppe an Substanzen verwendet, die für die Behandlung von bösartigen Tumoren eingesetzt werden. Diese Substanzen führen nur bei einer sehr kleinen Gruppe von Tumoren zur Heilung. Diese Tumorzellen scheinen eine besondere Sensitivität gegenüber DNA-Stress zu besitzen und daher durch diese Form der Therapie vollständig heilbar zu sein. Auf der anderen Seite geht man bei chemotherapieresistenten Tumoren von einer hohen Toleranz gegenüber DNA-Stress aus. Doch ist die Eigenschaft der „Resistenz“ gegenüber Chemotherapeutika vielmehr dem Zellverhalten normaler Gewebezellen entsprechend, sonst wäre das Ziel der Chemotherapie, den Tumorzellen zu schaden und das Normalgewebe möglichst zu schonen, überhaupt nicht möglich. Eine erfolgreiche Elimination eines bösartigen Tumors setzt demnach die Hypersensitivität dieses Tumors gegenüber einer oder mehrerer Substanzen voraus, die den Restkörper in einer gegen den Tumor wirksamen Konzentration nicht maßgeblich schädigen. In diesem Zusammenhang ist die Erforschung von Hypersensitivitätsphänomenen und den zugrunde liegenden Mechanismen von hoher Relevanz. Das Verständnis der veränderten intrazellulären Wege der hypersensiblen Tumorzellen kann zur Entwicklung neuer Substanzklassen beitragen, die durch pharmakologische Veränderung bestimmter Wege oder Proteine in „resistenten“ Tumorzellen einen hypersensitiven Phänotyp induzieren können. Diese könnten somit durch Chemotherapie heilbar werden.

Embryonale Keimzelltumore sind ein Beispiel außergewöhnlicher Hypersensitivität eines bösartigen Tumors gegenüber Chemotherapie. Selbst im metastasierten Stadium liegt die Heilungsquote bei über 80% (Bosl et al 1997). Diese Tumorentität bietet sich demnach an, mögliche Ursachen einer Hypersensitivität zu untersuchen.

#### **4.1 Verwendetes Modellsystem**

In der vorliegenden Arbeit sollten mögliche Ursachen der intrinsischen Hypersensitivität von embryonalen Keimzelltumoren gegenüber Cisplatin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Modellsystem etabliert, bei dem die intrinsische Hypersensitivität der NTERA-2D1 gegenüber Cisplatin durch Kurzzeitdifferenzierung teilweise verloren geht. Die NTERA-2D1 ist eine hochmaligne embryonale Keimzelltumorklinie, die Eigenschaften einer pluripotenten Stammzelle aufweist (Sperger et al 2003). Unter Behandlung mit RA differenziert die NTERA-2D1 und verliert dabei ihre malignen Eigenschaften (Andrews 1984, Miller et al 1994, Kitareewan et al 1999). Die vollständige Differenzierung der NTERA-2D1 durch Behandlung mit RA benötigt ca. 42-54 Tage (Paquet-Durand et al 2003). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit abgesehen von der Minderung der Sensitivität die intrinsischen Unterschiede zwischen NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA möglichst gering sein sollten, sollte die Behandlungszeit mit RA möglichst kurz sein, aber dennoch lange genug, um eine eindeutige Änderung der Cisplatinsensitivität zu erzielen. Nach einer Behandlungsdauer von 48h hatte die mit RA behandelte NTERA-2D1 eine um ca. eine log-Stufe verminderte Cisplatinsensitivität. Zudem scheint das etablierte Modell die in vivo Situation gut abzubilden, da die Differenzierung und der Verlust der embryonalen Stammzeleigenschaften, beispielsweise beim reifen Teratom, mit einer verminderten Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika einhergeht (Masters et al 2003, di Pietro et al 2005). Die verminderte Hypersensitivität der NTERA-2D1+RA bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit auch im Langzeitüberleben und der Fähigkeit der Zellen, nach Platinbehandlung Kolonien zu bilden, so dass es sich nicht um ein rein zeitliches Phänomen handelt.

Zur Untersuchung von Sensitivitäts- bzw. Resistenzphänomenen werden verschiedenste Modellsysteme genutzt. Beispiele sind Tumorzelllinien verschiedener Tumorentitäten, die eine unterschiedliche Sensitivität aufweisen (Fokkema et al 2002). Weiter ist der Vergleich sensibler und resistenter Tumorzelllinien derselben Tumorentität (beispielsweise eine sensible und eine resistente embryonale Keimzelltumorzell- oder Kolonkarzinomzelllinie) möglich (Fung et al 2006, Sergent et al 2002). Häufig wird ein Paar aus einer sensiblen Tumorzelllinie und der unter Selektionsdruck gezogenen resistenteren Tochterzelllinie verwendet (Noel et al 2008, Wilson et al 2005), oder, wenn bereits ein Zielgen oder Proteine ins Auge gefasst wurde, ein Vergleich innerhalb einer Zelllinie, wobei das zu untersuchende Zielgen/Protein überexprimiert oder stillgelegt wird (Pak et al 2011). Jedes dieser Modelle birgt eigene Probleme. Werden Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten vergleichend untersucht, besteht eine Schwierigkeit darin, dass beide Zelllinien eine unüberschaubare und unbekannt Anzahl an Unterschieden in den verschiedensten Bereichen aufweisen. Es können eine Vielzahl von Signalwegen und intrinsischen Eigenschaften an der Sensitivität einer Zelle gegenüber Cisplatin beteiligt sein (Beispiele sind Wege aus dem Bereich Reparatur, Apoptose oder Detoxifikation oder die intrinsische Ausstattung einer Zelle an Transportern oder bestimmten Proteinen) (Siddik et al 2003, Gonzalez et al 2001). In den meisten dieser Eigenschaften werden sich die beiden Zelllinien unterscheiden, meist, ohne dass die Unterschiede qualitativ oder quantitativ ausreichend bekannt sind. Es ist daher schwer, ein einzelnes Phänomen einem bestimmten Mitspieler zuzuordnen. Innerhalb einer Tumorentität ist vorstellbar, dass die Unterschiede nicht so gravierend sind, wie in Linien unterschiedlicher Ursprungsgewebe. Dennoch bestehen unzählige Unterschiede in Eigenschaften und Ausstattung verschiedener Zelllinien einer Tumorentität (man betrachte beispielsweise die Vielzahl der Mammakarzinom- oder Ovarialkarzinomzelllinien mit sehr differenten Eigenschaften (Estep et al 2007, van der Zee et al 1997). Deutlich werden diese Unterschiede innerhalb einer Tumorentität auch, wenn man die Biologie von Tumoren *in vivo* betrachtet, so z.B. die unterschiedlichen histologischen Subtypen des Mammakarzinoms (Turaga et al 2010). Der dritte genannte Ansatz (sensitive Mutterzelle mit resistenter Tochterzelle) ist gut geeignet, das klinisch leider relativ häufige Problem der erworbenen Resistenzbildung zu untersuchen, da es die *in vivo*-Situation gut widerspiegelt. Tumorzellen, die primär auf Behandlung mit

einer bestimmten Substanz angesprochen haben, werden durch Exposition mit der entsprechenden Substanz im Rahmen der Behandlung resistent. Dieser Umstand lässt sich *in vitro* gut imitieren und die Mechanismen der sogenannten erworbenen Resistenz untersuchen (beispielsweise eine Veränderung in der Ausstattung der Transporter (Choi et al 2006)). Die vierte Option (Aktivieren bzw. Stilllegen eines bestimmten Zielgens) entspricht der Validierung der Ergebnisse aus den zuvor genannten Ansätzen. Ein solches Experiment erfolgt, wenn durch Vorarbeiten ein entsprechendes Kandidatengen oder -protein identifiziert wurde, und eine Hypothese verifiziert oder falsifiziert werden soll. Die genannten Untersuchungsmodelle dienen alle primär der Untersuchung von Resistenzmechanismen und sind hierfür auch geeignet. Allerdings wurden sie in der Vergangenheit ebenso zur Untersuchung der Hypersensitivität der embryonalen Keimzelltumor herangezogen, und zwar vor allem durch den Vergleich mit resistenten Zellen (Usanova et al 2010, Perry et al 2009, Noel et al 2008). Diese Resistenzen wurden erzeugt durch einen langandauernden Selektionsprozess, bei dem die Zellen allmählich durch langsame Steigerung der Konzentration an das Zytostatikum gewöhnt wurden. Dieser nicht kontrollierbare Selektionsprozess hat den Nachteil, dass Resistenzen durch sehr unterschiedliche Mechanismen erzeugt werden können, die nicht unbedingt auf die zugrundeliegenden Mechanismen der Hypersensitivität schließen lassen. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modellsystem handelt sich hiermit nicht um eine unter Selektionsdruck erworbene Resistenz sondern vielmehr um eine Veränderung bestimmter Eigenschaften im Rahmen einer Kurzzeitdifferenzierung, die mit der Entstehung einer relativen Cisplatinresistenz vergesellschaftet sind. Die differenzierte und nichtdifferenzierte NTERA-2D1 sind sich hierbei aufgrund der sehr kurzen Behandlungsdauer (48h) mit RA in ihren intrinsischen Eigenschaften wahrscheinlich noch sehr ähnlich. Eine Untersuchung derjenigen Veränderungen, die mit der verminderten Hypersensitivität gegenüber Cisplatin zu tun haben, sind hiermit im Vergleich in der NTERA-2D1 und der NTERA-2D1+RA ausgesprochen gut möglich.

Analog gilt dies auch für ein weiteres in der Arbeitsgruppe etabliertes Modellsystem zur Untersuchung von Hypersensitivität in Tumorzellen. Es handelt sich dabei um eine pharmakologisch durch Imatinibbehandlung hervorgerufene Hypersensitivität von murinen, *Bcr/Abl*-positiven Zellen gegenüber Cisplatin, die sich auch in primären

*BCR/ABL*-positiven Zellen von CML-Patienten induzieren ließ (Skorta et al 2009). Die induzierte Hypersensitivität befand sich auf gleichem Niveau mit der Hypersensitivität der NTERA-2D1.

## 4.2 Sensitivität

Um die Hypersensitivität in der verwendeten NTERA-2D1 zu bestätigen, wurden in der vorliegenden Arbeit zum einen MTTs mit Cisplatin-Konzentrationsreihen durchgeführt, zum anderen wurden die Zellen in Kulturflaschen mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen behandelt und anschließend der Anteil toter Zellen durch Annexin-Färbung ermittelt. Als Vergleichslinien wurde eine Auswahl verschiedener Tumorzelllinien und Normalzelllinien verwendet, die alle charakterisiert sind durch die Expression des Genprodukts von *TP53*-Wildtyp. Sowohl im MTT-Assay als auch in der Annexin-Färbung bestätigte sich die deutlich höhere Sensitivität der NTERA-2D1 gegenüber den anderen Vergleichslinien. In der Betrachtung des zeitlichen Ablaufs der Apoptose der NTERA-2D1, verglichen mit dem Verlauf der Apoptoseinduktion in einer weiteren Keimzelltumorzelllinie (2102EP), einer Mammakarzinomzelllinie (MDA MB 134) und einer Ovarialkarzinomzelllinie (OVCAR 8) zeigte sich, dass der Zelltod in der NTERA-2D1 im Vergleich zu allen anderen betrachteten Zelllinien einschließlich der 2102EP sehr rasch eintritt. Nach ca. 7 Stunden waren bereits 50% der Zellen Annexin-positiv, dieser Wert stieg rasch weiter an bis nach 14 Stunden nahezu 90% der behandelten NTERA-2D1 Annexin-positiv waren. Bei der 2102EP waren zu den gegebenen Zeitpunkten knapp 30% bzw. knapp 60% der Zellen Annexin-positiv. Die MDA MB 134 und die OVCAR 8 zeigten unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen keine signifikante Zunahme der Annexin-positiven Zellen. Es handelte sich bei der NTERA-2D1 also um eine sehr rasche Induktion und Ausführung des Zelltodes nach entsprechender Cisplatinexposition.

Da epigenetische Veränderungen letztlich den Differenzierungsprozess steuern (Nichols et al 1998, De Carvalho et al 2010, Huang et al 2010, Juliani et al 2010, Harnicarova et al 2010, Sanosaka et al 2009, Boussouar et al 2008), war es nahe liegend, in

vorliegender Arbeit die Rolle der Promotormethylierung und Histonacetylierung für die Hypersensitivität bzw. für deren Verlust nach Kurzzeitdifferenzierung in NTERA-2D1-Zellen zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit dem Methyltransferaseinhibitor Decitabine vorinkubiert und im Anschluss mit Cisplatin behandelt. Es zeigte sich allerdings eine ausgeprägte *per se* Toxizität von Decitabine für die Zellen.

Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten überein. So zeigten Beyrouthy et al 2009 eine Hypersensitivität von testikulären Keimzelltumoren gegenüber AZA. Diese wird zum einen durch eine Aktivierung von ATM begründet, zum anderen dadurch, dass embryonale Keimzelltumore hohe Basalspiegel der DNA-Methyltransferase 3B besitzen, wobei ein Knockdown der Methyltransferase zu einer Resistenz gegenüber AZA führte. Diese Subgruppe der DNA-Methyltransferasen wird sonst nur in embryonalen Stammzellen derart hoch exprimiert und wird in einer Reihe von Studien als Marker für Pluripotenz gewertet (Sperger et al 2003, Muller et al 2008). Interessanterweise konnten Beyrouthy et al ebenso zeigen, dass auch Cisplatinresistente TGCT sensibel gegenüber AZA sind und durch eine Vorbehandlung mit AZA ihre Sensitivität gegenüber Cisplatin wiedererlangen können. Die ausgeprägte Toxizität von AZA für embryonale Keimzelltumore ließ sich in der vorliegenden Arbeit für die NTERA-2D1 bestätigen.

Um die Rolle der Histonacetylierung für die Hypersensitivität gegenüber Cisplatin zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die NTERA-2D1 neben dem DNA-Methylierungsinhibitor AZA auch mit dem Histondeacetylaseinhibitor SAHA vor Behandlung mit Cisplatin inkubiert. Die Behandlung mit dem Histondeacetylaseinhibitor hatte *per se* eine leichte Toxizität für die NTERA-2D1 zur Folge. Für die kombinierte Behandlung SAHA mit anschließender Behandlung mit Cisplatin zeigte sich ein leichter Effekt im Sinne einer geringeren Hypersensitivität der Zellen gegenüber Cisplatin. Ursächlich für diesen protektiven Effekt könnte eine durch SAHA bedingte beginnende Differenzierung der Zellen sein. So kann man unter dem Einsatz von Histondeacetylaseinhibitoren oder DNA-Methyltransferaseinhibitoren eine Differenzierung maligner Zellen beobachten (You et al 2009). Diese Arbeitsgruppe zeigte 2009, dass der stammzellspezifische Transkriptionsfaktor NANOG durch Behandlung mit dem Histondeacetylaseinhibitor Apicin reduziert wird. Diese

Beobachtung geht konform mit Studien, die eine Verminderung der *Nanog*-Expression in murinen embryonalen Stammzellen durch Behandlung mit RA vermindern und so zur Differenzierung führen (Pan et al 2007, Gu et al 2005, Lin et al 2005). Ein ähnlicher Differenzierungseffekt ist als Ursache der verminderten Cisplatinempfindlichkeit in der NTERA-2D1+RA in der vorliegenden Arbeit denkbar. Mueller et al veröffentlichten 2006 Ergebnisse, die mit dieser Theorie vereinbar sind. Sie beschreiben einen Verlust von OCT-4 im Verlauf der Differenzierung von TGCT-Zellen, der mit einem Verlust der Hypersensitivität der Zellen gegenüber Cisplatin einhergeht. In die Klinik übertragen vermuten die Autoren in Cisplatin-sensitiven TGCT eine Tumorstammzellpopulation, die ihre Stammzeleigenschaften weiter innehat (gezeigt durch die OCT-4-Expression). Bei resistenten TGCT vermuten sie dagegen eine Tumorstammzellpopulation, die ihr Stammzeleigenschaften verloren hat (keine OCT-4-Expression).

Somit scheinen epigenetische Veränderungen tatsächlich eine entscheidende Bedeutung nicht nur für die Keimzeleigenschaften sondern auch für die Sensitivität der Zellen gegenüber zytotoxischen Substanzen zu haben. Interessant wären nachfolgende Experimente, die untersuchen, ob durch eine Vorbehandlung mit Decitabine bzw. SAHA die ursprüngliche Hypersensitivität der NTERA-2D1 in der NTERA-2D1+RA wieder erreicht werden kann.

### 4.3 Mechanismen des Zelltodes

Es sind verschiedene Wege der Induktion, Vermittlung und Ausführung des Cisplatin-induzierten Zelltodes beschrieben, die abhängig vom Zelltyp zu sein scheinen. So wurde beispielsweise in Keratinozyten durch hohe Cisplatin-dosen Zelltod durch Nekrose ausgelöst, in bestimmten Leukämiezellen (L1210) fehlten im Zelltod einige charakteristische Bestandteile der Apoptose (Gonzalez et al 2001). Unsere Arbeitsgruppe konnte 2009 in mit Imatinib vorbehandelten *Bcr-Abl*-positiven Zellen einen weiteren Caspase-unabhängigen Weg des Cisplatin-induzierten Zelltodes über AIF zeigen (Skorta et al 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Beteiligung der Mitochondrien am Cisplatin-induzierten Zelltod untersucht. Mit Hilfe der TMRM-Färbung konnte ein rascher Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und somit ein mitochondrienabhängiger Weg des Cisplatin-induzierten Zelltodes in der NTERA-2D1 gezeigt werden. Der klassische Weg des mitochondrialen Zelltodes geht über die Freisetzung Zelltod-induzierender Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Dieser Vorgang ist Caspase-abhängig (Riedl et al 2007). Weiter gibt es Caspase-unabhängige Wege des mitochondrialen Zelltodes über Faktoren wie AIF oder Endonuclease G, die in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind (Susin et al 1999, Du et al 2000, Verhagen et al 2000, Li et al 2001, Suzuki et al 2001, Wolff et al 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde die Integrität der äußeren und inneren mitochondrialen Membran separat untersucht. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit TMRM bzw. Calcein-AM gefärbt. TMRM akkumuliert nur im Intermembranraum, so dass ein Signal Nachweis einer Zerstörung der äußeren mitochondrialen Membran ist. Zur Freisetzung von Calcein-AM müssen dagegen beide mitochondrialen Membranen zerstört werden (Petronilli et al 2001). Die NTERA-2D1 zeigte auf Cisplatinbehandlung eine positive TMRM-Färbung, aber kein positives Calcein-AM-Signal. Dies deutet daraufhin, dass der Weg des Cisplatin-induzierten Zelltodes in der NTERA-2D1 über das Mitochondrium geht, wobei der Weg über Caspasen der nahe liegende ist, da eine Freisetzung der Apoptose-induzierenden Faktoren aus dem inneren mitochondrialen Raum nicht erfolgt.

Um die Frage zu beantworten, ob der Weg des Zelltodes in der NTERA-2D1 der klassischen Apoptose entspricht, also abhängig von Caspasen ist, erfolgte die Vorbehandlung der Zellen mit dem Caspase-Inhibitor zVADfmk, der alle Apoptose-beteiligten Caspasen hemmt. Der Cisplatin-induzierte Zelltod in der NTERA-2D1 war durch Inhibition der Caspasen vollständig hemmbar. Dies geht konform mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die speziell in TGCT eine Caspase-abhängigkeit der Cisplatin-induzierten Apoptose propagieren (z.B. Mueller et al 2003, Spierings et al 2003).

