

**VERGLEICHENDE *IN VITRO*-UNTERSUCHUNGEN ZUR
MOLEKULAREN WIRKUNG VON CIS-, OXALI- UND
CARBOPLATIN AUF NIERENZELLEN SOWIE
PHARMAKOLOGISCHE STRATEGIEN ZU DEREN
ZYTOPROTEKTION**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katharina Krüger
aus Haan

Düsseldorf, September 2015

aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Gerhard Fritz

Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2015

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS I

ABBILDUNGSVERZEICHNIS VI

TABELLENVERZEICHNIS X

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS XIII

1 EINLEITUNG 1

1.1 KREBSERKRANKUNGEN 1

1.2 ZYTOSTATIKATHERAPIE MALIGNER TUMORE 3

1.2.1 PLATINVERBINDUNGEN 5

1.2.1.1 CISPLATIN 6

1.2.1.2 CARBOPLATIN 9

1.2.1.3 OXALIPLATIN 10

1.3 ZELLULÄRE STRESSANTWORT 11

1.3.1 DNA-SCHADENSANTWORT 11

1.3.1.1 DNA-REPARATUR 13

1.3.1.1.1 NUKLEOTIDEXZISIONSREPARATUR (NER) 15

1.3.2 ZELLTODMECHANISMEN – APOPTOSE UND NEKROSE 17

1.4 UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN DER ZYTOSTATIKATHERAPIE 19

1.4.1 NEPHROTOXIZITÄT NACH BEHANDLUNG MIT PLATINVERBINDUNGEN 20

1.5 MÖGLICHE MODULATOREN DER CISPLATIN-INDUZIERTEN NEPHROTOXIZITÄT 21

1.5.1 STATINE – LOVASTATIN 22

1.5.2 EXTRAKTE AUS MEERESSCHWÄMMEN – AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1 26

1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 28

2 MATERIAL UND METHODEN 29

2.1 MATERIAL 29

2.1.1 HERSTELLERNACHWEISE 29

2.1.2 GERÄTE 30

2.1.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN 32

2.1.4 KITS 32

2.1.5 CHEMIKALIEN 33

2.1.6	MEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE	34
2.1.7	ZELLINIEN	34
2.1.8	ENZYME	34
2.1.9	PRIMER	34
2.1.10	ANTIKÖRPER.....	35
2.1.10.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	35
2.1.10.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER.....	36
2.1.11	SONSTIGE MATERIALIEN	36
2.1.12	LÖSUNGEN UND PUFFER	37
2.1.13	SOFTWARE	39
2.2	METHODEN.....	39
2.2.1	ZELLKULTUR	39
2.2.2	MOLEKULARBIOLOGIE	40
2.2.2.1	DNA-ISOLIERUNG	40
2.2.2.2	RNA-ISOLIERUNG	40
2.2.2.3	cDNA-SYNTHESE	41
2.2.2.4	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR	41
2.2.3	PROTEINBIOCHEMIE	42
2.2.3.1	PROTEINISOLIERUNG	42
2.2.3.2	SDS-PAGE.....	43
2.2.3.3	WESTERN BLOT.....	43
2.2.4	ANALYSE DER ZELLVIABILITÄT	44
2.2.4.1	MTT-ASSAY.....	44
2.2.4.2	ALAMAR BLUE-ASSAY	45
2.2.4.3	IMPEDANZMESSUNG	45
2.2.4.4	TRYPANBLAU-ASSAY	46
2.2.5	ANALYSE DER ZELLYKLUSVERTEILUNG	46
2.2.5.1	DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	46
2.2.5.2	IMMUNZYTOCHEMIE	47
2.2.5.2.1	EDU-INKORPORATIONS-ASSAY	48
2.2.6	ANALYSE VON ZELLTODMECHANISMEN	49
2.2.6.1	APO-ONE®-ASSAY	49

2.2.6.2	DAPI-FÄRBUNG.....	50
2.2.6.3	LDH-ASSAY	51
2.2.7	ANALYSE VON DNA-SCHÄDEN.....	52
2.2.7.1	IMMUNZYTOCHEMIE – γ H2AX- UND 53BP1-FOCI.....	52
2.2.7.2	COMET-ASSAY	53
2.2.8	ANALYSE DER ZELLULÄREN PLATINIERUNG SOWIE VON PLATIN-DNA- INTRASTRANGVERKNÜPFUNGEN	54
2.2.8.1	INDUKTIV GEKOPPELTE MASSENSPEKTROMETRIE.....	54
2.2.8.2	SOUTHWESTERN BLOT	54
2.2.9	STATISTISCHE AUSWERTUNG	55
3	ERGEBNISSE.....	56
3.1	VERGLEICH DER ZELLULÄREN ANTWORTEN VON RENALEN PROXIMALEN TUBULUSEPITHEL- UND GLOMERULÄREN ENDOTHELZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT CIS-, OXALI- ODER CARBOPLATIN ..	56
3.1.1	ZYTOTOXISCHE EFFEKTE DER PLATINVERBINDUNGEN	56
3.1.2	EINFLUSS DER PLATINVERBINDUNGEN AUF DIE ZELLYKLUSVERTEILUNG.....	59
3.1.3	INDUKTION VON APOPTOTISCHEM UND NEKROTISCHEM ZELLTOD	67
3.1.4	EINFLUSS DER PLATINVERBINDUNGEN AUF DIE DNA-SCHADENSINDUKTION UND -ANTWORT	74
3.1.5	INDUKTION UND REPARATUR VON PLATIN-DNA-ADDUKTEN	82
3.1.6	EXPRESSION VON CISPLATINSUSZEPTIBILITÄTSFAKTOREN	85
3.2	PROTEKTION DER NIERENZELLEN VOR CISPLATIN-INDUZIERTER ZYTOTOXIZITÄT.....	88
3.2.1	MODULATION DER TOXIZITÄT DURCH LOVASTATIN.....	88
3.2.1.1	INHIBITION DER DNA-SCHADENSANTWORT DURCH LOVASTATIN	88
3.2.1.2	EINFLUSS VON LOVASTATIN AUF DIE INDUKTION VON DNA-SCHÄDEN.....	91
3.2.1.3	EINFLUSS VON LOVASTATIN AUF DIE EXPRESSION VON CISPLATINSUSZEPTIBILITÄTSFAKTOREN	93
3.2.1.4	ZYTOPROTEKTION DURCH LOVASTATIN.....	95
3.2.2	MODULATION DER TOXIZITÄT DURCH DIE SCHWAMMEXTRAKTE AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1	98
3.2.2.1	ZYTOPROTEKTION DURCH AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1.....	98
3.2.2.2	EINFLUSS VON AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1 AUF DIE INDUKTION VON DNA- SCHÄDEN	102

3.2.2.3	EINFLUSS VON AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1 AUF DIE DNA-SCHADENSANTWORT	104
4	DISKUSSION	106
4.1	VERGLEICH DER MOLEKULAREN WIRKUNG VON CIS-, OXALI- UND CARBOPLATIN AUF RENALE PROXIMALE TUBULUSEPITHEL- UND GLOMERULÄRE ENDOTHELZELLEN	107
4.1.1	EINFLUSS DER PLATINVERBINDUNGEN AUF DIE ZELLVIABILITÄT	107
4.1.2	UNTERSCHIEDE IN DER BILDUNG VON PLATIN-DNA-ADDUKTEN	109
4.1.3	VERÄNDERUNGEN IN DER ZELLYKLUSVERTEILUNG NACH BEHANDLUNG MIT DEN PLATINVERBINDUNGEN	110
4.1.4	EINFLUSS DER PLATINVERBINDUNGEN AUF DIE INDUKTION VON APOPTOTISCHEM UND NEKROTISCHEM ZELLTOD	111
4.1.5	INDUKTION VON DNA-SCHÄDEN UND DER DNA-SCHADENSANTWORT	113
4.1.6	WEITERE MÖGLICHE MECHANISMEN, DIE DER ZYTOTOXIZITÄT DER PLATINVERBINDUNGEN ZUGRUNDE LIEGEN KÖNNTEN	118
4.1.7	ZUSAMMENFASSUNG DER MOLEKULAREN WIRKUNG VON CIS-, OXALI- UND CARBOPLATIN AUF RENALE PROXIMALE TUBULUSEPITHEL- UND GLOMERULÄRE ENDOTHELZELLEN	120
4.2	PHARMAKOLOGISCHE STRATEGIEN ZUR PROTEKTION VON NIERENZELLEN VOR CISPLATIN-INDUZIERTER ZYTOTOXIZITÄT	121
4.2.1	PROTEKTION VOR CISPLATIN-INDUZIERTER TOXIZITÄT DURCH LOVASTATIN	122
4.2.1.1	INHIBITION DER CISPLATIN-INDUZIERTEN DNA-SCHADENSANTWORT	123
4.2.1.2	EINFLUSS VON LOVASTATIN AUF DIE BILDUNG UND REPARATUR VON CISPLATIN-INDUZIERTEN DNA-SCHÄDEN	124
4.2.1.3	EINFLUSS VON LOVASTATIN AUF DIE CISPLATIN-INDUZIERTE ZYTOTOXIZITÄT	126
4.2.1.4	WEITERE MÖGLICHE MECHANISMEN, DIE DER ZYTOPROTEKTION DURCH LOVASTATIN ZUGRUNDE LIEGEN KÖNNTEN	127
4.2.1.5	ZUSAMMENFASSUNG DER PROTEKTIVEN EFFEKTE VON LOVASTATIN AUF DIE CISPLATIN-INDUZIERTE ZYTOTOXIZITÄT VON NIERENZELLEN	129
4.2.2	EINFLUSS DER SCHWAMMEXTRAKTE AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1 AUF DIE CISPLATIN-INDUZIERTE TOXIZITÄT	129
4.2.2.1	EINFLUSS VON AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1 AUF DIE INDUKTION VON CISPLATIN-INDUZIERTEN DNA-SCHÄDEN UND DIE DNA-SCHADENSANTWORT	131

4.2.2.2	ZUSAMMENFASSUNG DER EFFEKTE VON AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1 AUF DIE CISPLATIN-INDUZIERT ZYTOTOXIZITÄT VON NIERENZELLEN.....	132
5	AUSBLICK	133
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	136
	SUMMARY.....	138
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	140
8	ANHANG.....	167
8.1	ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN.....	167
8.2	AUFLISTUNG DER DEN ABBILDUNGEN ZUGRUNDE LIEGENDEN DATEN	169
8.3	PUBLIKATIONEN	181
8.3.1	LISTE DER PUBLIKATIONEN	181

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Eigenschaften von Tumoren..... 3

Abbildung 1.2: Chemische Strukturen von in der Klinik verwendeten Platinverbindungen..... 6

Abbildung 1.3: Bioaktivierung von Cisplatin und resultierende Platin-DNA-Addukte. 7

Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort. 13

Abbildung 1.5: Mechanismus der Nukleotidexzisionsreparatur (NER). 17

Abbildung 1.6: Chemische Struktur von Lovastatin..... 23

Abbildung 1.7: Inhibition der HMG-CoA-Reduktase durch Statine. 24

Abbildung 1.8: Chemische Strukturen der Alkaloide Aaptamin und Aeroplysinin-1..... 27

Abbildung 2.1: Prinzip des MTT-Assays. 44

Abbildung 2.2: Prinzip des Alamar Blue-Assays..... 45

Abbildung 2.3: Prinzip des EdU-Inkorporations-Assays..... 49

Abbildung 2.4: Prinzip des Apo-ONE®-Assays..... 50

Abbildung 2.5: Prinzip des LDH-Assays..... 51

Abbildung 3.1: Viabilitätsuntersuchungen von Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin. 59

Abbildung 3.2: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung von NRK-52E-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin. 60

Abbildung 3.3: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung von RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin..... 62

Abbildung 3.4: Einfluss der Platinverbindungen auf die mitotische Aktivität der Nierenzellen..... 64

Abbildung 3.5: Einfluss der Platinverbindungen auf die Proliferation der Nierenzellen... 66

Abbildung 3.6: Fluoreszenzbasierte Analyse der Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin. 68

Abbildung 3.7: Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin mittels Western Blot-Analysen. 70

Abbildung 3.8: Induktion von apoptotischem Zelltod in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin anhand von fragmentierten Zellkernen.	71
Abbildung 3.9: Induktion von nekrotischem Zelltod in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.	73
Abbildung 3.10: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) sowie Western Blot-Analysen der Stressantworten in Nierenzellen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung.	76
Abbildung 3.11: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) in NRK-52E-Zellen nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.	77
Abbildung 3.12: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) in RGE-Zellen nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.	78
Abbildung 3.13: Aktivierung der DNA-Schadensantworten in Nierenzellen nach 8 h Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.	80
Abbildung 3.14: Aktivierung der DNA-Schadensantworten in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.	81
Abbildung 3.15: Analyse der Gesamtzellplatinierung von Nierenzellen nach Behandlung mit äquitoxischen Dosen von Cis-, Oxali- oder Carboplatin.	83
Abbildung 3.16: Bildung und Reparatur von Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten in Nierenzellen nach Behandlung mit Cis- oder Carboplatin.	85
Abbildung 3.17: Basale mRNA-Expressionen ausgewählter Cisplatin-suszeptibilitätsfaktoren in Nierenzellen.	86
Abbildung 3.18: mRNA-Expression ausgewählter Cisplatin-suszeptibilitätsfaktoren in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin. ..	87
Abbildung 3.19: Viabilitätsuntersuchung von NRK-52E-Zellen nach Vorbehandlung mit Lovastatin und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.	88
Abbildung 3.20: Lovastatin-vermittelte Protektion vor Cisplatin-induzierten Stressantworten in NRK-52E-Zellen anhand von Western Blot-Analysen.	90
Abbildung 3.21: Einfluss der Lovastatinvorbehandlung auf die Cisplatin-induzierte Bildung von DNA-Strangbrüchen in NRK-52E-Zellen.	92

Abbildung 3.22: Einfluss der Lovastatinvorbehandlung auf die Cisplatin-induzierte Bildung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen in NRK-52E-Zellen. 93

Abbildung 3.23: Einfluss der Lovastatinvorbehandlung auf die Cisplatin-induzierte Expression ausgewählter Cisplatinsuszeptibilitätsfaktoren in NRK-52E-Zellen. 95

Abbildung 3.24: Protektion von NRK-52E-Zellen vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität durch Lovastatinvorbehandlung..... 96

Abbildung 3.25: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Behandlung mit Cisplatin..... 97

Abbildung 3.26: Viabilitätsuntersuchungen unterschiedlicher Zelltypen nach Vorbehandlung mit Aaptamin oder Aeroplysinin-1 und anschließender Dauerkobehandlung mit Cis- oder Oxaliplatin. 100

Abbildung 3.27: Einfluss von Aaptamin und Aeroplysinin-1 auf Cisplatin-induzierte Apoptose mittels durchflusszytometrischer Analyse..... 101

Abbildung 3.28: Fluoreszenzbasierte Quantifizierungen von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in NRK-52E-Zellen nach Vorbehandlung mit Aaptamin oder Aeroplysinin-1 und anschließender Cisplatinkobehandlung..... 102

Abbildung 3.29: Einfluss von Aaptamin und Aeroplysinin-1 auf die Cisplatin-induzierte Bildung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen in NRK-52E-Zellen. 103

Abbildung 3.30: Cisplatin-induzierte Stressantworten in NRK-52E-Zellen nach Vorbehandlung mit Aaptamin oder Aeroplysinin-1 und anschließender Cisplatinkobehandlung anhand von Western Blot-Analysen..... 105

Abbildung 4.1: Zusammenfassung der molekularen Wirkung von Cis-, Oxali- und Carboplatin auf Nierenzellen..... 117

Abbildung 4.2: Modell der Inhibition der Cisplatin-induzierten DNA-Schadensantwort von proximalen Tubulusepithelzellen durch Lovastatin. 127

Abbildung 8.1: Zytotoxische Effekte der Platinverbindungen in nicht-renalen Zellen.... 167

Abbildung 8.2: Zytotoxische Effekte einer Pulsbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin in NRK-52E- und RGE-Zellen. 167

Abbildung 8.3: Viabilitätsuntersuchung von NRK-52E-Zellen nach Behandlung mit Lovastatin. 168

Abbildung 8.4: Viabilitätsuntersuchung von NRK-52E-Zellen nach Vorbehandlung mit Lovastatin, anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin und nachfolgenden 48 h Postinkubation..... 168

Abbildung 8.5: Einfluss einer EHT-Vorbehandlung auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität..... 169

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Beispiele für Wirkstoffe und Indikationen der unterschiedlichen Substanzgruppen von Zytostatika.	4
Tabelle 1.2: PEB-Schema zur Behandlung von Hodentumoren.....	9
Tabelle 1.3: PE- und CEV-Schema zur Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms.	10
Tabelle 1.4: FOLFOX4-Schema zur Behandlung des Kolorektalkarzinoms.	11
Tabelle 2.1: Auflistung der Herstellerhauptsitze.	29
Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Geräte.	30
Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	32
Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Kits.....	32
Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	33
Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Medien und Medienzusätze.	34
Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Zelllinien.....	34
Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Enzyme.....	34
Tabelle 2.9: Auflistung der verwendeten Real-time PCR-Primer.	34
Tabelle 2.10: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.....	35
Tabelle 2.11: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.	36
Tabelle 2.12: Auflistung sonstiger verwendeter Materialien.	36
Tabelle 2.13: Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer.....	37
Tabelle 2.14: Auflistung der verwendeten Computersoftware.....	39
Tabelle 2.15: Reaktionsbedingungen der Real-time PCR.	42
Tabelle 3.1: Einfluss der Platinverbindungen auf die Viabilität der Nierenzellen.	57
Tabelle 3.2: Zusammenfassung der durch die Platinverbindungen induzierten DNA-Schadensantwort in Nierenzellen.	82
Tabelle 3.3: Einfluss der Lovastatinvorbehandlung auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität von NRK-52E-Zellen.....	89
Tabelle 3.4: Einfluss der Schwammextrakte Aaptamin und Aeroplysinin-1 auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität von Nierenzellen.....	100
Tabelle 8.1: Daten der MTT-Assays von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.....	169

Tabelle 8.2: Daten der Trypanblau-Assays von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.....	169
Tabelle 8.3: Daten der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.....	170
Tabelle 8.4: Daten der immunzytochemischen Analysen der mitotischen Aktivität von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.....	170
Tabelle 8.5: Daten der immunzytochemischen Analysen der Proliferation von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.....	171
Tabelle 8.6: Daten der Apo-ONE®-Assays von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.....	171
Tabelle 8.7: Daten der DAPI-Färbungen von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.....	171
Tabelle 8.8: Daten der LDH-Assays von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.....	172
Tabelle 8.9: Daten der γ H2AX-Foci-Analysen von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Bestrahlung.	172
Tabelle 8.10: Daten der γ H2AX-Foci-Analysen von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.....	173
Tabelle 8.11: Daten der massenspektrometrischen Gesamtzellplatinierungsanalysen von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.....	173
Tabelle 8.12: Daten der Southwestern Blot-Analysen zur Bildung von Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten in NRK-52E- und RGE-Zellen nach Behandlung mit Cis- oder Carboplatin.....	173
Tabelle 8.13: Daten der Southwestern Blot-Analysen zur Reparatur von Cisplatin-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten in NRK-52E- und RGE-Zellen.	174
Tabelle 8.14: Daten der basalen mRNA-Expressionen von Cisplatin-suszeptibilitätsfaktoren in NRK-52E- und RGE-Zellen.	174

Tabelle 8.15: Daten der mRNA-Expressionen von Cisplatinsuszeptibilitätsfaktoren in NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.....	174
Tabelle 8.16: Daten der Alamar Blue-Assays von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.	175
Tabelle 8.17: Daten der γ H2AX-Foci-Analyse von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.	175
Tabelle 8.18: Daten der Comet-Analysen von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.	176
Tabelle 8.19: Daten der Southwestern Blot-Analyse von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.	176
Tabelle 8.20: Daten der mRNA-Expression von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.	176
Tabelle 8.21: Daten der Zellzyklusanalyse von NRK-52E-Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.....	177
Tabelle 8.22: Daten der MTT-Assays von NRK-52E-, RGE- und RT-112-Zellen nach Aaptamin- oder Aeroplysinin-1-Vorbehandlung und anschließender Kobehandlung mit Cis- oder Oxaliplatin.	177
Tabelle 8.23: Daten des MTT-Assays von NRK-52E-Zellen nach Aaptaminvorbehandlung und anschließender Kobehandlung mit Cisplatin.....	179
Tabelle 8.24: Daten der SubG1-Analysen von NRK-52E-Zellen nach Aaptamin- oder Aeroplysinin-1-Vorbehandlung und anschließender Kobehandlung mit Cisplatin.	179
Tabelle 8.25: Daten der γ H2AX- und 53BP1-Foci-Analysen von NRK-52E-Zellen nach Aaptamin- oder Aeroplysinin-1-Vorbehandlung und anschließender Kobehandlung mit Cisplatin.	180
Tabelle 8.26: Daten der Southwestern Blot-Analysen von NRK-52E-Zellen nach Aaptamin- oder Aeroplysinin-1-Vorbehandlung und anschließender Kobehandlung mit Cisplatin.	180

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

53BP1	P53-bindendes Protein 1
% (v/v)	<i>volume-volume percentage</i> ; Volumenprozent
% (w/v)	<i>mass-volume percentage</i> ; Gewichtsprozent
AKT	Serin/Threonin-Kinase; Proteinkinase B
APAF-1	<i>apoptotic protease-activating factor-1</i>
ApG	Adenin-Guanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Serin/Threonin-Kinase <i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Serin/Threonin-Kinase <i>ataxia telangiectasia and RAD3 related</i>
BAX; <i>Bax</i>	<i>BCL2-associated protein</i>
BCL; <i>Bcl</i>	<i>B-cell lymphoma</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	<i>base pairs</i> ; Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer</i> ; Brustkrebs
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
c-JUN	Komponente des Transkriptionsfaktors AP-1
CarboPt	<i>cis</i> -Diammin(cyclobutan-1,1-dicarboxylato)platin(II); Carboplatin
CDC42	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
CDDO	2-Cyan-3,12-dioxo-1,9-dien-28-oleanolsäure
CDDO-Im	Imidazol des Tripenoids CDDO
CdK	<i>cyclin dependent kinase</i> ; Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CEV	Carboplatin-Etoposid-Vincristin
CENP-F	<i>centromere protein F</i> ; Zentromerprotein F
CHK	Checkpointkinase
CisPt	<i>cis</i> -Diammindichloridoplatin(II); Cisplatin
CML	chronisch myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
Cq-Wert	<i>quantification cycle value</i>
CSA	<i>cockayne syndrome type A protein</i>
CSB; <i>Csb</i>	<i>cockayne syndrome type B protein</i>
CTR1; <i>Ctr1</i>	<i>solute carrier family 31, member 1; copper transporter 1</i> ; Kupfertransporter 1
DACH	1,2-Diaminocyclohexan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DDR	<i>DNA damage response</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbeccos's modified Eagle's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKc	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i>

DNase	Desoxyribonuklease
DSB	Doppelstrangbruch
dT	Desoxythymidin
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EHT	5-(5-(7-(Trifluoromethyl)quinolin-4-ylthio)pentyl)-2-(morpholinomethyl)-4H-pyran-4-on dihydrochlorid
ERCC; <i>Ercc</i>	<i>excision-repair cross-complementing</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> ; extrazellulär regulierte Kinase
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
FADD	<i>FAS-associated death domain protein</i>
FAM	Carboxyfluorescein-Azid
FAS	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOLFOX4	Folinsäure-5-Fluoruracil-Oxaliplatin
γ H2AX	<i>H2A histone family, member X</i> an Serin139 phosphoryliert
g	Erdbeschleunigung; 9,81 m/s ²
G0-Phase	<i>gap 0-Phase</i> ; Ruhephase des Zellzyklus
G1-Phase	<i>gap 1-Phase</i> ; postmitotische bzw. präsynthetische Phase des Zellzyklus
G2-Phase	<i>gap 2-Phase</i> ; postsynthetische bzw. prämitotische Phase des Zellzyklus
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GG	<i>global genomic</i> ; global genomisch
GpG	Guanin-Guanin
GpNpG	Guanin-beliebige Nukleinbase-Guanin
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
H2AX	<i>H2A histone family, member X</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H3	Histon 3
H9c2	Kardiomyoblastenzelllinie aus der Ratte
HCl	Salzsäure
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HNO ₃	Salpetersäure

HNPCC	<i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i> ; nicht-polypöses Kolorektalkarzinom
hOCT	<i>human solute carrier family 22</i> ; <i>human organic cation transporter</i>
HR	<i>homologous recombination</i> ; homologe Rekombination
HR23B	<i>UV excision repair protein RAD23, homolog B</i>
HRP	<i>horseradish peroxydase</i> ; Meerrettich-Peroxidase
HSP	<i>heat shock protein</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration 50 %</i> ; inhibitorische Konzentration 50 %
IC ₈₀	<i>inhibitory concentration 80 %</i> ; inhibitorische Konzentration 80 %
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> ; Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
Ig	Immunglobulin
INT	2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid; Iodnitrotetrazoliumchlorid
JNK	c-JUN N-terminale Kinase
KAP	<i>KRAB-associated protein</i>
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI-67	Proliferationsmarker
KO	Körperoberfläche
KRAB	<i>Krüppel-associated box</i>
λ	Wellenlänge
LDH	Laktatdehydrogenase
M-Phase	Mitosephase des Zellzyklus
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> ; Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MEM	<i>minimal essential medium</i> ; minimal essenzielles Medium
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMR	<i>mismatch repair</i> ; Fehlpaarungsreparatur
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>
MRN	Komplex aus MRE11, RAD50 und NBS1
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP2; <i>Mrp2</i>	<i>multidrug resistance-associated protein 2</i>
MSH	MutS-homolog
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MutSα	Komplex, bestehend aus den MutS-homologen Proteinen MSH2 und MSH6
MYC	Myelocytomatose
n	Anzahl der biologischen Replikate
N	Anzahl der technischen Replikate je biologischem Replikat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid

NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid-Hydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NBS	Nibrin
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
Neutralrot	2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> ; nicht-homologe Strangverknüpfung
NRF2	<i>nuclear factor erythroid 2-like 2</i>
NRK-52E	renale proximale Tubulusepithelzelllinie aus der Ratte
NT2	embryonalen Karzinomzellen
NT2-R	Cisplatin-resistente embryonalen Karzinomzellen
OCT	<i>solute carrier family 22; organic cation transporter</i>
OxaliPt	<i>trans-L-1,2-Diaminocyclohexanoxalatoplatin(II)</i> ; Oxaliplatin
p-	phospho-
P21	Inhibitor von CdKs
P38	MAPK
P53	Tumorsuppressorprotein
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; Polyacrylamid-gelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit 0,3 % Triton X-100
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PE	Cisplatin-Etoposid
PEB	Cisplatin-Etoposid- Bleomycin
PI	Propidiumiodid
PI3k	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKc	<i>protein kinase, catalytic subunit</i> ; katalytische Untereinheit der Proteinkinase
Poly-A	Polyadenylierung
PP	Pyrophosphat
RAC1	<i>RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAD50	DNA-Reparaturprotein
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RFU	<i>relative fluorescence unit</i> ; relative Fluoreszenzeinheit
RGE	renale glomeruläre Endothelzelllinie aus der Ratte
RHO	RAS-homolog
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNA PII	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> ; reaktive Stickstoffspezies
ROCK	<i>RHO-associated coiled-coil-containing protein kinase</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Replikationsprotein A2
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt am <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur

RT-112	humane Blasenurothelkarzinomzelllinie
SAPK	stressaktivierte Proteinkinase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SSB	<i>single-strand break</i> ; Einzelstrangbruch
SSC	<i>standard sodium citrate</i>
SGE1	renale glomeruläre Epithelzelllinie aus der Ratte
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TBS	<i>tris buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
TC	<i>transcription-coupled</i> ; transkriptionsgekoppelt
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> ; Tumornekrosefaktor
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett
vs.	<i>versus</i> ; gegenüber
WAF1	<i>wildtype P53-activated-fragment 1</i>
<i>Xiap</i>	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
XPA; <i>Xpa</i>	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group A protein</i>
XPB	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group B protein</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group C protein</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group D protein</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group F protein</i>
XPG; <i>Xpg</i>	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group G protein</i>
Z-DEVD-	bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-asparaginsäureamid)

1 EINLEITUNG

1.1 KREBSERKRANKUNGEN

Wie aus einer Pressemitteilung des Statistischen Bundesamts (Destasis) von Februar 2015 zu entnehmen ist, stellt Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Destasis Pressemitteilung Nr. 34 vom 02.02.2015). Obwohl Krebs gemeinhin als eine Krankheit der Moderne gilt, beschrieb schon IMHOTEP 2500 v. Chr. neoplastische Knoten in der weiblichen Brust und erkannte, dass es keine Behandlungsmöglichkeiten gibt (Mukherjee, 2010). Krebs kann in den verschiedensten Organen auftreten. Die vielfältigen Krebsarten unterscheiden sich deutlich in ihrer Fähigkeit zur Metastasierung, in der Art ihrer Behandlung sowie in der Überlebensrate der betroffenen Patienten. Solide Tumore werden nach den Geweben eingeteilt aus denen sie sich entwickeln. So entstehen Karzinome aus dem Epithel, das die inneren sowie äußeren Körperoberflächen bedeckt (z. B. Deckgewebe der Haut und der Schleimhäute sowie des Drüsengewebes) und Sarkome aus Binde- oder Stützgewebe (Mesenchym) (z. B. Fettgewebe, Muskeln, Sehnen und Knochen). Blastome sind embryonale Tumore, die während der Gewebe- oder Organentwicklung entstehen. Im Gegensatz zu diesen soliden, zunächst lokal begrenzten Tumoren, breiten sich Tumorerkrankungen des blutbildenden oder lymphatischen Systems (z. B. Leukämie) von Anfang an im ganzen Körper aus. Die häufigsten Tumorlokalisationen bei Männern sind die Prostata, die Lunge und der Darm. Bei Frauen steht die Brustdrüse als häufigste Tumorlokalisation vor dem Darm und der Lunge (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V., 2013). Die stetig steigenden Inzidenzen von Krebserkrankungen sind im Wesentlichen auf einen veränderten Altersaufbau der Bevölkerung zurückzuführen. Für das individuelle Krebsrisiko sind vor allem Umweltfaktoren (z. B. UV-Anteil der Sonnenstrahlung) und der Lebensstil entscheidend. Präventionsstrategien beinhalten daher eine ausgewogene Ernährung, ausreichende Bewegung (Thune und Furberg, 2001) sowie Tabak- und Alkoholabstinenz (Bagnardi *et al.*, 2001; Sasco *et al.*, 2004). Neben diesen vermeidbaren Tumorinzidenzfaktoren spielen auch das Geschlecht sowie die genetische Vorbelastung eine Rolle. Beispiele hierfür stellen die erblichen Formen von Brust- und Darmkrebs dar. Für ersteres haben Frauen,

die eine Mutation in dem für BRCA (*breast cancer*; Brustkrebs) kodierenden Gen aufweisen, ein erhöhtes Risiko (Engel und Fischer, 2015). Obwohl Kolorektalkarzinome zumeist sporadisch auftreten, sind auch hier etwa 5 % bis 10 % der Fälle eine Folge von Vererbung, mit dem hereditären, nicht-polypösen Kolorektalkarzinom (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*; HNPCC; Lynch-Syndrom) als häufigstem Vertreter. Dabei sind vor allem Gene, die für Fehlpaarungsreparaturproteine (*mismatch repair* (MMR)-Proteine) kodieren, mutiert (Macaron *et al.*, 2015).

Bei dem Dreistufenmodell der Tumorentstehung, für welches ISAAC BERENBLUM die Grundlagen schuf, wird in die Phasen der Initiation, einer ersten genetischen Veränderung (Mutation), der Promotion, einer Beschleunigung der Tumorentstehung, sowie der Progression, dem Übergang von einem benignen zu einem malignen Tumor, unterteilt (Berenblum, 1941). Für die Tumorentwicklung wichtige Mutationen verstärken vor allem die Proliferation, wie z. B. RAS (*rat sarcoma*)-aktivierende Mutationen (Bos, 1989), oder inhibieren die Apoptose, wie z. B. P53-inaktivierende Mutationen (Vogelstein *et al.*, 2000). Die dreistufige Unterteilung der Tumorentstehung, welche hauptsächlich auf Analysen zu chemisch induzierter Karzinogenese beruhte, wurde durch ein komplexeres Modell, das die maligne Transformation durch vielfache genetische Veränderungen mit fließenden Übergängen erklärt, ergänzt. Der mehrstufige Prozess der Kanzerogenese führt zu den für maligne Tumore charakteristischen Kennzeichen der kontinuierlichen Proliferationssignale, der Resistenz gegenüber Wachstumsinhibition und Zelltodmechanismen, der replikativen Immortalität, der Stimulation von Angiogenese sowie der aktiven Invasion und Metastasierung (Abbildung 1.1) (Hanahan und Weinberg, 2011). Bei der dafür erforderlichen schrittweisen Anhäufung von genetischen Veränderungen gehen verschiedene Eigenschaften von gesunden Zellen verloren und kommen andere neue, tumorzellspezifische Eigenschaften hinzu.

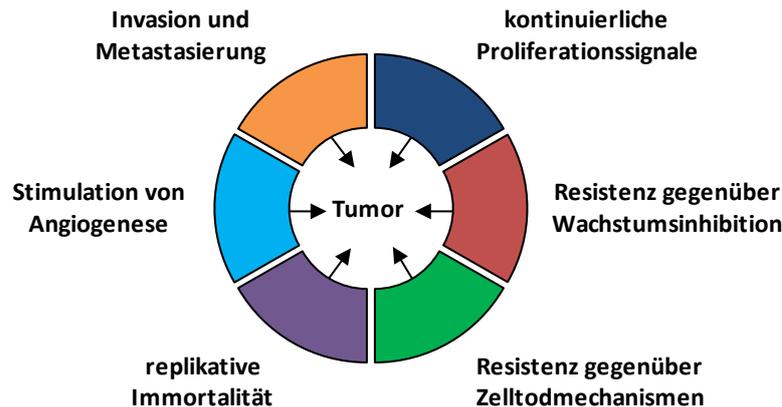


Abbildung 1.1: Eigenschaften von Tumoren.

Obwohl sich verschiedene Tumorerkrankungen hinsichtlich ihrer Überlebensrate oder der Art ihrer Behandlung unterscheiden, weisen Tumore die hier gezeigten sechs Kennzeichen der kontinuierlichen Proliferationssignale, der Resistenz gegenüber Wachstumsinhibition und Zelltodmechanismen, der replikativen Immortalität, der Stimulation von Angiogenese sowie der aktiven Invasion und Metastasierung auf. Modifiziert nach HANAHAN und WEINBERG (Hanahan und Weinberg, 2011).

1.2 ZYTOSTATIKATHERAPIE MALIGNER TUMORE

In Ergänzung zu einem chirurgischen Eingriff und/oder zur Strahlentherapie werden maligne Tumore mit Zytostatika bzw. Zytostatikakombinationen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen behandelt, um eine maximale Reduktion der Tumorgöße zu erzielen. Außerdem soll durch die Wirkstoffkombination eine mögliche Resistenzentwicklung vermieden und dosislimitierende Nebenwirkungen verringert werden.

Klassische Zytostatika hemmen die Zellproliferation und wirken so auch auf nicht-maligne Zellen, wie sich häufig teilende hämatopoetische Zellen (Kojda, 2002). Mögliche Angriffspunkte für Zytostatika stellen die Synthese von Ribonukleotiden, Desoxyribonukleotiden und die DNA-Synthese selbst dar. Je nach Wirkmechanismus bzw. Angriffspunkt lassen sich Zytostatika in Alkylanzien, Platinverbindungen, Interkalanzen, zytostatisch wirkende Antibiotika, Mitosehemmer sowie Antimetabolite und Topoisomerasehemmer unterteilen (Aktories *et al.*, 2009), wobei nicht alle Zytostatika nur einer Gruppe zuzuordnen sind. Alkylanzien wie Stickstofflostverbindungen, Aziridine, Sulfonsäurealkylester, Nitrosoharnstoffverbindungen oder Hydrazinderivate übertragen Alkylgruppen auf die DNA und führen so, wie Platinverbindungen (Abschnitt 1.2.1), über DNA-Verknüpfungen zu einer Hemmung der Replikation und zu DNA-Schäden (z. B. Doppelstrangbrüche; DSBs). Interkalanzen wie Anthrazykline binden an die DNA und verhindern so deren Replikation. Zu den Antibiotika mit zytostatischer Wirkung gehören neben den bereits erwähnten Anthrazyklinen und Aziridinen, Actinomycine sowie Bleomycine.

Mitosehemmer wie Vincaalkaloide oder Taxane sind Mikrotubuliinhibitoren, die spezifisch an das Zytoskelettprotein Tubulin binden und dessen Polymerisation zu Mikrotubuli und somit die Ausbildung des Spindelapparats blockieren. Antimetabolite wie Folsäureantagonisten, Purin- und Pyrimidinanaloga können als „falsche“ Bausteine in die DNA oder RNA eingebaut werden und hemmen so deren Synthese. Hemmer der Topoisomerase I, welche bei der Replikation einen DNA-Strang spaltet, stabilisieren den Spaltungskomplex, sodass die Religation der DNA gehemmt wird und Einzelstrangbrüche bestehen bleiben. Hemmer der Topoisomerase II, die durch das Öffnen und Wiederverschließen von DNA-Strängen diese für die Replikation entwindet, hemmen die Enzymaktivität und stabilisieren gleichzeitig die Bindung der Topoisomerase II an die DNA-Spaltstelle. So kann diese nachfolgend nicht mehr verschlossen werden (Aktories *et al.*, 2009). Neben den hier vorgestellten klassischen Zytostatika werden zur Behandlung von Tumorerkrankungen weitere Substanzen wie z. B. Hormonantagonisten, monoklonale Antikörper sowie Tyrosinkinase- und Angiogenesehemmer (z. B. Gefitinib und Sorafenib) verwendet. In Tabelle 1.1 sind beispielhaft Wirkstoffe der oben genannten Substanzgruppen sowie Beispiele für deren Indikation aufgelistet.

Tabelle 1.1. Beispiele für Wirkstoffe und Indikationen der unterschiedlichen Substanzgruppen von Zytostatika.

Substanzgruppe	Wirkstoff	Indikation	Quelle
Actinomycine	Dactinomycin	Endometriumkarzinom	(Moore <i>et al.</i> , 1999)
Angiogenesehemmer	Sorafenib	anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
Anthrazykline	Doxorubicin	Mammakarzinom	(Sledge <i>et al.</i> , 2003)
Aziridine	Mitomycin C	Bronchialkrebs	(Ekholm <i>et al.</i> , 1983)
Bleomycine	Bleomycin	Hodentumor	(Price und Peters, 1992)
Folsäureantagonisten	Methotrexat	akute lymphatische und myeloische Leukämie	(Hryniuk und Bertino, 1969)
Hormonantagonisten	Tamoxifen	Mammakarzinom	(Hu <i>et al.</i> , 2015)
Hydrazinderivate	Temozolomid	Gliom	(Hart <i>et al.</i> , 2013)
monoklonale Antikörper	Trastuzumab	Mammakarzinom	(Hortobagyi, 2005)
Nitrosoharnstoff- verbindungen	Carmustin	Hirntumor	(Lange <i>et al.</i> , 1987)
Purinanaloga	6-Thioguanin	nicht-lymphatische Leukämie	(Odom <i>et al.</i> , 1988)
Pyrimidinanaloga	5-Fluoruracil	Kolorektalkarzinom	(Saltz <i>et al.</i> , 2000)
Stickstofflost- verbindungen	Ifosfamid	Zervixkarzinom	(Tobias <i>et al.</i> , 1990)
Sulfonsäurealkylester	Busulfan	Chronisch myeloische Leukämie	(Hehlmann <i>et al.</i> , 1993)

Taxane	Paclitaxel	Ovarialkarzinom	(Ozols <i>et al.</i> , 2003)
Topoisomerase I-Hemmer	Irinotecan	Kolorektalkarzinom	(Saltz <i>et al.</i> , 2000)
Topoisomerase II-Hemmer	Etoposid	kleinzelliges Bronchialkarzinom	(Yilmaz <i>et al.</i> , 2011)
Tyrosinkinasehemmer	Gefitinib	nicht-kleinzelliger Lungenkrebs	(Maemondo <i>et al.</i> , 2010)
Vincaalkaloide	Vincristin	kleinzelliges Bronchialkarzinom	(von Pawel <i>et al.</i> , 1999)

1.2.1 PLATINVERBINDUNGEN

Platinkomplexe, Koordinationsverbindungen des Platins, werden als Zytostatika zur Therapie von einer Vielzahl solider Tumoren verwendet (siehe Abschnitte 1.2.1.1, 1.2.1.2 und 1.2.1.3). Der erste und prominenteste Vertreter dieser Übergangsmetallkomplexe, Cisplatin (*cis*-Diammindichloridoplatin(II); *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]; CisPt), (Abbildung 1.2 und Abschnitt 1.2.1.1) wurde erstmals 1844 von dem italienischen Chemiker MICHELE PEYRONE als „Peyrones Chlorid“ beschrieben. Seine zytotoxische Wirkung wurde aber erst über 100 Jahre später zufällig von BARNETT ROSENBERG entdeckt, der bei Wachstumsuntersuchungen des Darmbakteriums *Escherichia coli* in einem elektrischen Feld eine vollständig gehemmte Zellteilung bei unvermindertem Größenwachstum beobachten konnte (Rosenberg *et al.*, 1965; Rosenberg *et al.*, 1967). Dies basierte darauf, dass die verwendeten, vermeintlich inerten, Platinelektroden Platinionen in das ammoniumchloridhaltige Wachstumsmedium abgaben, sich also während der Elektrolyse zersetzten, was zur Bildung von *cis*-Diammindichloridoplatin(II)-Komplexen führte (Rosenberg *et al.*, 1967). ROSENBERG schloss daraus, dass, ein Platinkomplex, der die Bakterienteilung hemmen kann, möglicherweise auch die unkontrollierte Zellteilung bei Krebserkrankungen verhindert (Rosenberg *et al.*, 1969). Cisplatin wurde 1978 in den USA von der *Food and Drug Administration* (FDA) für die klinische Verwendung zur Behandlung von Hoden- und Blasenkrebs zugelassen (Prestayko *et al.*, 1979; Kelland, 2007).

Platinverbindungen werden je nach Entwicklungszeitpunkt verschiedenen Generationen zugeordnet, wobei Cisplatin die erste Generation repräsentiert. Die zweite Generation, mit Carboplatin (*cis*-Diammin(cyclobutan-1,1-dicarboxylato)platin(II); CarboPt) (Abbildung 1.2 und Abschnitt 1.2.1.2) als wichtigstem Vertreter, weist eine höhere pharmakologische Spezifität sowie andere Nebenwirkungen als Cisplatin auf. Die dritte Generation mit Oxaliplatin (*trans*-L-1,2-Diaminocyclohexanoxalatoplatin(II); OxaliPt) (Abbildung 1.2 und

Abschnitt 1.2.1.3) zeigt vor allem ein verändertes Wirkungsprofil (Raymond *et al.*, 2002). Cis-, Carbo- und Oxaliplatin unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik als auch hinsichtlich ihrer Indikation und den, zum Teil dosislimitierenden, Nebenwirkungen, die eine Chemotherapie mit diesen Platinverbindungen mit sich bringt.

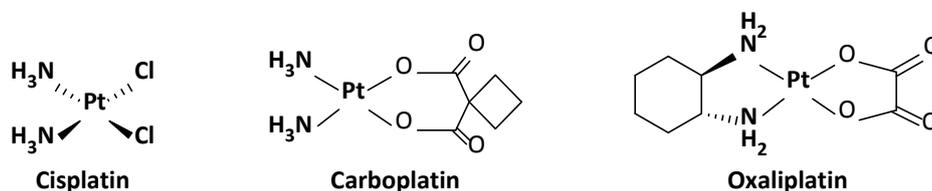


Abbildung 1.2: Chemische Strukturen von in der Klinik verwendeten Platinverbindungen.

Cisplatin (*cis*-Diammindichloridoplatin(II)) und Carboplatin (*cis*-Diammin(cyclobutan-1,1-dicarboxylato)-platin(II)) werden in der Klinik hauptsächlich zur Behandlung von Tumoren des Urogenitaltrakts verwendet. Weitere Indikationen sind das Bronchialkarzinom sowie Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches. Hauptanwendungsgebiet für Oxaliplatin (*trans*-L-1,2-Diaminocyclohexanoxalatoplatin(II)) ist das Kolorektalkarzinom.

1.2.1.1 CISPLATIN

Cisplatin stellt einen quadratisch planaren Platinkomplex dar, an dessen Platinatom mit der Oxidationsstufe +II zwei *cis*-ständige Chloridliganden sowie zwei Ammoniumgruppen kovalent gebunden sind (Abbildung 1.2). Hauptanwendungsgebiet für Cisplatin sind Tumore des Urogenitaltrakts wie Ovarial-, Zervix-, Endometrium-, Prostata-, Hoden- und Blasen-tumore sowie Kopf-Hals- und Lungentumore (Ali *et al.*, 2013).

Das ungeladene Cisplatin gelangt als *Prodrug* durch passive Diffusion und/oder durch Transportproteine wie dem Kupfertransporter CTR1 (*solute carrier family 31, member 1; copper transporter 1*) oder dem Kationentransporter OCT2 (*solute carrier family 22, member 2; organic cation transporter 2*) in die Zelle (Ishida *et al.*, 2002; Pabla *et al.*, 2009; Ciarimboli *et al.*, 2010; Yonezawa und Inui, 2011). Anschließend werden aufgrund der niedrigeren intrazellulären Chloridkonzentration von 3 mM bis 20 mM, im Gegensatz zu etwa 100 mM in extrazellulären Flüssigkeiten, die Chloridliganden des Cisplatin sukzessive durch Wassermoleküle substituiert (Abbildung 1.3) (Jamieson und Lippard, 1999). So entsteht der kationische Diaquakomplex $[cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$. Dieses elektrophile Intermediat kann in den Zellkern diffundieren und die DNA in einer S_N2 -Reaktion angreifen (Ali *et al.*, 2013). Dies geschieht bevorzugt an dem nukleophilen N7-Atom des Imidazolringes der Purinbasen Guanin und Adenin, mit einer stärkeren Präferenz für Guanin (Baik *et al.*, 2003). Hier ist die Elektronendichte für den Angriff des

positiv geladenen Komplexes am größten (Gelasco und Lippard, 1998). Es werden DNA-Monoaddukte gebildet ($t_{1/2}$: 0,1 h), die zu bivalenten Intra- und Interstrangverknüpfungen weiterreagieren können ($t_{1/2}$: 2,1 h), sofern sich weitere reaktive Stellen in unmittelbarer Nähe befinden (Bancroft *et al.*, 1990) (Abbildung 1.3).

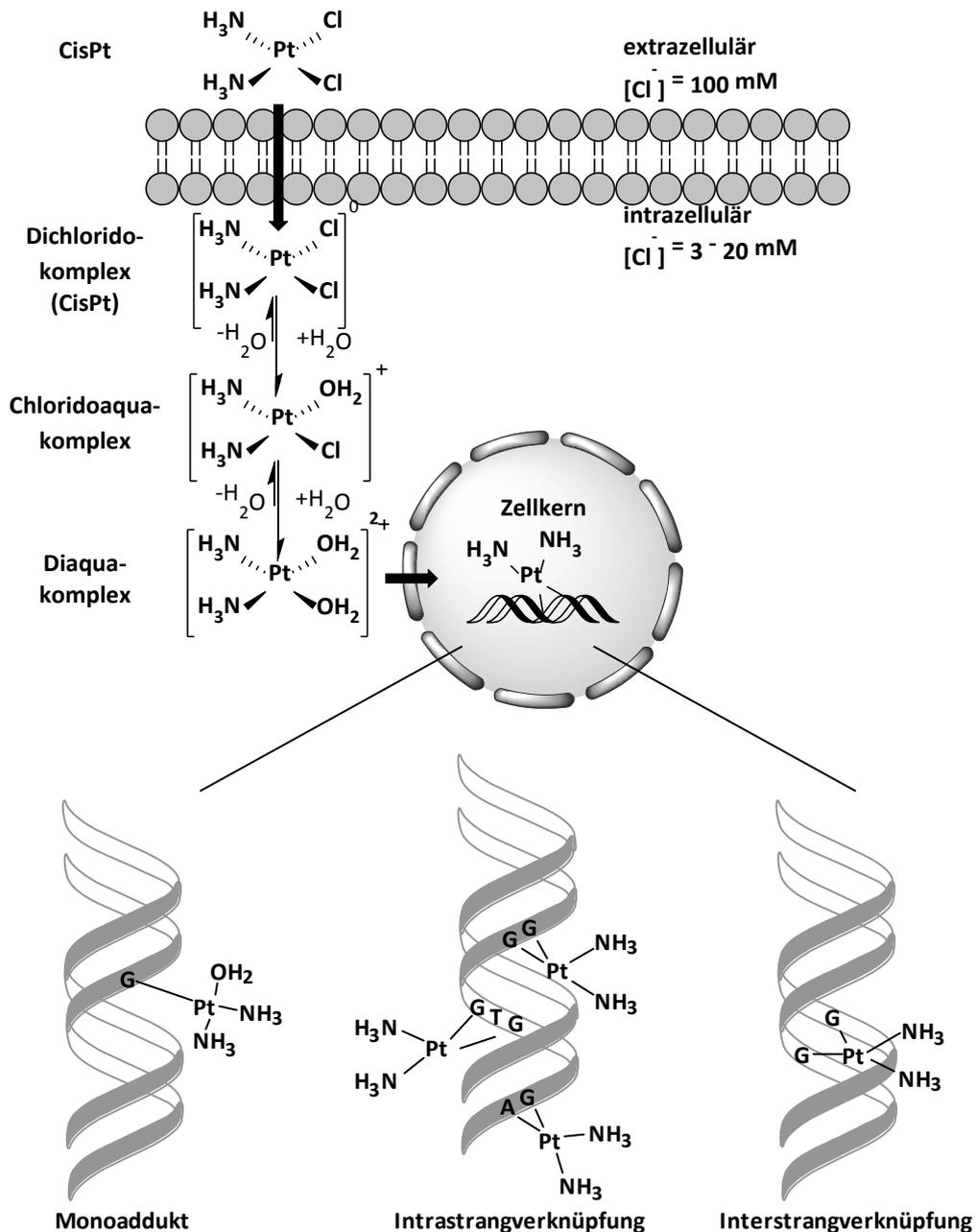


Abbildung 1.3: Bioaktivierung von Cisplatin und resultierende Platin-DNA-Addukte.

Nachdem Cisplatin (CisPt) durch passive Diffusion und/oder durch Transportproteine in die Zelle gelangt ist, wird es aufgrund der niedrigeren intrazellulären Chloridkonzentration ($[Cl^-]$) hydrolysiert. Der so entstandene kationische Diaquakomplex kann in den Zellkern diffundieren und die DNA in einer S_N2 -Reaktion angreifen. Dies geschieht bevorzugt an dem nukleophilen N7-Atom von Guanin oder Adenin. So werden DNA-Monoaddukte gebildet, die zu bivalenten Intra- und Interstrangverknüpfungen weiterreagieren können. Modifiziert nach JUNG und LIPPARD sowie RABIK und DOLAN (Jung und Lippard, 2007; Rabik und Dolan, 2007).

Für die zytotoxische Wirkung von Cisplatin sind vor allem Addukte verantwortlich, bei denen zwei benachbarte Guanine innerhalb eines DNA-Strangs miteinander verknüpft sind (1,2-d(GpG)-Addukte) (Pinto und Lippard, 1985). Sie kommen mit einer Häufigkeit von 60 % bis 65 % vor (Kartalou und Essigmann, 2001; Rebillard *et al.*, 2008). Adenin-Guanin-Intrastrangverknüpfungen (1,2-d(ApG)-Addukte) sowie Intrastrangverknüpfungen von zwei nicht direkt benachbarten Guaninen (1,3-d(GpNpG)-Addukte) sind mit einer Auftretshäufigkeit von 25 % bis 30 % bzw. 5 % bis 10 % wesentlich seltener. Zudem treten mit einer Häufigkeit von 1 % bis 2 % Interstrangverknüpfungen und residuale Monoaddukte auf (Fichtinger-Schepman *et al.*, 1985).

Die DNA-Verknüpfungen beeinträchtigen bzw. blockieren die Transkription und Replikation der DNA (Mello *et al.*, 1995; Cohen und Lippard, 2001), indem sie die DNA-Doppelhelix deformieren. Schon Cisplatinmonoaddukte erniedrigen die thermische Stabilität der DNA-Doppelhelix in direkter Umgebung und führen zu DNA-Verzerrungen (Brabec *et al.*, 1992). Die Ausbildung bivalenter Addukte führt zu zusätzlichen Veränderungen in der Sekundärstruktur. So drillen 1,2-Intrastrangverknüpfungen die DNA um etwa 13° auf und biegen die Doppelhelix um etwa 34° zur großen Furche (Rice *et al.*, 1988; Bellon *et al.*, 1991; Takahara *et al.*, 1995; Jamieson und Lippard, 1999). Dadurch kommt es zu einer Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen und die thermische Stabilität der DNA wird verringert. In Folge einer blockierten Replikation können Strangbrüche als sekundäre Läsionen entstehen (Olive und Banath, 2009). Diese führen zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort, die gegebenenfalls einen Zellzyklusarrest und die Reparatur der DNA-Schäden einleitet (Abschnitt 1.3.1). Ist der DNA-Schaden zu gravierend und übersteigt die zelluläre DNA-Reparaturkapazität, so kommt es zu Zelltod durch Apoptose (Norbury und Zhivotovsky, 2004; Roos und Kaina, 2013) oder Nekrose (Hirst *et al.*, 2015). Intrazellulär kann das aktivierte Cisplatin zudem mit anderen Nukleophilen, wie z. B. dem schwefelhaltigen Tripeptid Glutathion (GSH) und Amino- oder Thiolgruppen von Proteinen reagieren. Bindet Cisplatin an GSH, so wird es unter anderem aktiv über den Exporter MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*) aus der Zelle sezerniert (Chen und Kuo, 2010), was zur raschen Entgiftung beiträgt. Auch RNA steht als reaktiver Partner zur Verfügung (Hostetter *et al.*, 2012).