Um eine eventuell dominante Beteiligung des extrinsischen Apoptose-Aktivierungsweges zu zeigen, wurde die NTERA-2D1 in der vorliegenden Arbeit vor Cisplatinbehandlung mit Caspase 8-Inhibitor bzw. antagonistischem FAS-Liganden vorbehandelt. Keine der Vorbehandlungen hatte einen Einfluss auf die Apoptose nach Cisplatinbehandlung, so dass eine Beteiligung des extrinsischen Induktionsweges an der Hypersensitivität in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Ob die Apoptose-Induktion durch Cisplatin in TGCT über den intrinsischen oder extrinsischen Weg geht, wird in der Literatur kontrovers behandelt. Mueller et al zeigten 2003 in drei TGCT-Zelllinien (der sensitiven 2102EP und H12.1 und der resistenten 1411HP), dass die Cisplatin-induzierte Apoptose in diesen Zellen abhängig von Caspase 9-Aktivierung ist und die Aktivierung dieser Caspase bei der resistenten Linie ausbleibt. Der Zelltod wurde bei höheren Cisplatin Dosen über andere Caspasen ausgeführt. Eine Abhängigkeit von Caspase 8 konnte von dieser Arbeitsgruppe nicht gezeigt werden. Somit weisen die Ergebnisse von Mueller et al auf eine intrinsische Aktivierung der Apoptose hin. Andererseits zeigten Spierings et al 2003 in NTERA-2D1-Zellen, dass es nach Behandlung mit Cisplatin zu einer vermehrten FAS (CD95)-Expression in der Zellmembran kommt und die Apoptose durch gezielte Caspase 8-Inhibition verhindert werden konnte. In verschiedenen Zelllinien ist eine Assoziation von nicht funktionsfähiger Caspase 8 und Cisplatinresistenz beschrieben (Liu et al 2009). In Cisplatin-resistenten HeLa-Zellen konnte sogar eine Inhibierung des TRAIL-induzierten Zelltodes und der Caspase 8-Aktivität durch Cisplatin gezeigt werden (Han et al 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges nicht bestätigt werden. Denkbar für diese kontroversen Ergebnisse wäre allerdings beispielsweise eine raschere Apoptosevermittlung über den intrinsischen Weg, so dass

der extrinsischen Weg in dem hypersensitiven NTERA-2D1-Klon, mit dem in vorliegender Arbeit experimentiert wurde, nicht der dominierende war. Denkbar wäre weiter eine parallele Aktivierung von extrinsischem und intrinsischem Weg, die beide für sich genommen bereits zur Apoptose führen würden. Ein mögliches weiteres Experiment dahingehend wäre eine selektive Blockade des intrinsischen Apoptoseweges. Ist der extrinsische Weg beteiligt sollte dieser trotz der Blockade des intrinsischen Wegs zur Apoptose führen.

#### **4.4 Reparatur**

Um in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Beteiligung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) an dem in der NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA gezeigten Sensitivitätsunterschied zu zeigen, wurden stellvertretend für den jeweiligen Subweg der NER zum einen die Expression von XPA, zum anderen die Expression von XPC untersucht. Es konnten bei beiden Proteinen weder intrinsische noch Cisplatin-induzierte Expressionsunterschiede der beiden Schadenserkenungsproteine gezeigt werden.

Um zu untersuchen, ob die NTERA-2D1 generell eine deutlich verminderte Reparaturkapazität im Vergleich zu einer resistenten Zelllinie besitzt, wurde in der vorliegende Arbeit weiter die Fähigkeit der NTERA-2D1, DNA-Platin-Addukte aus der DNA zu entfernen, gemessen. Hierzu wurden die Zellen pulsatil mit Cisplatin behandelt und der Platingehalt der DNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung gemessen. Als Vergleichslinie wurde die Cisplatin-resistente MCF7 herangezogen. Es zeigte sich, dass die MCF7 die Platin-Addukte außerordentlich schnell von der DNA eliminieren kann, wohingegen die NTERA-2D1 zunächst einen flachen Abfall des Platingehalts zeigte, der jedoch nach 8 Stunde wieder anstieg, was mit den nun sterbenden Zellen, die keine Addukte mehr reparieren können sondern vielmehr das freie Platin in die DNA binden, in Einklang zu bringen ist. Wurden die NTERA-2D1 jedoch mit dem Breitband-Caspaseinhibitor zVADfmk vorbehandelt und somit am

Zelltod gehindert, war die Zelle dazu in der Lage, die DNA-Platin-Addukte weiter abzubauen.

Verschiedene Reparaturmechanismen werden mit der Cisplatin-Hypersensitivität in Verbindung gebracht (Martin et al 2008). So wird zur Erklärung der extremen Hypersensitivität von TGCT in zahlreichen Veröffentlichungen eine verminderte Kapazität der NER herangezogen (Köberle et al 1999, Masters et al 2003). Die Bedeutung verschiedener an der NER beteiligter Proteine als limitierender Faktor hinsichtlich Resistenz bzw. Sensitivität embryonaler Keimzelltumore ist seit einigen Jahren Gegenstand der Forschung, jedoch noch nicht abschließend geklärt. So gibt es beispielsweise widersprüchliche Aussagen bezüglich des NER-Erkennungsproteins XPA, das eine wichtige Rolle in der TC-NER spielt (Köberle et al 1999 und 2008). In einigen Studien wird ERCC1, einem jenseits der Schadenserkenung liegenden, an der TC-NER und GG-NER beteiligten Protein eine gewisse Rolle zugeschrieben. So wurde gezeigt, dass ein erhöhter Spiegel an ERCC1 mit einer Resistenz gegenüber Cisplatin einhergeht, wohingegen eine Inhibierung von ERCC1 zu einer Sensibilisierung gegenüber Cisplatin führt (Lee et al 1993, Yu et al 2003, Selvakumaran et al 2003, Ferry et al 2000, Köberle et al 2009). Eine Rolle für XPC, welches an der Initiierung der GG-NER über Schadenserkenung beteiligt ist, konnte nicht nachgewiesen werden. Furuta et al schlossen 2002 hieraus, dass der Unterweg der GG-NER möglicherweise an der Erkennung und Beseitigung von Cisplatin-DNA-Addukten nicht beteiligt ist.

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch eine Arbeit aus dem Jahr 2003, in der Mueller et al unter anderem zeigten, dass sich der Platinierungsgrad der DNA nach Cisplatinbehandlung in Cisplatin-sensitiven und -resistenten testikulären Keimzelltumorzelllinien nicht unterscheidet. Brozovic et al zeigten 2009 in Hamsterzellen, dass möglicherweise das reine Ausmaß an initialer DNA-Platinierung und initialer Schadensverarbeitung nicht voraussagend für die Sensitivität der Zellen gegenüber Cisplatin ist. Andererseits gibt es Studien, die einen Zusammenhang zwischen Ausmaß der DNA-Platinierung und Sensitivität der Zellen gegenüber der Substanz zeigen (Blair et al 2009).

In der vorliegende Arbeit konnten keine Unterschiede in der Expression oder Cisplatin-vermittelten Induktion von XPA oder XPC gezeigt werden, so dass eine im Rahmen der Kurzzeitdifferenzierung mit RA veränderte NER in dem verwendeten Modell zunächst

nicht ursächlich für die verminderte Sensitivität der NTERA-2D1+RA bzw. die Hypersensitivität der NTERA-2D1 zu sein scheint. Eine Beteiligung von ERCC1 im Sinne des limitierenden Faktors der NER in der NTERA-2D1 ist aber natürlich trotzdem möglich und nach der Literatur auch wahrscheinlich (Lee et al 1993, Yu et al 2003, Selvakumaran et al 2003, Ferry et al 2000, Köberle et al 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NTERA-2D1, wird der rasche Eintritt der Apoptose verhindert, dazu in der Lage ist, Platin-Addukte von der DNA zu eliminieren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die verminderte Reparaturkapazität zumindest nicht ausschließlich für die Hypersensitivität der NTERA-2D1 verantwortlich ist. Allerdings zeigt die NTERA-2D1 ein eindeutig weniger effektives Reparatursystem als die deutlich resistenteren Vergleichslinie MCF7. Hier könnte durchaus ein geringerer Spiegel an ERCC1 in der sensitiveren Linie ursächlich sein. Werden die Zellen durch Inhibition der Caspasen am schnellen Zelltod gehindert, kann die NTERA-2D1, wenn auch langsamer als die MCF7, das Platin von der DNA entfernen. Es scheint sich also gewissermaßen um konkurrierende aber sich dennoch unterstützende Systeme zu handeln. Wird der rasche Zelltod verhindert, kommt der zweite Mechanismus der langsamen Reparatur zum Tragen. Das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellzyklusarrest/Reparatur scheint in der NTERA-2D1 in Richtung Apoptose verschoben zu sein. Der Zelltod tritt normalerweise so schnell ein, dass die langsamere Reparatur nur insofern zum Tragen kommt, als sie der Apoptose die notwendige Zeit zur Einleitung und Ausführung des Zelltodes gibt, wobei möglicherweise auch die weniger effiziente Reparatur *per se* zu einem vermehrten Zelltod in der NTERA-2D1 führen könnte.

Nach der Schadenserkennung an der DNA erfolgt die Rekrutierung weiterer Signalproteine wie ATM/CHK1, ATR/CHK2 oder MAPK wie p38 $\alpha$ , die dann entweder Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren (Roos et al 2006, Sancar et al 2004, Abraham 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde in der Expression von ATM und CHK1 kein Unterschied zwischen der NTERA-2D1 oder der NTERA-2D1+RA gefunden.

CHK2 wurde in der NTERA-2D1 jedoch höher exprimiert als in der resistenteren NTERA-2D1+RA. Diese Ergebnisse erinnern an die von Pabla et al 2008 beschriebene Proteinexpression und -funktion in Nierenzellen. Die Nephrotoxizität ist einer der

limitierenden Faktoren in der Tumorbehandlung mit Cisplatin. Pabla et al zeigten 2008, dass an der Cisplatin-induzierten Apoptose als Antwort auf die DNA-Schädigung in Nierenzellen die Aktivierung von ATR/CHK2 mit nachfolgender Aktivierung von p53 eine wichtige Rolle spielt. ATM/CHK1 wird hingegen zwar aktiviert, aber es folgt ein rascher proteosomaler Abbau. Resultate einer Studie von Wilsker et al von 2007 zeigen dagegen eine ausgeprägte Sensitivierung von Kolonkarzinomzellen gegenüber Cisplatin durch ATR-Knockdown, was auf einen zytoprotektiven Effekt von ATR in diesen Tumorzellen hindeutet. Die Bedeutung von ATR/CHK2 scheint somit vom Kontext der spezifischen Zelle abzuhängen. In der NTERA-2D1 ist somit eine zusätzliche p53-Aktivierung über ATR/CHK2 denkbar.

#### **4.5 Die Rolle von p53**

Die Funktion von p53 ist stark abhängig vom vorliegenden Gewebe, dem Zelltyp und der Art des DNA-Stresses (Murray-Zmijewski 2008). Je nach vorliegendem Kontext kann p53 proapoptotische Pathways induzieren, oder die Zelle Richtung Zellzyklusarrest lenken und somit die DNA-Reparatur erlauben (Spierings et al 2004). Die Induktion und Aktivierung von p53 erfolgte in der vorliegenden Arbeit bei der NTERA-2D1 nach Cisplatinbehandlung deutlich rascher, als in der NTERA-2D1+RA. 24 Stunden nach Cisplatinbehandlung hatte der Spiegel von p53 und an Serin 15 phosphoryliertem p53 in der NTERA-2D1+RA die Maximalspiegel der NTERA-2D1 noch nicht erreicht. Ob der Maximalspiegel der NTERA-2D1 in der NTERA-2D1+RA erreicht wird, lässt sich aus der durchgeführten Zeitkinetik nicht sagen, hierzu müssten spätere Zeitpunkte betrachtet werden. Eine rasche Induktion von p53 in testikulären Keimzelltumoren ist beschrieben. (Zamble et al 1998). Auch wurden eine rasche Induktion und ein erhöhter Spiegel des Genprodukts von wtTP53 mit Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien in Zusammenhang gebracht (Lutzker et al 2001). Allerdings gibt es auch Autoren, die eine Beteiligung von p53 an der Hypersensitivität von TGCT nicht als notwendig ansehen (Burger et al 1998). Inwiefern die raschere Induktion von p53 in der NTERA-2D1 in der vorliegenden Arbeit in

Zusammenhang mit der Hypersensitivität der Zelle steht, ist leichter in Kontext mit den anderen p53 direkt und indirekt betreffenden Ergebnissen zu betrachten. Alles in allem deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass p53 im in dieser Arbeit verwendeten Modell eine wichtige Rolle in der Hypersensitivität der Zellen spielt.

TGCT exprimieren im Gegensatz zu vielen anderen soliden Tumoren in der Regel *wtTP53*. Die hohen Spiegel von p53 gehen einher mit einem niederen Level des p53-Gegenspielers MDM2. (di Pietro et al 2005). In Tumorzellen, die das Genprodukt von *TP53*-Wildtyp exprimieren, wird teilweise ein erhöhter MDM2-Spiegel als Ursache einer funktionalen p53-Inaktivität gesehen, so auch in resistenten TGCT (Li et al 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde der p53-Gegenspieler MDM2 in beiden Zellen vergleichbar exprimiert, so dass auch eine funktionale Suppression der proapoptischen p53-Funktion durch MDM2 hier für die Hypersensitivität der NTERA-2D1 keine Rolle zu spielen scheint.

Im Folgenden sollte die Rolle von p53 als Transkriptionsfaktor durch die Analyse von p53-Targets untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte in der NTERA-2D1 im Westernblot keine p21-Induktion nach Cisplatinbehandlung gezeigt werden. In der NTERA-2D1+RA kam es zu einer geringen Induktion, die jedoch im Vergleich zur MCF7 minimal war. In der Analyse der mRNA konnte der Expressionsunterschied in der NTERA-2D1 und der NTERA-2D1+RA sowie der insgesamt sehr geringe Gehalt an *CDKN1A* (für p21 kodierendes Gen) im Vergleich zu Fibroblasten bestätigt werden. Weiter wurde in TGCT ein Verlust von *CDKN1A* in TGCT, eine fehlende p21-Induktion durch Cisplatinbehandlung sowie eine Dysregulation des G1-S-Phase-Checkpoints beobachtet (di Pietro et al 2005). Mandoky et al kamen 2008 zu ähnlichen Ergebnissen, wobei embryonale Keimzelltumore im Gegensatz zu anderen histologischen Subtypen der Keimzelltumore die mit Abstand höchsten p53-Spiegel besaßen und p21 nur gering induziert wurde. Durch fehlende/geringe p21-Induktion kommt es in TCGT nach Cisplatinbehandlung nicht zum Zellzyklusarrest und somit der Möglichkeit zur Reparatur der DNA-Schäden. Weiter weisen einige Studien darauf hin, dass durch p21 nicht nur der Zellzyklus induziert wird sondern auch direkt die Apoptose als Folge von DNA-Schädigung verhindert wird (Gorospe et al 1997, Gervais et al 1998, Levkau et al 1998, Asada et al 1999, Zhang et al 1999, Spierings et al 2004). Interessanterweise wird in der NTERA-2D1 durch Radiatio sehr wohl p21 induziert

(Burger et al 1998.) Li et al zeigten 2010, dass die niedrige p21-Induktion nach p53-Aktivierung in TGCT nicht auf eine fehlende Promotorbindung zurückzuführen ist sondern vielmehr aus bislang nicht geklärten Ursachen heraus eine starke Transkription trotz gebundenen Promotors nicht induziert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte in der NTERA-2D1 keine p21-Induktion auf Cisplatinbehandlung hin gezeigt werden. In der NTERA-2D1+RA kam es zu einer geringen Induktion. Eine Mitbeteiligung der differentiellen p21-Regulation an der Hypersensitivität der NTERA-2D1 scheint durchaus wahrscheinlich und wird durch die Ergebnisse der siRNA-Experimente bestätigt. Dies steht in Einklang mit der Literatur. Allerdings ist die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Differenz nicht so groß, dass sie alleine für den Sensitivitätsunterschied der NTERA-2D1 und der NTERA-2D1+RA verantwortlich sein könnte.

Weiter wurde in der vorliegenden Arbeit die Protein-Expression einiger proapoptotischer p53-Targets (*BBC3/PUMA*, *BAX* und *PMAIP1/NOXA*), die durch genotoxischen Stress induziert werden können, untersucht. Weder für PUMA noch für BAX konnte eine unterschiedliche Induktion und somit eine Erklärung des Sensitivitätsunterschiedes in der NTERA-2D1 und der NTERA-2D1+RA gefunden werden. Das ebenfalls proapoptotische NOXA wurde in der NTERA-2D1 auf Cisplatinbehandlung hin im Gegensatz zur NTERA-2D1+RA aber stark induziert, wobei NOXA teils p53-abhängig induziert wird, teils sein Spiegel durch fehlenden proteosomalen Abbau erhöht wird.

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass p53 neben der transkriptionabhängigen auch eine nichttranskriptionsabhängige proapoptotische Funktion besitzt (Moll et al 2005). Sollte dieser Weg in der NTERA-2D1 eine Rolle spielen, so ist auch hier eine Bedeutung der rascheren p53-Induktion und Aktivierung zu suchen. Um die Rolle von p53 weiter zu untersuchen, wurden die NTERA-2D1 in der vorliegenden Arbeit einerseits mit Pifithrin- $\alpha$ , andererseits mit Pifithrin- $\mu$  behandelt, bevor die Cisplatinbehandlung folgte. Pifithrin- $\alpha$  ist ein Antagonist der transkriptionellen p53-Aktivität im Zellkern, wohingegen Pifithrin- $\mu$  selektiv die zytoplasmatische Funktion von p53 hemmt. Die Pifithrin- $\alpha$ -Behandlung hatte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf das Ausmaß der Cisplatin-induzierten Apoptose in der NTERA-2D1. Die Vorbehandlung mit Pifithrin- $\mu$  dagegen konnte die Apoptose zum Teil hemmen. Dies deutet darauf hin, dass die zytoplasmatische Bedeutung von p53 bei der Cisplatin-induzierten

Apoptoseinduktion der NTERA-2D1 dominant ist. Die fehlende Apoptosehemmung durch Pifithrin- $\alpha$  spricht auf den ersten Blick gegen eine Beteiligung der transkriptionellen Funktion von p53 an der Cisplatin-induzierten Apoptose in der NTERA-2D1, jedoch ist vorstellbar, dass diese potenzielle Bedeutung nicht zum Tragen kommt, da der Apoptoseweg über das zytosolische p53 schneller greift. Eine weitere Erklärung kann sein, dass Pifithrin- $\alpha$  nicht funktionsfähig war. Eine entsprechende Positivkontrolle in diesem Experiment fehlt. Weiter ist denkbar, dass die Wirkung von Pifithrin- $\alpha$  und Pifithrin- $\mu$  nicht vollständig und nicht absolut selektiv auf die jeweilige p53-Funktion wirkt. So ist zum einen eine nur partielle Inhibierung der transkriptionellen Aktivität von p53 durch Pifithrin- $\alpha$  denkbar, andererseits eine partielle Inhibierung von transkriptionellem p53 durch Pifithrin- $\mu$ . Hierfür spricht auch der starke Induktionsunterschied von NOXA (p53-abhängige Transkription) in der NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA.