Ein Beispiel für die Anwendung von Cisplatin stellt die Behandlung von Keimzelltumoren des Hodens mit einer Kombination aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin (PEB-Schema) (Tabelle 1.2) dar. Dieses Therapieschema erhöhte die 5-Jahresüberlebensrate von Hodentumorpatienten von etwa 45 % auf über 90 % (Williams *et al.*, 1987; de Wit, 1999).

Tabelle 1.2: PEB-Schema zur Behandlung von Hodentumoren.

Bei diesem Therapieschema mit einer Zyklusdauer von 21 Tagen werden Cisplatin, Etoposid und Bleomycin intravenös verabreicht (Berger *et al.*, 2008). KO: Körperoberfläche.

Tag	Substanz	Dosierung [mg/m ² KO]
1 - 5	Cisplatin	20
1 - 5	Etoposid	100
1, 8, 15	Bleomycin	30 (absolut)

Für die klinische Anwendung von Cisplatin ist vor allem seine schwerwiegende Nephrotoxizität dosislimitierend (Yao *et al.*, 2007) (Abschnitt 1.4.1).

1.2.1.2 CARBOPLATIN

Bei Carboplatin, das seit 1981 klinisch verwendet wird (Muggia, 1989), sind die beiden Chloridliganden des Cisplatins durch einen stabilen Cyclobutandicarboxylatring, der vergleichsweise wenig reaktiv ist, ersetzt (Abbildung 1.2). Der Wirkmechanismus von Carboplatin entspricht dem von Cisplatin, wobei die Umwandlung in die aktive Form hier bedeutend langsamer stattfindet (Wagstaff *et al.*, 1989). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Substitutionsreaktion ist das Öffnen des Cyclobutandicarboxylattrings durch ein Nukleophil. Durch die räumliche Anordnung dieses Rings über der Platinebene werden der nukleophile Angriff und die Ausbildung des trigonal planaren Übergangszustandes während der S_N2-Reaktion sterisch behindert. Dies hat einen verlangsamten Wirkungseintritt zur Folge.

Carboplatin zeichnet sich durch eine niedrigere Toxizität, erhöhte Stabilität sowie Wasserlöslichkeit im Vergleich zu Cisplatin aus. Carboplatin hat das gleiche Anwendungsspektrum wie Cisplatin, jedoch sind die unerwünschten Nebenwirkungen unterschiedlich. Dosislimitierend ist bei Carboplatin die Myelosuppression (Wagstaff *et al.*, 1989; Hartmann und Lipp, 2003). Zudem hat die verminderte Reaktivität zur Folge, dass höhere therapeutische Dosen erforderlich sind. Beispielsweise werden bei der Chemotherapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms 80 mg Cisplatin je m² Körperoberfläche verabreicht

(PE-Schema), wohingegen 300 mg Carboplatin je m² Körperoberfläche benötigt werden (CEV-Schema) (Berger *et al.*, 2008) (Tabelle 1.3).

Tabelle 1.3: PE- und CEV-Schema zur Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms.

Gezeigt sind links das PE-Schema sowie rechts das CEV-Schema zur Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Bei diesen Therapieschemata mit einer Zyklusdauer von 21 Tagen werden Cisplatin, Etoposid und Vincristin intravenös verabreicht (Berger *et al.*, 2008). KO: Körperoberfläche.

Tag	Substanz	Dosierung [mg/m ² KO]	Tag	Substanz	Dosierung [mg/m ² KO]
1	Cisplatin	80	1	Carboplatin	300
1 - 3	Etoposid	120	1 - 3	Etoposid	120
			1, 8, 15	Vincristin	1,4

Carboplatin bildet dieselben DNA-Verknüpfungen wie Cisplatin aus, ihre Verteilung ist allerdings grundlegend verschieden (Wagstaff *et al.*, 1989; Blommaert *et al.*, 1995). Hier werden zu etwa 36 % 1,3-d(GpNpG)-Intrastrangverknüpfungen gebildet, gefolgt von 30 % 1,2-d(GpG)- und 15 % 1,2-d(ApG)-Intrastrangverknüpfungen. Interstrangverknüpfungen sowie Monoaddukte entstehen zu 3 % bis 4 %. Die Ähnlichkeit in den DNA-Addukten führt zu einer Kreuzresistenz zu Cisplatin (Gore *et al.*, 1989; Eisenhauer *et al.*, 1990).

1.2.1.3 OXALIPLATIN

Bei Oxaliplatin ist das Platinatom mit 1,2-Diaminocyclohexan (DACH) und einer Oxalatgruppe komplexiert (Abbildung 1.2). Es wird angenommen, dass der Oxalatligand als Abgangsgruppe bereits im Plasma durch Chloridionen ersetzt wird und die Bioaktivierung von Oxaliplatin so ähnlich der von Cisplatin abläuft (Rivory, 2002; Jerremalm *et al.*, 2004; Alcindor und Beauger, 2011). Der DACH-Ligand bleibt unverändert an dem Platinatom gebunden. Aufgrund dieser DACH-Struktur hemmt Oxaliplatin die DNA-Synthese vermutlich effektiver als Cisplatin (Raymond *et al.*, 1998) und die Aufwindungen der DNA-Doppelhelix unterscheiden sich von den durch Cisplatin verursachten (Scheeff *et al.*, 1999). Der in der Sesselkonformation vorliegende DACH-Ring ragt in die große Furche, was diese deutlich verändert und weniger polar macht (Saris *et al.*, 1996; Scheeff *et al.*, 1999). In Studien mit reiner DNA, in denen sowohl äquimolare als auch äquitoxische Konzentrationen von Cis- und Oxaliplatin eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der DNA-Platinierung bei letzterem wesentlich geringer ist, der Anteil an DNA-Einzelstrangbrüchen im Vergleich zu Cisplatin jedoch deutlich erhöht ist (Raymond *et al.*, 2002; Faivre *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu Cisplatin wird Oxaliplatin als Platinverbindung der dritten Generation hauptsächlich zur Behandlung von Kolorektalkarzinomen eingesetzt, bei denen Cisplatin keine Wirkung zeigt (Judson und Kelland, 2000; Ali *et al.*, 2013). Es wurde erstmals 1998 für die Erstlinientherapie zugelassen. Die Wirkung von Oxaliplatin ist unabhängig von MMR-Proteinen, die mit einer höheren Affinität an Cisplatin-DNA-Addukte als an Oxaliplatin-DNA-Addukte binden (Fink *et al.*, 1996; Zdraveski *et al.*, 2002). Defekte in Genen der MMR, wie sie häufig bei Kolorektalkarzinomen auftreten, erhöhen so die Resistenz gegenüber Cisplatin, haben aber keinen Effekt auf die Oxaliplatintherapie, was die besondere Effizienz von Oxaliplatin gegen das Kolorektalkarzinom (FOLFOX4-Schema) (Tabelle 1.4) ausmacht.

Tabelle 1.4: FOLFOX4-Schema zur Behandlung des Kolorektalkarzinoms.

Bei diesem Therapieschema mit einer Zyklusdauer von 14 Tagen werden Oxaliplatin, Folinsäure und 5-Fluoruracil intravenös verabreicht (Preiß *et al.*, 2014). KO: Körperoberfläche.

Tag	Substanz	Dosierung [mg/m ² KO]
1	Oxaliplatin	85
1, 2	Folinsäure	200
1, 2	5-Fluoruracil	400 (Bolus)
1, 2	5-Fluoruracil	600

Nicht nur diese zu Cisplatin verschiedene Indikation, sondern auch andere Nebenwirkungen zeichnen Oxaliplatin aus. Bei Oxaliplatin ist die kumulative Neurotoxizität dosislimitierend (Hartmann und Lipp, 2003). Oxaliplatin zeigt trotz dieser nennenswerten Unterschiede ein ähnliches Spektrum an DNA-Verknüpfungen wie für Cisplatin beschrieben (Jennerwein *et al.*, 1989; Woynarowski *et al.*, 1998; Woynarowski *et al.*, 2000).

1.3 ZELLULÄRE STRESSANTWORT

1.3.1 DNA-SCHADENSANTWORT

Als Folge von Reparaturprozessen (Abschnitt 1.3.1.1) und Replikationsblockaden kann es zu DNA-Strangbrüchen kommen. Durch DSBs oder Replikationsstress werden die Serin/Threonin-Kinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*) oder die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*; DNA-PKcs) aktiviert

(Savitsky *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1999; Smith und Jackson, 1999) (Abbildung 1.4). ATM und DNA-PKcs erkennen hauptsächlich DSBs, wohingegen ATR durch Einzelstrangbereiche bei einer blockierten Replikationsgabel aktiviert wird. Ein Komplex bestehend aus den Proteinen MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 und NBS1 (Nibrin), der MRN-Komplex, dient als Doppelstrangbruchsensor und ermöglicht die Bindung von ATM. Nachdem ATM an den Doppelstrangbruch gebunden hat, dissoziiert das zuvor inaktive Dimer in ein Monomer, welches autophosphoryliert und so aktiviert wird (Bakkenist und Kastan, 2003). Einzelstrangbereiche während einer blockierten Replikation werden von dem Replikationsprotein A2 (RPA) erkannt, woraufhin ATR zu der Läsion gelangt (Zou und Elledge, 2003). ATM rekrutiert weitere Schadensindikatoren wie das P53-bindende Protein 1 (53BP1). Als Folge der Rekrutierung von ATR und ATM und der Aktivierung von letzterem werden eine Reihe spezifischer Substrate phosphoryliert, die z. B. an der Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur sowie an der Apoptose beteiligt sind. Die Phosphorylierung der Checkpointkinasen 1 und 2 (CHK1 und CHK2) durch ATR bzw. ATM sind wesentlicher Bestandteil der Zellzykluskontrolle (Guo *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2000). Unter anderem wird nachgeschaltet das Tumorsuppressorprotein P53 phosphoryliert. P53 ist unter normalen Bedingungen instabil und wird ubiquitinvermittelt unter Einbezug von MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) als Ubiquitinligase abgebaut. In seiner phosphorylierten Form kann P53 nicht mehr abgebaut werden. Der so akkumulierende P53-Spiegel stimuliert die Expression einer Reihe von Genen, zu denen unter anderem das Gen des Inhibitors cyclinabhängiger Kinasen (*cyclin dependent kinase*; Cdk) P21^{WAF1} sowie die Gene der proapoptotischen Proteine der BCL2 (*B-cell lymphoma 2*)-Familie wie z. B. BAX (*BCL2-associated X protein*) und anderer, an der Apoptose beteiligter Faktoren gehören. So wird entweder ein Zellzyklusarrest induziert, z. B. der Zellzyklusübergang von der G1- zur S-Phase durch P21^{WAF1} (Hoeflerlin *et al.*, 2011), oder caspasevermittelt Apoptose eingeleitet (Abschnitt 1.3.2), wenn der DNA-Schaden zu umfangreich und nicht reparierbar ist. Ein durch P21^{WAF1} eingeleiteter Zellzyklusarrest kann sowohl P53-abhängig als auch -unabhängig erfolgen (Russo *et al.*, 2013). Als Folge der Erkennung von DSBs oder von Replikationsstress wird außerdem das Histon H2AX (*H2A histone family, member X*) durch ATM und ATR an seinem Serin 139 phosphoryliert (γ H2AX), was die Rekrutierung weiterer DNA-Reparaturfaktoren nach sich zieht (Mah *et al.*, 2010). γ H2AX kann als Surrogatmarker für die Menge an DSBs verwendet werden

(Löbrich *et al.*, 2010; Valdiglesias *et al.*, 2013). ATM phosphoryliert während der DNA-Schadensantwort zudem den KRAB (*Krüppel-associated box*)-Korepressor KAP1 (*KRAB-associated protein 1*), welcher für die Chromatinkondensation verantwortlich ist (Cann und Dellaire, 2011).

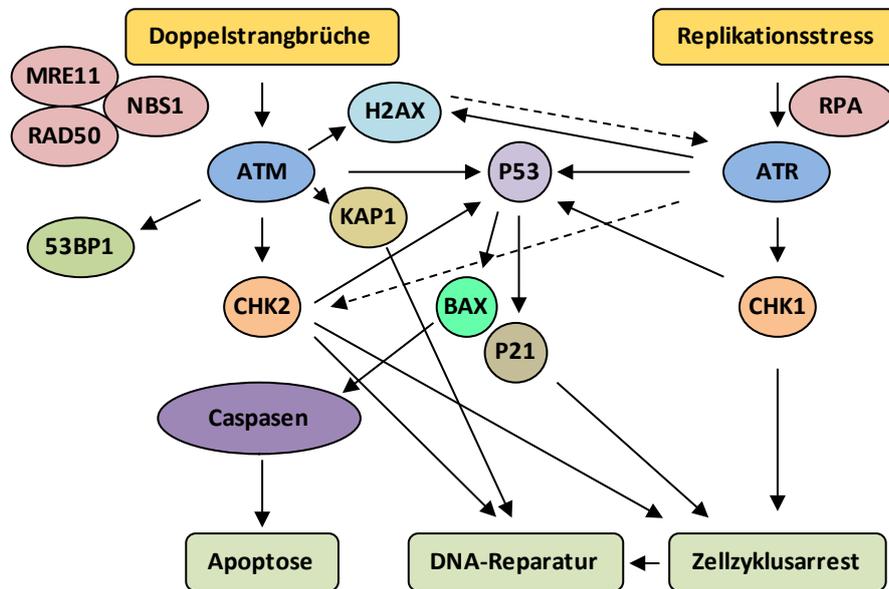


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort.

Durch Doppelstrangbrüche (DSBs) bzw. Replikationsstress kommt es zur Aktivierung von ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) oder ATR (*Ataxia telangiectasia und RAD3 related*). Als Doppelstrangbruchsensordient ein Komplex bestehend aus den Proteinen MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 und NBS1 (Nibrin). Er ermöglicht die Bindung von ATM an den Bruch. ATM rekrutiert bzw. phosphoryliert weitere Schadensindikatoren wie 53BP1 (P53-bindendes Protein 1) oder H2AX (*H2A histone family, member X*). Einzelstrangbereiche bei einer blockierten Replikationsgabel werden von RPA (Replikationsprotein A2) erkannt, woraufhin ATR zu der Läsion rekrutiert wird, was ebenfalls H2AX phosphoryliert. Nachfolgend werden eine Reihe spezifischer Substrate phosphoryliert. Die Phosphorylierung von CHK1 und 2 (Checkpointkinase 1 und 2) durch ATR bzw. ATM sind wesentlicher Bestandteil der Zellzykluskontrolle. Unter anderem wird nachgeschaltet das Tumorsuppressorprotein P53 phosphoryliert, welches wiederum P21, sowie proapoptotische Proteine wie BAX (*BCL2-associated protein*) aktiviert. So wird entweder ein Zellzyklusarrest induziert, der DNA-Reparatur ermöglicht oder über Caspasen Apoptose eingeleitet. KAP1: *KRAB-associated protein 1*. Die gestrichelten Linien stellen weniger starke Einflüsse dar. Modifiziert nach ZHOU und BARTEK, SIDDIK, LJUNGMAN sowie BRANZEI und FOIANI (SIDDIK, 2003; ZHOU UND BARTEK, 2004; BRANZEI UND FOIANI, 2008; LJUNGMAN, 2010).

1.3.1.1 DNA-REPARATUR

Um den Erhalt der genetischen Information nach DNA-Schäden, ausgelöst durch endogene oder exogene Einflüsse, zu gewährleisten, haben sich verschiedene DNA-Reparaturmechanismen entwickelt.

Bei der Reversionsreparatur wird der DNA-Schaden durch enzymatische Reaktionen behoben. Sowohl die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) als auch die Dioxygenase stellen Enzyme dieses Reparaturmechanismus dar. MGMT entfernt eine prä-

mutagene Alkylierung am O6-Atom des Guanins, welche aufgrund einer möglichen Fehlpaarung mit Thymin gravierende Folgen hätte, indem eine Methylgruppe direkt auf das MGMT-Protein übertragen wird. So wird die Alkyltransferase MGMT inaktiviert und Guanin in der DNA wieder hergestellt (Christmann *et al.*, 2003). Die Dioxygenase entfernt Methylierungen im N1-Atom des Adenins sowie im N3-Atom des Cytosins.

Die meisten Basenschäden werden durch die Basenexzisionsreparatur (BER), an welcher neben verschiedenen Reparaturproteinen auch die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) beteiligt ist, entfernt. Dabei schneiden DNA-Glykosylasen veränderte DNA-Basen aus, wobei apurine Stellen entstehen, die durch nachfolgende Stranginzision, sowie DNA-Polymerasen und -Ligasen repariert werden (Christmann *et al.*, 2003).

Die bereits in vorherigen Abschnitten erwähnte MMR entfernt Basenfehlpaarungen aus der DNA. Dabei werden neben spontan auftretenden Fehlpaarungen auch chemisch induzierte DNA-Läsionen, wie die zuvor bereits genannten O6-Methylguaninfehlpaarungen mit Thymin (Duckett *et al.*, 1996) oder 1,2-d(GpG)-Intrastrangverknüpfungen nach Cis- (Mello *et al.*, 1996) nicht aber nach Oxaliplatinbehandlung (Nehme *et al.*, 1999) erkannt. Bei der MMR wird die Läsion durch den MutS α -Komplex, bestehend aus den MutS-homologen Proteinen MSH2 und MSH6, erkannt. Dadurch wird ein weiterer Proteinkomplex an die Fehlpaarungsstelle rekrutiert, welcher einen Strangbruch einführt. Dieser wird wiederum von einer Exonuklease erkannt, die die fehlerhafte DNA entfernt. Abschließend wird der DNA-Strang durch Polymerasen neu synthetisiert und von einer Ligase verbunden (Christmann *et al.*, 2003).

Die für die Zelle besonders kritischen DSBs, welche durch ionisierende Strahlung, durch Zytostatika (Abschnitt 1.2) oder auch während der Replikation an Stellen mit DNA-Basenschäden, DNA-Strangverknüpfungen oder Einzelstrangbrüchen entstehen, werden durch die DNA-Doppelstrangbruchreparatur behoben. Sie kann sowohl als nicht-homologe Strangverknüpfung (*non-homologous end joining*; NHEJ) als auch als homologe Rekombination (*homologous recombination*; HR) erfolgen (Shrivastav *et al.*, 2008).

Die Erkennung sowie Prozessierung der oben beschriebenen Cisplatin-DNA-Addukte (Abschnitt 1.2.1.1) erfolgt hauptsächlich über die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) (Zamble und Lippard, 1995; Zamble *et al.*, 1996; Reed, 1998), die sich bei Eukaryonten in

die globale genomische (*global genomic*; GG) und die transkriptionsgekoppelte (*transcription-coupled*; TC) NER untergliedert (Friedberg *et al.*, 1995; Christmann *et al.*, 2003) (Abschnitt 1.3.1.1.1 und Abbildung 1.5).

1.3.1.1.1 NUKLEOTIDEXZISIONSREPARATUR (NER)

Die beiden Wege der NER (Abbildung 1.5), die vor allem für die Beseitigung UV-induzierter DNA-Schäden verantwortlich ist (Friedberg, 2006), unterscheiden sich in der Erkennung der DNA-Schäden, der beteiligten DNA-Reparaturfaktoren, der Lokalisation der zu reparierenden DNA-Schäden sowie den Umständen, unter denen sie reparieren. Die GG-NER repariert DNA-Schäden hauptsächlich in transkriptionell inaktiven Bereichen des Genoms (Christmann *et al.*, 2003), wohingegen die TC-NER DNA-Schäden repariert, die in transkriptionell aktiven Genbereichen auftreten (Bohr *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 2003). Dieser Mechanismus erkennt und repariert transkriptionsblockierende DNA-Schäden. Er wird aktiviert, wenn die RNA-Polymerase II (RNA PII) auf eine Verformung der durch den Transkriptionsfaktor TFIIH entwundenen DNA-Doppelhelix stößt und so an der Transkription gehindert wird. Dieser Transkriptionsstopp führt zur Rekrutierung von CSA (*cockayne syndrome type A protein*; ERCC8 (*excision-repair cross-complementing 8*)) und CSB (*cockayne syndrome type B protein*; ERCC6 (*excision-repair cross-complementing 6*)) an die Läsionsstelle (Nakatsu *et al.*, 2000). Dadurch wird die RNA PII von der Läsion entfernt, wodurch diese für die nachfolgenden Reparaturproteine zugänglich wird. Bei der GG-NER erfolgt der Erkennungsschritt durch das Heterodimer XPC (*Xeroderma pigmentosum, complementation group C protein*)-HR23B (*UV excision repair protein RAD23 homolog B*). Zur weiteren DNA-Schadenserkennung dienen bei der GG-NER XPA (*Xeroderma pigmentosum, complementation group A protein*) und RPA, welche den Transkriptionsfaktor TFIIH mit den Helikasen XPB (*Xeroderma pigmentosum, complementation group B protein*) und XPD (*Xeroderma pigmentosum, complementation group D protein*) zur distordierten DNA-Läsion dirigieren. Diese entwenden die DNA unmittelbar in der Nähe der Läsion und XPA sowie RPA stabilisieren das geöffnete Intermediat anschließend. Sowohl bei der GG- als auch bei der TC-NER werden die Endonukleasen XPF (*Xeroderma pigmentosum, complementation group F protein*)-ERCC1 (*excision-repair cross-complementing 1*) sowie XPG (*xeroderma pigmentosum, complementation group G protein*; ERCC5 (*excision-repair cross-complementing 5*)) an die zuvor markierte Stelle rekrutiert (Sarker *et al.*, 2005). XPF schneidet den beschädigten DNA-Strang vor dem

Schaden in 5'-Position (Inzision), XPG etwa 24 bp bis 32 bp entfernt von dem ersten Einschnitt in 3'-Richtung, sodass das schadhafte DNA-Einzelstrangstück herausgeschnitten wird (Exzision). Anschließend ersetzen die DNA-Polymerasen δ und ϵ den fehlenden Bereich, indem sie den unbeschädigten komplementären Strang als Matrize verwenden. Bevor die Transkription fortgeführt werden kann, wird das 5'-Ende durch die DNA-Ligase I an den Strang ligiert (de Laat *et al.*, 1999). Vor allem die TC-NER ist an der Reparatur der Cisplatin-DNA-Addukte beteiligt (Furuta *et al.*, 2002).

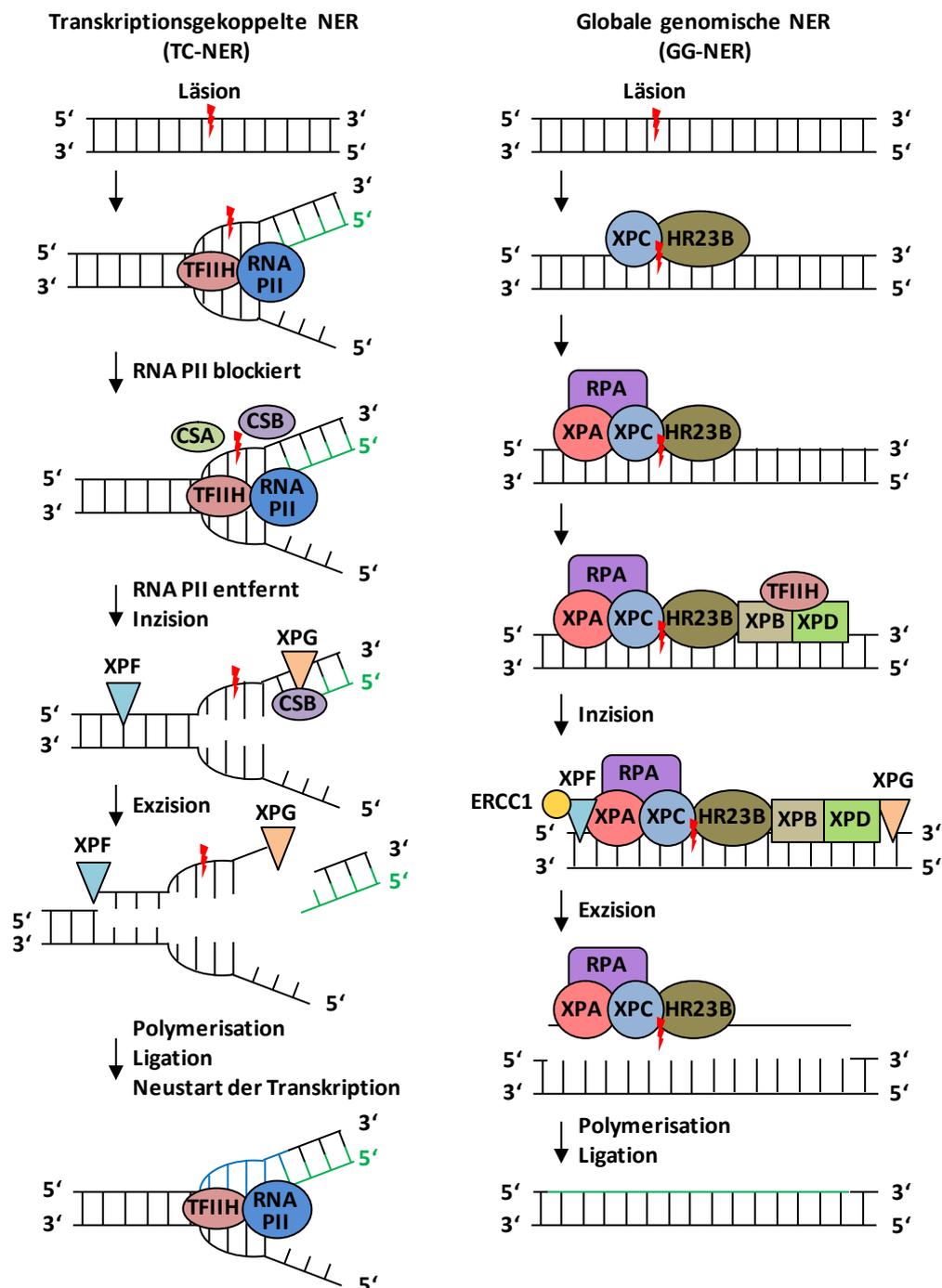


Abbildung 1.5: Mechanismus der Nukleotidexzisionsreparatur (NER).

Die transkriptionsgekoppelte (TC) Nukleotidexzisionsreparatur (NER) wird aktiviert, wenn die RNA-Polymerase II (RNA PII) blockiert wird. Dieser Transkriptionsstopp führt zur Rekrutierung von CSA (*cockayne syndrome type A protein*) und CSB (*cockayne syndrome type B protein*) an die Läsionsstelle, woraufhin die RNA PII von der Läsion entfernt wird. Bei der globalen genomischen (GG) NER erfolgt die Erkennung der Läsion durch das Heterodimer XPC-HR23B (*Xeroderma pigmentosum, complementation group C protein - UV excision repair protein RAD23 homolog B*). Außerdem werden XPA (*Xeroderma pigmentosum, complementation group A protein*) und RPA (Replikationsprotein A2) rekrutiert, die dann den Transkriptionsfaktor TFIIH mit den Helikasen XPB (*Xeroderma pigmentosum, complementation group B protein*) und XPD (*Xeroderma pigmentosum, complementation group D protein*) zur Läsion dirigieren. Diese entwinden die DNA unmittelbar in der Nähe der Läsion. XPA und RPA stabilisieren das geöffnete Intermediat anschließend. Sowohl bei der GG- als auch bei der TC-NER werden daraufhin die Endonukleasen XPF-ERCC1 (*Xeroderma pigmentosum, complementation group F protein - excision-repair cross-complementing 1*) sowie XPG (*Xeroderma pigmentosum, complementation group G protein*) an die markierte Stelle rekrutiert. XPF schneidet den beschädigten DNA-Strang vor dem Schaden in 5'-Position (Inzision), XPG etwa 24 bp bis 32 bp entfernt von dem ersten Einschnitt in 3'-Richtung, sodass das schadhafte DNA-Einzelstrangstück herausgeschnitten wird (Exzision). Anschließend ersetzen die DNA-Polymerasen δ und ϵ den fehlenden Bereich, und das 5'-Ende wird durch die DNA-Ligase I an den Strang ligiert. Modifiziert nach CHRISTMANN *et al.* (Christmann *et al.*, 2003).

Die Relevanz der DNA-Reparatur für die Cisplatinempfindlichkeit wird darin deutlich, dass mittels der Expression des an der NER beteiligten Proteins ERCC1 die therapeutische Wirksamkeit von Cisplatin in Lungen- und Hodenkarzinomen (Köberle *et al.*, 1997; Köberle *et al.*, 1999; Masters und Köberle, 2003; Welsh *et al.*, 2004; Olausson *et al.*, 2006; Friboulet *et al.*, 2013) sowie bei Blasenkrebs (Ozcan *et al.*, 2013) vorhergesagt werden kann. Dies ist allerdings nicht unumstritten. So stellten FRIBOULET *et al.* mit ihrer Studie die Verwendbarkeit von ERCC1 zur Vorhersage der Cisplatinwirksamkeit bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs in Frage (Friboulet *et al.*, 2013).

1.3.2 ZELLTODMECHANISMEN – APOPTOSE UND NEKROSE

Ist der DNA-Schaden zu umfangreich oder irreparabel, so wird entweder ein Zellzyklusarrest induziert oder caspasevermittelt Apoptose eingeleitet (siehe auch Abbildung 1.4). Dabei kann ein einzelner, nicht reparierter DSB ausreichen, um Apoptose zu induzieren (Rich *et al.*, 2000). Charakteristische Anzeichen für die Apoptose sind das Schrumpfen der Zellen mit Ausstülpungen auf der Zelloberfläche (*membrane blebbing*), die Abschnürung von apoptotischen Körperchen, die Kondensation des Chromatins sowie die DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen. Apoptotische Körperchen werden durch Phagozytose eliminiert (Martin *et al.*, 1995). Die morphologischen Veränderungen des Chromatins lassen sich mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Färbung detektieren, wobei Fragmentierungen des Zellkerns sowie apoptotische Körperchen erkannt werden können.

Im Verlauf der Apoptose spielen Caspasen, cysteinabhängige Proteasen, eine wesentliche Rolle. Sie vermitteln die Regulation und Exekution des apoptotischen Zelltods indem sie ihre Substrate nach einem Aspartatrest spalten. Caspasen liegen in Zellen normalerweise als inaktive Procaspasen vor und müssen zunächst proteolytisch aktiviert werden. Man unterscheidet zwischen Initiator- und Effektorcaspasen. Zu ersteren zählen die Caspasen 2, 8, 9 und 10, zu letzteren die Caspasen 3, 6 und 7. Effektorcaspasen sind von der Aktivierung durch Initiatorcaspasen abhängig, um Apoptose auszuführen. Die Induktion der Apoptose kann zum einen über den intrinsischen, Mitochondrien-vermittelten Weg und zum anderen über den extrinsischen Weg erfolgen. Letzterer wird durch die Bindung eines Liganden, z. B. *tumor necrosis factor* (TNF), an Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-superfamilie ausgelöst. Vor allem der intrinsische Signalweg wird als Antwort auf Stimuli wie z. B. reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) oder auch DNA-Schäden ausgelöst. Dabei wird die äußere Mitochondrienmembran durch die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins P53 unter Anlagerung von Proteinen der BCL2-Familie permeabel, sodass es zu einem Cytochrom C-Ausstrom aus den Mitochondrien in das Zytoplasma kommt. Cytochrom C interagiert mit dem Adapterprotein *apoptotic protease-activating factor-1* (APAF-1) und ändert dadurch dessen Konformation. Zusammen mit APAF-1 und der daran in Anschluss an dessen Konformationsänderung gebundenen Procaspase 9 bildet Cytochrom C das Apoptosom (Zou *et al.*, 1999). Die so aktivierte Caspase 9 kann wiederum die Effektorcaspasen 3 und 7 aktivieren. Bei dem extrinsischen Weg der Apoptose kommt es nach Bindung eines Liganden an den trimeren Todesrezeptor und der nachfolgenden Anlagerung des Adapterproteins *FAS-associated death domain protein* (FADD) an eine intrazelluläre Domäne des Rezeptors zur Bildung eines Signalkomplexes (*death inducing signaling complex*; DISC), wodurch die Initiatorcaspasen 8 und 10 aktiviert werden und die Caspasekaskade ausgelöst wird (Kischkel *et al.*, 1995). Die so aktivierten Initiatorcaspasen können nun wiederum die Effektorcaspasen 3 und 7 aktivieren und so die Apoptose einleiten. Als Zwischenschritt wird dabei das DNA-Reparaturenzym PARP-1 proteolytisch von der Caspase 3 abgebaut (D'Amours *et al.*, 2001). Da die Zellmembran während des gesamten Vorganges der Apoptose intakt bleibt, kommt es zu keiner Entzündungsreaktion (Columbano, 1995).

Im Gegensatz zur Apoptose wird die Nekrose von Zellen nicht aktiv durchgeführt. Sie tritt ein, wenn die Zellen für eine kontrollierte Apoptose zu stark geschädigt sind. Bei der

Nekrose kommt es zu einem Einstrom von Natrium- sowie Calciumionen, der die Ionenhomöostase stört, sodass schließlich Wasser in die Zelle einströmt. Die Zelle schwillt an, ihre Membran wird lysiert und der Zellinhalt in den Extrazellulärraum abgegeben (Kroemer *et al.*, 1998; Van Cruchten und Van Den Broeck, 2002). Die so freigesetzten Zytoplasmabestandteile locken Fresszellen an und es kommt zu einer Entzündungsreaktion (Lotze und Demarco, 2004).

1.4 UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN DER ZYTOSTATIKATHERAPIE

Klassische Zytostatika hemmen insbesondere Zellen mit hoher Proliferationsgeschwindigkeit (Abschnitt 1.2). So wirken sie nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf sich schnell teilende, nicht-maligne Zellen. Dadurch treten zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen in Normalgeweben auf, die dosislimitierend sein können. Betroffen sind vor allem das Knochenmark, das Epithel des Gastrointestinaltrakts sowie Haarfollikel. Zytotoxische Wirkungen auf diese Gewebe führen z. B. zu der für Carboplatin dosislimitierenden Myelosuppression (siehe auch Abschnitt 1.2.1.2), zu intestinalen Schleimhautschädigungen wie Mukositis (z. B. nach Behandlung mit dem zusammen mit Oxaliplatin bei der Chemotherapie von Kolorektalkarzinomen eingesetzten 5-Fluoruracil) und Stomatitis sowie zu Haarausfall. Dazu kommen sehr häufig Übelkeit und Erbrechen. Dies tritt nach Cisplatinbehandlung mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90 % auf (D'Amours *et al.*, 2001). Starke Nebenwirkungen verhindern eine ausreichend hohe Dosierung, um Tumorzellen restlos abzutöten und Resistenzbildungen zu verhindern. Da einige Zytostatika selbst mutagen sowie kanzerogen wirken, können durch die chemotherapeutische Behandlung des Primärtumors Sekundärtumoren mit einer Latenz von einigen Jahren entstehen, die zumeist therapieresistent sind (Luqmani, 2005). Einige Zytostatika zeigen zudem akute oder chronische, organspezifische Nebenwirkungen zu denen insbesondere die Kardiotoxizität (z. B. nach Behandlung mit Anthrazyklinen wie Doxorubicin (Shi *et al.*, 2011)), die Neurotoxizität (für Oxaliplatin ist kumulative Neurotoxizität dosislimitierend (Saif und Reardon, 2005) (siehe auch Abschnitt 1.2.1.3)) sowie die in Abschnitt 1.4.1 näher erläuterte Nephrotoxizität zählen. Starke Nebenwirkungen verhindern eine ausreichend hohe Dosierung, um Resistenzentwicklung vorzubeugen, sodass eine zunächst Erfolg versprechende Therapie unwirksam werden kann.

1.4.1 NEPHROTOXIZITÄT NACH BEHANDLUNG MIT PLATINVERBINDUNGEN

Neben Ototoxizität, Übelkeit und Neurotoxizität (Alberts und Noel, 1995; Thomas *et al.*, 2006) ist vor allem die akute oder chronische Nephrotoxizität bei einer Cisplatinbehandlung dosislimitierend (Daugaard und Abildgaard, 1989; Hartmann *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2007). Diese ist durch einen allmählichen Anstieg der Kreatinin-, Harnstoff- und Harnsäurewerte im Blut, sowie eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) gekennzeichnet und kann zu akutem Nierenversagen führen. Zudem können sich andere Elektrolytwerte im Serum, wie die Magnesium-, Kalium-, Calcium- und Phosphatkonzentration, verändern, was zu Symptomen wie Krämpfen, Tremor sowie Herzrhythmusstörungen führen kann. Risikofaktoren für eine Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität stellen ein erhöhtes Alter, Rauchen, eine erniedrigte GFR sowie die simultane Applikation weiterer nephrotoxischer Wirkstoffe oder auch eine Strahlentherapie im Bereich der Niere dar. Zu den potenziell nephrotoxischen Zytostatika zählen unter anderem der Antimetabolit Methotrexat, die Stickstofflostverbindungen Mitomycin C und Ifosfamid sowie das Pyrimidinanalogon Gemcitabin (Abschnitt 1.2).

Die durch Cisplatin induzierte Nephrotoxizität basiert im Wesentlichen auf einer dosisabhängigen Schädigung der proximalen Tubuli (Arany und Safirstein, 2003; Yao *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2012). Diese beruht unter anderem auf einer verstärkten Anreicherung des Zytostatikums in den Tubuluszellen durch Transportmechanismen unter Beteiligung von organischen Kationen- (Ciarimboli *et al.*, 2005; Yonezawa und Inui, 2011) sowie Kupfertransportern (Ishida *et al.*, 2002; Pabla *et al.*, 2009). Von diesen Transportern sind einige agensspezifisch. So interagiert Cisplatin mit der hauptsächlich in der Niere zu findenden Isoform hOCT2 des humanen organischen Kationentransporters, nicht aber mit hOCT1. Im Gegensatz zu Cisplatin zeigt Carboplatin keine Interaktion mit hOCT2 (Ciarimboli *et al.*, 2005). Für Oxaliplatin existieren widersprüchliche Studien hinsichtlich dessen Interaktion mit hOCT2 (Ciarimboli *et al.*, 2005; Yonezawa *et al.*, 2006; Burger *et al.*, 2010; Yonezawa und Inui, 2011). Der Kupfertransporter CTR1 unterscheidet nicht zwischen Cis-, Oxali- und Carboplatin (Larson *et al.*, 2009). Nicht nur ein erhöhter Import, sondern auch ein verringerter Export kann an der Zytotoxizität der Platinverbindungen beteiligt sein. So fungiert MRP2 als Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Pumpe für Cis- (Rabik und Dolan, 2007), Oxali- (Mohn *et al.*, 2010) und Carboplatin (Materna *et al.*, 2005). Aufgrund solcher Transportprozesse kann sich z. B. Cisplatin in den Tubuluszellen

bis zur fünffachen Plasmakonzentration anreichern (Kuhlmann *et al.*, 1997), was morphologisch vor allem zu Nekrosen in den proximalen Tubuli (Safirstein *et al.*, 1981) sowie zu Apoptose von Zellen in distalen Teilen der Nephrone führen kann (Arany und Safirstein, 2003). Eine Folge dieser Schädigungen sind eine verminderte Perfusions- sowie Konzentrierungsfähigkeit der Niere, die durch die oben beschriebenen Parameter festgestellt werden kann.

Die besondere Sensitivität der Tubuluszellen gegenüber Cisplatin kann neben den zuvor erwähnten Transportprozessen (Filipski *et al.*, 2009; Yonezawa und Inui, 2011) auch auf der Induktion von mitochondrialen DNA-Schäden oder inflammatorischen Prozessen (Miller *et al.*, 2010), der Bildung von ROS oder reaktiven Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*; RNS) (Matsushima *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2007; Chirino und Pedraza-Chaverri, 2009), der Aktivierung des ATR-Chk2-Signalweges (Pabla *et al.*, 2008) oder erhöhten Signalen Mitogen-aktivierter Kinasen (MAPKs) (Arany und Safirstein, 2003; Ramesh und Reeves, 2005) beruhen. Denkbar ist zudem, dass auch andere Mechanismen, wie die Bildung von spezifischen DNA-Schäden, die Aktivierung von verschiedenen Teilen der DNA-Schadensantwort sowie proapoptotischer Mechanismen ausschlaggebend für die unterschiedlich stark ausgeprägte Nephrotoxizität von Cis-, Oxali- und Carboplatin sind.

Neben den Tubuli stellen auch die Glomeruli hoch sensitive Strukturen der Niere dar, die bei der Nephrotoxizität induziert durch Aminoglykoside oder Cyclosporin A eine wesentliche Rolle spielen (Remuzzi und Perico, 1995; Martinez-Salgado *et al.*, 2007).

1.5 MÖGLICHE MODULATOREN DER CISPLATIN-INDUZIERTEN NEPHROTOXIZITÄT

Ergänzend zu Supportivmaßnahmen, wie einer ausreichenden Hydrierung und somit einer Stimulation der Diurese, wurden einige wenige nephroprotektive Strategien entwickelt, bei denen unter anderem die Bildung von ROS, z. B. durch Erhöhung des zellulären Glutathionpools mittels der Cystein-*Prodrug* L-2-Oxothiazolidin-4-Carboxylsäure (Lee *et al.*, 2006), verringert wird (Lee *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2009). Zudem werden antioxidative Mechanismen z. B. über den NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-like 2*)-Signalweg durch das Imidazol des Tripenoids 2-Cyan-3,12-dioxo-1,9-dien-28-oleanolsäure (CDDO) (CDDO-Im) (Aleksunes *et al.*, 2010) stimuliert. Außerdem wird in der Klinik bereits

versucht mit dem organischen Thiophosphatester Amifostin die Nephrotoxizität einzudämmen (Capizzi, 1999). Amifostin wird unter Einwirkung alkalischer Phosphatasen in seine aktive Form überführt. Dies geschieht bevorzugt bei neutralem pH-Wert, wie er in normalem Gewebe vorherrscht. Im Gegensatz dazu besteht im Inneren solider, maligner Tumoren ein saures Milieu (Tannock und Rotin, 1989). Amifostin wirkt damit protektiv auf Normalgewebe, nicht jedoch auf maligne Zellen. Es fungiert zum einen als Thiolgruppen-donor und zum anderen reduziert es die Bildung der toxischen Platin-DNA-Addukte (Treskes *et al.*, 1992). Die Anwendbarkeit von Amifostin ist wiederum durch Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen, allergische Reaktionen sowie schwerwiegende Hautreaktionen limitiert (Gu *et al.*, 2014).

Um die Tumorsensitivität gegenüber Chemotherapeutika zu erhöhen oder aber die dosis-limitierenden Nebenwirkungen auf das Normalgewebe zu reduzieren, wurden in einigen Studien pharmakologisch aktive Naturstoffe auf ihre Fähigkeit zur Modulation der von Chemotherapeutika vermittelten, antitumorigenen Wirkungen sowie der den Nebenwirkungen zugrunde liegenden Mechanismen untersucht (Nobili *et al.*, 2009). Beispiele hierfür stellen Extrakte aus Meeresschwämmen (Porifera) dar. In marinen Ökosystemen herrscht aufgrund der immensen biologischen Vielfalt ein hoher Konkurrenzdruck. Um in diesem zu bestehen, haben einige Organismen effektive Abwehrmechanismen entwickelt. So produzieren Meeresschwämme ein recht breites Spektrum an Sekundärmetaboliten, die den Tieren unter anderem zur Abwehr von Fressfeinden dienen. Unter diesen Sekundärmetaboliten konnten einige bioaktive Substanzen wie z. B. der Proteinkinase-inhibitor Bryostatinsin-1 oder AplidinTM, das oxidativen Stress induziert (Garcia-Fernandez *et al.*, 2002), identifiziert werden (Haefner, 2003; Larghi *et al.*, 2009). Auch die in Abschnitt 1.5.2 näher beschriebenen Alkaloide Aaptamin und Aeropylsinin-1 stellen solche bioaktiven Schwammextrakte dar. Des Weiteren zeigten, die in der Klinik bereits als Lipid-senker verwendeten, Statine in bisherigen Studien vielfältige Effekte wie die Erhöhung des antitumorigenen Potenzials von Zytostatika sowie die Protektion von Normalgewebe (siehe Abschnitt 1.5.1).

1.5.1 STATINE – LOVASTATIN

Statine, wie das in Abbildung 1.6 gezeigte Lovastatin, gehören zu den 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase)-Hemmern, die zur

Behandlung von Hypercholesterinämie seit 1987 in der Klinik verwendet werden (Corsini *et al.*, 1995; Lardizabal und Deedwania, 2010). Sie wurden ursprünglich aus dem Schimmelpilz *Penicillium citrinum* isoliert (Endo *et al.*, 1976). Statine besitzen einen, der 3-Hydroxy-3-methyl-glutarsäure (HMG) ähnlichen, Molekülteil, der im Falle von Lovastatin als inaktives Laktone vorliegt und zunächst durch Hydrolyse aktiviert werden muss.

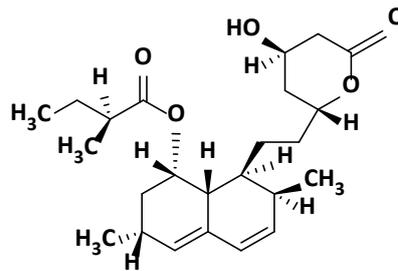


Abbildung 1.6: Chemische Struktur von Lovastatin.

Statine inhibieren kompetitiv die Synthese von Mevalonat (Goldstein und Brown, 1990; Kreisberg, 1991; Rikitake und Liao, 2005), dem Salz der Malonsäure, einer Vorstufe des Cholesterins, das wiederum einen wichtigen Bestandteil von Zellmembranen darstellt und zur Bildung von Steroidhormonen benötigt wird (Grundy, 1978) (Abbildung 1.7). Auch die Synthese des Farnesylpyrophosphats (Farnesyl-PP) und folglich die des Geranylgeranylpyrophosphats (Geranylgeranyl-PP) werden so gehemmt. Dies hat zur Folge, dass Proteine, die durch diese Isopreneinheiten posttranslational modifiziert werden, in ihrer Funktion beeinflusst werden (Liao und Laufs, 2005). Zu diesen Proteinen zählen fast alle Mitglieder der Superfamilie der RAS-Proteine, kleine GTPasen, welche durch die Isoprenylierung an der Plasmamembran lokalisiert werden. Farnesylpyrophosphat ist außerdem ein Vorläufer für die Bestandteile der mitochondrialen Atmungskette Ubichinon (Coenzym Q10) und Häm A, als Komponente der Cytochrom-C-Oxidase, sowie für Dolichol, das bei der *N*-Glykosylierung von Proteinen eine Rolle spielt.

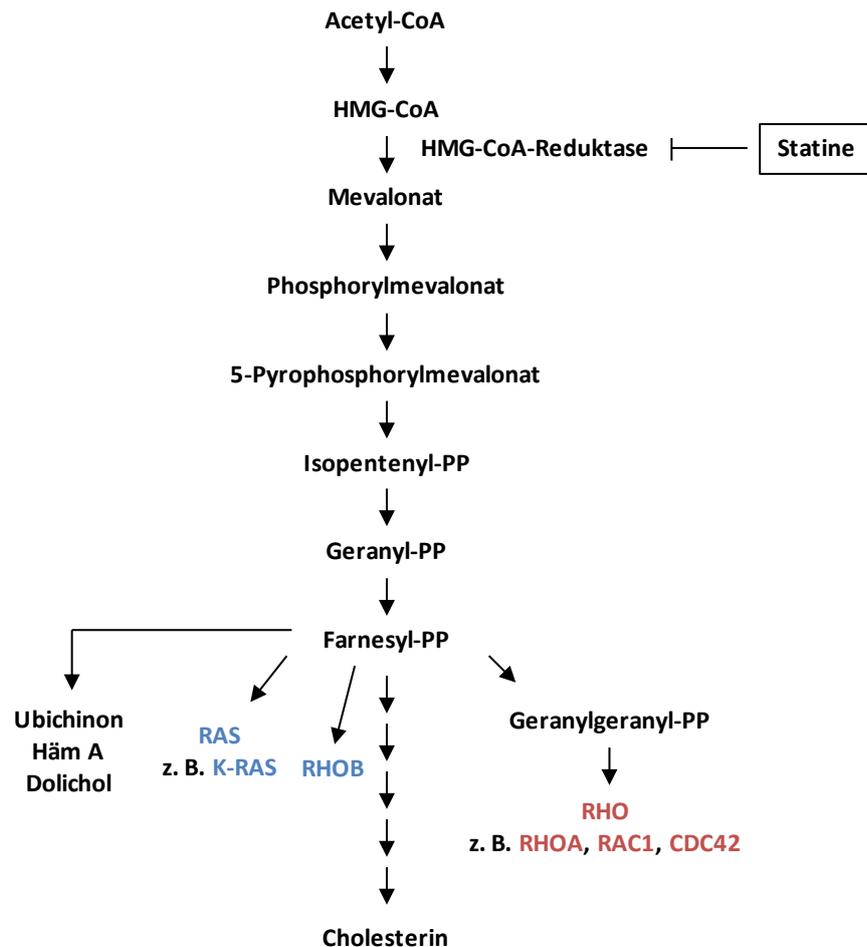


Abbildung 1.7: Inhibition der HMG-CoA-Reduktase durch Statine.

Die Inhibition der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase durch Statine verhindert die Synthese von Zwischenprodukten der Cholesterinbiosynthese wie Farnesylpyrophosphat (Farnesyl-PP) und infolgedessen Geranylgeranylpyrophosphat (Geranylgeranyl-PP). So wird die Isoprenylierung von kleinen GTPasen wie RAS (*rat sarcoma*) und RHO (RAS-homolog) gehemmt. CDC42: *Cell division control protein 42 homolog*; CoA: Coenzym A; PP: Pyrophosphat; RAC1: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*. Der Übersicht halber wurden in dieser Darstellung die Enzyme mit Ausnahme der HMG-CoA-Reduktase nicht aufgeführt. Blau: farnesylierte GTPasen; rot: geranylgeranylierte GTPasen. Modifiziert nach GOLDSTEIN, LIAO und LAUFS sowie RIKITAKE und LIAO (Goldstein und Brown, 1990; Liao und Laufs, 2005; Rikitake und Liao, 2005).

Kleine GTPasen sind Nukleotid-gesteuerte Schalter, die zwischen ihrem inaktiven (Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen) und ihrem aktiven (GTP-gebundenen) Zustand wechseln, was von *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) bzw. *GTPase-activating proteins* (GAPs) katalysiert wird. Dabei überführen GEFs die GTPasen in ihren aktiven und GAPs in ihren inaktiven Zustand. Der Austausch von GDP gegen GTP führt zu einer Konformationsänderung der kleinen GTPasen, die eine Interaktion mit Effektorproteinen ermöglicht (Bishop und Hall, 2000; Iden und Collard, 2008). So werden extrazelluläre Stimuli von der Zellmembran z. B. an verschiedenste Kinasen (z. B. *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) (Hilger *et al.*, 2002)), Transkriptionsfaktoren (z. B. NRF2 (Cuadrado

et al., 2014)) und Zytoskelettmodulatoren (z. B. Aktin (Sit und Manser, 2011)) weitergeleitet. Ras-homologe (RHO)-GTPasen sind essenziell für regulatorische Prozesse wie Mitose, Genexpression sowie die Ausbildung des Aktinzytoskeletts (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Zudem spielt die RHO-GTPase RAC1 (*RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1*) durch ihre Beteiligung bei der Migration und Invasion (Schmitz *et al.*, 2000) sowie für Metastasierungsprozesse (Arnold *et al.*, 2014) eine wichtige Rolle in der Tumorprogression.

Für die Isoprenylierung der kleinen GTPasen werden Fettsäuren wie Farnesol oder Geranylgeraniol in von spezifischen Transferasen katalysierten Reaktionen mit den Aminosäuren am C-Terminus der RAS-Proteine verknüpft (Kinsella *et al.*, 1991). Diese Isoprenylierung erfolgt an einem Cystein in der so genannten CaaX-Box unter Bildung eines Thioesters, wobei C für das Cystein steht, das prenyliert wird, a für eine aliphatische Aminosäure und X für eine beliebige Aminosäure. Während RAS-Proteine farnesyliert werden, werden RHO-GTPasen, mit Ausnahme von RHOB, das ebenfalls farnesyliert wird (Armstrong *et al.*, 1995), geranylgeranyliert. Dies ist durch die variable Aminosäure in der CaaX-Box bedingt. So erkennen Farnesyltransferasen Methionin, Serin, Glutamin, Alanin oder Cystein in der CaaX-Box, wohingegen Geranylgeranyltransferasen bei Leucin oder Glutaminsäure in der CaaX-Box aktiv werden (Casey *et al.*, 1991). Diese posttranslationale Isoprenylierung der kleinen GTPasen ist für ihre Membranlokalisation und somit für ihre biologische Funktion essenziell.

Durch die Inhibition der Mevalonatsynthese (Abbildung 1.7) hemmen Statine indirekt die zuvor beschriebene, für die korrekte intrazelluläre Lokalisation essenzielle, Isoprenylierung von RAS- und RHO-GTPasen (Graaf *et al.*, 2004; Fritz *et al.*, 2011). So üben sie neben ihrer cholesterinsenkenden Wirkung pleiotrope Effekte, die in Zusammenhang mit Inflammation, Apoptose, Zellwachstum, -form, -motilität und adhäsion stehen, auf verschiedene Zellen aus (Waldman und Kritharides, 2003; Futterman und Lemberg, 2004; Graaf *et al.*, 2004; Berndt *et al.*, 2011). Statine können antiproliferativ, antiinflammatorisch sowie antithrombotisch wirken (Epstein und Campese, 2005; Schachter, 2005; Quist-Paulsen, 2010) und Apoptose über den intrinsischen Weg induzieren (Cafforio *et al.*, 2005). Zudem können sie das antitumorogene Potenzial von Zytostatika (Agarwal *et al.*, 1999; Feleszko *et al.*, 2000) erhöhen und schützen Normalgewebszellen vor Zelltod durch

das Anthrazyklin Doxorubicin (Bardeleben *et al.*, 2002; Damrot *et al.*, 2006; Hülsenbeck *et al.*, 2011) oder durch ionisierende Strahlung (Nübel *et al.*, 2006; Haydont *et al.*, 2007). Dabei vermindern sie DNA-Schäden (Damrot *et al.*, 2006). So konnte *in vivo* eine Protektion des Herzens (Henninger *et al.*, 2015) und der Leber (Bopp *et al.*, 2013) vor Doxorubicin-induzierter Zytotoxizität durch Lovastatin gezeigt werden (Bopp *et al.*, 2013; Henninger *et al.*, 2015). Zusätzlich zu diesen protektiven Effekten auf Normalgewebe fördern höhere Statinkonzentrationen die Antikrebseffekte ionisierender Strahlung auf Tumorzellen (Agarwal *et al.*, 1999; McKenna *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 2003; Graaf *et al.*, 2004; Cafforio *et al.*, 2005), indem sie den Übergang der G1- in die S-Phase beeinflussen (Rao *et al.*, 1998) und Apoptose induzieren (Dimitroulakos *et al.*, 2001). *In vitro* führt eine Behandlung mit Statinen als Folge der Inhibition kleiner RHO-GTPasen zu Veränderungen im Aktinzytoskelett und somit zu einer Abrundung der Zellen (Koch *et al.*, 1997).