In der von zytoplasmatischem p53 induzierten Apoptose spielt die Familie der BCL-2-Proteine eine wichtige Rolle. Es gibt antiapoptotische Proteine der BCL-2-Familie, wie BCL-2, BCL-X oder MCL-1 und proapoptotische BCL-2-Proteine wie BAX, BAK, BIM, NOXA, BAD oder PUMA (Philchenkov 2004, Kuwana et al 2002, Kroemer et al 2007). Genotoxischer Stress kann zum Beispiel und u.a. proapoptotische BH3-Proteine induzieren. Bei der Apoptoseempfindlichkeit spielt hierbei unter anderem das Verhältnis von pro- zu antiapoptotischen Proteinen eine Rolle (Reed 2006). Schmelz et al untersuchten Expressionslevel von 19 in Apoptose und Zellzykluskontrolle involvierten Genen in TGCT. Hier zeigte die Arbeitsgruppe, dass Gene, die die Apoptose erleichtern, im Vergleich zu normalem Hodengewebe hoch reguliert waren (z.B. *BAX*). Gene, die die Apoptose hemmen, wie z.B. *BCL2* waren häufig herunter reguliert. (Schmelz et al 2010). Burger et al zeigten 1997 in einer Studie mit 4 TGCT-Linien, dass die BCL-2/BAX-Relation für die Sensitivitätsunterschiede dieser Linien gegenüber Cisplatin nicht verantwortlich war. Zwar wurde in der NTERA-2D1 im Gegensatz zu den anderen Linien eine Hochregulation von BAX in der apoptotischen Zellpopulation gesehen, dies hatte aber in der Studie keinen Einfluss auf die Hypersensitivität und konnte in keiner der anderen Linien nachgewiesen werden (Burger et al 1997). 1998 zeigte dieselbe Arbeitsgruppe, dass auch die unterschiedliche Sensitivität gegenüber Bestrahlung nicht mit der Radiatio-induzierten Expression von

BCL-2, BCL-X, BAX oder BAK korreliert war. Akhtar et al zeigten 2006, dass in neuronalen Vorläuferzellen PUMA und NOXA für den auf genotoxischen Stress folgenden Zelltod mitverantwortlich sind. Allerdings gibt es auch Publikationen, die speziell in TGCT keinen Zusammenhang zwischen der Expression der Proteine der BCL-2-Familie und der Cisplatin-induzierten Apoptose sehen (Burger et al 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte keine unterschiedliche Induktion von PUMA oder BAX in der NTERA-2D1 und der NTERA-2D1+RA gefunden werden. Das ebenfalls proapoptotische NOXA wurde in der NTERA-2D1 auf Cisplatinbehandlung hin dagegen deutlich stärker induziert als in der NTERA-2D1+RA, wobei NOXA teils p53-abhängig induziert wird, teils sein Spiegel durch fehlenden proteosomalen Abbau erhöht wird. p53 kann im Zytosol auch direkt mit Proteinen der BCL-2-Familie interagieren. Hierbei kann es entweder als direkter Aktivator der proapoptotischen BAX und/oder BAK agieren oder indirekt proapoptotisch wirken (Übersicht in Green et al 2009). In diesem Kontext ist durchaus denkbar, dass die oben erwähnte frühere Induktion und Aktivierung von p53 im Zytosol in der NTERA-2D1 nach Cisplatinbehandlung mit der ausgeprägten Hypersensitivität in Zusammenhang steht.

Die exakte Funktion von p53 ist abhängig von Gewebetyp, Zellart und Stimulus (Murray-Zmijewski 2008). Die vorwiegend proapoptotische Transaktivierungsaktivität von p53 in TGCT kann demnach durch Cofaktoren von p53 verursacht sein. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit weiter die p53-Cofaktoren ASPP1, ASPP2 und iASPP untersucht. Die Proteine der ASPP-Familie sind seit einiger Zeit in das Interesse der Forschung gerückt. Die Proteine können durch Bindung an p53 dessen DNA-Affinität modulieren und so die Expression proapoptotischer Gene modulieren. ASPP1 und 2 wirken proapoptotisch, iASPP antiapoptotisch (Samuel-Levs et al 2001, Bergamaschi et al 2004). In der Betrachtung der ASPP-Protein-Familie in der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Vergleich der NTERA-2D1 mit der NTERA-2D1+RA kein Unterschied in der Protein-Expression von ASPP2 und iASPP. ASPP1 dagegen war in der NTERA-2D1 im Westernblot deutlich höher exprimiert, als in der NTERA-2D1+RA. ASPP1 bewirkt durch Bindung an p53 eine erhöhte transkriptionelle Induktion proapoptotischer Proteine. Durch Blockade von *ASPP1* mittels si-RNA war die Cisplatin-induzierte Apoptose in der NTERA-2D1 teilweise zu verhindern. Eine veränderte Expression in verschiedenen Tumorzelllinien mit *TP53*-Wildtyp wurde



von p53 vielmehr proapoptotisch denn pro Zellzyklusarrest/Reparatur fungiert wobei zum einen zytosolisches p53 MOMP induziert, zum anderen p53 transkriptionell vermehrt proapoptotische Zielgene und somit deren Genprodukte induziert (z.B. NOXA, wobei natürlich weitere, im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchte Gene hinzukommen können) wohingegen die Induktion von Zellzyklusaktivierenden Proteinen vermindert ist (p21). In 2 kürzlich veröffentlichten Studien zeigten TGCT eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber Nutlin-3 (Bauer et al 2009, Li et al 2010). Dieses Ergebnis unterstützt die Bedeutung von p53, welches durch Nutlin stabilisiert, also indirekt erhöht wird. Interessant an diesem Ergebnis ist, dass durch Nutlin kein DNA-Schaden induziert wird sondern nur der p53-Abbau verhindert wird. Das bedeutet, dass eine Erhöhung des p53 in den Untersuchungen ausreichend war, um die Apoptose zu induzieren und hierzu keine DNA-Schädigung notwendig war. Auch diese Überlegungen unterstützen die These der in TGCT „scharf gestellten“ Apoptose. Diese „scharf“ gestellte Apoptose ist ein hochinteressanter Ansatz für die pharmakologische Forschung und sollte weiter untersucht werden. Gibt es beispielsweise Möglichkeiten, in weniger sensitiven Tumoren die „Scharfstellung“ der Apoptose pharmakologisch zu induzieren? Ist es denkbar, dass NOXA hierbei als ein Schlüsselprotein fungiert, das möglicherweise in resistenteren Tumoren durch epigenetische Modifikation wie Methylierung stumm geschaltet ist? Kann diese Methylierung medikamentös (z.B. durch Decitabine) aufgehoben und *PMAIP1/NOXA* somit freigeschaltet werden? Welches Potenzial haben BH3-Mimetika (wie z.B. Obatoclax), die eine Bindung von NOXA an MCL-1 hemmen und somit vermehrt NOXA zur Verfügung stellen bzw. eine Kombinationsmedikation mit Decitabine (falls *PMAIP1* hiermit „freizuschalten“ wäre) und einem BH3-Mimetikum? Was ist die Bedeutung von NOXA in anderen *TP53*-Wilytyp tragenden Tumoren? Wird in diesen Zellen durch Erhöhung von NOXA eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber Cisplatin erreicht? Hier eröffnet sich ein interessantes Feld, welches mit Sicherheit viel Potenzial in sich birgt und möglicherweise in einigen Jahren einen wichtigen Beitrag in der systemischen Tumorthherapie darstellen kann.

#### **4.6 Wiederherstellung des hypersensitiven Charakters der NTERA-2D1+RA durch Vorbehandlung mit Substanzen der Prestwick-Library**

Im letzten Teil der Arbeit sollten mögliche Einflüsse einer Vorbehandlung der NTERA-2D1+RA mit anderen Substanzen auf die Sensitivität der Zellen gegenüber Cisplatin untersucht werden. Der Grundgedanke war, durch Vorbehandlung mit einer zweiten Substanz die NTERA-2D1+RA auf das Sensitivitätsniveau der nicht mit RA behandelten NTERA-2D1 zu bringen. Dies würde bedeuten, dass es eine Möglichkeit gäbe, die extreme Hypersensitivität der NTERA-2D1 in der NTERA-2D1+RA zu induzieren, bzw., die durch Kurzzeitdifferenzierung erworbene verminderte Sensitivität umzukehren. Eine Beeinflussung entsprechender Signalwege wäre für die klinische Anwendung von hohem Interesse, da eine pharmakologisch induzierte Hypersensitivität in primär resistenteren Tumoren zu deutlich besseren Ergebnissen führen könnte. Darüber hinaus sind auch andere Beeinflussungen der Cisplatinwirkung im Hinblick auf Begleitmedikationen während der Cisplatinhaltigen Chemotherapie interessant. Die Prestwick-Library wurde ausgewählt, da sie nur Substanzen enthält, die bereits in der Klinik zugelassen sind und so zum einen im Falle eines positiven Ergebnisses eine raschere Einführung im Rahmen einer klinischen Studie denkbar wäre. Andererseits sind einige der Substanzen der Library häufige im klinischen Alltag angewandte Medikamente, so dass eine eventuelle gegenseitige Wirkbeeinflussung der Substanz und Cisplatins für die Therapie durchaus relevant sein kann.

In der Auswertung zeigten sich vier Gruppen von Medikamenten. Die Mehrheit der 1120 Substanzen hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der behandelten Zellen im Vergleich zu den nur mit Cisplatin behandelten NTERA-2D1+RA. Einige der Substanzen waren *per se* extrem toxisch für die NTERA-2D1+RA. Diese Substanzen sollten in weiteren Experimenten in deutlich niedrigerer Konzentration erneut auf ihre Wirkung hin untersucht werden, da ein eventuell synergistischer Effekt unter den gegebenen Umständen nicht erfasst werden konnte.

Weiter gab es eine Reihe an Substanzen, die offenbar einen protektiven Effekt auf die mit Cisplatin behandelten Zellen haben. Als protektiv wurde in der vorliegenden Arbeit ein Überleben gleich der nur mit Cisplatin behandelten Zellen plus 2 Standardabweichungen gewertet. Zu diesen Substanzen zählen u. a. Metronidazol,

Aciclovir und Diazoxid. Auch bei diesen Substanzen sollten weitere Untersuchungen folgen, die die gegenseitige Wirkbeeinflussung näher beleuchten, da eine entsprechende Co-Medikation möglicherweise das Ergebnis der Chemotherapie verschlechtern könnte. Einige wenige Substanzen wiesen einen synergistischen Effekt mit Cisplatin auf. Als synergistisch wurde analog zu oben ein Überleben der co-mediaktiv behandelten Zellen minus 2 Standardabweichungen gewertet. Es handelt sich hierbei um die Substanzen Glibenclamid, Fluphenazindihydrochlorid, Pramoxinhydrochlorid, Tiletaminhydrochlorid, Isometheptene mucate, Nomegestrolacetat und Letrozol. Auch bei diesen Substanzen sollte eine weitere Analyse des Synergismus, der notwendigen Substanzkonzentration und der beteiligten Wege erfolgen um hieraus eventuellen Nutzen im klinischen Alltag ziehen zu können.

Keine der Substanzen konnte die Sensitivität gegenüber Cisplatin in der NTERA-2D1+RA auf das Niveau der nicht mit RA behandelten NTERA-2D1 bringen. Betrachtet man die oben diskutierten Ergebnisse und die daraus erkennbare Rolle von p53, ist denkbar, dass Substanzen, die dieses Resultat mit sich bringen könnten, entscheidend in die Zellzyklusregulatorischen/Apoptoseregulierenden Prozesse einer Zelle eingreifen müssten. Solche Substanzen bergen das Potential, in vivo genotoxisches bzw. kanzerogenes Potenzial zu besitzen. Entsprechende Substanzen werden kaum zur Behandlung am Patienten zugelassen, so dass Substanzen, die den beschriebenen Effekt hervorrufen könnten, in der verwendeten Library wahrscheinlich aufgrund dieser Kriterien nicht vorhanden waren. Diese Überlegungen zeigen auch die eventuell auftretenden Schwierigkeiten einer klinischen Zulassung entsprechender, bestimmten Tumoren gegenüber Chemotherapie stark sensitivierender Substanzen. Die Wiederholung des Versuches mit anderen Zweitsubstanzen wie Kinaseinhibitoren oder Phosphataseinhibitoren könnte das entsprechende Sensitivitätspotenzial erreichen. Allerdings wäre dieses Experiment vor allem interessant, um die relevanten an der Hypersensitivität bzw. Resistenz beteiligten Signalwege zu identifizieren. und hieraus dann in weiteren Schritten die Möglichkeit der pharmakologischen Induktion von Hypersensitivität in Tumorzellen zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Das seit 1978 zugelassene Cisplatin wird als Einzelpräparat oder zusammen mit anderen synergistisch wirkenden Zytostatika für die Behandlung von Hoden-, Ovarial-, Blasen- und Lungenkarzinomen sowie gegen Tumore des Hals-Kopf-Bereichs eingesetzt. Ein besonderer Durchbruch gelang mit der Substanz in der Therapie der testikulären Keimzelltumore, bei denen die Heilungsraten selbst im metastasierten Stadium auf über 80% gesteigert werden konnten. Ursächlich hierfür ist eine ausgesprochene Hypersensitivität dieser embryonalen Keimzelltumoren gegenüber Cisplatin, deren Mechanismus bis heute nicht abschließend geklärt werden konnte. Allerdings gibt es auch bei den testikulären Keimzelltumoren immer wieder Tumore, die schlecht auf Cisplatin ansprechen (entweder primär oder durch erworbene Resistenz). Eine genaue Kenntnis der molekularen Ursachen der Hypersensitivität einerseits und der Resistenzmechanismen andererseits ist für die Medizin von hohem Interesse, da die hieraus gewonnenen Erkenntnisse möglicherweise auf andere, weniger sensitive Tumore übertragbar sind und so potenziell neue und gezielte Ansätze in der Tumorthherapie ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit sollten primäre Mechanismen der Hypersensitivität von testikulären Keimzelltumoren untersucht werden. Hierzu sollte zunächst die Sensitivität der pluripotenten Hodenkarzinomlinie NTERA-2D1 gegenüber Cisplatin im Vergleich zu anderen Tumorzelllinien gezeigt und der molekulare Mechanismus des eingeleiteten Zelltodes charakterisiert werden. Weiter sollte die Frage beantwortet werden, ob, wie vielfach angenommen, eine verminderte DNA-Reparaturkapazität tatsächlich die Schlüsselrolle bei der Hypersensitivität dieser Tumorentität spielt. Für die Untersuchung der Mechanismen der Hypersensitivität sollte ein Modellsystem entwickelt werden, das es ermöglicht, mittels pharmakologischer Modulation der Cisplatinsensitivität sensitive und weniger sensitive Zellen innerhalb eines Zellsystems zu vergleichen. Anhand dieses Modellsystems sollte insbesondere die Cisplatin-abhängige Induktion von Proteinen, die für Reparatur, Apoptose und Zellzyklusarrest relevant sind, verglichen werden.

Die Hypersensitivität der NTERA-2D1 konnte in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Sensitivitätsassays (MTT, Fähigkeit zur Koloniebildung nach

Cisplatinbehandlung, Apoptosemessung mittels Annexin-/PI-Färbung) im Vergleich zu verschiedenen Vergleichslinien bestätigt werden. Hierbei war die NTERA-2D1 etwa eine log-Stufe sensitiver als die sensitivste Vergleichslinie. Die Induktion des Zelltodes war im Vergleich zu einer weiteren embryonalen Keimzelltumorzelllinie, einer Ovarialkarzinomzelllinie und einer Mammakarzinomzelllinie mit ca. 86% Annexin-positiven Zellen nach 13h sehr schnell. Im Vergleich hierzu waren zum selben Zeitpunkt nur ca. 56% der zweiten embryonalen Keimzelltumorzelllinie Annexin-positiv, die Mamma- und die Ovarialkarzinomlinie waren komplett Annexin-negativ und reagierten innerhalb des Messzeitraumes von 26 Stunden auch nicht auf die Cisplatinbehandlung.

Um diese ausgeprägte Hypersensitivität der NTERA-2D1 näher zu charakterisieren wurde in einem ersten Schritt untersucht, inwieweit epigenetische Prozesse hierfür eine Rolle spielen. Deshalb wurde die NTERA-2D1 in der vorliegenden Arbeit zum einen mit dem Methyltransferaseinhibitor Decitabine zum anderen mit dem Histon-Deacetylaseinhibitor SAHA vorbehandelt. Es konnte eine extreme Toxizität von Decitabine alleine auf die NTERA-2D1 gezeigt werden, die auch in der Literatur beschrieben wird. Die Vorbehandlung mit SAHA führte zu einem partiellen Verlust der Hypersensitivität der NTERA-2D1 gegenüber Cisplatin, so dass eine zellspezifische epigenetische Signatur eine gewisse Rolle in der der intrinsischen Hypersensitivität der NTERA-2D1 zu spielen scheint.

Im Weiteren wurden die Mechanismen des beobachteten rapiden Zelltods bei NTERA-2D1 nach Cisplatingabe untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich um einen klassischen mitochondrialen, Caspase-abhängigen Zelltod handelt. So führt die Cisplatinbehandlung der NTERA-2D1 zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, wobei die äußere mitochondriale Membran geschädigt wird, die innere aber intakt bleibt. Darüber hinaus konnte durch Vorbehandlung mit dem Breitbandcaspaseinhibitor zVADfmk der Cisplatin-induzierte Zelltod in der NTERA-2D1 vollständig verhindert werden. Der Versuch einer Beeinflussung des Zelltodes durch FAS-Antagonisten oder Caspase 8-Inhibitor war negativ, so dass in der vorliegenden Arbeit keine Beteiligung des extrinsischen Aktivierungsweges der Apoptose bestätigt werden konnte.

Die Bedeutung von p53 für die Hypersensitivität, welches bei embryonalen Keimzelltumoren gewöhnlich als Produkt von *TP53*-Wildtyp vorliegt, wird in der Literatur kontrovers behandelt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die transkriptionsunabhängige proapoptotische Funktion von p53 eine Rolle in der Hypersensitivität der NTERA-2D1 spielen könnte. So führt eine Vorbehandlung der Zellen mit Pifithrin- $\mu$ , dem Antagonisten des zytosmatischen p53, zu einer deutlichen Reduktion des Cisplatin-induzierten Zelltodes. Pifithrin- $\alpha$  hatte hingegen keinen Einfluss.

Nach wie vor unklar ist auch die Rolle einer möglichen insuffizienten Reparatur der DNA-Platin-Addukte bei TGCT-Zellen, ein Mechanismus, der von vielen Arbeitsgruppen als entscheidend für die Hypersensitivität von TGCT gewertet wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NTERA-2D1, wenn sie durch den Breitbandcaspaseinhibitor zVADfmk am frühzeitigen Zelltod gehindert wird, durchaus in der Lage ist, zwar langsamer als eine resistente MCF7, aber dennoch das Platin suffizient von der DNA zu entfernen. Somit scheinen die Reparaturmechanismen in diesen Zellen funktionell zu sein. Dies deutet darauf hin, dass die rapide Induktion von Apoptose der dominante Mechanismus für die Hypersensitivität ist und die beobachtete Reparaturdefizienz bei TGCT-Zellen zumindest teilweise darauf zurückzuführen ist, dass die Zellen in Apoptose gehen, bevor die Reparatur effektiv eingeleitet werden kann.

Für die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die diesem raschen Zelltod nach Cisplatingabe bei NTERA-2D1-Zellen zugrunde liegen, wurden im Rahmen dieser Arbeit unbehandelte NTERA-2D1-Zellen mit NTERA-2D1 verglichen, die über einen Zeitraum von 48h mit All-trans-Retinolsäure behandelt wurden. All-trans-Retinolsäure bewirkt eine Differenzierung der Zellen, die normalerweise 42-54 Tage benötigt. Durch die Kurzzeitbehandlung konnte eine Minderung der Hypersensitivität um ca. eine log.-Stufe erreicht werden, ohne die Zellmorphologie oder das Wachstum signifikant zu beeinflussen. Dieser Sensitivitätsunterschied bestätigte sich sowohl im Kurzzeitüberleben (MTT, Annexin-Färbung) als auch im Langzeitüberleben (Koloniebildung). Im Folgenden wurden anhand dieses Modellsystems verschiedene Proteine, die relevant für Reparatur, Schadenserkennung und Apoptose sind, vergleichend untersucht. Es wurden keine Unterschiede in der

Schadenserkennungsproteinen XPA und XPC gefunden, auch die Induktion von ATM und CHK1 unterschieden sich nicht voneinander. Allerdings zeigte sich eine leicht vermehrte Induktion von CHK2 in der NTERA-2D1. In der NTERA-2D1 konnte im Vergleich zur NTERA-2D1+RA weiter eine frühere Induktion und Aktivierung von p53 gezeigt werden. Die Genprodukte PUMA und BAX der proapoptotischen Zielgene von p53 *BBC3* und *BAX* waren gleich exprimiert, NOXA hingegen wurde in der undifferenzierten NTERA-2D1-Linie deutlich stärker induziert. Der p53-abhängige Zellzyklusinhibitor p21 war, konform mit der Literatur, in der NTERA-2D1 im Westernblot nicht nachweisbar und wurde auch nicht durch Cisplatin induziert. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Funktion von p53 in der NTERA-2D1 stark proapoptotisch ausgerichtet ist, wohingegen Zellzyklusarrest einleitende Proteine nicht induziert werden.

Um die Ursache dieser einseitigen p53-Funktion zu betrachten wurden die p53-Cofaktoren der ASPP-Familie untersucht. Diese Proteine können durch Bindung an p53 dessen Promotor-Affinität modulieren, wobei ASPP1 und 2 proapoptotisch, iASPP antiapoptotisch wirken. Im vorliegenden Modell konnte gezeigt werden, dass das antiapoptotische iASPP und das proapoptotische ASPP2 in NTERA-2D1 und NTERA-2D1+RA gleich exprimiert wurden. Das ebenfalls proapoptotische ASPP1 hingegen war in der NTERA-2D1 deutlich höher exprimiert. Wurde in der NTERA-2D1 die *ASPP1*-Expression mittels RNA-Interferenz gehemmt, konnte der Cisplatin-induzierte Zelltod teilweise verhindert werden. Somit konnte neben der zytoplasmatischen Bedeutung auch die transkriptionelle Bedeutung von p53 an der Hypersensitivität gegenüber Cisplatin gezeigt werden. Die Bedeutung der Proteine der gesamten BCL-2-Familie (zu denen PUMA, BAX und NOXA gehören) sowie des Histonacetylierungsmusters für die Sensitivität gegenüber Cisplatin sollte in weitergehenden Arbeiten näher untersucht werden, um die zellspezifische p53-Wirkung näher zu charakterisieren und hieraus gegebenenfalls neue Therapieansätze zur Modulation der Sensitivität von resistenten Tumoren gegenüber Chemotherapeutika zu entwickeln.

Im letzten Teil der Arbeit sollte die Bedeutung einer Co-Medikation zur Cisplatingabe untersucht werden. Primäre Frage war, ob durch Vorbehandlung der Modelllinie NTERA-2D1+RA mit einer weiteren Substanz die ursprüngliche Sensitivität der Ausgangslinie wiederhergestellt werden kann. Verwendet wurde die Prestwick-Library,

die 1120 klinisch zugelassene Substanzen erhält. Die Mehrzahl der Substanzen hatte keine Wirkung auf das Sensitivitätsniveau der NTERA-2D1+RA. Einige der Medikamente waren *per se* toxisch für die Zellen. Einige Substanzen wiesen einen protektiven Effekt für die Zellen auf, einige einen synergistischen, wobei keine der Substanzen vermochte, die Zellen auf das Ausgangsniveau zu sensibilisieren. Ursächlich hierfür ist möglicherweise die Auswahl der Library, da Substanzen, die den erwünschten Effekt besäßen, wahrscheinlich in zellzyklusregulatorische Prozesse eingreifen müssten. Dies birgt potentiell genotoxisches, kanzerogenes Potenzial und ist somit ein Gegenargument zur klinischen Zulassung von Medikamenten. Jedoch sollten in weiteren Untersuchungen jene Substanzen, die einen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen hatten (sowohl synergistisch als auch zellprotektiv), näher beleuchtet werden, da eine entsprechende (Haus-) Medikation des Patienten während Chemotherapie einen entscheidenden Einfluss auf das Therapieergebnis haben könnte.

## 6. Literaturverzeichnis

Abraham R. T., Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 2001; 15: 2177-2196

Agirre X., Román-Gómez J., Jiménez-Velasco A., Garate L., Montiel-Duarte C., Navarro G., Vázquez I., Zalacain M., Calasanz M. J., Heiniger A., Torres A., Minna J. D., Prósper F., ASPP1, a common activator of TP53, is inactivated by aberrant methylation of its promoter in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene.* 2006; 25: 1862-1870

Akhtar R. S., Geng Y., Klocke B. J., Latham C. B., Villunger A., Michalak E. M., Strasser A., Carroll S. L., Roth K. A. BH3-Only Proapoptotic Bcl-2 Family Members Noxa and Puma Mediate Neural Precursor Cell Death, *Journal of Neuroscience* 2006; 26: 7257–7264

Alenzi F. Q. Cell type specific expression of the apoptosis stimulating protein (ASPP-2) in human tissues. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2010; 57: 419-429

Andrews P. W. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol.* 1984; 103: 285-293

Asada M., Yamada T., Ichijo H., Delia D., Miyazono K., Fukumuro K., Mizutani S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J.* 1999; 18: 1223-1234

Ashcroft M. and Vousden K. H., Regulation of p53 stability. *Oncogene* 1999; 18: 7637-7643

Basma H., El-Refaey H., Sgagias M. K., Cowan K. H., Luo X., Cheng P.-W. BCL-2 antisense and cisplatin combination treatment of MCF-7 breast cancer cells with or without functional p53. *J. Biomed. Sci.* 2005, 12: 999-1011

Bauer S., Mühlenberg T., Leahy M., Hoiczky M., Gauler T., et al. Therapeutic Potential of Mdm2 Inhibition in Malignant Germ Cell Tumours. *Eur Urol.* 2009 Epub ahead of print

Baylin S. B., Herman J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000; 16: 168–174

Beckerman R., Prives C., Transcriptional regulation by p53., *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2: a000935. Review

Bellon S. F., Coleman J. H., Lippard S. J., DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 1991; 30: 8026-8035

Berdasco M., Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell.* 2010; 19: 698-711

Bergamaschi D., Samuels Y., Jin B., Duraisingham S., Crook T., Lu X., ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 1341–1350

Bergamaschi D., Samuels-Lev Y., O'Neil N., Trigiante G., Crook T., Hsieh J. K., O'Connor D. J., Zhong S., Compargue I., Tomlinson M., Kuwabara P. and Lin X., iASPP oncoprotein is key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat. Genet.* 2003; 33: 162–167

Bestor T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 2395-2402

Beyrouthy J. M., Garner K. M., Hever M. P., Freemantle S. J., Eastman A., Dmitrovsky E., Spinella M. J. High DNA methyltransferase 3B expression mediates 5-Aza-Deoxycytidine hypersensitivity in testicular germ cell tumors. *Cancer Research* 2009; 69: 9360-9366

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21

Blair B. G., Larson C. A., Safaei R., Howell S. B. Copper Transporter 2 Regulates the Cellular Accumulation and Cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4312-4321

Bosl G. J., Motzer R. J., Testicular germ-cell cancer. *N Engl JMed* 1997; 337: 242-254

Boussouar F., Rousseaux S., Khochbin S. A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle.* 2008; 7: 3499-3502

Boyer L. A., Lee T. I., Cole M. F., et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947–956

Bragado P., Armesilla A., Silva A., and Porras A., Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* 2007; 12: 1733-1742

Brozovic A., Damrot J., Tsaryk R., Helbig L., Nikolova T., Hartig C., Osmak M., Roos W. P., Kaina B., Fritz G. Cisplatin sensitivity is related to late DNA damage processing and checkpoint control rather than to the early DNA damage response. *Mutat Res.* 2009; 670: 32-41

Burger H., Nooter K., Boersma A. W., Kortland C. J., van den Berg A. P., Stoter G. Expression of p53, p21/WAF/CIP, Bcl-2, Bax, Bcl-x, and Bak in radiation-induced apoptosis in testicular germ cell tumor lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998; 41: 415-424

Burger H., Nooter K., Boersma A. W., Kortland C. J., Stoter G., Expression of p53, Bcl-2 and Bax in cisplatin-induced apoptosis in testicular germ cell tumour cell lines. *Br J Cancer.* 1998; 77: 1562-1567

Burger H., Nooter K., Boersma A. W., Kortland C. J., Stoter G. Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int. J. Cancer,* 1997; 73: 592-599

Burger H., Nooter K., Boersma A. W., van Wingerden K. E., Looijenga L. H., Jochemsen A. G., Stoter G. Distinct p53-independent apoptotic cell death signalling pathways in testicular germ cell tumour cell lines. *Int. J. Cancer,* 1999; 81: 620-628

Cande C., Cecconi F., Dessen P., Kroemer G., Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathway of cell death? *J Cell Sci* 2002; 115: 4727–4734

Cawley S., Bekiranov S., Ng H.-H., Kapranov P., Sekinger E. A., Kampa D., Piccolboni A., Sementchenko V., Cheng J., Williams A. J., Wheeler R., Wong B., Drenkow J., Yamanaka M., Patel S., Brubaker S., Tammana H., Helt G., Struhl K., Gingeras T. R., Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell*. 2004; 116 : 499-509

Chaganti R. S., Houldsworth J. Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res*. 2000; 60: 1475–1482

Chiou S.-H., Yu C.-C., Huang C.-Y., et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4085–4095.

Chirnomas D., Taniguchi T., de la Vega M., Vaidya A. P., Vasserman M., Hartman A. R., Kennedy R., Foster R., Mahoney J., Seiden M. V., D'Andrea A. D., Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway, *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 952–961

Chipuk J. E., Bouchier-Hayes L., Kuwana T., Newmeyer D. D., Green D. R., PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 2005; 309: 1732-1735

Chipuk, J. E., Green, D. R., Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*. 2006; 13: 994-1002

Chipuk J. E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N. M., Newmeyer D.D., Schuler M, Green D. R., Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004; 303: 1010-1014

Choi M. K., Kim D. D. Platinum transporters and drug resistance. *Arch Pharm Res*. 2006; 29: 1067-1073

Chresta C. M., Masters J. R., Hickman J. A. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. *Cancer Res*.1996; 56: 1834-1841

Colton S. L., Xu X. S., Wang Y. A., Wang G., The involvement of ataxia-telangiectasia mutated protein activation in nucleotide excision repair-facilitated cell survival with cisplatin treatment. *J Biol Chem*. 2006; 281: 27117-27125

Costello J. F., Fruhwald M. C., Smiraglia D. J., Rush L. J., Robertson G. P., Gao X., Wright F. A., Feramisco J. D., Peltomaki P., Lang J. C., Schuller D. E., Yu L., Bloomfield C. D., Caligiuri M. A., Yates A., Nishikawa R., Huang H. S., Petrelli N. J., Zhang X., O'Dorisio M. S., Held W. A., Cavenee W. K., Plass C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*. 2000; 24: 132–138

De Carvalho D. D., You JS, Jones P. A. DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends Cell Biol*. 2010 Oct; 20: 609-617

DeLeo, A. B. Jay G., Appella E., Dubois G. C., Law L. W., Old L. J., Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1979; 76: 2420–2424

Deveraux Q. L., Reed J. C., IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 239-252

di Pietro A., Vries E. G., Gietema J. A., Spierings D. C., de Jong S. Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemo-sensitive solid tumours. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 2437-2456

Du C., Fang M., Li Y., Li L. and Wang X., Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition *Cell* 2000; 102: 33-42

Duale N., Lindeman B., Komada M., Olsen A.-K., Andreassen A., Soderlund E. J., Brunborg G. Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles. *Mol Cancer* 2007; 6: 53

Dumont P., Leu J. I., Della Pietra A. C. 3rd, George D. L., Murphy M., The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003; 33: 357-365

Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463

Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21: 5427-5440

Esteller M., Corn P. G., Baylin S. B., Herman J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-3229

Estep A. L., Palmer C., McCormick F., Rauen K. A. Mutation Analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 Ovarian Cancer Cell Lines: Implications for Therapy. *PLoS One*. 2007; 2: e1279

Faivre S., Chan D., Salinas R., Woynarowska, B., Woynarowski, J. M., DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 66: 225-237

Fan T. J., Han L. H., Cong R. S., Liang J., Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2005; 27: 719-727

Feinberg A. P., Ohlsson R., Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 21–33

Feinberg A. P., Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301: 89-92

Ferry K. V., Hamilton T. C., Johnson S. W., Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: Role of ercc1-xpf. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1305-1313

Fichtinger-Schepman A. M. J., van der Veer J. L., den Hartog J. H. J., Lohman P. H. M., Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*, 1985; 24: 707-713

Fichtinger-Schepman A. M. J., van Oosterom A. T., Lohman P. H. M., Berends F., cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients: quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Research*, 1987; 47: 3000-3004

Fokkema E., Groen H. J., Helder M. N., de Vries E. G., Meijer C. JM216-, JM118-, and cisplatin-induced cytotoxicity in relation to platinum-DNA adduct formation, glutathione levels and p53 status in human tumour cell lines with different sensitivities to cisplatin. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63:1989-1996

Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S. and Orlandini, S. Z., Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 2000; 182: 41-49

Fulda S., Los M., Friesen C. and Debatin K. M., Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int. J. Cancer* 1998; 76: 105-114

Fulda S., Strauss G., Meyer E. and Debatin K. M., Functional CD95 ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells. *Blood*, 2000; 95: 301-308

Fung M. K., Cheung H. W., Ling M. T., Cheung A. L., Wong Y. C., Wang X. Role of MEK/ERK pathway in the MAD2-mediated cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumour cells. *Br J Cancer.* 2006; 95: 475-484

Furuta T., Ueda T., Aune G., Sarasin A., Kraemer K. H., Y. Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair as a Determinant of Cisplatin Sensitivity of Human Cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4899-4902

Galm O., Herman J. G., Baylin S. B. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev* 2006; 20: 1-13

Galusca B., Dumollard J. M., Lassandre S., et al. Global DNA methylation evaluation: potential complementary marker in differential diagnosis of thyroid neoplasia. *Virchows Arch* 2005; 447: 18-23

Gervais J. L., Seth P., Zhang H. Cleavage of CDK inhibitor p21(Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1998; 273: 19207-19212

Gonzalez V. M., Fuertes M. A., Alonso C., and Perez J. M., Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001; 59: 657-663

Gorospe M., Cirielli C., Wang X., Seth P., Capogrossi M. C., Holbrook N. J. *Oncogene* 1997; 14, 929-935

- Gostissa M., Hengstermann A., Fogal V., Sandy P., Schwarz S. E., Scheffner M., Del Sal G. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J.* 1999; 18: 6462-6471
- Gottesman M. M., Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 2002; 53: 615-627
- Green D. R., Kroemer G. Cytoplasmic Functions of the Tumor Suppressor p53 *Nature.* 2009; 458: 1127-1130. Review.
- Gu P., LeMenuet D., Chung A. C. K., Mancini M., Wheeler D. A., Cooney A. J. Orphan nuclear receptor GCNF is required for the repression of pluripotency genes during retinoic acid-induced embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 8507–8519
- Gudkov A. V., Komarova E. A. Dangerous habits of a security guard: the two faces of p53 as a drug target. *Hum Mol Genet.* 2007; 15/16: R67-72
- Hajkova P., Erhardt S., Lane N., et al. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002; 117: 15–23
- Hall M. D., Okabe M., Shen D. W., Liang X. J., Gottesman M. M., The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48: 495-535
- Han J. Y., Chung Y. J., Park S. W., Kim J. S., Rhyu M. G., Kim H. K., Lee K. S., The relationship between cisplatin-induced apoptosis and p53, bcl-2 and bax expression in human lung cancer cells. *Korean J. Int. Med.* 1999; 14: 42-52
- Han S.-J., Ahn T.-K., Choi H.-S., Shin J.-N., Piya S., Kim T.-H., TRAIL-induced cell death and caspase-8 activation are inhibited by cisplatin but not carboplatin. *J Gynecol Oncol.* 2009; 2: 113-116
- Harnicarová Horáková A., Bártová E., Kozubek S. Chromatin structure with respect to histone signature changes during cell differentiation. *Cell Struct Funct.* 2010; 35: 31-44
- Hartwell L. H., Kastan M. B., Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-1828
- Heidenreich A., Schenkman N. S., Sesterhenn I. A., Mostofi K. F., Moul J. W., Srivastava S., Engelmann U. H., Immunohistochemical and mutational analysis of the p53 tumour suppressor gene and the bcl-2 oncogene in primary testicular germ cell tumours. *Apmis* 1998; 106: 90-99, discussion 99–100
- Helleday T., Petermann E., Lundin C., Hodgson B., Sharma R. A., DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 193-204
- Hengartner M. O., The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042-2054
- Hill M. M., Adrain C., Martin S. J., Portrait of a killer: The mitochondrial apoptosome emerges from the shadows *Mol Interv.* 2003; 3: 19-26

Hoglund A., Nilsson L. M., Forshell L. P., Maclean K. H., Nilsson J. A. Myc sensitizes p53-deficient cancer cells to the DNA-damaging effects of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine. *Blood* 2009; 113: 4281–4288

Huang K., Fan G. DNA methylation in cell differentiation and reprogramming: an emerging systematic view. *Regen Med.* 2010 Jul; 5: 531-544

Jaenisch R. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet.* 1997; 13: 293-295

Jaenisch R., Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003; 33 Suppl: 245-254

Jamieson E. R., Lippard S. J., Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev.*, 1999; 99: 2467-2498

Jiang P., Du W., Heese K., Wu M., The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 9071-9082

Jones P. A., Baylin S. B. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683–692

Juliandi B., Abematsu M., Nakashima K. Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation. *Dev Growth Differ.* 2010 Aug; 52: 493-504

Juttermann R., Li E., Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91 :11797–11801

Kaneda Y., Shimamoto H., Matsumura K., Arvind R., Zhang S., Sakai E., Omura K., Tsuchida N., Role of caspase 8 as a determinant in chemosensitivity of p53-mutated head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *J Med Dent Sci.* 2006; 53: 57-66

Kato T., Duffey D. C., Ondrey F. G., Dong G., Chen Z., Cook J. A., Mitchell J. B. and Van Waes C., Cisplatin and radiation sensitivity in human head and neck squamous carcinomas are independently modulated by glutathione and transcription factor NF-kappaB. *Head Neck* 2000; 22: 748-759

Kaufmann S. H. and Earnshaw W. C., Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256: 42-49

Kelekar A. and Thompson C. B., Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1998; 8: 324-330

Kerley-Hamilton J. S., Pike A. M., Li N., DiRenzo J. and Spinella M. J., A p53-dominant transcriptional response to cisplatin in testicular germ cell tumor-derived human embryonal carcinoma. *Oncogene* 2005; 24: 6090–6100

Kersemaekers A. M., Mayer F., Molier M., van Weeren P. C., Oosterhuis J. W., Bokemeyer C., Looijenga L. H. J., Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 1551–1561

Kim R., Minami K., Nishimoto N., Toge T., Enhancement of antitumor effect by intratumoral administration of bax gene in combination with anticancer drugs in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* 2001; 18: 363-367.