In Bezug auf die Therapie mit Platinverbindungen wurde gezeigt, dass Lovastatin normale humane Mesothelzellen vor Cisplatinzytotoxizität schützt (Shi *et al.*, 2012). Des Weiteren zeigten *in vivo*-Studien, dass die Statine Simvastatin, Pravastatin und Rosuvastatin protektiv auf die von Platinverbindungen induzierte Nephrotoxizität wirken (Iseri *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; An *et al.*, 2011; Fujieda *et al.*, 2011; Khoshnoud *et al.*, 2011; Maheshwari *et al.*, 2013). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch weitestgehend unklar.

1.5.2 EXTRAKTE AUS MEERESSCHWÄMMEN – AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1

Für das erstmals von NAKAMURA *et al.* aus dem Schwamm *Aaptos aaptos* isolierte und seitdem gut charakterisierte Alkaloid Aaptamin (Abbildung 1.8) (Ohizumi *et al.*, 1984) wurden umfassende antiproliferative Wirkungen auf Tumorzellen publiziert. Dabei wird z. B. P53-unabhängig P21^{WAF1} in Zellen der chronisch myeloischen Leukämie (CML) induziert (Jin *et al.*, 2011). Auch bei Osteosarkomzellen konnten diese Effekte gezeigt werden (Aoki *et al.*, 2006). Zudem wurde die antiproliferative Wirkung von Aaptamin auf Cisplatin-resistente Keimzelltumorzellen (Dyshlovoy *et al.*, 2014) sowie Kolorektalkarzinom- und Lungenkrebszellen (Shen *et al.*, 1999) gezeigt. Aaptamin kann an DNA binden (Bowling *et al.*, 2008), ist antioxidativ (Takamatsu *et al.*, 2003) und agiert als Inhibitor des Proteasoms (Tsukamoto *et al.*, 2010).

Einen antiproliferativen Effekt auf Tumorzellen zeigte auch das in dem Schwamm *Aplysina aerophoba* zur Abwehr von pathogenen Bakterien und gegen Biofouling vorkommende Alkaloid Aeroplysinin-1 (Abbildung 1.8) (Kreuter *et al.*, 1989). Für Aeroplysinin-1 wurde unter anderem eine zytotoxische Wirkung auf Aszitestumor- und Zervixkarzinomzellen (HeLa-Zellen) beschrieben (Koulman *et al.*, 1996). Mechanistisch wurde für Aeroplysinin-1 eine Beteiligung an der Induktion von ROS und damit verbunden einer gesteigerten Toxizität bei GSH-Mangel, sowie eine Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen durch kovalente Modifikation derer aktiver Zentren beschrieben (Koulman *et al.*, 1996; Hinterding *et al.*, 1998). Aeroplysinin-1 ist zudem ein Inhibitor des EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptors (Kreuter *et al.*, 1990) und hemmt außerdem die Angiogenese sowie die Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2)-Aktivität (Cordoba *et al.*, 2007; Martinez-Poveda *et al.*, 2013).

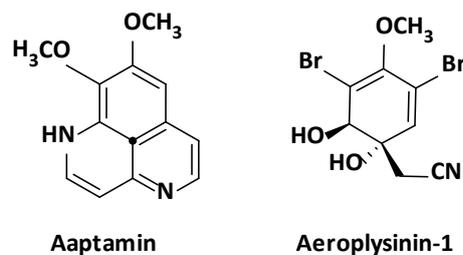


Abbildung 1.8: Chemische Strukturen der Alkaloide Aaptamin und Aeroplysinin-1.

Ob diese Substanzen zusätzlich zu ihrer antitumorigenen Kapazität auch protektive Effekte auf das Normalgewebe zeigen und so gegebenenfalls vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität schützen können, wurde bislang nicht untersucht.

1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Platinverbindungen werden in der Klinik als Chemotherapeutika zur Behandlung diverser solider Tumorarten verwendet. Tumore des Urogenitaltrakts sowie Kopf-Hals- und Lungentumore werden vor allem mit Cis- und Carboplatin therapiert, während Oxaliplatin hauptsächlich der Behandlung von Kolorektalkarzinomen dient. Bei einer Chemotherapie wird außer den Tumorzellen auch Normalgewebe geschädigt. Als dosislimitierende Nebenwirkung des prominentesten Vertreters der Platinverbindungen, Cisplatin, ist die Nephrotoxizität zu nennen (Daugaard und Abildgaard, 1989), wobei hauptsächlich proximale Nierentubuluszellen geschädigt werden (dos Santos *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu Cisplatin gelten die Platinverbindungen Oxaliplatin und vor allem Carboplatin als weniger nephrotoxisch.

In dieser Arbeit sollte die molekulare Wirkung der drei oben genannten Platinverbindungen auf Nierenzellen untersucht werden. Dazu sollten renale proximale Tubulusepithelzellen (NRK-52E-Zellen) mit glomerulären Endothelzellen (RGE-Zellen) als *in vitro*-Modellsysteme hinsichtlich ihrer qualitativen sowie quantitativen Unterschiede in den Stressantworten nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin verglichen werden. Hierbei sollte der Fokus vor allem auf die, der Zytotoxizität durch die Platinverbindungen möglicherweise zugrunde liegenden, DNA-Schäden sowie auf der resultierenden DNA-Schadensantwort gelegt werden.

Ein weiteres Ziel war es, mögliche pharmakologische Modulatoren der Cisplatin-sensitivität zu finden sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzuklären, um möglicherweise die therapeutische Bandbreite der Chemotherapie mit Platinverbindungen zu erweitern. Vielversprechende Substanzen stellten dabei der klinisch bereits verwendete Lipidsenker Lovastatin, aber auch andere Naturstoffe, wie die aus marinen Schwämmen stammenden Alkaloide Aaptamin und Aeroplysinin-1, dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollten sie hinsichtlich ihrer protektiven Wirkung gegenüber Cisplatin in proximalen Nierentubulusepithelzellen untersucht werden. Damit sollten die experimentellen Grundlagen zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Prophylaxe sowie Linderung der dosislimitierenden Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität geschaffen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 HERSTELLERNACHWEISE

Tabelle 2.1: Auflistung der Herstellerhauptsitze.

Hersteller	Sitz
Abcam	Cambridge, UK
ACEA Biosciences Inc.	San Diego, Kalifornien, USA
Active Motif	La Hulpe, Belgien
Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen, Deutschland
AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Axon Lab AG	Stuttgart, Deutschland
B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
baseclick GmbH	Tutzing, Deutschland
Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Best Theratronics Ltd.	Vancouver, Kanada
BINDER GmbH	Tuttlingen, Deutschland
Bioline	London, UK
Bio-Rad	Hercules, Kalifornien, USA
Biosan	Riga, Lettland
BioSurplus	San Diego, Kalifornien, USA
Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, Deutschland
BRAND GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland
Cell Signaling Technology	Cambridge, UK
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Braunschweig, Deutschland
Edmund Bühler GmbH	Hechingen, Deutschland
Excelitas Technologies Corp.	Waltham, Massachusetts, USA
Epitomics Inc.	Burlingame, Kalifornien, USA
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eurofins Genomics	Huntsville, Alabama, USA
GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Gilson	Middleton, Wisconsin, USA
GK Sondermaschinenbau GmbH	Arnsdorf, Deutschland
Labortechnik Medingen	
GraphPad	La Jolla, Kalifornien, USA
Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
Hoffmann-La Roche AG	Basel, Schweiz
ICN Biomedicals GmbH	Eschwege, Deutschland
IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland
Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien, USA

Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Menzel GmbH	Braunschweig, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Merck Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH	Heidelberg, Deutschland
NordCap®	Bremen, Deutschland
Omni Life Science GmbH & Co. KG	Bremen, Deutschland
Olympus	Shinjuku, Japan
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Pechiney Plastic Packaging, Inc	Chicago, Illinois, USA
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Promega Corporation	Madison, Wisconsin, USA
Qiagen	Hilden, Deutschland
Rockland Immunochemicals	Limerick, Pennsylvania, USA
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Dallas, Texas, USA
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Schott AG	Mainz, Deutschland
Scientific Industries Inc.	New York, USA
SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Starlab	Hamburg, Deutschland
Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz
Teva Pharmaceutical Industries Ltd.	Petach Tikva, Israel
Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
TriTek Corporation	Sumerduck, Virginia, USA
VWR International GmbH	Radnor, Pennsylvania, USA
Vector Laboratories	Burlingame, Kalifornien, USA
Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell, Deutschland

2.1.2 GERÄTE

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Absaugstation MINI-VAC ECO	Peqlab Biotechnologie GmbH
Bestrahlungsanlage Gammacell® 1000 Elite	Best Theratronics Ltd.
Blottingsystem Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
CFX96™ Real-time PCR Detection System	Bio-Rad
CO ₂ -Inkubator Serie CB	BINDER GmbH
Dokumentationssystem Fusion FX7	Peqlab Biotechnologie GmbH
Durchflusszytometer BD Accuri™ C6	Becton, Dickinson and Company
Elektrophoresekammer PerfectBlue™	Peqlab Biotechnologie GmbH
Gelsystem Midi S	
ELEMENT 2™ ICP-MS	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Feinwaage Kern ABS	Kern & Sohn GmbH

Flockeneisbereiter SPR-80	NordCap®
Fluoreszenzlampe HBO50	Carl Zeiss AG
Fluoreszenzlampe x-Cite Series 120Q	Excelitas Technologies Corp.
Fluoreszenzmikroskop Axiolab	Carl Zeiss AG
Fluoreszenzmikroskop BX43	Olympus
Gelelektrophoreseapparatur Mini	Bio-Rad
PROTEAN® Tetra Cell System	
Heizblock Drybath System	Starlab
Heizplatte/Magnetrührer Combimag Ret	IKA-Werke GmbH & Co. KG
iCELLigence	ACEA Biosciences Inc.
Kühlzentrifuge MIKRO 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Laborschüttler SWIP SM25-C	Edmund Bühler GmbH
Mikroliterpipetten Pipetman classic 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite® F200	Tecan Group AG
Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise™	Tecan Group AG
Milli-Q® Advantage A10 System	Merck Millipore
Mini Rocker-Shaker MR-1	Biosan
Mini-Vac power Vacuum System	Axon Lab AG
Mini-Zentrifuge	Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Multichannel Research plus	Eppendorf AG
Multipette® plus	Eppendorf AG
NanoVue™ Plus Spectrophotometer	GE Healthcare
Netzgerät PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad
Personal Bio-Vortex V-1 plus	Peqlab Biotechnologie GmbH
QIAcube	Qiagen
Radiometer Copenhagen PHM 93	BioSurplus
Reference pH Meter	
Roto-Shake Genie®	Scientific Industries Inc.
Slot-Blot Apparatur	Carl Roth GmbH und Co. KG
Sonifiziergerät EpiShear™ Probe sonicator	Active Motif
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Thermomixer® compact	Eppendorf AG
Waage 3716MP	Sartorius
Wärme-/Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG
Wasserbad W22	GK Sondermaschinenbau GmbH Labortechnik Medingen
Zählkammer Neubauer-Improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X1	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Zentrifuge PerfectSpin P	Peqlab Biotechnologie GmbH
Zentrifuge Universal 320	Andreas Hettich GmbH & Co.KG

2.1.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Adhesive PCR Plate Seals	Thermo Fisher Scientific, Inc.
6-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
8-Well Platten E-Plates L8	Omni Life Science GmbH & Co. KG
96-Well Mikrotiterplatten 0,2 ml skirted	Thermo Fisher Scientific, Inc.
96-Well Mikrotiterplatten schwarz	Thermo Fisher Scientific, Inc.
96-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
Deckgläser 18 x 18 mm	VWR International GmbH
Einfrierröhren Cryo.s™	Greiner Bio-One International AG
Filterspitzen 10 µl, 20 µl	Biozym Scientific GmbH
Mehrweckröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One International AG
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Objektträger für Comet-Assay	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Spritzen Braun Injekt 5 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG
Sterilfilter 0,2 µm, 0,45 µm	VWR International GmbH
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner Bio-One International AG
Zellkulturschalen Ø: 3,5 cm, 6 cm	Greiner Bio-One International AG
Stepper Tips 20 µl, 100 µl	Eppendorf AG
Pasteurpipetten	BRAND GmbH & Co. KG

2.1.4 KITS

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Apo-ONE® homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega Corporation
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Hoffmann-La Roche AG
DNeasy Blood & Tissue	Qiagen
EdU-Click 488	baseclick GmbH
HCS Mitotic Index Kit	Life Technologies
Omniscript® Reverse Transcription	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy® Mini	Qiagen
SensiMix SYBR® Hi-ROX	Bioline

2.1.5 CHEMIKALIEN

Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Carl Roth GmbH und Co. KG
Agarose <i>low gelling temperature</i>	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat	Merck KGaA
APS	Merck KGaA
Borsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG
BSA	Merck Millipore
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck Millipore
DTT	AppliChem GmbH
EDTA	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG
Ethanol	Merck Millipore
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth GmbH und Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH und Co. KG
H ₂ O ₂ (30 %)	Sigma-Aldrich
HCl	Carl Roth GmbH und Co. KG
HNO ₃	Merck KGaA
Isopropanol	VWR International GmbH
KCl	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH und Co. KG
Luminol	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH und Co. KG
Methanol	VWR International GmbH
Methylenblau	ICN Biomedicals GmbH
MTT	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA
Na-Acetat	Carl Roth GmbH und Co. KG
Na-Citrat	Merck KGaA
Na-Laurylsarcosinat	Sigma-Aldrich
Na-Resazurin	Sigma-Aldrich
NaCl	VWR International GmbH
NaOH	Merck KGaA
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich
Ponceau-S	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	Carl Roth GmbH und Co. KG
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH und Co. KG
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH
TEMED	Carl Roth GmbH und Co. KG
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck KGaA

2.1.6 MEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Medien und Medienzusätze.

Bezeichnung	Hersteller
DMEM	Sigma-Aldrich
DMEM ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich
FCS	Merck Millipore
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
RPMI-1640	Sigma-Aldrich

2.1.7 ZELLINIEN

Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Bezugsquelle
NRK-52E	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
RGE	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
RT-112	Forschungslabor der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf

2.1.8 ENZYME

Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Enzyme.

Bezeichnung	Bezugsquelle
RNase	SERVA Electrophoresis GmbH
DNase-freie RNase	RNase-Free DNase Set; Qiagen
Trypsin/EDTA-Lösung (10 x)	Sigma-Aldrich

2.1.9 PRIMER

Tabelle 2.9: Auflistung der verwendeten Real-time PCR-Primer.

Bezeichnung	Primersequenz
<i>Bax</i>	<i>forward</i> : 5'-TCATGAAGACAGGGGCCTTT-3' <i>reverse</i> : 5'-CTGCAGCTCCATGTTGTTGT-3'
<i>Bcl2</i>	<i>forward</i> : 5'-CTTCAGGGATGGGGTGAAC-3' <i>reverse</i> : 5'-CAGCCTCCGTTATCCTGGAT-3'
<i>Csb</i>	<i>forward</i> : 5'-AGTGTGGTCTGGATGGGAAG-3' <i>reverse</i> : 5'-ATGGAGTGGAGCGGACTATG-3'
<i>Ctr1</i>	<i>forward</i> : 5'-TATTTGGTGGCTGGGGTTCT-3' <i>reverse</i> : 5'-CACTAGGTCTGGAGAGGCA-3'
<i>Ercc1</i>	<i>forward</i> : 5'-GAAGCTGCTGACCTCCTTA-3' <i>reverse</i> : 5'-GATGCGGTGATGAGCTGTTCC-3'
<i>Mrp2</i>	<i>forward</i> : 5'-GGAGCTGGTTGGAACTTGG-3' <i>reverse</i> : 5'-TTGGTCTCTGCTTCTGACGT-3'

<i>Xiap</i>	<i>forward</i> : 5'-AGAAGCCAGACTGAAGACGT-3' <i>reverse</i> : 5'-AGTGTCTCCTGTGCTCTGAC-3'
<i>Xpa</i>	<i>forward</i> : 5'-TCGATTTGCCAACATGCGAT-3' <i>reverse</i> : 5'-ATGGCGAGGGTTCTTCTTCA-3'
<i>Xpg</i>	<i>forward</i> : 5'-CCTGGACAAAGCAAACGGAA-3' <i>reverse</i> : 5'-GAACCTTCTGCCTCCTCACT-3'
<i>Gapdh</i>	<i>forward</i> : 5'-GTATGACTCTACCCACGGCA-3' <i>reverse</i> : 5'-AAGACGCCAGTAGACTCCAC-3'
<i>β-Aktin</i>	<i>forward</i> : 5'-GGGAAATCGTGCGTGACATT-3' <i>reverse</i> : 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGA-3'

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert und vor Gebrauch auf 3 µM verdünnt.

2.1.10 ANTIKÖRPER

2.1.10.1 PRIMÄRANTIKÖRPER

Tabelle 2.10: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.

Name	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
53BP1	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000
BAX	Kaninchen	Epitomics Inc.	1 : 1000
Caspase 3 (8G10)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 500
Caspase 7	Kaninchen	Cell Signaling Technology	5 : 50
CENP-F (H-260)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 100
cleaved Caspase 7 (Asp198)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000
ERK2 (C-14)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 1000
γH2AX (S139)	Maus	Merck Millipore	1 : 500
KI-67	Kaninchen	Abcam	1 : 750
p-AKT (S473)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000
PARP-1 (H-250)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 1000
p-ATM (S1981)	Maus	Abcam	1 : 500
p-ATR (S428)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 500
p-CHK1 (S345)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000
p-CHK2 (pT68)	Kaninchen	Epitomics Inc.	1 : 1000
p-c-JUN (pS63)	Kaninchen	Epitomics Inc.	1 : 1000
p-H3 (S10)	Kaninchen	HCS Mitotic Index Kit; Life Technologies	1 : 50
p-KAP1 (S824)	Kaninchen	Bethyl Laboratories	1 : 1000
p-P38 (Thr189/Tyr182)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000
p-P53 (Ser15)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000
p-RPA32 (S4/S8)	Kaninchen	Bethyl Laboratories	1 : 1000
p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000

Pt-(GpG)	Ratte	Dr. Jürgen Thomale, Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen	1 : 200
β -Aktin	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 1000

2.1.10.2 SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Tabelle 2.11: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.

Name	Spezies	Bezugsquelle/ Referenz	Verdünnung
Alexa Fluor® 488	Ziege anti-Maus	Life Technologies	1 : 500
Alexa Fluor® 546	Ziege anti-Kaninchen	Life Technologies	1 : 500
anti-Maus IgG Peroxidase-konjugiert	Ziege anti-Maus	Rockland Immunochemicals	1 : 2000
anti-Kaninchen IgG Peroxidase-konjugiert	Ziege anti-Kaninchen	Rockland Immunochemicals	1 : 2000
anti-Ratte IgG Peroxidase-konjugiert	Ziege anti-Ratte	Rockland Immunochemicals	1 : 2000

2.1.11 SONSTIGE MATERIALIEN

Tabelle 2.12: Auflistung sonstiger verwendeter Materialien.

Bezeichnung	Hersteller
Aptamin	Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (AG Prof. Dr. Proksch)
Aeroplysin-1	Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (AG Prof. Dr. Proksch)
Carboplatin	Teva Pharmaceutical Industries Ltd.
Chromatographie-Papier Whatman™	GE Healthcare
Cisplatin	Teva Pharmaceutical Industries Ltd.
Glasflaschen	Schott AG
Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 20 ml	BRAND GMBH & CO KG
Lovastatin	Sigma-Aldrich
Nitrozellulosemembran Amersham™	GE Healthcare
Protran™ 0,2 μ m	
Öl Immersion Oil Type-F	Olympus
Oxaliplatin	Teva Pharmaceutical Industries Ltd.
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc
Platinum Standard for ICP TraceCERT®	Sigma-Aldrich
RNase Inhibitor RiboLock	Thermo Fisher Scientific Inc.
Roti®-Load-Puffer	Carl Roth GmbH
Vectashield®	Vector Laboratories
Zellschaber	Greiner Bio-One International AG
Zellzähler	Infactory

2.1.12 LÖSUNGEN UND PUFFER

Tabelle 2.13: Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blottingpuffer	250 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
ECL-Lösung	3 ml Lösung A 30 µl Lösung B 3 µl H ₂ O ₂ (30 %)
Elektrophoresepuffer alkalisch (pH > 13)	300 mM NaOH 1 mM EDTA
Elektrophoresepuffer neutral (pH 7,5)	90 mM Tris-Base 90 mM Borsäure 2 mM EDTA
Lösung A	100 mM Tris-HCl pH 8,6 50 mg Luminol in 200 ml
Lösung B	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO
Lysepuffer (alkalisch pH 10,0; neutral pH 7,5)	2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris-Base 1 % Na-Laurylsarcosinat unmittelbar vor Gebrauch zu 89 ml dieses Lysepuffers: 1 ml Triton X-100 10 ml DMSO
Methylenblaulösung	0,5 M Na-Acetat 0,4 g/l Methylenblau
NaCl/P _i -Puffer	1,06 mM KH ₂ PO ₄ 154 mM NaCl 3,77 mM Na ₂ HPO ₄
Neutralisationspuffer PBS (pH 7,4)	0,4 M Tris-Base pH 7,5 2 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄

PBS <i>high salt</i>	2 mM KH_2PO_4 400 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4
PBST	PBS 0,3 % (v/v) Triton X-100
Ponceau-S-Lösung	1,5 g/l Ponceau-S 5 ml/l Essigsäure
Resazurinlösung	1 ml Resazurinstocklösung 9999 ml NaCl/ P_i -Puffer
Resazurinstocklösung	440 mM Na-Resazurin in Dimethylformamid
Sammelgel (5 %)	1,3 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 1 ml 1,5 M Tris-Base pH 6,8 5,5 ml MilliQ-H ₂ O 160 µl SDS 10 % 80 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED 10 %
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SSC (10x) (pH 7,0)	1,5 M NaCl 150 mM Na-Citrat
TBS	50 mM Tris-Base pH 7,4 150 mM NaCl
TBST	TBS 0,05 % (v/v) Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris-Base pH 8,0 1 mM EDTA
Trenngel (6 %)	4 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 5 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8 10,4 ml MilliQ-H ₂ O 200 µl SDS 10 % 200 µl APS (100 g/l) 160 µl TEMED 10 %
Trenngel (12 %)	8 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 5 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8 6,5 ml Milli-Q-H ₂ O 200 µl SDS 10 % 200 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED 10 %

2.1.13 SOFTWARE

Tabelle 2.14: Auflistung der verwendeten Computersoftware.

Bezeichnung	Hersteller / Bezugsquelle
i-control™ Software	Tecan Group AG
BD Accuri™ C6	Becton, Dickinson and Company
Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad
CellSens Dimension	Olympus
Fusion Software Version 15.17	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
GraphPad Prism 5.01	GraphPad
Mikroskopsoftware ZEN 2012 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH
RTCA Data Analysis Software 1.0.0.1304	ACEA Biosciences Inc.
Software ImageJ 1.483	http://rsb.info.nih.gov/ij/
TriTek Comet Score™ Freeware v1.5	TriTek Corporation

2.2 METHODEN

2.2.1 ZELLKULTUR

Die renalen proximalen Tubulusepithelzellen aus der Ratte (NRK-52E-Zellen) sowie die humanen Blasenurothelkarzinomzellen (RT-112-Zellen) wurden in DMEM (*Dulbeccos's modified Eagle's minimal essential medium*) mit 10 % fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*; FCS) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Die renalen glomerulären Endothelzellen aus der Ratte (RGE-Zellen) wurden unter identischen Bedingungen in RPMI-1640 mit 10 % fetalem Kälberserum sowie 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 % bis 90 % wurden die Zellen passagiert, indem sie mittels Trypsin/EDTA vereinzelt (NRK-52E: 6 min, RGE: 3 min; 37 °C) und in frischem Medium neu ausgesät wurden. Für Zelleexperimente wurden die Zellen 24 h nach der Aussaat je nach Versuchsdurchführung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin bzw. Lovastatin, Aaptamin oder Aeroplysinin-1 behandelt. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit einer Cäsium¹³⁷-Quelle in der Bestrahlungsanlage Gammacell® 1000 Elite.

2.2.2 MOLEKULARBIOLOGIE

2.2.2.1 DNA-ISOLIERUNG

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte halbautomatisch mittels des DNeasy Blood & Tissue Kits unter Verwendung des QIAcubes gemäß dem Protokoll „*Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells*“ (Qiagen). Diese DNA-Isolierung beruht auf der Bindung von DNA an eine Silikamembran unter Anwesenheit von chaotropen Salzen. Auf der Säulenmembran wird die DNA durch mehrere Waschschriffe gereinigt und anschließend mit Wasser oder einem Elutionspuffer eluiert.

Für die Isolierung wurden die Zellen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle) mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA vereinzelt (NRK-52E: 6 min; RGE: 3 min; 37 °C) und durch Zentrifugation (800 x g; 3 min) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte nach Herstellerangaben inklusive der RNase-Behandlung (4 µl DNase freie RNase (100 mg/ml); 2 min; RT). Die Konzentration sowie Reinheit der DNA wurde photometrisch mit dem NanoVue™ Plus Spectrophotometer bestimmt. Dabei entsprechen die Absorptionsverhältnisse 260 nm/230 nm von 2,0 bis 2,2 und 260 nm/280 nm von 1,8 reiner DNA. Die DNAs wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 RNA-ISOLIERUNG

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte ebenfalls halbautomatisch mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits unter Verwendung des QIAcubes gemäß dem Protokoll „*Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology*“ (Qiagen). Diese RNA-Isolierung beruht auf der Bindung von RNA an eine Silikamembran unter Anwesenheit von chaotropen Salzen. Auf der Säulenmembran wird die RNA durch mehrere Waschschriffe gereinigt und anschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert. Da dabei vor allem RNAs mit einer Länge von mehr als 200 Nukleotiden aufgereinigt werden und die meisten RNAs wesentlich kleiner sind, wird vor allem mRNA isoliert.

Für die Isolierung wurden die Zellen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle) mit PBS gewaschen, in Dithiothreitol (DTT)-haltigem RLT-Puffer (350 µl DTT-haltiger RLT-Puffer (40 µl DTT (1 M) je ml RLT-Puffer (aus RNeasy® Mini Kit)) je 6 cm-Zellkulturschale) mittels eines Zellschabers von der Kulturplatte geschabt und lysiert (RT). Zusätzlich wurde ein

DNase-Verdau unmittelbar auf der mRNA-bindenden Säule durchgeführt. Die Konzentration sowie Reinheit der mRNA wurde photometrisch mit dem NanoVue™ Plus Spectrophotometer bestimmt. Dabei entsprechen die Absorptionsverhältnisse 260 nm/230 nm von 2,0 bis 2,2 und 260 nm/280 nm von 2,0 reiner RNA. Die mRNAs wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 cDNA-SYNTHESE

Die cDNA-Synthese mittels reverser Transkription wurde mit dem Omniscript® Reverse Transcription Kit mit Oligo-dT-Primern nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wird mit Hilfe der reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, aus der mRNA die komplementäre cDNA synthetisiert. Die Oligo-dT-Primer sind dabei komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA und ermöglichen so den Synthesestart.

Für die cDNA-Synthese wurden 1000 ng der zuvor isolierten mRNA (Abschnitt 2.2.2.2) und der RNase-Inhibitor mit einer finalen Konzentration von 10 U/µl verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und die cDNAs bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.4 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Zur quantitativen Analyse der mRNA-Expression wurden DNA-Fragmente mittels der quantitativen Real-time PCR mit dem CFX96™ Real-time PCR Detection System unter Verwendung des SensiMix SYBR® Hi-ROX Kits amplifiziert. Diese quantitative Real-time PCR beruht darauf, dass der fluoreszierende Farbstoff SYBR-Green in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Quantifizierung basiert auf der Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes, dem Cq-Wert (*quantification cycle value*). Er entspricht dem Wert, ab dem die SYBR-Green Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt.

Für die quantitative Real-time PCR wurden die DNA-Fragmente mit den der Tabelle 2.9 zu entnehmenden Primer und unter den in Tabelle 2.15 aufgelisteten, optimierten Bedingungen amplifiziert. Die Schritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung sowie der Elongation wurden dabei für 45 Zyklen wiederholt. Je Reaktionsansatz wurden 20 ng der cDNA (Abschnitt 2.2.2.3) sowie 0,25 µM der Primer eingesetzt. Die SYBR-Green Fluoreszenz, die proportional zur gebildeten DNA-Menge ist, wurde nach jedem Zyklus detektiert. Die auf die mRNA-Menge von *Gapdh* und *β-Aktin* normalisierte mRNA-

Expression ($\Delta\Delta C_q$) wurde mittels der Bio-Rad CFX Manager 3.1 Software errechnet. Am Ende des kompletten Amplifizierungsdurchganges wurde von jedem PCR-Produkt eine Schmelzkurve zur Qualitätskontrolle aufgezeichnet, anhand welcher unspezifische Produkte, wie z. B. Primerdimere, erkannt werden können. Für die nachfolgende Auswertung wurden nur Amplifikate berücksichtigt, die sowohl spezifische Schmelzkurven zeigten als auch vor 35 Amplifizierungszyklen den von der Software vorgeschlagenen Schwellenwert erreichten. Die relative mRNA-Expression unbehandelter Zellen, bzw. beim Vergleich der basalen mRNA-Expression (Abbildung 3.17) die der NRK-52E-Zellen, wurde auf 1,0 gesetzt. Lediglich Veränderungen in der mRNA Expression von $\geq 2,0$ oder $\leq 0,5$ wurden als biologisch relevant angesehen.

Tabelle 2.15: Reaktionsbedingungen der Real-time PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer
Polymeraseaktivierung	95°C	10:00 min
Denaturierung	95°C	0:15 min
Primerhybridisierung	55°C	0:15 min
Elongation	72°C	0:17 min

2.2.3 PROTEINBIOCHEMIE

2.2.3.1 PROTEINISOLIERUNG

Zur Gesamtproteinisolierung wurde eine identische Anzahl an Zellen mit reduzierendem, *sodium dodecyl sulfate* (SDS)-haltigem, Roti®-Load-Puffer (200 μ l 1 x Roti®-Load-Puffer in H₂O je 6 cm-Zellkulturschale; 5 min; RT) überschichtet, die Zellen unter Verwendung eines Zellschabers abgeschabt und anschließend zum Zellaufschluss sonifiziert (50 % Amplitude; 1 s Puls; 1 s Pause; 5 Stöße; 2 Durchgänge).

Bei dieser Art des Zellaufschlusses werden die Zellen durch Kavitationskräfte zerschert. Während der Aufarbeitung verhindern die Bestandteile des Roti®-Load-Puffers den Abbau der Proteine. Zudem werden die Proteine durch das enthaltene SDS denaturiert, solubilisiert sowie ihre Eigenladung durch die Negativladung des resultierenden SDS-Proteinkomplexes überlagert. Die Sekundärstruktur der Proteine wird durch das in dem Roti®-Load-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert. So ist die elektrophoretische Mobilität der Proteine in der nachfolgenden Elektrophorese (Abschnitt 2.2.3.2) ausschließlich von ihrem Molekulargewicht abhängig.

Nach dem Zellaufschluss wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (10000 x g; 10 min; RT) pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wurde schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen nach LAEMMLI (Ornstein, 1964; Laemmli, 1970; Fling und Gregerson, 1986). Durch die Negativladung der Proteine wandern diese während der Elektrophorese zur Anode, wobei sie durch die Poren des Acrylamids nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Mit Hilfe des Sammelgels werden die Proteine an dem Übergang zum Trenngel konzentriert, was durch den gleichzeitigen Übertritt in das Trenngel die Bandenschärfe verbessert.

Es wurden 6 %ige bis 12 %ige Trenngele und 5 %ige Sammelgele verwendet. Die Proteinlysate wurden vor der Auftrennung durch Hitze denaturiert (5 min; 95 °C). Die Elektrophorese erfolgte mittels des Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophorese-Systems in SDS-Laufpuffer bei 10 mA bis 30 mA pro Gel bis zur gewünschten Auftrennung. Als Größenstandard wurden 5 µl bis 10 µl des Proteingemischs PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder verwendet.

2.2.3.3 WESTERN BLOT

Die zuvor elektrophoretisch über die SDS-Page (Abschnitt 2.2.3.2) aufgetrennten Proteine wurden mittels des Mini Trans-Blot® Cell Systems durch Anlegen eines elektrischen Feldes (90 min; 300 mA) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und das Ergebnis mittels Ponceau-S-Lösung überprüft. Die Membran wurde für nachfolgende immunologische Nachweise der darauf gebundenen Proteine verwendet. Die folgenden Versuchsschritte wurden unter konstantem Schwenken durchgeführt. Unspezifische Antigenbindungsstellen auf der Membran wurden mittels einer 5 %igen Magermilchpulverlösung in TBST abgesättigt (2 h; RT) und die Membran mit dem entsprechenden, für das Zielprotein spezifischen, Primäantikörper (Tabelle 2.10) inkubiert (1 : 500 bis 1 : 1000; ü. N.; 4 °C). Anschließend wurde überschüssiger Antikörper durch Waschen mit TBST entfernt (3 x 5 min; RT) und mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten, gegen Epitope des

verwendeten Primärantikörper gerichteten, Sekundärantikörper (Tabelle 2.11) inkubiert (1 : 2000; 2 h; RT). Die Verdünnung der Primärantikörper erfolgte je nach Herstellerangaben in 5 %iger Magermilchpulver- oder BSA-Lösung oder in TBST, die der Sekundärantikörper in 5 %iger Magermilchpulverlösung. Zur Visualisierung der spezifischen Antikörperbindungen wurde die Membran nach erneutem Waschen mit TBST (3 x 5 min; RT) mit einer luminolhaltigen Chemilumineszenzlösung (*enhanced chemiluminescence*; ECL) inkubiert (1 min; RT) und die Intensität der Signale mittels des Fusion FX7 Imaging Systems und der Fusion Software Version 15.17 analysiert.

2.2.4 ANALYSE DER ZELLVIABILITÄT

2.2.4.1 MTT-ASSAY

Die Zellviabilität wurde mittels des MTT-Assays (Mosmann, 1983) bestimmt. Dieser beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan ((E, Z)-5-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylformazan) durch Dehydrogenasen, die nur in metabolisch aktiven Zellen aktiv sind (Abbildung 2.1).

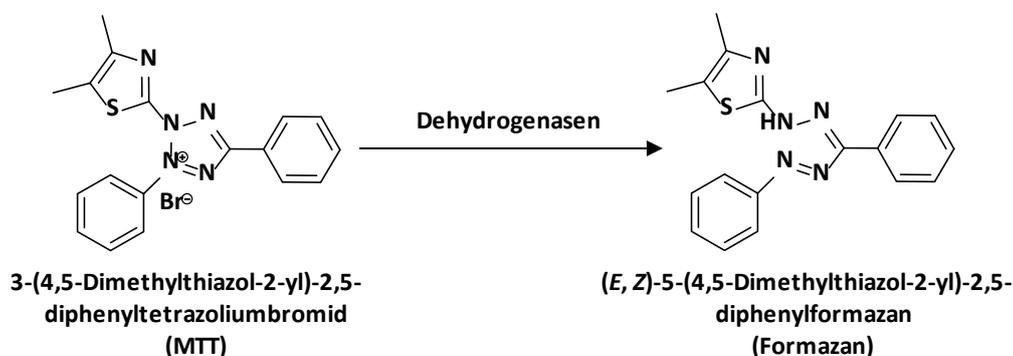


Abbildung 2.1: Prinzip des MTT-Assays.

Zelluläre Dehydrogenasen setzen das gelbe Substrat 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu dem blau-violetten, wasserunlöslichen Produkt (E, Z)-5-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylformazan (Formazan) um. Dieser Farbumschlag kann photometrisch ($\lambda = 560 \text{ nm}$) gemessen werden und dient als Maß für die Zellviabilität.

Zur Analyse der Zellviabilität wurden die Zellen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle) für 30 min bis 40 min mit MTT-Lösung (20 μl MTT-Lösung (5 mg/ml MTT in PBS)/100 μl Medium/96-Well) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als *Blank* dienten mit Zellkulturmedium befüllte Wells. Anschließend wurde das Medium mit der MTT-Lösung entfernt und die Formazankristalle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (100 μl DMSO/96-Well)

unter Schütteln gelöst. Zur Analyse wurde die Absorption mittels des Mikrotiterplatten-Photometers Sunrise™ bei einer Wellenlänge von 560 nm (Referenzwellenlänge: 0 nm) gemessen und die Hintergrundabsorption (*Blank*) abgezogen. Die relative Viabilität der un- oder vorbehandelten Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt.

2.2.4.2 ALAMAR BLUE-ASSAY

Zusätzlich zu dem MTT-Assay (Abschnitt 2.2.4.1) wurde die Zellviabilität mittels des Alamar Blue-Assays bestimmt (O'Brien *et al.*, 2000). Dabei reduzieren lebende Zellen den blauen, wasserlöslichen, nicht-fluoreszierenden Farbstoff 7-Hydroxyphenoxazin-3-on-10-oxid (Resazurin) zu rosafarbenem, fluoreszierendem 7-Hydroxyphenoxazin-3-on (Resorufin) (Abbildung 2.2).

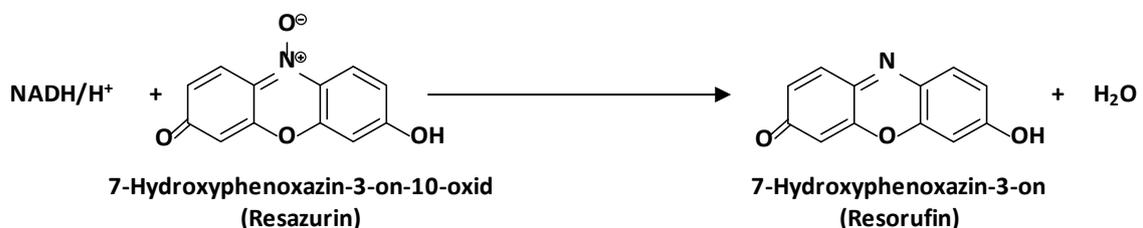


Abbildung 2.2: Prinzip des Alamar Blue-Assays.

Metabolisch aktive Zellen setzen das blaue, nicht-fluoreszierende Substrat 7-Hydroxyphenoxazin-3-on-10-oxid (Resazurin) zu dem rosafarbenen, fluoreszierenden Produkt 7-Hydroxyphenoxazin-3-on (Resorufin) um. Anschließend kann die Fluoreszenz gemessen werden (Anregung: 535 nm; Emission: 590 nm). Sie dient als Maß für die Zellviabilität.

Für diesen Assay wurden die Zellen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle) für 90 min bei 37 °C und 5 % CO₂ mit Resazurinlösung (100 µl Resazurinlösung in DMEM ohne Phenolrot (1 : 10)/96-Well; finale Konzentration: 44 µM) inkubiert. Als *Blank* dienen mit Zellkulturmedium befüllte Wells. Zur Analyse wurde die Fluoreszenz mittels des Mikrotiterplatten-Lesegerätes Infinite® F200 gemessen (Exzitation: 535 nm; Emission: 590 nm; 5 Blitze; Integrationszeit: 20 µs) und die Hintergrundfluoreszenz (*Blank*) abgezogen. Die relative Viabilität der un- oder vorbehandelten Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt.

2.2.4.3 IMPEDANZMESSUNG

Zusätzlich zu den MTT- und Alamar Blue-Assays (Abschnitt 2.2.4.1 und 2.2.4.2) wurden Veränderungen in der Zellviabilität in Echtzeit durch Messungen der elektrischen Impedanz mit dem iCELLigence System aufgezeichnet. Dabei gilt, dass die elektrische Impedanz mit einer zunehmenden Zelldichte ansteigt. Zudem ist die Impedanz abhängig

von der Qualität der Zellinteraktionen mit den Elektroden des Systems. Somit kann sie Veränderungen in der Viabilität, Anzahl, Morphologie sowie Adhäsion der Zellen aufzeigen.

Zur Durchführung wurde zunächst die elektrische Impedanz des Zellkulturmediums (200 µl/8-Well) in 8-Well Platten mit Goldmikroelektroden gemessen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 7500 für NRK-52E- und 15000 für RGE-Zellen in 250 µl Zellkulturmedium dazugegeben. Das Absetzen und die Anheftung der Zellen wurde für 24 h dokumentiert (Zeitintervall: für 4 h minütlich, dann halbstündlich). Zur Behandlung der Zellen wurde die Impedanzmessung unterbrochen und die Zytostatika in 50 µl Medium hinzugegeben. Anschließend wurde die Impedanz für bis zu 100 h weiter aufgezeichnet (Zeitintervall: 30 min). Unterschiede in der elektrischen Impedanz wurden als Zellindex unter Verwendung der Software RTCA Data Analysis Software 1.0.0.1304 angegeben. Dabei wurde der Zellindex auf den Behandlungsbeginn mit den Zytostatika normiert.

2.2.4.4 TRYPANBLAU-ASSAY

Des Weiteren wurde die Anzahl an lebenden Zellen mittels des Trypanblau-Assays untersucht. Dabei dringt der Diazofarbstoff Trypanblau in tote Zellen ein und färbt diese blau. Lebende Zellen werden nicht angefärbt, da der Farbstoff die intakte Zellmembran nicht passieren kann.

Für die Analyse wurden die Zellen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle) mit Trypsin/EDTA vereinzelt und mit einer Trypanblaulösung inkubiert (0,4 % Trypanblau; 5 : 1; 1 min; RT). Anschließend wurde die Anzahl an Trypanblau-negativen Zellen unter Verwendung einer Neubauer-Improved Zählkammer quantifiziert.

2.2.5 ANALYSE DER ZELLYKLUSVERTEILUNG

2.2.5.1 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Analyse der Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen abhängig von ihrem Zellzyklusstatus unterschiedliche DNA-Gehalte aufweisen. So lässt sich durch Messung dieses DNA-Gehaltes der prozentuale Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase (einfacher DNA-Gehalt) sowie der G2/M-Phase (doppelter DNA-Gehalt)

ermitteln. Die zwischen diesen beiden Phasen befindliche S-Phase (einfacher bis doppelter DNA-Gehalt) ist mit dieser Methode nicht klar abgrenzbar. Der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen ist aufgrund von intrazellulären Degradationsprozessen niedriger als der der in der G0/G1-Phase befindlichen Zellen (SubG1-Population).

Für die Zellzyklusanalyse wurden das Kultivierungsmedium sowie alle verwendeten Waschlösungen und die Trypsin/EDTA-Lösung gesammelt, um apoptotische, bereits vom Zellrasen abgelöste, Zellen mit in die Analyse einzuschließen. Der Zellrasen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle) wurde mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA vereinzelt (NRK-52E: 6 min, RGE: 3 min; 37 °C), zu den gesammelten Lösungen gegeben und durch Zentrifugation (800 x g; 3 min; 4 °C; mit reduzierter Bremse) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit PBS gewaschen (800 x g; 3 min; 4 °C; mit reduzierter Bremse) und in 100 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden unter *Vortexen* 2 ml -20 °C kaltes Ethanol hinzugefügt und die Zellsuspension bis zur Analyse bei -20 °C inkubiert (mindestens 20 min). Anschließend wurden die Zellen abermals durch Zentrifugation (800 x g; 3 min; 4 °C; mit reduzierter Bremse) pelletiert, in RNase-haltigem PBS (132 µl PBS + 1 µl RNase (1 mg/ml)) inkubiert (1 h; RT) und mit dem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) (367 µl; 50 µg PI/ml PBS) versetzt. Die Analyse der Zellzyklusverteilung erfolgte in dem Durchflusszytometer BD Accuri™ C6 mit der gleichnamigen Software. Quantifiziert wurden die prozentualen Anteile der Zellen in der G0/G1- und der G2/M-Phase des Zellzyklus. Die SubG1-Fraktion wurde als apoptotische Zellpopulation betrachtet.

2.2.5.2 IMMUNZYTOCHEMIE

In Ergänzung zur Durchflusszytometrie (Abschnitt 2.2.5.1) wurden Veränderungen in der Zellzyklusverteilung mittels des mitotischen Index analysiert. Dieser erfasst die Anzahl an Zellen, die sich zu einem definierten Zeitpunkt in der Teilung befinden (Zellteilungsindex). Der mitotische Index lässt sich durch die immunzytochemische Detektion des an seinem Serin 10 phosphorylierten Histons 3 (p-H3) bestimmen. Diese Phosphorylierung erreicht ihr Maximum während der Metaphase der Mitose und fällt während der späten Anaphase und frühen Telophase wieder ab (Gurley *et al.*, 1978; Hendzel *et al.*, 1997).

Zudem wurde die Anzahl an Zellen, die das Zentromerprotein F (*centromere protein F*; CENP-F) als Marker für die G2/M-Phase des Zellzyklus exprimieren, quantifiziert. CENP-F

ist ein Protein der nukleären Matrix. Es assoziiert während der Zellzyklusprogression mit den Kinetochoren und erreicht sein Maximum in der G2/M-Phase. Mit Abschluss der Mitose wird es wieder abgebaut (Liao *et al.*, 1995).

Außerdem wurde der Anteil an sich teilenden Zellen mittels des Proliferationsmarkers KI-67 ermittelt. KI-67 ist im Verlauf der Interphase von proliferierenden Zellen im Zellkern und während der Mitose auf der Chromosomenoberfläche zu finden. In der G0-Phase von ruhenden Zellen fehlt es jedoch (Scholzen und Gerdes, 2000).

Für diese immunzytochemischen Analysen wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät. Nach der Behandlung wurden die Zellen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle) mit 4 % Formaldehyd in PBS fixiert (15 min; RT) und mit eiskaltem Methanol permeabilisiert (≥ 20 min; -20 °C). Nachdem unspezifische Antigenbindungsstellen mit 5 % BSA in PBST blockiert worden waren (1 h; RT), erfolgte die Inkubation mit p-H3 (S10)-, KI-67- oder CENP-F (H-260)-spezifischem Antikörper in PBST (p-H3 (S10): 1 : 50; KI-67: 1 : 750; CENP-F (H-260): 1 : 100; ü. N.; 4 °C). Anschließend wurde der überschüssige Antikörper mit PBS entfernt (2 x 5 min; RT), es wurde mit PBS *high salt* (2 min; RT) sowie PBST (5 min; RT) gewaschen und unter Lichtausschluss mit Fluorochrom-gekoppeltem Sekundärantikörper in PBST inkubiert (Alexa Fluor® 488 und 546; 1 : 500; 2 h; RT). Nach abermaligem Waschen mit PBS (3 x 5 min; RT; unter Lichtausschluss) wurden die Zellen in 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-haltigem Vectashield® eingedeckelt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI lagert sich in doppelsträngiger DNA an, sodass die Zellkerne sichtbar werden. Die nachfolgende mikroskopische Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop BX43 und der Software CellSens Dimension.

2.2.5.2.1 EDU-INKORPORATIONS-ASSAY

Zur Bestimmung der DNA-Syntheseaktivität (S-Phaseaktivität) der Zellen in Ergänzung zu der durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus, bei der die S-Phase nicht eindeutig quantifizierbar ist (Abschnitt 2.2.5.1), wurde die 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU)-Inkorporation mittels des Kits EdU-Click 488 quantifiziert. EdU stellt ein modifiziertes Nukleosid, ein Thymidinanalogon, dar, das während der S-Phase in die DNA inkorporiert wird (Yu *et al.*, 2009). Als Alkin kann EdU in einer Kupfer-katalysierten Reaktion unter Ringschluss eine kovalente Bindung zu Aziden ausbilden (Abbildung 2.3). So kann die EdU-Inkorporation

ration durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs 6-Carboxyfluorescein-Azid (6-FAM) mikroskopisch sichtbar gemacht werden.

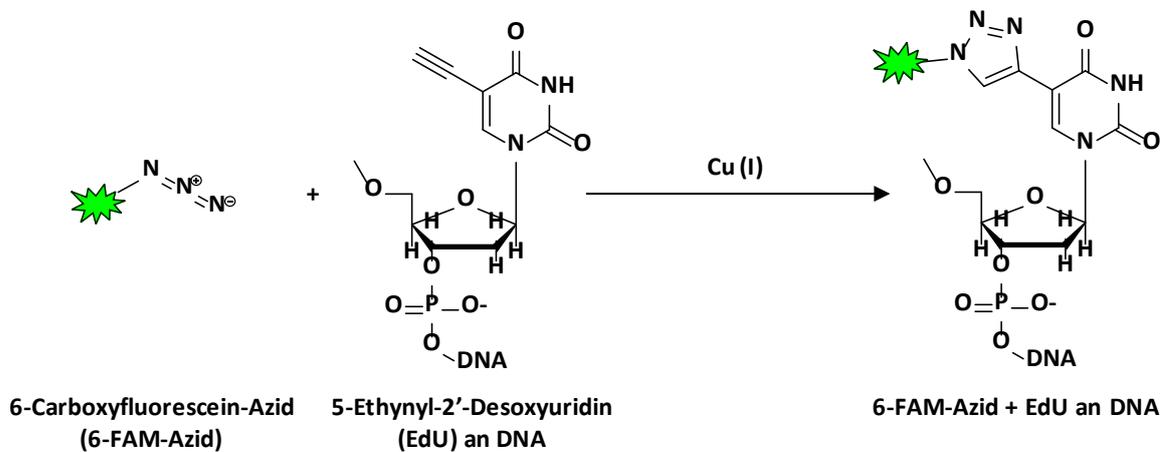


Abbildung 2.3: Prinzip des EdU-Inkorporations-Assays.

Das während der S-Phase in die DNA eingebaute 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) bindet in einer Kupfer-katalysierten Reaktion mit seiner Alkynguppe kovalent und unter Ringschluss an das Fluoreszenzkonstrukt 6-Carboxyfluorescein-Azid (6-FAM-Azid). Die so fluoreszenzmarkierten, in der S-Phase befindlichen Zellen sind somit mikroskopisch sichtbar und ihr Anteil an der gesamten Zellpopulation ist quantifizierbar.

Abweichend von den Herstellerangaben wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät. Im Anschluss an den EdU-Puls nach Herstellerangaben (30 min; 37 °C) wurden die Zellen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle) wie unter 2.2.5.2 beschrieben fixiert, mit 5 % BSA in PBS blockiert (2 x 5 min; RT) und mit PBST permeabilisiert (≥ 20 min; RT), gefolgt von einer Inkubation mit der Reaktionslösung unter Lichtausschluss gemäß den Herstellerangaben (1 h; RT). Anschließend wurden die Zellen, wie unter 2.2.5.2 beschrieben, in DAPI-haltigem Vectashield® eingedeckelt und die Anzahl an EdU-positiven Zellen mittels mikroskopischer Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop BX43 und der Software CellSens Dimension quantifiziert.

2.2.6 ANALYSE VON ZELLTODMECHANISMEN

2.2.6.1 APO-ONE®-ASSAY

Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 wurde mittels des Apo-ONE® homogeneous Caspase-3/7 Assay Kits gemäß den Herstellerangaben quantifiziert. In diesem Assay wird das nicht-fluoreszierende Substrat Rhodamin 110, bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-asparaginsäureamid) (Z-DEVD-Rhodamin 110) durch die Caspasen 3 und 7

gespalten, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 110 freigesetzt wird (Abbildung 2.4).

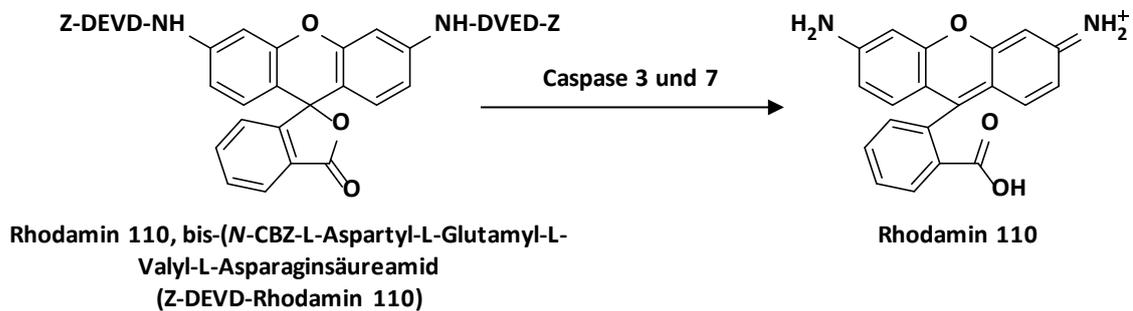


Abbildung 2.4: Prinzip des Apo-ONE®-Assays.

Das nicht-fluoreszierende Substrat Rhodamin 110, bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-asparaginsäureamid) (Z-DEVD-Rhodamin 110) wird durch die Caspasen 3 und 7 gespalten, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 110 freigesetzt wird. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 kann als Fluoreszenzanstieg über die Zeit gemessen werden (Exzitation: 499 nm; Emissionsmaximum: 521 nm).

Für diesen Assay wurden schwarze 96-Well Platten verwendet. Vor der Durchführung des Apo-ONE®-Assays wurde die Zellviabilität mittels des unter 2.2.4.2 beschriebenen Alamar Blue-Assays bestimmt. Anschließend wurden 50 µl des Apo-ONE®-Substrats zu 50 µl verbliebenem Zellkulturmedium gegeben und der Fluoreszenzanstieg (Δ relative fluorescence unit; Δ RFU) über 3 h bei 37 °C mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesegeräts Infinite® F200 und der Software i-control™ gemessen (Exzitation: 499 nm; Emissionsmaximum: 521 nm). Der Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit reflektiert die Aktivität der Caspasen 3 und 7. Δ RFU wurde auf die jeweilige Zellviabilität sowie auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert.