Kitagawa R., Kastan M. B. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005; 70: 99-109 Review.

Kitareewan S., Spinella M. J., Allopenna J., Reczek P. R., Dmitrovsky E., 4HPR triggers apoptosis but not differentiation in retinoid sensitive and resistant human embryonal carcinoma cells through an RAR $\gamma$  independent pathway. *Oncogene*, 1999; 18, 5747-5755

Köberle B., Masters J. R., Hartley J. A., Wood R. D. Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol* 1999; 9: 273-276

Köberle B., Roginskaya V., Zima K. S., Masters J. R., Wood R. D. Elevation of XPA protein level in testis tumor cells without increasing resistance to cisplatin or UV radiation. *Mol Carcinog.* 2008; 47: 580-586

Koul S., Houldsworth J., Mansukhani M. M., Donadio A., McKiernan J. M., Reuter V. E., Bosl G. J., Chaganti R. S., Murty V. V. Characteristic promoter hypermethylation signatures in male germ cell tumors. *Mol Cancer.* 2002;1: 8

Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C., Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev* 2007; 87: 99-163

Kruse J. P., Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell.* 2009; 137: 609-622.

Kubbutat M. H., Jones S. N., and Vousden K. H., Regulation of p53 stability by mdm2. *Nature* 1997; 387: 299-303

Kuwana T., Mackey M. R., Perkins G., Ellisman M. H., Latterich M., Schneiter R., Green D. R. and Newmeyer D. D., Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002; 111: 331-342

Lage H., Dietel M., Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 156-165

Lakin N. D., Jackson S. P., Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999; 18: 7644-7655

Lane D. P., Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.

Lane, D. P., Crawford, L. V., T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263

Launay S., Hermine O., Fontenay M., Kroemer G., Solary E., Garrido C., Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 2005; 24: 5137-5148

- Leblanc A., Natural inhibitors of Caspases. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry* 2003; 27: 215-229
- Leu J. I., Dumont P., Hafey M., Murphy M. E., George D. L., Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol.* 2004; 6: 443-450.
- Levkau B., Koyama H., Raines E. W., Clurman B. E., Herren B., Orth K., Roberts J. M., Ross R. Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol. Cell* 1998; 1: 553-563
- Li B., Cheng Q., Li Z., Chen J. p53 inactivation by MDM2 and MDMX negative feedback loops in testicular germ cell tumors. *Cell Cycle* 2010; 2010 December 17; 9(7): 1411-1420.
- Li L. Y., Luo X., Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001; 412: 95-99
- Li J., Sasaki H., Sheng Y. L., Schneiderman D., Xiao C. W., Kotsuji F., Tsang B. K., Apoptosis and chemoresistance in human ovarian cancer: is Xiap a determinant? *Biol Signals Recept.* 2000; 9: 122-130
- Li M., Brooks C. L., Wu-Baer F., Chen D., Baer R., Gu W., Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 2003; 302: 1972-1975
- Lin T., Chao C., Saito S., et al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 165-171
- Link P. A., Baer M. R., James S. R., Jones P. A., Karpf A. R. P53-inducible ribonucleotide reductase (p53R2/RRM2B) is a DNA hypomethylation-independent decitabine gene target that correlates with clinical response in myelodysplastic syndrome/acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2008; 68: 9358-9366
- Linzer D. I. and Levine A. J., Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17: 43-52
- Liu G., Chen X., DNA polymerase eta, the product of the xeroderma pigmentosum variant gene and a target of p53, modulates the DNA damage checkpoint and p53 activation. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 1398-1413
- Liu H., Wang M., Diao S., Rao Q., Zhang X., Xing H., Wang J., siRNA-mediated down-regulation of iASPP promotes apoptosis induced by etoposide and daunorubicin in leukemia cells expressing wild-type p53. *Leuk Res.* 2009; 33: 1243-1248
- Liu J., Uematsu H., Tsuchida N., Ikeda M. A., Association of caspase-8 mutation with chemoresistance to cisplatin in HOC313 head and neck squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 390: 989-994
- Liu Z. J., Lu X., Zhang Y., Zhong S., Gu S. Z., Zhang X. B., Yang X., Xin H. M., Downregulated mRNA expression of ASPP and the hypermethylation of the 5'-untranslated region in cancer cell lines retaining wild-type p53. *FEBS Lett.* 2005; 579: 1587-1590

- Lopez-Serra L., Esteller M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer* 2008; 98: 1881-1885.
- Lu B., Guo H., Zhao J., Wang C., Wu G., Pang M., Tong X., Bu F., Liang A., Hou S., Fan X., Dai J., Wang H., Guo Y., Increased Expression of iASPP, Regulated by Hepatitis B Virus X Protein-Mediated NF- $\kappa$ B Activation, in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2010 Jun 20, Epub ahead of print
- Lutzker S. G. , Mathew R , Taller D. R. A p53 dose-response relationship for sensitivity to DNA damage in isogenic teratocarcinoma cells. *Oncogene*. 2001; 20: 2982-2986
- Lytle R. A., Jiang Z., Zheng X., Rich K. M., BCNU down-regulates anti-apoptotic proteins bcl-xL and Bcl-2 in association with cell death in oligodendroglioma-derived cells. *J. Neuro-Oncol*. 2004; 68: 233-241
- Mandoky L., Szende B., Géczi L., Bodrogi I., Kásler M., Bak M. Apoptosis regulation and spontaneous apoptosis index of testicular germ cell tumors are associated with differentiation and resistance to systemic treatment. *Anticancer Res*. 2008;28:1641-1649
- Marchenko N. D., Moll U. M., The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53. *Cell Cycle* 2007; 6: 1718–1723
- Marchenko N. D., Wolff S., Erster S., Becker K., Moll U. M., Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *Embo J*. 2007; 26: 923-934
- Marchenko N. D., Zaika A., Moll U. M., Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 2000; 275:16202-16212
- Martin L. P., Hamilton T. C. and Schilder R. J., Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways, *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 1291-1295
- Masters J. R., Köberle B. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 517-525
- Mayer F., Gillis A. J., Dinjens W., Oosterhuis J. W., Bokemeyer C., Looijenga L. H., Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res*. 2002; 62: 2758-2760
- Melino G., Braithwaite A. W., Del Sal G. and Lu X., Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death *Cell Death and Differentiation* 2006; 13, 984–993
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P., Moll U. M., p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 2003; 11: 577-590
- Miller Jr W. H., Maerz W. J., Kurie J., Moy D., Baselga J., Lucas D. A., Grippo J. F., Masui H. and Dmitrovsky E., All-trans-retinoic acid and hexamethylene bisacetamide (HMBA) regulate TGF- $\alpha$  and Hst-1/kFGF expression in differentiation sensitive but not in resistant human teratocarcinomas. *Differentiation*, 1994; 55, 145-152.

- Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H. G., Lin H. K., Liebermann D. A., et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9: 1799-1805
- Miyashita T., and Reed J. C., Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-299
- Moasser M. M., DeBlasio A., Dmitrovsky E. Response and resistance to retinoic acid are mediated through the retinoic acid nuclear receptor gamma in human teratocarcinomas. *Oncogene* 1994; 9: 833-840
- Moll U. M., Marchenko N., Zhang X. K., p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene*. 2006; 25: 4725-4743
- Moll U. M., Wolff S., Speidel D., Deppert W., Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17: 631-636
- Momand J., Wu H. H., and Dasgupta G., MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 2000; 242: 15-29
- Morris G. F., Bischoff J. R., and Mathews M. B., Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 895-899
- Moss T. J., Wallrath L. L. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. *Mutat Res* 2007; 618: 163-174
- Muller F. J., Laurent L. C., Kostka D., et al. Regulatory networks define phenotypic classes of human stem cell lines. *Nature* 2008; 455: 401-405
- Mueller T., Mueller L. P., Luetzkendorf J., Voigt W., Simon H., Schmoll H. J. Loss of Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells is associated with induction of cisplatin resistance. *Tumour Biol*. 2006; 27: 71-83
- Mueller T., Voigt W., Simon H., Fruehauf A., Bulankin A., Grothey A. and Schmoll H.-J., Failure of Activation of Caspase-9 Induces a Higher Threshold for Apoptosis and Cisplatin Resistance in Testicular Cancer; *Cancer Res* 2003 ; 63, 513-521
- Muller M., Strand S., Hug H., Heinemann E. M., Walczak H., Hofmann W. J., Stremmel W., Krammer P. H. and Galle P. R., Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest*. 1997; 99: 403-413
- Muller M., Wilder S., Bannasch D., Israeli D., Lehlbach K., Li-Weber M., Friedman S. L., Galle P. R., Stremmel W., Oren M. and Krammer P. H., P53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med*. 1998; 188: 2033-2045
- Murphy P. J. M., Galigniana M. D., Morishima Y., Harrell J. M., Kwok R. P. S., Ljungman M. and Pratt W. B., Pifithrin-a Inhibits p53 Signaling after Interaction of the Tumor Suppressor Protein with hsp90 and Its Nuclear translocation. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 30195-30201

Murray-Zmijewski F., Slee E. A., Lu X., A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9:702-712

Nakano K., and Vousden K. H., PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7: 683-694

Netto G. J., Nakai Y., Nakayama M., et al. Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors. *Mod Pathol* 2008; 21: 1337–1344

Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998; 95: 379–391

Noel E. E., Perry J., Chaplin T., Mao X., Cazier J. B., Joel S. P., Oliver R. T., Young B. D., Lu Y. J. Identification of genomic changes associated with cisplatin resistance in testicular germ cell tumor cell lines. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008; 47: 604-613

Norbury C. J. and Zhivotovsky B., DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 2004; 23: 2797-2808

Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., and Tanaka N., Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288: 1053-1058

Oliner J. D., Pietenpol J. A., Thiagalingam S., Gyuris J., Kinzler K. W., und Vogelstein B., Oncoprotein mdm2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 1993; 362: 857-860

Pabla N., Huang S., Mi Q.-S., Daniel R., Dong Z. ATR-Chk2 Signaling in p53 Activation and DNA Damage Response during Cisplatin-induced Apoptosis *THEJOURNALOFBIOLOGICALCHEMISTRY* 2008; 283: 6572–6583

Pak J. H., Choi W. H., Lee H. M., Joo W. D., Kim J. H., Kim Y. T., Kim Y. M., Nam J. H. Peroxiredoxin 6 overexpression attenuates cisplatin-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *Cancer Invest.* 2011 Jan; 29: 21-28

Palii S. S., Van Emburgh B. O., Sankpal U. T., Brown K. D., Robertson K. D. DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 752–771

Pan G., Thomson J. A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 2007; 17: 42–49

Paquet-Durand F., Tan S., Bicker G., Turning teratocarcinoma cells into neurons: rapid differentiation of NT-2 cells in floating spheres. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003; 142: 161-167

Perez R. P., Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1535-1542

- Perry J., Powles T., Shamash J., Veerupillai A., McGrowder E., Noel E., Lu Y. J., Oliver T., Joel S. The relative activity of cisplatin, oxaliplatin and satraplatin in testicular germ cell tumour sensitive and resistant cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009; 64: 925-933
- Philchenkov A., Caspases.potential targets for regulating cell death. *J. Cell. Mol. Med.* 2004; 8: 432-444
- Piyathilake C. J., Bell W. C., Jones J., et al. Pattern of nonspecific (or global) DNA methylation in oral carcinogenesis. *Head Neck* 2005; 27: 1061–1067
- Piyathilake C. J., Frost A. R., Bell W. C., et al. Altered global methylation of DNA: an epigenetic difference in susceptibility for lung cancer is associated with its progression. *Hum Pathol* 2001; 32: 856–862
- Qin T., Jelinek J., Si J., Shu J., Issa J. P. Mechanisms of resistance to 5-aza-2'deoxyctidine in human cancer cell lines. *Blood* 2009; 113: 659–667
- Rabik C. A., Dolan M. E., Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *CancerTreat Rev* 2007; 33: 9-23
- Reed J. C., Proapoptotic multidomain Bcl-2/bax-family proteins: mechansims, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Diff.* 2006; 13: 1378-1386
- Reik W., Dean W., Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001; 293: 1089–1093
- Richards E. J., Elgin S. C. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 2002; 108: 489-500
- Riedl S. J., Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5: 897-907
- Rodriguez M. S., Desterro J. M., Lain S., Midgley C. A., Lane D. P., Hay R. T., SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J.* 1999; 18: 6455- 6461
- Roos W. P. and Kaina B., DNA Damage-Induced Cell Death by Apoptosis. *Trends. Mol Med* 2006; 12: 440-450
- Rossi D., Gaidano G., Messengers of cell death: apoptotic signalling in health and disease. *Haematologica/Journal of haematology* 2003; 88: 212-218
- Roy N., Deveraux Q. L., Takahashi R., Salvesen G. S. and Reed J. C., The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997 ; 16: 6914-6925
- Rozencweig M., von Hoff D. D., Slavik M., Muggia F. M., Cis-diamminedichloroplatinum (II). A new anticancer drug. *Ann Intern Med.* 1977; 86: 803-812
- Rozenfeld-Granot G., Krishnamurthy J., Kannan K., Toren A., Amariglio N., Givol D. and Rechavi G., A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of Apaf-1 by p53 and the coactivator Zac-1. *Oncogene* 2002; 21: 1469-1476

Safaei R., Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett.* 2006; 234: 34-39

Safaei R., Howell S. B., Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53: 13-23

Samuels-Lev Y., O'Connor D. J., Bergamaschi D., Trigiante G., Hsieh J. K., Zhong S., Campargue I., Naumovski L., Crook T., and Lu X., ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol. Cell* 2001; 8; 781-794

Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Unsal-Kacmaz K., and Linn S., Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 2004; 73: 39-85

Sanosaka T., Namihira M., Nakashima K. Epigenetic mechanisms in sequential differentiation of neural stem cells. *Epigenetics.* 2009; 4: 89-92

Santini V., Gozzini A., Ferrari G. Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular and Biological Activity as a Premise to Current Drug Metabolism, 2007; 8: 383-394

Sayan B. S., Sayan A. E., Knight R. A., Melino G., and Cohen G. M., p53 is cleaved by caspases generating fragments localizing to mitochondria. *J Biol Chem* 2006; 281: 13566-13573

Schmelz H. U., Port M., Stockinger M., Ruf C., Martinscheck A., Sparwasser C., Weidner W., Abend M., Testis cancer cells have a genetic determination for a high sensitivity to apoptosis inducing stimuli. *Urol Oncol.* 2010; 28: 49-58

Schulz W. A., Hoffmann M. J. Transcription factor networks in embryonic stem cells and testicular cancer and the definition of epigenetics. *Epigenetics* 2007; 2: 37-42

Selvakumaran M., Pisarcik D. A., Bao R., Yeung A. T., Hamilton T. C., Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 2003; 63: 1311-1316

Seoane J., Le H. V. and Massague J., Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 2002; 419: 729-734

Seol D. W., Li J., Seol M. H., Park S. Y., Talanian R. V., Billiar T. R., Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res* 2001; 61: 1138-1143

Sergent C., Franco N., Chapusot C., Lizard-Nacol S., Isambert N., Correia M., Chauffert B. Human colon cancer cells surviving high doses of cisplatin or oxaliplatin in vitro are not defective in DNA mismatch repair proteins. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002 Jun; 49: 445-452

Siddik Z. H., Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265-7279

Skorta I., Oren M., Markwardt C., Gutekunst M., Aulitzky W. E., van der Kuip H., Imatinib Mesylate Induces Cisplatin Hypersensitivity in Bcr-Abl+ Cells by Differential Modulation of p53 Transcriptional and Proapoptotic Activity. *Cancer Res* 2009; 69: 9337–9345

Soares J., Pinto A. E., Cunha C. V., et al. Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer* 1999; 85: 112–118

Soini Y., Paakko P., Extent of apoptosis in relation to p53 and bcl-2 expression in germ cell tumors. *Hum. Pathol.*, 1996; 27: 1221-1226

Song H., Xin X. Y., Xiao F., Wang D. T., Han X., Guo H. L., Influence of survivin gene repression by RNA interference on the radiosensitivity and chemosensitivity to cisplatin of cervical cancer cell HeLa. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2006; 41: 554-558

Sperandio S., de Belle I. and Bredesen D. E., An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 14376-14381

Sperger J. M., Chen X., Draper J. S., Antosiewicz J. E., Chon C. H., et al. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13350-13355

Spierings D. C. J., de Vries E. G. E., Stel A. J., te Rietstap N., Vellenga E., de Jong S. Low p21Waf1/Cip1 protein level sensitizes testicular germ cell tumor cells to Fas-mediated apoptosis. *Oncogene* 2004; 23: 4862–4872

Spierings D. C., de Vries E. G. E., Vellenga E., de Jong S., Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line *Cell Death and Differentiation* 2003; 10: 808–822

Strahl B. D., Allis C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-45

Strobel T., Swanson L., Korsmeyer S., Cannistra S. A., BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93: 14094-14099

Sugars K. L., Budhram-Mahadeo V., Packham G., Latchman D. S., A minimal Bcl-x promoter is activated by Brn-3a and repressed by p53. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 4530-4540

Sun Q., Sakaida T., Yue W., Gollin S. M., Yu J., Chemosensitization of head and neck cancer cells by PUMA. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6: 3180-3188

Surani M. A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line *Cell* 1998; 93:309-312

Susin S. A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Constantini P., Ferri K. F., Irinipoulou T., Prevost M. C., Brothers G., Mak T. W., Penninger J., Earnshaw W. C., Kroemer G., Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192: 571-580

Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M., Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature*. 1999; 397: 441-446

Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 2001; 8: 613-621

Suzuki H., Watkins D. N., Jair K. W., Schuebel K. E., Markowitz S. D., Chen W. D., Pretlow T. P., Yang B., Akiyama Y., Van Engeland M., Toyota M., Tokino T., Hinoda Y., Imai K., Herman J. G., Baylin S. B. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 417-422.

Tan T., Chu G., p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 3247-3254

Tanaka Y., Era T., Nishikawa S.-I., Kawamata S. Forced expression of Nanog in hematopoietic stem cells results in a  $\gamma\delta$ T-cell disorder. *Blood* 2007; 110: 107-115

Taniguchi T., Tischkowitz M., Ameziane N., Hodgson S. V., Mathew C. G., Joenje H., Mok S. C., D'Andrea A. D., Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med* 2003; 9: 568-574

Tirrò E., Consoli M. L., Massimino M., Manzella L., Frasca F., Sciacca L., Vicari L., Stassi G., Messina L., Messina A., Vigneri P., Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells. *Cancer Res*. 2006; 66: 4263-4272

Tomita Y., Marchenko N., Erster S., Nemajerova A., Dehner A., Klein C., Pan H., Kessler H., Pancoska P., Moll U. M., WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem*. 2006; 281: 8600-8606

Tovar C., Rosinski J., Filipovic Z., Higgins B., Kolinsky K., Hilton H., Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 1888-1893

Toyozumi Y., Arima N., Izumaru S., Kato S., Morimatsu M., Nakashima T., Loss of caspase-8 activation pathway is a possible mechanism for CDDP resistance in human laryngeal squamous cell carcinoma, HEP-2 cells. *Int J Oncol*. 2004; 25: 721-728

Turaga K., Acs G., Laronga C. Gene expression profiling in breast cancer. *Cancer Control*. 2010 Jul; 17: 177-182. Review.

Unger T, Juven-Gershon T, Moallem E, Berger M, Vogt Sionov R, Lozano G, Oren M, Haupt Y. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J*. 1999;18:1805-1814

- Usanova S., Piée-Staffa A., Sied U., Thomale J., Schneider A., Kaina B., Köberle B., Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression. *Mol Cancer*. 2010 Sep 16; 9: 248
- Vaisman A., Varchenko M., Umar A., Kunkel T. A., Risinger J. I., Barrett J. C., Hamilton T. C. and Chaney S. G., The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adduct. *Cancer Res*. 1998; 58: 3579–3585
- van der Zee A. G., Hollema H. H., de Bruijn H. W., Willemsse P. H., Boonstra H., Mulder N. H., Aalders J. G., de Vries E. G. Cell biological markers of drug resistance in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1995 Aug; 58: 165-178.
- Vaseva A. V. and Moll U. M., The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1787: 414-420
- Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J. and Vaux D. L., Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102: 43-53
- Vogelstein B., Lane D. and Levine A. J., Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307–310
- Wang D., Lippard S. J., Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4: 307-320
- Wang H., Qian H., Yu J., Zhang X., Zhang L., Fu M., Liang X., Zhan Q., Lin C., Administration of PUMA adenovirus increases the sensitivity of esophageal cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Biol Ther*. 2006; 5: 380-385
- Willis S. N. and Adams J. M., Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2005; 17: 617-625
- Willis S. N., Chen L., Dewson G., Wei A., Naik E., Fletcher J. I., Adams J. M., Huang D. C., Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*. 2005; 19: 1294-1305
- Wilsker D., Bunz F., Loss of ataxia telangiectasia mutated- and Rad3-related function potentiates the effects of chemotherapeutic drugs on cancer cell survival. *Mol Cancer Ther*. 2007 Apr; 6: 1406-1413.
- Wilson C., Yang J., Strefford J. C., Summersgill B., Young B. D., Shipley J., Oliver T., Lu Y. J. Overexpression of genes on 16q associated with cisplatin resistance of testicular germ cell tumor cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005 Jun; 43: 211-216
- Wolff S., Erster S., Palacios G., Moll U. M. p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell Res*. 2008; 18: 733-744

- Wong J. C., Alon N., Mckerlie C., Huang J. R., Meyn M. S., Buchwald M., Targeted disruption of exons 1-6 of the Fanconi Anemia group A leads to growth retardation. Strain-specific microphthalmia, meiotic defects and primordial germ cell hypoplasia. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12, 2063-2076
- Wu X., Bayle J. H., Olson D., and Levine A. J., The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, 1993; 7: 1126-1132
- Xu J. H., Pan C. B., Huang H. Z., Zhang B., Wang J.G., Zhang L. T., Silencing of survivin gene enhances chemosensitivity of human tongue cancer cell line Tca8113 to cisplatin. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2007; 42: 280-283
- Yang X., Fraser M., Moll U. M., Basak A., and Tsang B. K., Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway. *Cancer Res* 2006; 66: 3126-3136
- You J. S., Kang J. K., Seo D. W., Park J. H., Park J. W., Lee J. C., Jeon Y. J., Cho E. J., Han J. W. Depletion of embryonic stem cell signature by histone deacetylase inhibitor in NCCIT cells: involvement of Nanog suppression. *Cancer Res.* 2009; 69: 5716-5725
- Youle R. J. and Strasser A., The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2008; 9, 47-59
- Yu J. J., Lee K. B., Mu C., Li Q., Abernathy T. V., Bostick-Bruton F. and Reed E., Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int J Oncol* 2000; 16: 555-560
- Yu J., Yue W., Wu B., Zhang L., PUMA sensitizes lung cancer cells to chemotherapeutic agents and irradiation. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 2928-2936
- Zamble D. B., Jacks T., Lippard S. J. p53-Dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 6163-6168
- Zhang Y., Fujita N., Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene.* 1999 Feb 4; 18: 1131-1138.
- Zhao J., Wu G., Bu F., Lu B., Liang A., Cao L., Tong X., Lu X., Wu M., Guo Y., Epigenetic silence of ankyrin-repeat-containing, SH3-domain-containing, and proline-rich-region-containing protein 1 (ASPP1) and ASPP2 genes promotes tumor growth in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2010; 51: 142-153
- Zhu W., Hileman T., Ke Y., et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21 pathway to inhibit cell proliferation. *J Biol Chem* 2004; 15: 15161-15166

## 7. Anhang

**Tabelle 1**

	survival			
	[% of untreated contr]			
	in present of			
	substance	substance		
substance	98,8	+cisPt	Cis+2xSD	Cis-2xSD
Azaguanine-8	72,321	60,403		
Meticrane	97,350	82,042		
Sulfaphenazole	100,116	88,845		
Chloramphenicol	99,807	84,089		
Procaine hydrochloride	96,742	86,252		
Trichlorfon	95,874	81,326		
Morantel tartrate	104,091	87,001		
Todralazine hydrochloride	108,947	87,325		
Allantoin	92,795	83,076		
Benzonatate	98,970	90,552		
Panthenol (D)	101,991	94,109		
Epirizole	102,867	94,362		
Moxisylyte hydrochloride	99,522	87,513		
Carbamazepine	101,547	88,218		
Homatropine hydrobromide (R,S)	106,807	90,547		
Imipramine hydrochloride	109,778	89,265		
Acetazolamide	90,589	89,736		
Hydroflumethiazide	93,852	91,612		
Sulfadiazine	95,581	90,338		
Diprophylline	98,970	88,517		
Betazole hydrochloride	96,170	88,073		

Triflupromazine hydrochloride	92,664	80,458		
Nifedipine	97,790	80,724		
Sulindac	103,204	87,116		
Metformin hydrochloride	93,663	88,183		
Sulfacetamide sodic hydrate	103,396	87,251		
Norethynodrel	100,292	85,152		
Triamterene	101,765	90,749		
Isoxicam	101,464	83,705		
Mefenamic acid	105,011	83,806		
Chlorpromazine hydrochloride	89,914	72,400		
Amitryptiline hydrochloride	106,601	83,723		
Atracurium besylate	93,950	89,766		
Heptaminol hydrochloride	101,419	88,733		
Thiamphenicol	92,932	84,491		
Dapsone	96,159	83,310		
Naproxen	98,661	85,416		
Acetohexamide	104,208	87,761		
Diphenhydramine hydrochloride	111,803	89,766		
Adiphenine hydrochloride	107,703	85,967		
Isoflupredone acetate	95,021	91,004		
Sulfathiazole	100,895	86,089		
Cimetidine	104,124	89,139		
Troleandomycin	101,623	87,642		
Naphazoline hydrochloride	102,766	86,215		
Sulpiride	104,406	83,946		
Minaprine dihydrochloride	106,721	88,080		

Dibucaine	108,514	83,331		
Amiloride hydrochloride dihydrate	93,055	91,029		
Levodopa	105,430	96,927		
Doxylamine succinate	100,683	86,013		
Pyrimethamine	94,285	83,769		
Ticlopidine hydrochloride	93,721	80,712		
Benoxinate hydrochloride	102,774	81,346		
Miconazole	100,543	77,421		
Prednisone	100,775	83,090		
Amprolium hydrochloride	88,043	84,497		
Idoxuridine	99,243	78,195		
Ethambutol dihydrochloride	96,608	82,545		
Hexamethonium dibromide dihydrate	99,676	81,980		
Dicyclomine hydrochloride	97,035	78,689		
Oxethazaine	90,461	73,756		
Isoxsuprine hydrochloride	104,942	82,988		
Thioridazine hydrochloride	50,959		62,827	
Hydrochlorothiazide	94,438	78,018		
Captopril	104,272	79,362		
Antipyrine	104,258	81,245		
Diflunisal	105,753	78,505		
Amyleine hydrochloride	102,099	79,121		
Pheniramine maleate	109,226	79,254		
Acebutolol hydrochloride	106,618	83,064		
Diphemanil methylsulfate	107,795	80,446		
Sulfaguanidine	95,024	80,391		
Minoxidil	101,525	77,860		

Antipyrine, 4-hydroxy	118,524	94,752		
Niclosamide	37,496	34,418		
Lidocaine hydrochloride	98,560	80,788		
Tolazoline hydrochloride	107,081	81,771		
Tolnaftate	115,613	84,573		
Trimethobenzamide hydrochloride	109,655	82,145		
Metronidazole	95,912		120,979	
Khellin	102,881	93,441		
R(-) Apomorphine hydrochloride hemihydrate	76,892		86,937	
Naloxone hydrochloride	102,841	93,462		
Bromocryptine mesylate	95,160	86,343		
Glipizide	99,545	90,783		
Verapamil hydrochloride	101,093	94,741		
Erythromycin	114,980	91,030		
Cotinine (-)	99,015		115,983	
Zimelidine dihydrochloride monohydrate	102,307		107,025	
Amoxapine	95,924	92,033		
Metolazone	92,758		93,891	
Metanephrine hydrochloride DL	99,818	77,187		
Loxapine succinate	96,527	77,100		
Dipyridamole	102,460	96,641		
Oleandomycin phosphate	98,560	78,487		
Edrophonium chloride	101,611		105,027	
Azacyclonol	106,947	95,349		
Cyproheptadine hydrochloride	101,031	89,652		

Ciprofloxacin hydrochloride	100,951	96,711		
Dehydrocholic acid	102,129	99,821		
Hydroxyzine dihydrochloride	105,556	94,987		
Chlorhexidine	44,705	43,355		
Midecamycin	108,336	92,939		
Moroxidine hydrochloride	94,147		111,162	
Azathioprine	103,376	101,081		
Famotidine	105,249	96,706		
Ampicillin trihydrate	103,815	88,867		
Hesperetin	104,851	94,275		
Diltiazem hydrochloride	100,643	88,386		
Loperamide hydrochloride	98,002	84,513		
Josamycin	98,605	89,730		
Baclofen (R,S)	98,263	91,024		
Lynestrenol	101,316	97,576		
Danazol	100,678	91,518		
Haloperidol	104,783	92,224		
Perphenazine	79,196	77,889		
Methotrexate	95,080	84,583		
Chlortetracycline hydrochloride	104,640	88,916		
Paclitaxel	62,314	67,422		
Acyclovir	93,782		96,854	
Guanabenz acetate	95,006	88,690		
Nicorandil	104,105	98,232		
Naltrexone hydrochloride dihydrate	101,121	91,751		
Mefloquine hydrochloride	59,598	45,963		
Astemizole	13,072	10,595		

Tamoxifen citrate	94,124	79,948		
Ivermectin	101,087	89,659		
Diazoxide	100,609		102,321	
Disulfiram	92,148	73,722		
Tomatine	16,768	10,108		
Chlorpheniramine maleate	102,727	86,119		
Isoconazole	101,076	87,270		
Clindamycin hydrochloride	103,797	85,454		
Nicergoline	98,331	87,723		
Gallamine triethiodide	99,304	89,194		
Amidopyrine	97,722	96,123		
Acetylsalicylsalicylic acid	98,554	87,653		
Nomifensine maleate	99,339	87,200		
Nalbuphine hydrochloride	96,043	85,383		
Spirolactone	96,271	79,099		
Terfenadine	6,821	8,510		
Canrenoic acid potassium salt	104,053	88,196		
Neomycin sulfate	103,546	86,288		
Ursolic acid	97,267	92,664		
Mianserine hydrochloride	101,708	97,463		
Dizocilpine maleate	98,776	90,606		
Picotamide monohydrate	96,794	88,253		
Pirenzepine dihydrochloride	96,191	85,588		
Cefotaxime sodium salt	101,286	89,051		
Thiopropazine dimesylate	97,961	86,995		
Dihydrostreptomycin sulfate	102,965	90,649		

Pindolol	96,749	86,372		
Nocodazole	66,773	68,137		
Acenocoumarol	99,209	95,025		
Triamcinolone	98,223	88,027		
Dexamethasone acetate	100,410	85,517		
Tetracycline hydrochloride	103,495	85,391		
Dihydroergotamine tartrate	100,410	86,754		
Gentamicine sulfate	107,263	84,818		
Isoniazid	99,700	77,064		
Tranexamic acid	104,624	79,375		
Ampyrone	104,994	82,277		
Midodrine hydrochloride	99,633	82,560		
Ranitidine hydrochloride	102,495	79,344		
Piroxicam	102,843	81,591		
Norfloxacin	99,392	85,582		
Etodolac	104,793	81,402		
Pentylentetrazole	103,932	87,769		
Etofylline	104,396	89,863		
Levamisole hydrochloride	106,418	95,640		
Thalidomide	99,530	91,926		
Tiratricol, 3,3',5-triiodothyroacetic acid	102,499	90,487		
Pyrantel tartrate	103,660	91,144		
Antimycin A	98,999	87,179		
Scopolamin-N-oxide hydrobromide	101,874	88,519		
Chlorzoxazone	105,655	82,308		
Tranlycypromine hydrochloride	106,508	89,551		
Pargyline hydrochloride	101,843	87,180		
Oxolinic acid	99,414	86,242		

Flufenamic acid	106,249	88,554		
Fenspiride hydrochloride	103,628	90,518		
Xylometazoline hydrochloride	108,365	90,608		
Hyoscyamine (L)	105,968	86,458		
Ornidazole	106,570	88,331		
Alverine citrate salt	105,865	86,554		
Methocarbamol	104,369	81,998		
Nimesulide	99,633	85,461		
Flumequine	102,222	82,279		
Gemfibrozil	101,303	89,084		
Oxymetazoline hydrochloride	103,838	91,642		
Chlorphensin carbamate	103,503	89,672		
Ethosuximide	101,941	83,275		
Aceclofenac	102,030	82,340		
Aztreonam	100,021	83,337		
Hydrastinine hydrochloride	100,401	82,058		
Tolfenamic acid	103,124	81,747		
Mefexamide hydrochloride	100,816	83,058		
Nifenazone	103,231	83,057		
Metampicillin sodium salt	103,959	78,938		
Mafenide hydrochloride	102,748	84,183		
Iproniazide phosphate	103,173	84,745		
Cloxacillin sodium salt	103,124	83,745		
Pentoxifylline	103,066	82,840		
Meclofenamic acid sodium salt monohydrate	107,526	85,897		
Tiapride hydrochloride	101,843	84,342		
Griseofulvin	100,419	83,123		

Dilazep dihydrochloride	103,419	83,119		
Riluzole hydrochloride	93,731	75,567		
Sulfamethoxazole	97,794	78,815		
Nalidixic acid sodium salt hydrate	96,044	77,472		
Metaraminol bitartrate	96,705	80,776		
Kawain	97,557	80,464		
Mebendazole	51,475	51,921		
Clemizole hydrochloride	100,155	79,496		
Ofloxacin	99,503	82,647		
Nitrofurantoin	95,696	80,400		
Mephesisin	99,441	81,773		
Pentolinium bitartrate	101,294	83,738		
Salbutamol	105,923	83,644		
Trimethoprim	106,249	82,802		
Fenbufen	104,646	84,177		
Tropicamide	105,472	86,295		
Lomefloxacin hydrochloride	105,137	84,109		
Hydralazine hydrochloride	96,066	81,803		
Phenformin hydrochloride	97,803	79,465		
Aminopurine, 6-benzyl	100,396	79,152		
Prilocaine hydrochloride	101,803	78,747		
Metoclopramide monohydrochloride	103,097	79,837		
Ketoprofen	103,423	77,062		
Nefopam hydrochloride	102,039	79,181		
Orphenadrine hydrochloride	102,106	78,308		
Phenelzine sulfate	97,749	75,501		
Flutamide	95,700	78,341		

Tolbutamide	98,347	80,123		
Camptothecine (S,+)	18,606	12,419		
Fenbendazole	50,461	48,455		
Indapamide	99,102	77,345		
Phentolamine hydrochloride	102,110	83,676		
Proglumide	95,276	77,308		
Mexiletine hydrochloride	100,738	92,049		
Chlorothiazide	101,185	92,028		
Ethisterone	69,600	69,715		
Vincamine	109,062	91,835		
Fludrocortisone acetate	105,997	88,446		
Dantrolene sodium salt	97,521	86,071		
Lisinopril	105,791	89,199		
Ifenprodil tartrate	107,474	88,792		
Flavoxate hydrochloride	96,179	92,465		
Diphenidol hydrochloride	102,743	98,311		
Triprolidine hydrochloride	102,457		100,871	
Indomethacin	100,132		99,206	
Fenoterol hydrobromide	102,557	96,802		
Trazodone hydrochloride	105,442	93,399		
Lincomycin hydrochloride	104,883	92,191		
Flunarizine dihydrochloride	111,238	91,028		
Bufexamac	100,003	96,914		
Norethindrone	93,743	88,813		
Doxepin hydrochloride	96,893	93,849		
Cortisone	101,112	96,279		
Homochlorcyclizine dihydrochloride	99,000	92,191		
Glafenine hydrochloride	98,287	94,584		

Telenzepine dihydrochloride	95,575	89,439		
Trifluoperazine dihydrochloride	94,881	84,799		
Glutethimide, para-amino	103,557	89,617		
Nortriptyline hydrochloride	97,292	89,148		
Dyclonine hydrochloride	95,194	91,097		
Prednisolone	94,388	91,871		
Diethylcarbamazine citrate	94,229	88,355		
Pimethixene maleate	95,241	85,188		
Econazole nitrate	94,682	77,392		
Enalapril maleate	98,894	86,450		
Dropropizine (R,S)	103,677	96,006		
Niflumic acid	101,890	91,293		
Dimenhydrinate	101,065	94,817		
Fenofibrate	98,919	90,988		
Chenodiol	97,054	89,431		
Pergolide mesylate	99,199	88,355		
Bupivacaine hydrochloride	101,405	85,813		
Minocycline hydrochloride	100,971	81,148		
Pinacidil	105,969	98,810		
Isotretinoin	102,936	95,268		
Disopyramide	98,286	92,773		
Bumetanide	102,651	96,980		
Perhexiline maleate	21,057	19,687		
Acemetacin	103,577	89,708		
Clemastine fumarate	101,271	87,166		
<b>Glibenclamide</b>	<b>143,292</b>			<b>87,719</b>
Albendazole	71,573		86,399	
Retinoic acid	98,613	96,057		

Clotrimazole	85,912	83,897		
Labetalol hydrochloride	96,628	91,511		
Oxybutynin chloride	99,939	89,108		
Benzydamine hydrochloride	99,420	86,686		
Oxytetracycline dihydrate	103,484	90,017		
Guanethidine sulfate	113,617	86,704		
Clonidine hydrochloride	109,373	99,192		
Antazoline hydrochloride	103,850	91,282		
Vinpocetine	98,467	91,242		
Cinnarizine	97,140	88,104		
Spiperone	92,083	76,093		
Fipexide hydrochloride	99,339	87,286		
Pimozide	94,468	82,664		
Quinacrine dihydrochloride dihydrate	26,961	16,578		
Bupropion hydrochloride	109,979		106,755	
Ethacrynic acid	106,435	98,864		
Clomipramine hydrochloride	90,057	90,682		
Methylprednisolone, 6- alpha	99,792	90,959		
Pyrilamine maleate	101,231	89,071		
Mifepristone	99,280	90,304		
Amodiaquin dihydrochloride dihydrate	94,522	77,243		
Clofilium tosylate	94,108	71,141		
Alprenolol hydrochloride	102,890	90,817		
Praziquantel	104,337	87,442		
Fendiline hydrochloride	81,575	75,661		
Quinidine hydrochloride	100,626	93,242		

monohydrate				
Sulfinpyrazone	99,699	86,835		
Diperodon hydrochloride	96,275	88,566		
Mebeverine hydrochloride	100,732	83,762		
Fluphenazine dihydrochloride	126,904			74,421
Streptomycin sulfate	105,908	75,195		
Tremorine dihydrochloride	110,932	80,533		
Furosemide	113,100	77,270		
Chlorthalidone	113,373	76,857		
Bambuterol hydrochloride	111,309	75,133		
Ketotifen fumarate	116,116	81,930		
Lidoflazine	103,117	77,329		
Terbutaline hemisulfate	97,320	67,516		
Alfuzosin hydrochloride	116,686	80,079		
Practolol	119,139	82,724		
Methapyrilene hydrochloride	115,157	79,416		
Dobutamine hydrochloride	120,784	78,103		
Betamethasone	108,789	73,101		
Debrisoquin sulfate	106,196	86,149		
Betaxolol hydrochloride	106,609	78,832		
Ketanserine tartrate hydrate	111,537	78,088		
Chlorpropamide	105,105	76,001		
Zidovudine, AZT	109,795	78,195		
Desipramine hydrochloride	109,743	77,175		
Enoxacin	109,040	75,198		
Colchicine	23,318	18,877		
Amethopterin (R,S)	70,389	74,074		
Nicardipine hydrochloride	101,750	75,399		
Hemicholinium bromide	101,632	70,367		