2.2.6.2 DAPI-FÄRBUNG

Um die im Verlauf der Apoptose fragmentierten Zellkerne zu detektieren, wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Dieser lagert sich in doppelsträngiger DNA an, sodass die Zellkerne sichtbar werden.

Dazu wurden die auf Deckgläsern ausgesäten Zellen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle), wie unter 2.2.5.2 beschrieben, fixiert und permeabilisiert und nach Waschen mit PBS sowie PBST in DAPI-haltigem Vectashield® eingedeckelt. Die nachfolgende mikroskopische Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop BX43 und der Software CellSens Dimension.

2.2.6.3 LDH-ASSAY

Die Messung der Freisetzung des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) aus dem Zytoplasma wurde mit dem Cytotoxicity Detection Kit (LDH) durchgeführt. Das Prinzip dieses Zytotoxizitätsassays beruht darauf, dass beim nekrotischen Zelltod die Membranintegrität verloren geht und der Zellinhalt freigesetzt wird. Größere Mengen an LDH im Zellkulturmedium dienen als Nachweis für Nekrose. Mit Hilfe des verwendeten Kits wird die Menge an LDH über eine enzymatische Reaktion bestimmt. Dabei wird zunächst Laktat zu Pyruvat oxidiert und parallel Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) zu Nikotinamidadenindinukleotid-Hydrid (NADH/H^+) reduziert (Abbildung 2.5). Anschließend reduziert NADH/H^+ , katalysiert von der Diaphorase, das gelbe Tetrazoliumsals 2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid (Iodnitrotetrazoliumchlorid; INT), wodurch ein rotes Formazansalz (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenylformazan) entsteht.

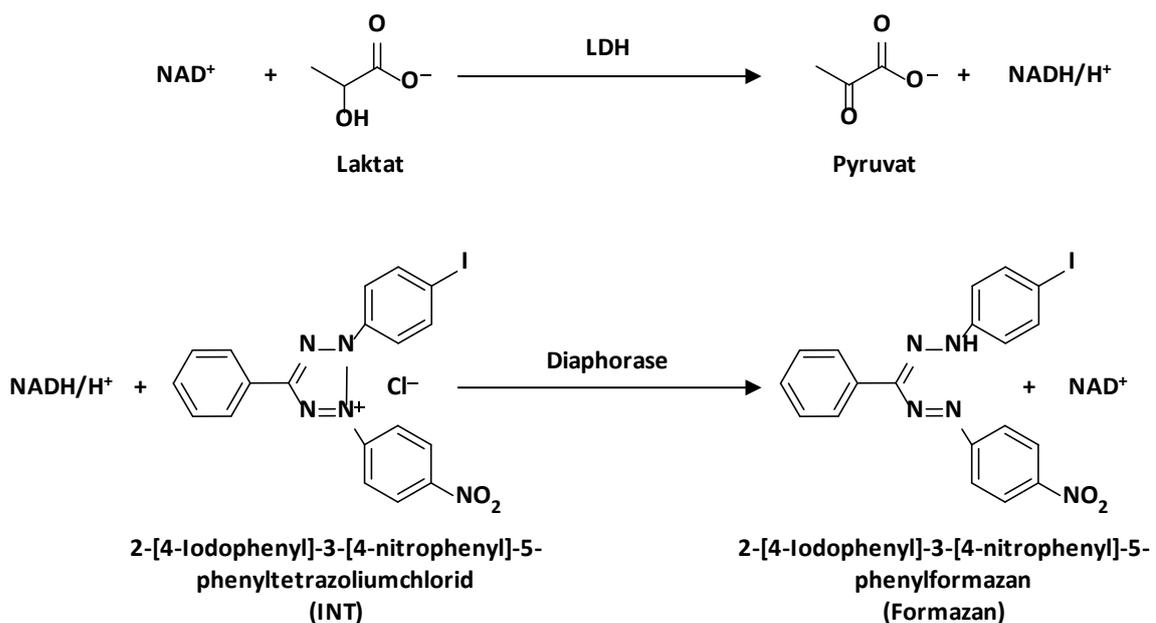


Abbildung 2.5: Prinzip des LDH-Assays.

Die als Folge von Nekrose freigesetzte Laktatdehydrogenase (LDH) oxidiert Laktat zu Pyruvat und reduziert gleichzeitig Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) zu Nikotinamidadenindinukleotid-Hydrid (NADH/H^+). In einer zweiten Reaktion reduziert NADH/H^+ das gelbe Tetrazoliumsals 2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT) zu dem roten 2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenylformazan (Formazan). Dieser Farbumschlag kann photometrisch ($\lambda = 492 \text{ nm}$) gemessen werden und dient als Maß für die Zellviabilität.

Für diesen Assay wurden zu $100 \mu\text{l}$ Zellkulturüberstand $100 \mu\text{l}$ der Reaktionslösung ($2,5 \mu\text{l}$ *Catalyst*, $112,5 \mu\text{l}$ *Dye solution* (aus Cytotoxicity Detection Kit (LDH))) gegeben und für 30 min unter Lichtausschluss inkubiert (RT). Als *Blank* dienten mit Zellkulturmedium

befüllte Wells. Die Absorption wurde anschließend mittels des Mikrotiterplatten-Photometers SunriseTM bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge: 625 nm) gemessen und die Hintergrundabsorption (*Blank*) abgezogen. Die relative LDH-Aktivität der unbehandelten Kontrollzellen wurde auf 1 gesetzt.

2.2.7 ANALYSE VON DNA-SCHÄDEN

2.2.7.1 IMMUNZYTOCHEMIE – γ H2AX- UND 53BP1-FOCI

Zusätzlich zu den Western Blot-Analysen (Abschnitt 2.2.3.3) wurde die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) mittels immunzytochemischer Färbungen des an seinem Serin 139 phosphorylierten Histons H2AX (γ H2AX) sowie des P53-bindenden Proteins 1 (53BP1) quantifiziert. Diese Methode basiert darauf, dass DSBs durch den MRN-Komplex (Komplex aus MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 und NBS1 (Nibrin)) erkannt werden, was eine Rekrutierung der Proteinkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*) und DNA PKc (*protein kinase, catalytic subunit*) zur Folge hat (Abschnitt 1.3.1). Diese vermitteln eine Phosphorylierung des dem DSB nächstgelegenen H2AX (γ H2AX-Focus). Diese γ H2AX-Foci lassen sich durch eine spezifische Antikörperfärbung detektieren und quantifizieren. γ H2AX dient als Surrogatmarker für DSBs und somit für den DNA-Schaden (Rogakou *et al.*, 1998; Olive, 2004). Neben den γ H2AX-Foci stellen Foci des P53-bindenden Proteins 1 (53BP1) einen weiteren DNA-Doppelstrangbruchindikator dar (Panier und Boulton, 2014). 53BP1 wird als Folge eines DSBs aus dem Zytoplasma rekrutiert und bindet an das Chromatin in der Nähe des DNA-Schadens. Sowohl die Anzahl der γ H2AX-Foci als auch der 53BP1-Foci je Zellkern sind somit proportional zur Anzahl der DSBs.

Für die immunzytochemischen Analysen wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät. Nach der Behandlung wurden die Zellen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle) mit 4 % Formaldehyd in PBS fixiert (15 min; RT), mit eiskaltem Methanol inkubiert (≥ 20 min; -20 °C) und unspezifische Antigenbindungsstellen mit 5 % BSA in PBST blockiert (1 h; RT). Anschließend erfolgte die Inkubation mit γ H2AX- bzw. 53BP1-spezifischem Primärantikörper (1 : 500; ü. N.; 4 °C). Nachdem überschüssiger Antikörper durch Waschen mit PBST entfernt worden war, wurde unter Lichtausschluss mit Fluorochrom-gekoppeltem Sekundärantikörper in PBST inkubiert (Alexa Fluor[®] 488 und 546; 1 : 500; 2 h; RT). Nach

abermaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen wie unter 2.2.5.2 beschrieben in DAPI-haltigem Vectashield® eingedeckelt. Die nachfolgende mikroskopische Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop BX43 und der Software CellSens Dimension.

2.2.7.2 COMET-ASSAY

Die Bildung von DSBs wurde zudem direkt mittels des neutralen Comet-Assays, die von Einzel- (*single-strand breaks*; SSBs) und Doppelstrangbrüchen mittels des alkalischen Comet-Assays detektiert (Singh *et al.*, 1988; Olive und Banath, 2006). Bei letzterem werden durch die Verwendung eines stark alkalischen Puffers alkalilabile Apurin- bzw. Apyrimidinstellen der DNA in Einzelstrangbrüche überführt und können somit mit der nachfolgenden Einzelzellgelelektrophorese zusammen mit DSBs detektiert werden. Bei dieser ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA größenabhängig. Je kleiner die Fragmente sind, umso schneller wandern sie im Gel und bilden den für diesen Assay namensgebenden Kometenschweif aus. Somit erlaubt der Anteil der im Schweif detektierten DNA indirekt die Bestimmung der Menge an DNA-Strangbrüchen.

Für diesen Assay wurden die Zellen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle) mit Trypsin/EDTA vereinzelt, auf zuvor mit Agarose beschichteten Objektträgern mit auf 37 °C temperierter *low gelling temperature* Agarose (0,5 %ig) eingebettet, für 5 min bei 4 °C gelagert und in vorgekühltem Lysepuffer inkubiert (1 h; 4 °C). Im Falle des alkalischen Comet-Assays folgte eine weitere Lyse mit vorgekühltem alkalischem Elektrophoresepuffer (25 min; 4 °C). Nach der Elektrophorese (25 min; 25 V; 300 mA; Elektrophoresekammer gekühlt) wurden die Proben des alkalischen Comet-Assays in Neutralisationspuffer inkubiert (5 min; RT) mit Wasser und Ethanol (100 %) gewaschen (5 min; RT) und getrocknet (ü. N.; RT). Bei dem neutralen Comet-Assay entfiel der Neutralisationsschritt. Die Kometen wurden nach Zugabe von PI (50 µl PI-Lösung (50 µg PI je ml PBS) je Objektträger) mikroskopisch sichtbar gemacht und der Anteil an Schweif-DNA mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiolab und der Software TriTek Comet Score™ Freeware v1.5 quantifiziert.

2.2.8 ANALYSE DER ZELLULÄREN PLATINIERUNG SOWIE VON PLATIN-DNA- INTRASTRANGVERKNÜPFUNGEN

2.2.8.1 INDUKTIV GEKOPPELTE MASSENSPEKTROMETRIE

Die Messung der Gesamtzellplatinierung erfolgte mittels des ELEMENT 2™ ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*; Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) in Kooperation mit Dr. Maja Osmak, *Laboratory for Genotoxic Agents, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute* in Zagreb, Kroatien.

Um die Gesamtzellplatinierung zu messen, wurden die Zellen (etwa 90 % Konfluenz in der Kontrolle) mit HNO₃ fixiert (75 %; 2 min; RT) und unter Verwendung eines Zellschabers abgeschabt. Anschließend wurden die Zellen erhitzt (2 h; 65 °C) und bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Für die Kalibrierung des Spektrometers wurde ein Platinstandard (1 g/l) verwendet.

2.2.8.2 SOUTHWESTERN BLOT

Die Menge an Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen wurde mittels Southwestern Blot-Analysen quantifiziert. Diese Methode beruht darauf, dass äquivalente Mengen an DNA auf eine Membran aufgebracht werden und die Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen direkt mit einem addukt-spezifischen Primärantikörper (Liedert *et al.*, 2006) detektiert werden.

0,5 µg der genomischen DNA (Abschnitt 2.2.2.1) wurden mit TE-Puffer zu einem Endvolumen von 100 µl verdünnt, durch Erhitzen denaturiert (10 min; 95 °C) und auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 100 µl eiskaltes Ammoniumacetat (2 M) hinzugegeben. Eine Nitrozellulosemembran wurde in Ammoniumacetat (1 M) getränkt und in die Slot-Blot Apparatur eingelegt. Die vorbereitete DNA wurde in die Aussparungen der Apparatur pipettiert und mit Hilfe einer Vakuumpumpe auf die Membran transferiert. Es folgte jeweils einmaliges Waschen der Membran mit Ammoniumacetat (1 M) und Wasser sowie eine Inkubation mit 5 x SSC (5 min; RT) bevor die DNA durch Erhitzen der Membran (2 h; 80 °C) auf dieser fixiert wurde. Die folgenden Versuchsschritte wurden unter konstantem Schwenken durchgeführt. Unspezifische Antigenbindungsstellen auf der Membran wurden mittels einer 5 %igen Magermilchpulverlösung in TBST abgesättigt (ü. N.; 4 °C) und die Membran mit dem Primärantikörper (1 : 200; 1 h; RT) gegen Pt-(GpG)-Intrastrang-

verknüpfungen (Liedert *et al.*, 2006) inkubiert (1 : 200; 1 h; RT). Anschließend wurde überschüssiger Antikörper durch Waschen mit TBST entfernt (3 x 5 min; RT) und es wurde mit dem Peroxidase-gekoppelten anti-Ratte IgG Sekundärantikörper inkubiert (1 : 2000; 2 h; RT). Zur Visualisierung der spezifischen Antikörperbindungen wurde die Membran nach erneutem Waschen mit TBST (3 x 5 min; RT) mit einer ECL-Lösung inkubiert (1 min; RT) und die Intensität der Signale mittels des Fusion FX7 Imaging Systems und der Fusion Software Version 15.17 analysiert. Anschließend wurde die Membran mit Methylenblau-Lösung (5 min; RT) angefärbt, um eine gleichmäßige Beladung der Membran mit genomischer DNA zu überprüfen. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch mit Hilfe des Programmes ImageJ ermittelt. Dabei wurde ein Verfahren verwendet, welches die Bandenintensitäten über den Flächeninhalt von Integralen (Plots) bestimmt.

2.2.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Überprüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels des zweiseitigen ungepaarten t-Tests nach STUDENT (STUDENT, 1908). Eine Zufallswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % wurde als statistisch signifikant angenommen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit *, # oder + versehen. *, #, +: $p \leq 0,05$; **, ##, ++: $p \leq 0,01$; ***, ###, +++: $p \leq 0,001$.

3 ERGEBNISSE

Die in dieser Arbeit verwendeten Platinverbindungen Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin werden in der Klinik zur Behandlung diverser solider Tumorarten verwendet. Hauptanwendungsgebiete für Cis- und Carboplatin sind dabei Tumore des Urogenitaltrakts, sowie Kopf-Hals- und Lungen-Tumore, wohingegen Oxaliplatin hauptsächlich zur Behandlung von Kolorektalkarzinomen eingesetzt wird. Die klinisch relevanteste und auch dosislimitierende Nebenwirkung von Cisplatin ist die Nephrotoxizität, welche vor allem Schäden der proximalen Tubuluszellen beinhaltet. Oxali- und vor allem Carboplatin gelten als weniger nephrotoxisch.

In dieser Arbeit wurden zum einen renale proximale Tubulusepithelzellen (NRK-52E-Zellen) sowie glomeruläre Endothelzellen (RGE-Zellen) aus der Ratte als *in vitro*-Modellsystem verwendet und die zelltyp- sowie agensspezifischen Zellantworten nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin miteinander verglichen. Zum anderen wurde überprüft, ob die Zellantwort der NRK-52E-Zellen auf Cisplatin als prominentesten Vertreter der Platinverbindungen mit Hilfe des Lipidsenkers Lovastatin sowie der Naturstoffe Aaptamin und Aeroplysinin-1 pharmakologisch modulierbar ist. Die hier zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wurden untersucht.

3.1 VERGLEICH DER ZELLULÄREN ANTWORTEN VON RENALEN PROXIMALEN TUBULOSEPITHEL- UND GLOMERULÄREN ENDOTHELZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT CIS-, OXALI- ODER CARBOPLATIN

3.1.1 ZYTOTOXISCHE EFFEKTE DER PLATINVERBINDUNGEN

Um die Sensitivität der tubulären NRK-52E- und der glomerulären RGE-Zellen gegenüber Cis-, Oxali- und Carboplatin zu untersuchen, wurde zunächst die Viabilität nach 72 h Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Platinverbindungen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen mittels des MTT-Assays, der die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität aufzeigt, analysiert. Aus den resultierenden Dosiswirkungskurven geht hervor, dass sowohl die tubulären als auch die glomerulären Zellen am sensitivsten für Cisplatin sind (Abbildung 3.1A (auf S. 58)), wohingegen Oxaliplatin bei gleicher Konzentration weniger und Carboplatin am geringfügigsten zytotoxisch ist. Bei einem Vergleich der beiden Nierenzelllinien zeigt sich, dass RGE-Zellen eine höhere Sensitivität

gegenüber den verwendeten Platinverbindungen aufweisen als NRK-52E-Zellen (Abbildung 3.1A). Die resultierenden IC₅₀ (*inhibitory concentration 50 %*) und IC₈₀ (*inhibitory concentration 80 %*) sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Einfluss der Platinverbindungen auf die Viabilität der Nierenzellen.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen mittels des MTT-Assays untersucht. Aufgelistet sind die aus den Mittelwerten der MTT-Assays (Abbildung 3.1A) resultierenden IC₅₀ (*inhibitory concentration 50 %*) und IC₈₀ (*inhibitory concentrations 80 %*).

	NRK-52E		RGE	
	IC ₅₀	IC ₈₀	IC ₅₀	IC ₈₀
CisPt	10 µM	32 µM	5 µM	14 µM
OxaliPt	5 µM	133 µM	5 µM	30 µM
CarboPt	100 µM	179 µM	22 µM	63 µM

Um den Zytotoxizitätsverlauf nach Behandlung der Nierenzellen mit den jeweiligen IC₈₀ von Cis-, Oxali- oder Carboplatin (entsprechend Abbildung 3.1A und Tabelle 3.1) in Echtzeit zu verfolgen, wurde die elektrische Impedanz (Wechselstromwiderstand) mittels des iCELLigence Systems über 72 h gemessen. Dabei gilt, dass die elektrische Impedanz mit zunehmender Zelldichte ansteigt. Zudem ist die Impedanz abhängig von der Qualität der Zellinteraktionen mit den Elektroden des Systems. Somit kann sie Veränderungen in der Viabilität, der Anzahl, Morphologie sowie Adhäsion der Zellen aufzeigen. In Abbildung 3.1B ist die elektrische Impedanz über die Behandlungszeit als Zellindex normalisiert auf den Zeitpunkt der Zytostatikabehandlung dargestellt. Bei unbehandelten Kontrollzellen verläuft der Graph des normalisierten Zellindex annähernd sigmoidal. Der Maximalwert ist zelltypabhängig. Sowohl bei NRK-52E- als auch bei RGE-Zellen wird die maximale Zelldichte (maximaler Zellindex) etwa 60 h nach Beginn der Behandlung erreicht. Bei beiden Zelllinien fällt der Zellindex zwischen 6 h und 12 h nach Cis- bzw. Oxaliplatingabe stark ab. Im Gegensatz dazu fällt der Zellindex nach Carboplatinbehandlung erst nach etwa 24 h bei RGE- und nach etwa 32 h bei NRK-52E-Zellen ab. Cis- und Oxaliplatin wirken folglich bereits sehr früh zytotoxisch, wohingegen die durch Carboplatin induzierte Toxizität erst wesentlich verspätet auftritt.

Ergänzend wurde die Anzahl an lebenden Zellen nach 72 h Behandlung mit den jeweiligen IC₅₀ von Cis-, Oxali- oder Carboplatin mittels des Trypanblau-Assays quantifiziert. Dieser beruht darauf, dass tote Zellen den Diazofarbstoff Trypanblau aufnehmen und unter dem

Lichtmikroskop blau erscheinen, wohingegen er in lebende Zellen mit einer intakten Zellmembran nicht eindringen kann. Die Quantifizierung der Anteile an lebenden Zellen nach 72 h Behandlung im Vergleich zu der Anzahl an lebenden Zellen zum Zeitpunkt der Zytostatikazugabe (Kon 1) zeigt zwischen den beiden Nierenzelllinien, vor allem nach Cisplatinbehandlung, keine nennenswerten Unterschiede (Abbildung 3.1C).

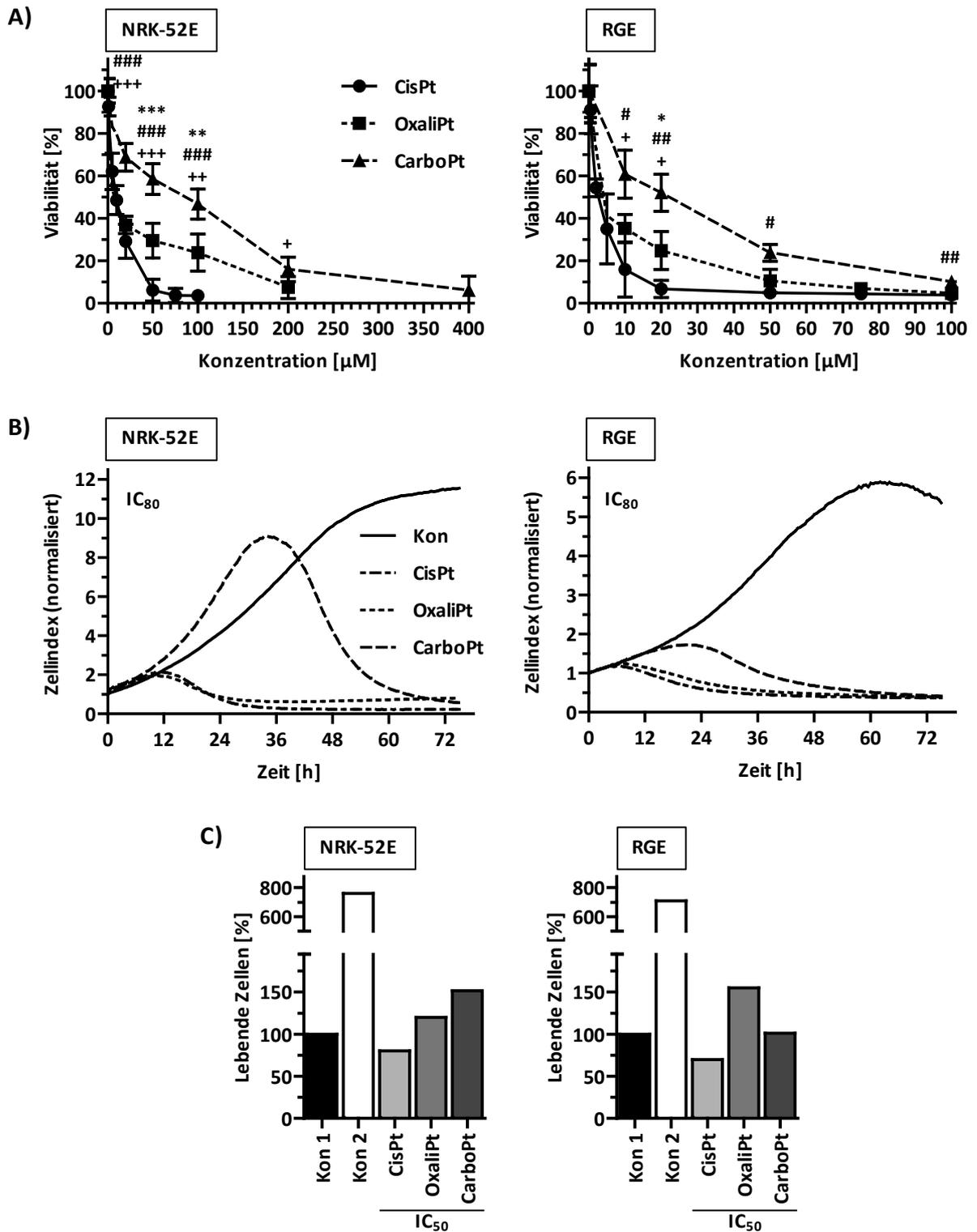


Abbildung 3.1: Viabilitätsuntersuchungen von Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

A) NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen mittels des MTT-Assays untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten Kontrolle (NRK-52E: n = 5, N = 4; RGE: n = 3, N = 4). *: Signifikanz CisPt vs. OxaliPt; #: Signifikanz CisPt vs. CarboPt; +: Signifikanz OxaliPt vs. CarboPt. B) NRK-52E- und RGE-Zellen wurden mit den jeweiligen IC_{80} von Cis-, Oxali- oder CarboPt behandelt. Anschließend wurde die Viabilität ermittelt, indem Veränderungen in der elektrischen Impedanz in Echtzeit mittels des iCELLigence Systems aufgezeichnet wurden. Gezeigt sind Ergebnisse von repräsentativen Experimenten. Kon: unbehandelte Kontrolle. C) NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 72 h mit den jeweiligen IC_{50} von Cis-, Oxali- oder CarboPt behandelt. Anschließend wurde die Anzahl an lebenden Zellen mittels des Trypanblau-Assays bestimmt. Die Anzahl der lebenden Zellen zum Zeitpunkt der Zytostatikazugabe (Kon 1) wurde auf 100 % gesetzt. Kon 2: unbehandelte Kontrolle nach 72 h Behandlung. Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten (n = 1, N = 3). Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind den Tabellen 8.1 und 8.2 des Anhangs zu entnehmen.

Dies deutet darauf hin, dass die höhere Sensitivität der RGE-Zellen in dem oben beschriebenen MTT-Assay (Abbildung 3.1A) eher von einer verringerten mitochondrialen Aktivität herrührt als von vermehrtem Zelltod. Obwohl bei dem Trypanblau-Assay mit äquitoxischen Dosen behandelt worden ist, ist die Anzahl an lebenden Zellen nach 72 h Oxali- bzw. Carboplatinbehandlung höher als nach Cisplatinbehandlung.

3.1.2 EINFLUSS DER PLATINVERBINDUNGEN AUF DIE ZELLYKLUSVERTEILUNG

Um zu überprüfen, ob die oben beschriebenen Unterschiede in der Viabilität nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin auf vermehrter Apoptose beruhen oder mit einem Zellzyklusarrest einhergehen, wurde der Einfluss der Platinverbindungen auf die Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dazu wurde der Zellzyklus 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung mit den jeweiligen IC_{50} bzw. IC_{80} von Cis-, Oxali- oder Carboplatin (entsprechend der Viabilitätsuntersuchungen in Abbildung 3.1A und Tabelle 3.1) analysiert. Dabei zeigte sich, dass eine Behandlung der NRK-52E-Zellen mit der IC_{50} von Cisplatin zu allen gemessenen Zeitpunkten eine Vermehrung in der SubG1-Fraktion, welche die apoptotische Zellpopulation darstellt, zur Folge hat (Abbildung 3.2). Dieser proapoptotische Effekt ist bei Behandlung mit Cisplatin bei 24 h und 48 h noch verstärkt, bei 72 h ist das Maximum bereits bei Behandlung mit der IC_{50} erreicht. Oxali- bzw. Carboplatinbehandlung mit äquitoxischen Dosen führen zu einer wesentlich geringeren Erhöhung der SubG1-Fraktion mit Ausnahme der IC_{80} nach 72 h Behandlung.