Phenylpropanolamine hydrochloride	104,743	82,170		
Sulfisoxazole	101,749	94,101		
Clorgyline hydrochloride	100,772	77,273		
Clopanide	104,995	78,032		
Metergoline	104,493	85,322		
Methylergometrine maleate	103,589	79,410		
Probucol	108,484	80,776		
Kanamycin A sulfate	95,918	72,047		
Ascorbic acid	100,817	77,406		
Zaprinast	104,955	80,698		
Clenbuterol hydrochloride	102,483	78,864		
Hycanthon	27,424	25,177		
Brinzolamide	104,379	81,443		
Methiothepin maleate	104,239	80,998		
Mitoxantrone dihydrochloride	15,038	13,087		
Amikacin hydrate	93,096	74,830		
Methyldopa (L,-)	114,172	91,236		
Chlormezanone	112,423	82,302		
Maprotiline hydrochloride	109,965	86,170		
Adenosine 5'-monophosphate monohydrate	108,858	73,974		
Ambroxol hydrochloride	109,456	73,651		
Clofazimine	71,137	61,809		
GBR 12909 dihydrochloride	83,052	64,394		
Etoposide	51,952	37,829		
Cefoperazone dihydrate	120,614	87,494		

Procainamide hydrochloride	108,980	84,245		
Thioguanosine	41,350	45,578		
Amoxicillin	112,142	83,324		
Benfluorex hydrochloride	108,941	84,207		
Nafronyl oxalate	107,901	81,488		
Carbetapentane citrate	102,209	84,436		
Clomiphene citrate (Z,E)	97,096	65,908		
Zoxazolamine	100,692	90,612		
N6-methyladenosine	101,387	77,560		
Chlorprothixene hydrochloride	104,992	88,836		
Cephalexin monohydrate	102,391	82,160		
Bepidil hydrochloride	111,406	92,845		
Bezafibrate	121,494	79,811		
Dequalinium dichloride	26,637	22,473		
Oxantel pamoate	109,318	77,942		
Tacrine hydrochloride hydrate	100,401	77,522		
Guanfacine hydrochloride	102,982	80,171		
Ritodrine hydrochloride	106,370	80,779		
Dextromethorphan hydrobromide monohydrate	98,900	78,725		
Bupirone hydrochloride	103,749	82,127		
Mimosine	102,406	76,892		
Ketoconazole	103,161	81,457		
Prochlorperazine dimaleate	105,393	69,935		
Bisoprolol fumarate	113,795	85,489		
Domperidone	108,213	90,786		
Clozapine	110,095	88,339		

Droperidol	104,776	85,932		
Benzbromarone	105,096	84,441		
Clebopride maleate	105,792	81,556		
Fusidic acid sodium salt	100,549	80,359		
Hesperidin	99,907	74,429		
Testosterone propionate	112,340	79,023		
Androsterone	113,105	80,770		
Suloctidil	90,611	63,278		
Coralyne chloride hydrate	88,223	63,240		
Estradiol-17 beta	112,139	79,047		
Kynurenine, 3-hydroxy (R,S)	114,236	86,448		
Tropisetron HCl	115,888	85,017		
Strophantine octahydrate	16,675	15,385		
Arecoline hydrobromide	115,372	81,304		
Anisomycin	14,990	10,197		
Carcinine	109,477	87,155		
Corticosterone	112,902	87,545		
Fusaric acid	107,912	86,435		
Lactobionic acid	111,880	86,956		
Cefixime	112,103	91,400		
Pantothenic acid calcium salt monohydrate	99,557	80,057		
Thyroxine (L)	110,939	84,737		
Carbarsone	109,103	85,450		
Carisoprodol	105,415	81,700		
Cyanocobalamin	110,648	85,469		
Gabazine	110,811	85,965		
Lumicolchicine gamma	99,698	84,253		
Metrizamide	109,376	87,811		
Cefotetan	97,878	83,491		

Tocopherol (R,S)	123,711	89,746		
Apigenin	117,364	90,601		
Cephalosporanic acid, 7-amino	112,562	84,700		
Cefadroxil	113,114	90,124		
Ginkgolide A	112,092	87,092		
Lysergol	107,802	89,392		
Muramic acid, N-acetyl	106,725	87,489		
Piperine	98,572	83,670		
Pepstatin A	108,989	83,795		
Aspartic acid, N-acetyl (R,S)	105,763	85,878		
Chicago sky blue 6B	112,005	92,802		
Cyclosporin A	93,611	74,887		
Cyclobenzaprine hydrochloride	106,789	87,923		
Mebhydroline 1,5-naphtalenedisulfonate	106,177	88,313		
Myricetin	116,358	102,075		
Brompheniramine maleate	105,258	84,327		
SR-95639A	109,720	89,331		
Bacampicillin hydrochloride	108,844	84,700		
Buflomedil hydrochloride	110,391	85,487		
Digitoxigenin	20,093	16,520		
Carteolol hydrochloride	108,218	87,192		
Meclocycline sulfosalicylate	96,340	74,552		
Naringenine	107,900	85,214		
Primaquine diphosphate	33,236	32,451		
Adamantamine fumarate	104,089	81,489		

Betulinic acid	42,058	46,348		
Chlorogenic acid	112,794	95,982		
Digoxin	17,900	14,443		
Hydrocortisone base	104,590	86,176		
Meclozine dihydrochloride	97,467	85,326		
Naringin hydrate	99,282	85,351		
Progesterone	93,112	77,143		
Butoconazole nitrate	110,188	84,619		
Biotin	103,087	80,107		
Cephaeline dihydrochloride heptahydrate	18,875	13,929		
Doxorubicin hydrochloride	11,815	10,358		
Hydroxytacrine maleate (R,S)	105,406	83,163		
Melatonin	99,399	84,780		
Neostigmine bromide	102,495	86,361		
Felodipine	91,038	81,756		
Amiodarone hydrochloride	101,768	83,838		
Bisacodyl	100,711	79,412		
Cholecalciferol	104,728	80,851		
Carbimazole	102,759	80,776		
Pilocarpine nitrate	104,898	83,249		
Menadione	92,149	59,223		
Niridazole	103,883	85,239		
Methoxy-8-psoralen	90,175	78,334		
Amphotericin B	100,020	83,925		
Calciferol	108,193	84,408		
Cisapride	105,676	83,125		
Epiandrosterone	108,207	80,993		
Dicloxacillin sodium salt	106,257	87,551		

Dinoprost trometamol	103,957	80,633		
Ceforanide	104,221	85,561		
Puromycin dihydrochloride	10,109	10,519		
Serotonin hydrochloride	97,084	90,361		
Metixene hydrochloride	87,693		91,480	
Vigabatrin	100,507	98,714		
Fluoxetine hydrochloride	96,670		104,739	
Glycocholic acid	99,182	96,148		
Pirenperone	100,849		99,859	
Ciclopirox ethanolamine	42,076		70,253	
Hexetidine	70,065		83,969	
Cefotiam hydrochloride	102,361	97,765		
Nitrofurazone	98,243		100,735	
Biperiden hydrochloride	100,897		100,067	
Iohexol	98,390		99,835	
Thiostrepton	65,394		83,836	
Isoquinoline, 6,7- dimethoxy-1-methyl- 1,2,3,4-tetrahydro, hydrochloride	102,784	97,580		
Probenecid	97,685		97,927	
Selegiline hydrochloride	94,907	85,171		
Azathymine, 6	103,580	101,019		
Omeprazole	99,770		98,838	
Cetirizine dihydrochloride	98,700		98,873	
Norcyclobenzaprine	96,149		101,561	
Methionine sulfoximine (L)	97,736		99,959	
Phenacetin	96,773		98,925	
Betahistine mesylate	97,035		99,911	

Pentamidine isethionate	82,425		87,496	
Benperidol	103,010		107,702	
Propylthiouracil	98,678		105,432	
Etifenin	96,230		101,684	
Pyrazinamide	95,616		103,386	
Tiabendazole	97,780		107,156	
Atovaquone	95,784		101,415	
Tobramycin	92,846		100,923	
Tolazamide	89,776	79,075		
Cefaclor	101,350		104,162	
Terconazole	99,496		100,342	
Metaproterenol sulfate, orciprenaline sulfate	102,489	100,390		
Trimethadione	95,135		97,542	
Rifampicin	103,178		112,751	
Methoxamine hydrochloride	100,755	99,035		
Tetramisole hydrochloride	94,729		96,830	
Nifuroxazide	53,199	54,966		
Colistin sulfate	108,701	98,480		
Tiaprofenic acid	108,478	101,006		
Sisomicin sulfate	106,197	101,017		
Lovastatin	27,179	25,562		
Ethionamide	118,694	107,787		
(S)-(-)-Atenolol	105,420	96,692		
Pregnenolone	107,741	95,768		
Mycophenolic acid	37,587		61,024	
Daunorubicin hydrochloride	12,569	17,564		
Vancomycin hydrochloride	102,496	99,970		
Quercetine dihydrate	102,077		102,003	

Nystatine	98,676		99,562	
Tenoxicam	104,960	97,197		
Piracetam	104,168		104,269	
Molsidomine	103,372	97,739		
Dirithromycin	94,492	88,040		
Dosulepin hydrochloride	104,365	101,054		
Artemisinin	100,756	97,394		
Resveratrol	104,172	101,116		
Budesonide	92,781	91,071		
Triflusal	102,212	98,122		
Phenindione	110,372	103,670		
Chloroquine diphosphate	102,059	97,162		
Gliclazide	97,076	88,941		
Ceftazidime pentahydrate	104,679	101,918		
Propafenone hydrochloride	103,387	99,206		
Bromperidol	105,986	100,978		
Imipenem	100,559	97,009		
Mesoridazine besylate	101,554		102,333	
Thiocolchicoside	104,189	95,569		
Trimetazidine dihydrochloride	103,398	86,899		
DO 897/99	95,262	82,089		
Iobenguane sulfate	102,176	95,001		
Ethamivan	101,826	95,901		
Cyclizine hydrochloride	103,183	93,607		
Sulfasalazine	102,785	91,376		
Trolox	108,216		105,620	
Clorsulon	100,062		100,321	
Parthenolide	85,026		89,742	
Prenylamine lactate	89,387		91,273	
Tubocurarine chloride	107,359	81,904		

pentahydrate (+)				
Tetracaine hydrochloride	104,769	83,085		
Hydrastine hydrochloride	102,956	84,396		
Laudanosine (R,S)	101,936	84,137		
Scoulerine	52,693	57,682		
Harmalol hydrochloride dihydrate	109,575	92,694		
Methoxy-6-harmalan	111,785	88,221		
Thiamine hydrochloride	116,256	94,661		
Dihydroergocristine mesylate	103,942	80,557		
Mometasone furoate	98,451	80,592		
Lobelanidine hydrochloride	104,339	84,288		
Ajmalicine hydrochloride	97,464	79,226		
Ajmaline	101,397	85,919		
Harmol hydrochloride monohydrate	93,242	79,628		
Stachydrine hydrochloride	107,965	89,745		
Dipivefrin hydrochloride	121,748	112,196		
Noscapine	94,002	86,261		
Tomatidine	82,928	67,518		
Papaverine hydrochloride	99,919	85,558		
Trigonelline	96,915	85,878		
Monocrotaline	96,983	86,342		
Harmine hydrochloride	84,271	68,741		
Pyridoxine hydrochloride	104,583	90,228		
Thiorphan	105,784	93,951		
Syrosingopine	104,305	76,097		
Dacarbazine	101,007	83,535		
Yohimbine hydrochloride	104,118	82,743		

Diclofenac sodium	102,056	82,285		
Piperlongumine	11,227	11,864		
Ellipticine	10,212	10,355		
Cytisine (-)	108,397	88,754		
Riboflavine	93,645	86,951		
Atropine sulfate monohydrate	106,867	87,108		
Ipratropium bromide	99,511	84,656		
Lobeline alpha (-) hydrochloride	103,659	85,865		
Calycanthine	98,644	80,611		
Hydrocotarnine hydrobromide	101,171	88,262		
Chrysene-1,4-quinone	17,988	19,459		
Pseudopelletierine hydrochloride	102,259	92,893		
Hydroquinine hydrobromide hydrate	113,633	102,894		
Eserine sulfate, physostigmine sulfate	101,880	89,546		
Acetopromazine maleate salt	92,399	83,099		
Berberine chloride	82,181	75,524		
Convolamine hydrochloride	96,122	86,397		
(-)-Cinchonidine	97,606		101,842	
Demecarium bromide	101,063	92,695		
Racecadotril	100,706	96,425		
Epivincamine	104,639	97,901		
Aconitine	111,044	95,845		
Rauwolscine	102,741	85,025		

hydrochloride				
Chelidonine (+)	62,872	68,605		
Isocorydine (+)	96,031	86,452		
Eburnamonine (-)	79,743	79,274		
Quipazine dimaleate salt	104,770	93,577		
Folic acid	105,410	95,155		
Retrorsine	100,610		100,955	
Rescinnamin	106,872	83,992		
Corynanthine hydrochloride	105,167	82,408		
Galanthamine hydrobromide	102,900	78,247		
Xylazine	100,542	74,788		
Cinchonine	102,554	85,760		
Sparteine (-)	106,033	86,034		
Salsolinol hydrobromide	123,217	103,943		
Conessine	108,759	90,883		
Dihydroergotoxine mesylate	106,651	80,788		
Palmatine chloride	97,425	79,013		
Bicuculline (+)	101,556	75,493		
Seneciophylline	99,074	75,951		
Canavanine sulfate monohydrate (L,+)	98,043	80,855		
Diflorasone Diacetate	105,427	84,409		
Gramine	101,278	86,191		
Protoveratrine A	100,337	80,863		
Emetine dihydrochloride	27,798	21,502		
Trimethylcolchicinic acid	90,885	74,307		
Yohimbinic acid monohydrate	105,694	82,284		

Boldine	101,619	81,122		
Harmaline hydrochloride dihydrate	102,543	80,002		
Harmane hydrochloride	107,348	81,519		
Dimethisoquin hydrochloride	107,898	85,044		
Solanine alpha	96,042	80,782		
Sulmazole	89,780	73,584		
Glimepiride	92,096	74,715		
Vitexin	92,609	72,835		
Dydrogesterone	91,471	70,645		
Austricine hydrate	98,528	73,527		
Fillalbin	100,669	72,662		
Trihexyphenidyl-D,L Hydrochloride	104,351	75,497		
Sulfabenzamide	106,528	72,670		
Epicatechin(-)	107,523	90,062		
Picrotoxinin	91,532	75,974		
Gelsemine	93,041	73,759		
(d,l)-Tetrahydroberberine	94,285	74,914		
beta- Belladonnine dichloroethylate	96,066	72,302		
Citalopram Hydrobromide	98,436	76,769		
Succinylsulfathiazole	100,134	76,297		
Benzocaine	97,457	72,144		
Flunisolide	92,581	77,679		
Mepenzolate bromide	94,504	77,166		
Solasodine	91,764	74,541		
Deltaline	95,160	73,121		
Pempidine tartrate	98,893	74,248		
Promazine hydrochloride	94,451	71,731		

Famprofazone	101,144	71,925		
Dipyron	114,173	78,929		
N-Acetyl-DL-homocysteine Thiolactone	97,076	75,324		
Benfotiamine	98,136	73,788		
Delcorine	93,366	72,434		
Graveoline	95,206	68,121		
Heliotrine	96,755	69,781		
Sulfamerazine	99,395	72,186		
Bromopride	101,429	73,891		
Isosorbide dinitrate	112,831	69,893		
Flurandrenolide	94,685	73,419		
Halcinonide	96,134	74,339		
Evoxine	91,517	70,613		
Hippeastrine hydrobromide	89,862	66,813		
Nitrarine dihydrochloride	92,260	71,400		
Acacetin	96,174	70,249		
Methyl benzethonium chloride	25,092	21,295		
Sulfachloropyridazine	105,817	70,866		
Helveticoside	53,470	52,882		
Lanatoside C	17,536	14,373		
(cis-) Nanophine	96,947	72,554		
Beta-Escin	100,975	75,965		
Lycorine hydrochloride	40,562	36,211		
Ethotoin	113,859	86,124		
(1-[(4-Chlorophenyl)phenylmethyl]-4-methylpiperazine)	104,159	73,630		

<b>Pramoxine hydrochloride</b>	<b>127,592</b>			<b>76,130</b>
Myosmine	104,208	78,585		
Benzamil hydrochloride	98,538	77,351		
Foliosidine	97,247	73,232		
Gossypol	59,346	46,568		
Karakoline	104,472	73,394		
3-alpha-Hydroxy-5-beta-androstan-17-one	105,239	76,006		
Diphenylpyraline hydrochloride	103,063	76,196		
Finasteride	104,576	79,420		
Betonicine	100,087	78,051		
Suxibuzone	99,027	77,757		
Skimmianine	95,110	73,576		
Ricinine	93,926	73,075		
Estropipate	96,380	73,643		
Tetrahydrozoline hydrochloride	97,516	77,352		
Benzethonium chloride	45,425	43,782		
Fluorometholone	115,070	75,985		
Etanidazole	105,781	85,668		
6-Furfurylaminopurine	102,427	84,285		
Anabasine	98,468	78,354		
Delsoline	95,870	80,088		
Ungerine nitrate	96,534	80,031		
Hexestrol	91,076	79,641		
Trioxsalen	91,850	80,373		
Cephalothin sodium salt	103,959	84,918		
Butirosin disulfate salt	102,510	83,271		
Avermectin B1	97,657	81,222		
Tetrandrine	19,237	16,224		

Fluorocurarine chloride	96,255	79,512		
Napelline	97,768	76,333		
Cefmetazole sodium salt	96,927	79,504		
Strophanthidin	28,164	26,532		
Cefuroxime sodium salt	107,325	74,358		
Althiazide	110,567	81,115		
Sulfaquinoxaline sodium salt	103,053	84,786		
Nadide	99,980	84,712		
Terazosin hydrochloride	100,061	85,952		
Butamben	101,661	82,528		
Alclometasone dipropionate	109,592	87,852		
Clobetasol propionate	108,676	84,159		
(R) -Naproxen sodium salt	113,122	98,790		
Isopyrin hydrochloride	107,981	87,016		
Streptozotocin	108,021	83,975		
Sulfamethizole	106,284	83,738		
Phenazopyridine hydrochloride	107,347	81,418		
Sulfapyridine	105,189	83,892		
Leflunomide	103,007	85,126		
Podophyllotoxin	73,175	69,366		
Propidium iodide	109,512	98,000		
Phenethicillin potassium salt	105,125	83,851		
Metoprolol-(+,-) (+)-tartrate salt	111,577	81,722		
Medrysone	103,927	78,813		
Demeclocycline hydrochloride	105,274	79,480		

Meclofenoxate hydrochloride	106,674	82,037		
Norgestrel-(-)-D	110,766	84,696		
Clofibric acid	114,940	85,103		
Cloperastine hydrochloride	118,886	91,864		
Sulfamethoxypyridazine	110,688	86,441		
Flumethasone	112,398	84,098		
Flunixin meglumine	111,429	79,570		
Fenoprofen calcium salt dihydrate	107,778	80,797		
Furaltadone hydrochloride	106,216	82,880		
Fluocinonide	102,025	75,884		
Bendroflumethiazide	108,463	81,914		
Eucatropine hydrochloride	107,963	86,360		
Deferoxamine mesylate	69,474	51,882		
Flecainide acetate	110,364	82,689		
Spiramycin	109,757	83,226		
Piperacillin sodium salt	109,987	83,026		
Ethoxyquin	120,654	92,740		
Sulfamethazine sodium salt	109,310	83,922		
Dicumarol	112,219	85,578		
Isocarboxazid	113,363	86,981		
Mephentermine hemisulfate	106,336	80,273		
Cefazolin sodium salt	110,646	74,580		
Glycopyrrolate	107,765	74,903		
Diethylstilbestrol	95,347	67,731		
Tinidazole	110,592	78,558		
Guaifenesin	110,698	78,343		
Methimazole	112,703	80,780		

Lithocholic acid	96,744	63,611		
Ergocryptine-alpha	116,858	77,935		
Atractyloside potassium salt	112,668	74,289		
Cefamandole sodium salt	110,151	74,649		
Chlorotrianisene	113,221	79,561		
Guanadrel sulfate	111,885	76,274		
Alexidine dihydrochloride	29,109	22,215		
Merbromin	98,375	75,480		
Methotrimoprazine maleat salt	107,546	76,389		
Sulfadimethoxine	107,954	71,482		
Folinic acid calcium salt	116,897	76,289		
Monensin sodium salt	53,579	28,315		
Ribostamycin sulfate salt	109,852	79,983		
Vidarabine	109,084	78,689		
Proadifen hydrochloride	111,305	80,604		
Hexylcaine hydrochloride	113,998	80,030		
Dienestrol	110,710	76,896		
Sulfanilamide	105,152	72,679		
Levonordefrin	135,039	109,992		
Isoetharine mesylate salt	119,307	93,950		
Methacholine chloride	106,404	82,106		
Sulfameter	83,365	81,961		
Zomepirac sodium salt	108,422	83,661		
Drofenine hydrochloride	107,950	87,140		
Pridinol methanesulfonate salt	108,081	79,609		
Hecogenin	101,769	73,754		
Ebselen	108,680	84,687		
Mevalonic-D, L acid	107,305	79,585		

lactone				
Pipenzolate bromide	107,818	80,336		
Isopropamide iodide	85,561	80,221		
Cinoxacin	108,165	81,248		
Cycloheximide	41,052	41,294		
Amrinone	120,273	82,781		
Carbinoxamine maleate salt	107,269	92,081		
Bergenin monohydrate	105,756	92,488		
Azlocillin sodium salt	103,795	89,158		
Butacaine	109,831	91,053		
Securinine	94,631	81,303		
Paroxetine Hydrochloride	89,468	72,705		
Gabapentin	111,567	85,417		
Iopamidol	113,009	82,937		
Methazolamide	104,228	93,812		
Cromolyn disodium salt	103,671	94,169		
Clidinium bromide	108,337	93,567		
Cefoxitin sodium salt	102,606	91,220		
Trimeprazine tartrate	96,362	88,319		
Doxycycline hyclate	102,178	86,752		
Raloxifene hydrochloride	104,079	87,906		
Iopromide	108,958	87,834		
Pyrithyldione	105,805	95,562		
Bucladesine sodium salt	104,717	94,578		
Sulfamonomethoxine	103,268	92,187		
Ifosfamide	100,256	90,905		
Nafcillin sodium salt monohydrate	97,972	89,470		
Liothyronine	98,587	87,764		
Etidronic acid, disodium	104,087	90,721		

salt				
Theophylline monohydrate	105,247	90,936		
Spectinomycin dihydrochloride	108,639	99,186		
Cefsulodin sodium salt	103,399	93,954		
Benzthiazide	99,129	85,938		
Novobiocin sodium salt	96,762	87,232		
Procyclidine hydrochloride	94,497	86,908		
Roxithromycin	98,286	84,729		
Methylhydantoin-5-(D)	99,754	85,400		
Theobromine	105,751	85,116		
Piromidic acid	108,023	98,943		
Fosfosal	104,418	93,043		
Trichlormethiazide	98,916	87,808		
Tetrahydroxy-1,4-quinone monohydrate	99,482	90,724		
Amiprilose hydrochloride	94,136	87,948		
Beclomethasone dipropionate	88,731	85,690		
Simvastatin	23,494	18,058		
Reserpine	88,202	74,124		
Trimipramine maleate salt	108,367		118,043	
Suprofen	103,933	94,099		
Oxalamine citrate salt	98,384	93,045		
Indoprofen	99,554	90,969		
Ethinylestradiol 3-methyl ether	105,625	93,018		
Tolmetin sodium salt dihydrate	100,370	84,007		
Azacytidine-5	74,307	62,468		
Arcaïne sulfate	111,804	86,331		

Chloropyramine hydrochloride	115,078		110,691	
Catechin-(+,-) hydrate	119,116	110,772		
Propantheline bromide	100,882	90,994		
Carbenoxolone disodium salt	100,338	88,463		
(-) -Levobunolol hydrochloride	102,487	88,689		
(+) -Levobunolol hydrochloride	105,840	84,974		
Paromomycin sulfate	110,971	86,326		
Scopolamine hydrochloride	111,515	87,892		
Furazolidone	107,761	94,314		
Nadolol	106,109	89,447		
Lasalocid sodium salt	58,380	63,591		
Iocetamic acid	100,620	88,321		
Iodixanol	104,903	90,314		
Doxazosin mesylate	103,805	89,486		
Acetaminophen	109,769	89,063		
Ioversol	118,029	88,608		
Dichlorphenamide	112,472	90,729		
Moxalactam disodium salt	110,471	93,589		
Dimethadione	103,451	92,962		
Ganciclovir	108,619	90,615		
Rolitetraacycline	110,422	91,766		
Fluvastatin sodium salt	26,063	20,037		
Phthalylsulfathiazole	118,244	89,389		
Capsaicin	111,085	83,628		
Sulconazole nitrate	108,125	94,837		
Aminophylline	112,455	88,249		

Ethaverine hydrochloride	97,457	82,872		
Ethopropazine hydrochloride	107,101	88,976		
Equilin	106,194	87,284		
Methylhydantoin-5-(L)	103,254	85,261		
Luteolin	91,219	69,793		
Carbachol	120,059	87,379		
Niacin	85,899	75,242		
3-Acetylcoumarin	84,374		87,236	
Hymecromone	92,329	78,775		
(+)-Isoproterenol (+)-bitartrate salt	97,261	80,655		
Nizatidine	90,370	71,366		
Propofol	95,642	76,848		
Pentetic acid	96,328	82,072		
Crotamiton	103,217	63,044		
Bemegride	75,084	60,401		
Esculin Hydrate	89,599	87,526		
Caffeic acid	94,527	90,041		
Monobenzone	77,113	70,230		
Thioperamide maleate	90,489	78,787		
S(-)Eticlopride hydrochloride	89,719	73,155		
Bretylium tosylate	96,305	71,874		
Propranolol hydrochloride	97,335	84,291		
Digoxigenin	27,577	29,410		
Felbinac	91,235	82,918		
Diloxanide furoate	98,796	65,539		
2-Aminobenzenesulfonamide	105,631	64,806		
Xamoterol hemifumarate	101,439	64,881		

Primidone	103,907	67,283		
Pralidoxime chloride	103,578	69,665		
(R)-(+)-Atenolol	97,590	58,584		
Meglumine	97,072	66,537		
Butylparaben	91,970	79,513		
Metyrapone	100,317	75,918		
Estrone	100,206	75,495		
Rolipram	95,340	75,106		
Flucytosine	97,301	76,610		
Phenoxybenzamine hydrochloride	101,537	78,375		
Tyloxapol	109,948	68,974		
Cantharidin	1,965	0,181		
Aminohippuric acid	90,876	83,363		
Urapidil hydrochloride	92,273	77,891		
Lorglumide sodium salt	95,554	74,824		
Thonzonium bromide	45,472	28,721		
(-)-MK 801 hydrogen maleate	102,441	78,170		
Salmeterol	104,661	77,302		
Florfenicol	96,051	72,953		
Clioquinol	92,804	72,043		
N-Acetyl-L-leucine	103,156	85,223		
Fluspirilen	93,540	76,838		
Nitrendipine	99,059	75,887		
Idazoxan hydrochloride	101,495	80,637		
Bephenium hydroxynaphthoate	102,492	83,646		
Altretamine	106,258	77,100		
Megestrol acetate	108,547	80,644		
Oxybenzone	99,530	70,469		

Pipemidic acid	97,744	78,510		
S-(+)-ibuprofen	101,131	73,829		
Flurbiprofen	99,454	74,224		
Quinapril HCl	100,055	74,323		
Dehydroisoandrosterone 3- acetate	102,463	69,945		
Prazosin hydrochloride	84,868	62,536		
Deoxycorticosterone	105,758	74,838		
Promethazine hydrochloride	78,036	81,468		
Dioxybenzone	83,390	83,271		
Ethinodiol diacetate	98,349	80,212		
Nimodipine	103,161	74,810		
Nilutamide	108,798	78,225		
Benserazide hydrochloride	118,418	83,838		
Timolol maleate salt	119,550	78,938		
Urosiol	115,609	77,734		
Chrysin	81,971	78,157		
Adrenosterone	84,266		94,762	
Nabumetone	92,308	88,199		
Bacitracin	103,326	79,185		
Ketorolac tromethamine	101,329	79,737		
Iodipamide	88,555	78,157		
(+,-)-Octopamine hydrochloride	101,364	82,127		
Proparacaine hydrochloride	104,921	69,556		
Proxyphylline	94,150	83,306		
Methylatropine nitrate	89,958	78,399		
Nisoxetine hydrochloride	97,461	77,285		
L(-)-vesamicol	96,488	77,237		

hydrochloride				
Protriptyline hydrochloride	95,221	80,872		
Esculetin	91,752	74,885		
(±)-Nipecotic acid	100,802	81,230		
Aminocaproic acid	106,943	82,164		
Denatonium benzoate	126,952	80,505		
Remoxipride Hydrochloride	123,574	79,035		
Nitrocaramiphen hydrochloride	126,406	76,931		
Gliqidone	123,345	77,277		
Alfadolone acetate	117,574	77,901		
Flucloxacillin sodium	119,508	74,101		
Isradipine	118,682	71,696		
Halofantrine hydrochloride	120,670	76,849		
Scopoletin	128,486	82,891		
THIP Hydrochloride	124,625	80,765		
Rilmenidine hemifumarate	124,832	81,661		
Pizotifen malate	123,982	77,519		
Alfaxalone	117,157	72,539		
Trapidil	119,496	72,906		
<b>Tiletamine hydrochloride</b>	<b>126,169</b>			<b>75,112</b>
Articaine hydrochloride	124,418	75,619		
Enilconazole	117,103	79,434		
Pirlindole mesylate	123,649	80,010		
Dimaprit dihydrochloride	126,018	77,873		
Ribavirin	122,748	73,825		
Azapropazone	117,106	72,449		
Deptropine citrate	110,382	69,222		
<b>Isometheptene mucate</b>	<b>123,523</b>			<b>71,240</b>
<b>Nomegestrol acetate</b>	<b>126,201</b>			<b>75,028</b>

Methacycline hydrochloride	119,628	80,607		
Pronethalol hydrochloride	126,075	84,438		
Reserpinic acid hydrochloride	129,084	80,617		
Cyclopentiazide	120,943	76,870		
Meptazinol hydrochloride	112,787	77,015		
Sertraline	64,237	49,402		
Nifurtimox	126,694	80,220		
Pancuronium bromide	123,340	81,186		
Gibberellic acid	118,616	86,651		
Naftopidil dihydrochloride	130,283	82,355		
Beta-sistosterol	57,295	39,918		
Fluvoxamine maleate	121,154	76,753		
Apramycin	113,388	76,055		
Ethamsylate	147,444	93,077		
Letrozole	130,433			78,302
Molindone hydrochloride	125,202	77,907		
Sotalol hydrochloride	124,739	84,481		
Tracazolate hydrochloride	127,237	80,452		
Proscillaridin A	23,455	14,441		
Cefalonium	127,439	81,659		
Epitiostanol	124,006	81,626		
Moxonidine	116,619	78,116		
Arbutin	130,243	79,930		
Alcuronium chloride	122,718	80,396		
6-Hydroxytropinone	120,817	80,793		
Zardaverine	122,769	79,524		
Sanguinarine	12,450	9,318		
Fluticasone propionate	53,790	41,678		
Fursultiamine	113,983	80,304		

Hydrochloride				
Etilefrine hydrochloride	114,811	79,690		
Tocainide hydrochloride	111,079	76,129		
Zalcitabine	118,778	82,134		
Decamethonium bromide	120,355	84,164		
Memantine Hydrochloride	126,048	84,852		
Harpagoside	127,994	83,092		
Zuclopenthixol hydrochloride	109,752	78,397		
Gabexate mesilate	112,358	81,334		
Alprostadil	113,892	85,591		
Benzathine benzylpenicillin	114,409	92,829		
Methyldopate hydrochloride	149,924	113,977		
3-Acetamidocoumarin	115,730	80,261		
Ozagrel hydrochloride	120,555	87,457		
Asiaticoside	117,141	86,311		
Proguanil hydrochloride	107,715	79,928		
Pivampicillin	107,844	81,446		
Tribenoside	103,667	83,133		
Risperidone	109,286	86,262		
Levocabastine hydrochloride	110,853	79,655		
Roxarsone	111,310	84,796		
Piribedil hydrochloride	121,003	89,264		
Betulin	45,755	38,991		
Lymecycline	110,781	84,090		
Talampicillin hydrochloride	96,172	81,031		
Rimexolone	100,130	80,466		

Torseamide	112,007	80,122		
Pyrvinium pamoate	32,995	17,022		
Etomidate	103,300	82,742		
Moricizine hydrochloride	109,189	83,492		
Phensuximide	109,023	79,091		
Imidurea	103,567	79,784		
(S)-propranolol hydrochloride	103,208	78,210		
Spaglumic acid	106,097	78,098		
Netilmicin sulfate	104,373	73,634		
Mecamylamine hydrochloride	104,167	77,451		
Tridihexethyl chloride	103,054	80,403		
Iopanoic acid	101,927	74,136		
Ioxaglic acid	107,024	75,314		
Lansoprazole	101,176	75,079		
(-)-Eseroline fumarate salt	106,923	81,164		
(-)-Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate	107,044	83,229		
Loracarbef	102,744	82,851		
Procarbazine hydrochloride	106,279	82,790		
Penbutolol sulfate	100,846	81,593		
Pivmecillinam hydrochloride	101,394	75,889		
Naftifine hydrochloride	102,814	76,673		
Bethanechol chloride	99,420	75,383		
Condelfine	98,624	73,423		
(-)-Quinpirole hydrochloride	102,808	79,259		
Quinic acid	103,283	76,526		

Viomycin sulfate	102,182	78,805		
Prednicarbate	99,009	70,692		
Levopropoxyphene napsylate	105,793	78,126		
Meprylcaine hydrochloride	98,821	74,946		
Cyproterone acetate	104,034	77,623		
Leucomisine	101,347	77,158		
Sulfadoxine	105,364	75,817		
Natamycin	97,125	75,752		
Saquinavir mesylate	100,362	76,801		
Sertaconazole nitrate	92,869	69,968		
Piperidolate hydrochloride	110,594	77,527		
Milrinone	103,810	74,357		
(R)-Propranolol hydrochloride	102,373	72,988		
Dubinidine	100,154	71,101		
Cyclopentolate hydrochloride	97,479	75,287		
Verteporfin	3,590	2,387		
Ronidazole	105,451	80,599		
Repaglinide	102,553	75,118		
Trifluridine	91,095	66,982		
Methantheline bromide	105,627	70,774		
Ciprofibrate	101,762	75,993		
D-cycloserine	104,578	75,746		
Estriol	100,988	77,755		
Meropenem	94,981	82,023		
Dorzolamide hydrochloride	95,425	76,641		
Piretanide	95,598	80,475		
Oxprenolol hydrochloride	104,828	80,353		

Ticarcillin sodium	99,974	73,628		
Tropine	101,124	72,305		
2-Chloropyrazine	103,043	73,237		
(-)-Isoproterenol hydrochloride	112,788	86,063		
Ramipril	96,700	75,224		
Azaperone	94,830	79,552		
Piperacetazine	101,220	90,928		
Ondansetron Hydrochloride	95,694	82,176		
Thiethylperazine malate	99,197	84,257		
Benzylpenicillin sodium	92,834	78,072		
(+,-)-Synephrine	99,713	79,350		
Kaempferol	89,971	82,296		
Mephentoin	88,505	78,233		
Cefepime hydrochloride	91,400	77,652		
Oxyphenbutazone	103,312	85,076		
Propoxycaine hydrochloride	103,127	80,756		
Mesalamine	104,065	77,727		
Chlorambucil	88,050	73,340		
(S)-(-)-Cycloserine	95,022	80,102		
Nialamide	100,924	84,154		
Rifabutin	97,137	82,351		
Clocortolone pivalate	32,457	29,593		
Quinethazone	92,130	82,148		
Oxaprozol	96,734	80,642		
alpha-Santonin	92,257	80,452		
Methiazole	56,262	57,879		
Homosalate	95,868	76,361		
Vitamin K2	105,552	92,314		

Parbendazole	43,324	43,810		
Cyclacillin	101,704	76,265		

## 8. Danksagung

Ich möchte zunächst ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Walter E. Aulitzky für die Bereitstellung eines hochinteressanten Forschungsthemas danken. Weiter will ich ihm danken für regelmäßige und immer wieder neue Gedanken anregende Diskussionen, seine ansteckende Begeisterung und sein Engagement.

Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schwab danke ich, dass er die Promotionsarbeit von seiten der Universität Tübingen betreut hat und für die Möglichkeit, in seinem hervorragend ausgestatteten Labor zu arbeiten. Ohne ihn wäre die Erstellung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Heiko van der Kuip für seine hervorragende Betreuung. Seine ständige Bereitschaft zu Hilfe und Diskussion, sein Interesse an dem Thema und die Offenheit seiner Gedanken haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. van der Kuip nochmals ausdrücklich für das schnelle und gewissenhafte Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich weiter bei meinen ehemaligen Kollegen für die gute Zusammenarbeit, für die Hilfsbereitschaft bei technischen Fragen, aber auch für mittägliche Sonnenspaziergänge und kulinarische Mittagspausen. Erwähnen möchte ich hier besonders Frau Ioanna Skorta, Frau Maike Sonnenberg, Frau Silke Fanta, Frau Tabea Peuß, Frau Kerstin Willecke, Frau Silke Haubeiß und Herrn Matthias Gutekunst.

Für die finanzielle Unterstützung während der Dissertation möchte ich der Robert-Bosch-Stiftung danken.

Nicht zuletzt möchte mich bei meinem Mann bedanken für seine Unterstützung, seine Geduld und seine Liebe.