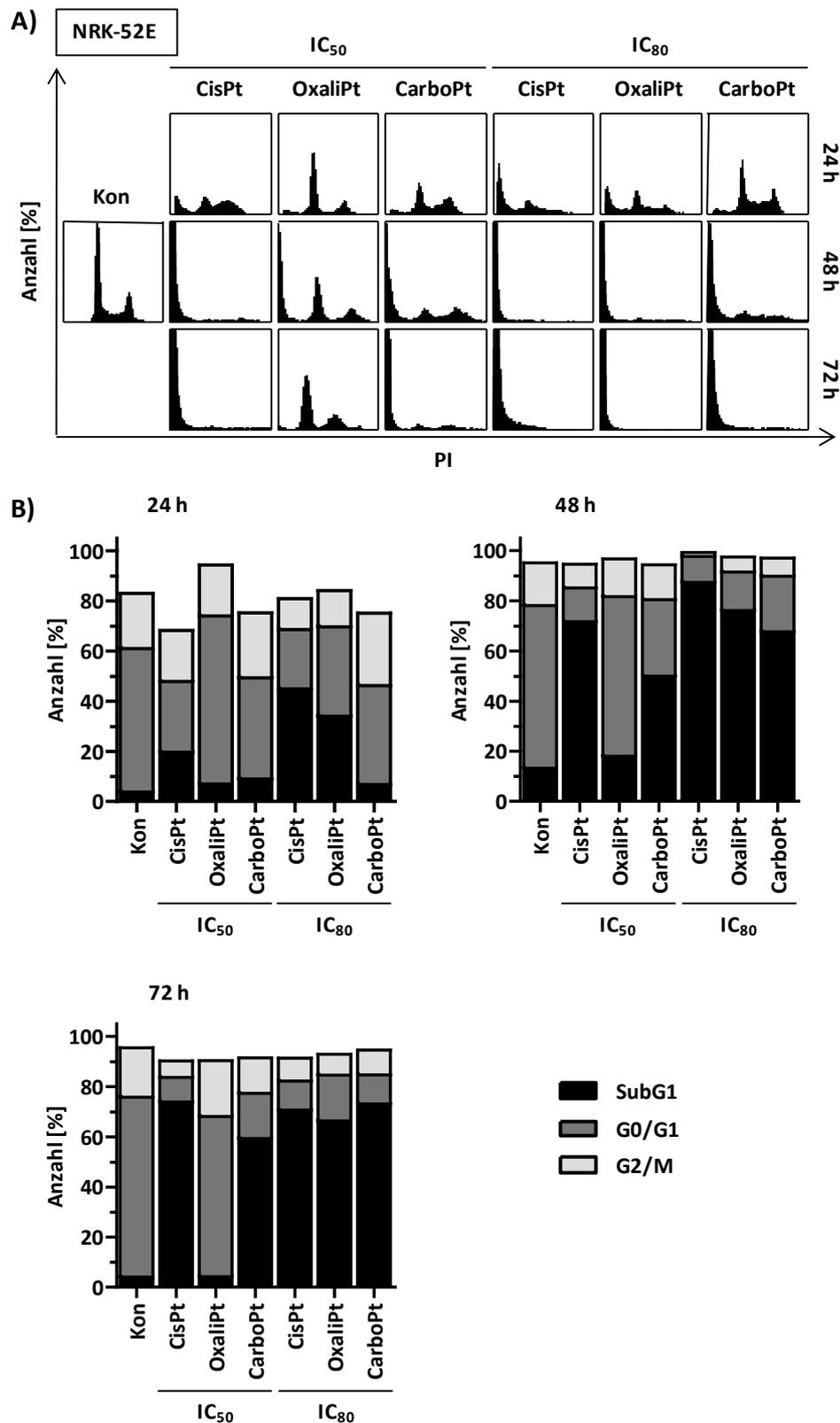
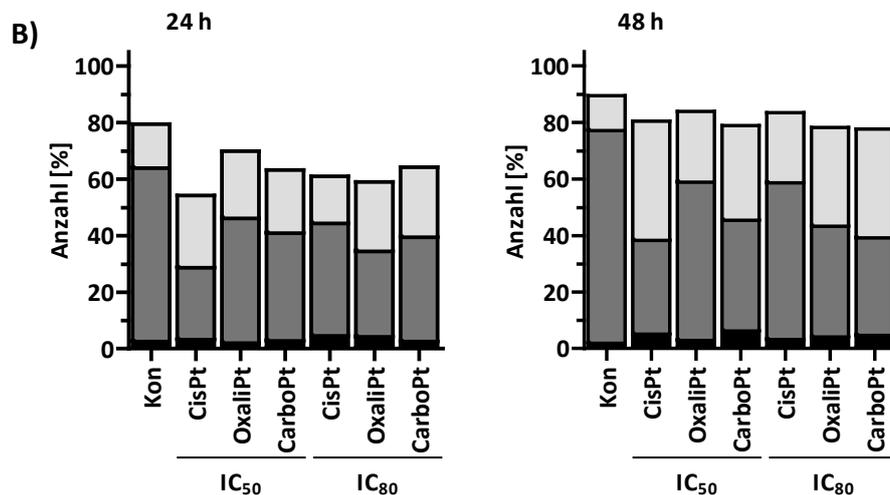
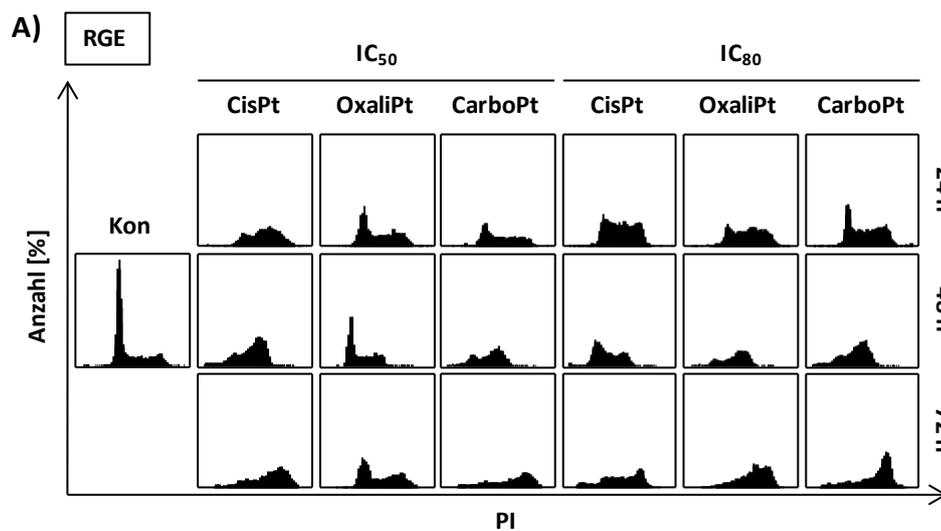


Abbildung 3.2: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung von NRK-52E-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers ermittelt. Gezeigt sind A) exemplarische Zellzyklusverteilungen der unterschiedlichen Bedingungen sowie B) die quantitative Auswertung der Anteile an Zellen in der SubG1-, der G0/G1- und der G2/M-Phase des Zellzyklus. Dargestellt sind Mittelwerte in Prozent der

gemessenen Gesamtzellzahl ($n \geq 1$, $N = 2$). Kon: unbehandelte Kontrolle. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.3 des Anhangs zu entnehmen.

Wurden RGE-Zellen mit äquitoxischen Cisplatin Dosen behandelt, so führte dies weder nach 24 h noch nach 48 h oder 72 h zu einem ähnlich gravierenden Anstieg der SubG1-Fraktion (Abbildung 3.3). Stattdessen reagieren RGE-Zellen auf eine Behandlung mit der IC_{50} von Cisplatin mit einem deutlichen G2/M-Phasenarrest. Dieser tritt auch nach Behandlung mit Carboplatin (IC_{50} und IC_{80}) und der IC_{80} von Oxaliplatin ab einer Behandlungsdauer von 48 h auf.



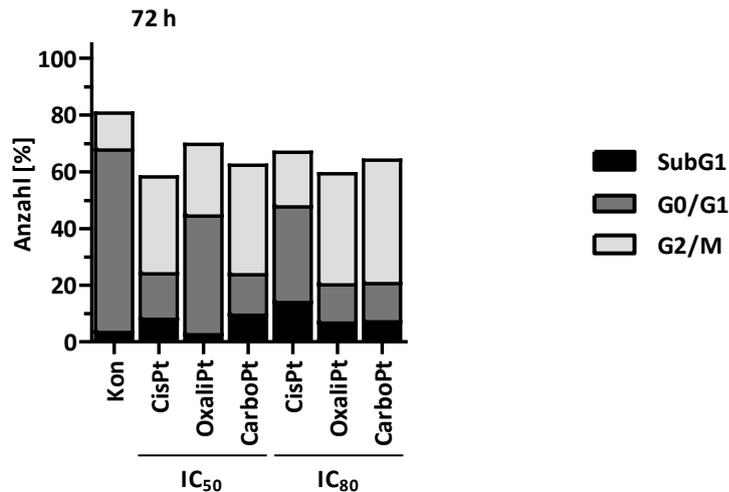


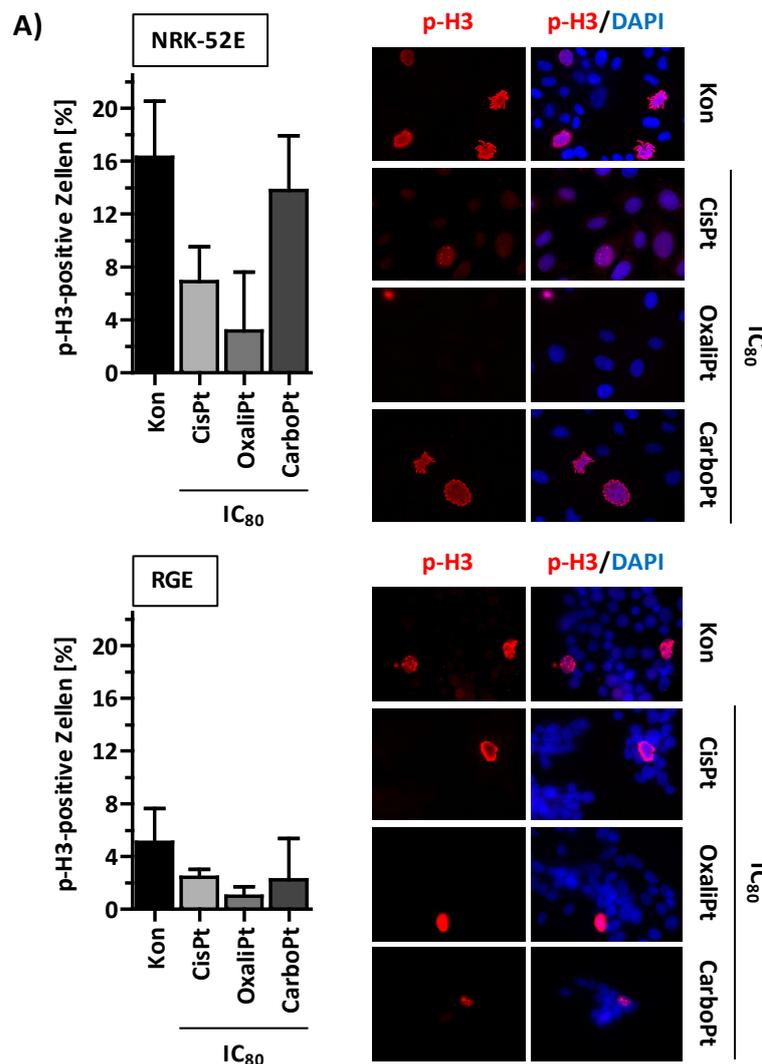
Abbildung 3.3: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung von RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

RGE-Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers ermittelt. Gezeigt sind A) exemplarische Zellzyklusverteilungen der unterschiedlichen Bedingungen sowie B) die quantitative Auswertung der Anteile an Zellen in der SubG1-, der G0/G1- und der G2/M-Phase des Zellzyklus. Dargestellt sind Mittelwerte in Prozent der gemessenen Gesamtzellzahl (n ≥ 1, N = 2). Kon: unbehandelte Kontrolle. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.3 des Anhangs zu entnehmen.

Um den Einfluss der Platinverbindungen auf die Zellzyklusverteilung weiter zu untersuchen, wurden mehrere Zellzyklusmarker mittels immunzytochemischer Färbungen nach 24 h Behandlung mit den jeweiligen IC₈₀ von Cis-, Oxali- oder Carboplatin durchgeführt.

Zum einen wurde der mitotische Index durch eine Färbung mit dem für mitotische Zellen spezifischen Marker phospho-Histon 3 (p-H3) ermittelt. Zum anderen wurde eine immunzytochemische Färbung mit dem Zentromerprotein F (*centromere protein F*; CENP-F) als Marker für die G2/M-Phase des Zellzyklus durchgeführt. Es ist auffällig, dass sich bei RGE-Zellen im Vergleich zu NRK-52E-Zellen wesentlich weniger Zellen im Mitosestadium des Zellzyklus befinden (Abbildung 3.4A). Nach Behandlung mit Oxaliplatin verringert sich der Anteil an p-H3-positiven NRK-52E- und RGE-Zellen um etwa 80 %. Die äquitoxische Dosis von Carboplatin reduziert den Anteil an mitotischen Zellen nicht nennenswert, während Cisplatin ihn etwas weniger beeinflusst als Oxaliplatin. Dies gilt sowohl für NRK-52E- als auch für RGE-Zellen. Obwohl sich NRK-52E- und RGE-Zellen basal in der Anzahl der Zellen im Mitosestadium des Zellzyklus deutlich unterscheiden, ist ihre qualitative Antwort auf die Zytostatikabehandlungen gleich. Äquitoxische Konzentrationen der Platinverbindungen beeinflussen nach 24 h Behandlung das Mitosestadium und folglich die Zell-

zyklusprogression unterschiedlich. Die Anzahl an NRK-52E-Zellen, welche CENP-F exprimieren, nimmt mit Behandlung aller drei Platinverbindungen signifikant, jedoch mit geringfügig unterschiedlichem Ausmaß, zu (Abbildung 3.4B). Auch hier zeigt Oxaliplatin den deutlichsten Einfluss auf die Zellzyklusprogression. RGE-Zellen zeigen nach der Zytostatikabehandlung keine Veränderungen in der Anzahl der G2/M-Phase-Zellen. Der Einfluss der Platinverbindungen auf die G2/M-Phase des Zellzyklus ist folglich zelltypspezifisch.



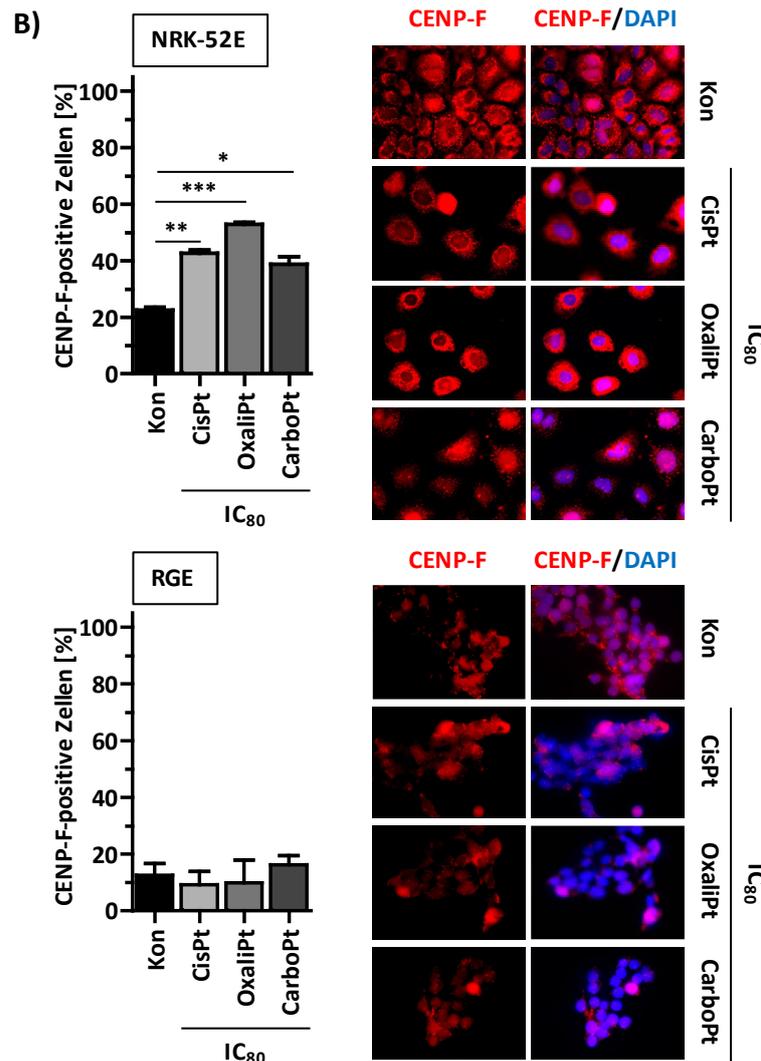
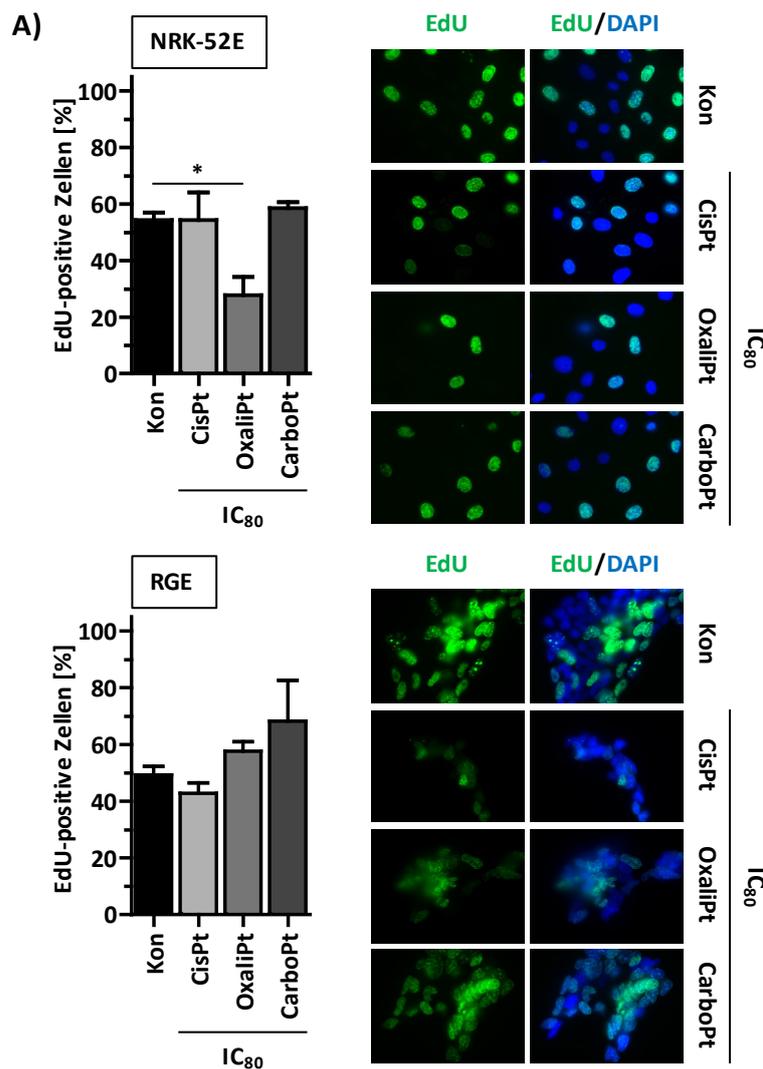


Abbildung 3.4: Einfluss der Platinverbindungen auf die mitotische Aktivität der Nierenzellen.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h mit den jeweiligen IC_{80} der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Anzahl an A) phospho-Histon 3 (p-H3)- und B) Zentromerprotein F (CENP-F)-positiven Zellen nach immunzytochemischen Färbungen bestimmt. Dargestellt sind links Mittelwerte + Standardabweichungen in Prozent sowie rechts exemplarische Fluoreszenzaufnahmen. DAPI: 4',6-Diamin-2-phenylindol; Kon: unbehandelte Kontrolle (n = 2, N = 2). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellen gezählt. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.4 des Anhangs zu entnehmen.

Die S-Phase-Aktivität der behandelten Zellen wurde anhand des Einbaus des Thymidin-analogons 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) überprüft. Hierzu wurden die Zellen im Anschluss an die Zytostatikabehandlung einem 30 minütigen EdU-Puls ausgesetzt. Bei NRK-52E-Zellen zeigt sich eine signifikante Abnahme an EdU-positiven Zellen nach Behandlung mit Oxaliplatin (Abbildung 3.5A). Im Gegensatz dazu zeigen RGE-Zellen lediglich eine geringfügige Verringerung im EdU-Einbau nach Cisplatinbehandlung, wohingegen der Anteil an EdU-positiven Zellen nach Oxali- bzw. Carboplatinbehandlung etwas erhöht ist.

Die proliferierende Zellpopulation wurde zudem zusätzlich mittels einer immunzytochemischen Färbung des Antigens KI-67 bestimmt. KI-67 ist bei sich teilenden Zellen im Zellkern zu finden, fehlt jedoch in der G0-Phase von ruhenden Zellen. Die Auszählung der KI-67-positiven Zellen ergab, dass nur die Cis- und in geringerem Ausmaß die Oxaliplatinbehandlung von NRK-52E-Zellen zu einer geringfügigen Verminderung der proliferierenden Zellfraktion führt (Abbildung 3.5B). Nach Carboplatinbehandlung sowie bei RGE-Zellen wird die Anzahl an KI-67-exprimierenden Zellen nicht beeinflusst.



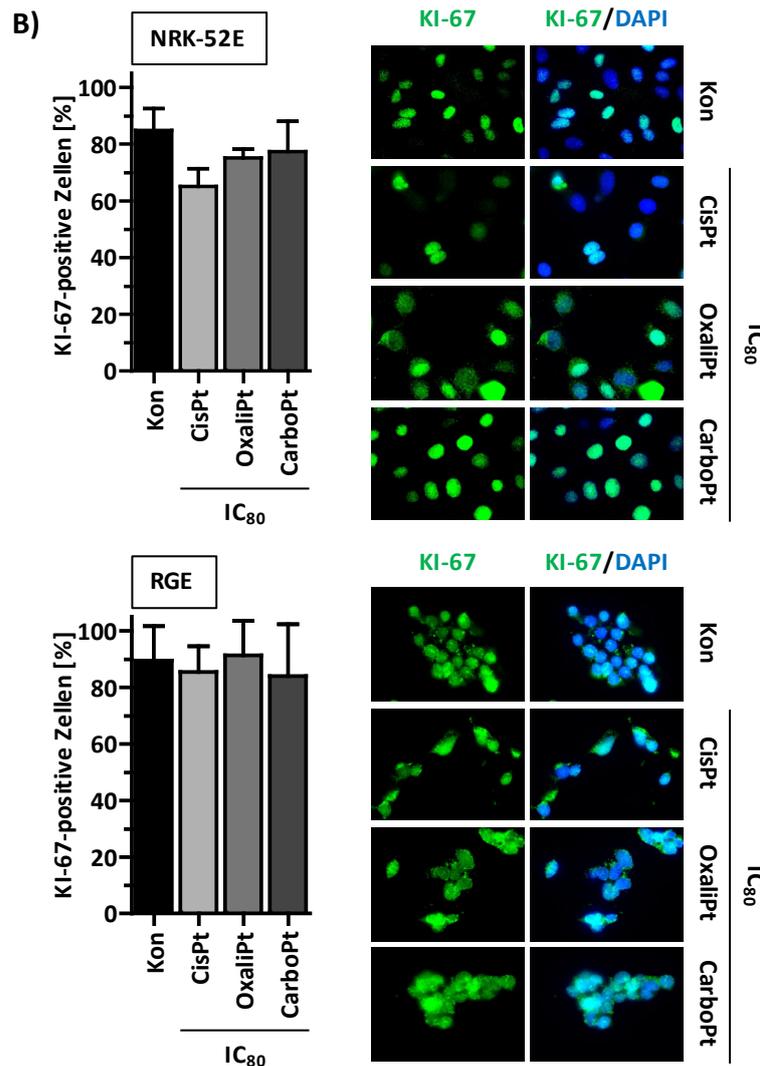


Abbildung 3.5: Einfluss der Platinverbindungen auf die Proliferation der Nierenzellen.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h mit den jeweiligen IC_{80} der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. A) Anschließend wurden die Zellen mit 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) behandelt und die EdU-Inkorporation mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. B) Zudem wurde die Anzahl an KI-67-positiven Zellen nach immunzytochemischer Färbung bestimmt. Dargestellt sind links Mittelwerte + Standardabweichungen in Prozent sowie rechts exemplarische Fluoreszenzaufnahmen. DAPI: 4',6-Diamin-2-phenylindol; Kon: unbehandelte Kontrolle ($n = 2$, $N = 2$). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellen gezählt. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.5 des Anhangs zu entnehmen.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sowie der immunzytochemischen Fluoreszenzfärbungen, dass äquitoxische Dosen von Cis-, Oxali- und Carboplatin zu einer deutlich unterschiedlichen Zellantwort hinsichtlich der Zellzyklusverteilung sowie der Mitoseaktivität führen. Zudem gibt es zelltypspezifische Unterschiede.

3.1.3 INDUKTION VON APOPTOTISCHEM UND NEKROTISCHEM ZELLTOD

Um die molekularen Mechanismen des Zelltods, die den oben beschriebenen zytotoxischen Effekten der Platinverbindungen zugrunde liegen, näher zu untersuchen, wurden als Endpunkte Apoptose sowie Nekrose betrachtet.

Zunächst wurde der Einfluss der Zytostatikabehandlung auf den apoptotischen Zelltod analysiert, indem die Aktivierung der beiden Effektorcaspasen 3 und 7, welche sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsischen Signalweg erfolgen kann, fluorimetrisch mittels des Apo-ONE[®]-Assays quantifiziert wurde. Bei diesem Assay wird ein Substrat der Caspasen 3 und 7 spezifisch gespalten, wodurch der fluoreszierende Farbstoff Rhodamin 110 freigesetzt wird. Die über die Zeit gemessene Fluoreszenzintensität dient als Maß für die Aktivität der beiden Caspasen 3 und 7. NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cis-, Oxali- oder Carboplatin (entsprechend der Viabilitätsuntersuchungen in Abbildung 3.1A und Tabelle 3.1) behandelt und der Fluoreszenzanstieg anschließend über 3 h gemessen (Δ *relative fluorescence unit*; Δ RFU). Um auszuschließen, dass Unterschiede in der ermittelten Fluoreszenzintensität auf Proliferationseffekten beruhen, wurde der Anstieg der Caspaseaktivität jeweils sowohl auf die mittels des Alamar Blue-Assays bestimmte Viabilität als auch auf die Aktivität unbehandelter Kontrollzellen bezogen. Von den getesteten Platinverbindungen induzieren bei NRK-52E-Zellen die IC₈₀ von Cis- und Oxaliplatin nach 24 h Behandlung die stärkste Caspaseaktivität (Abbildung 3.6). Bei RGE-Zellen ist eine deutlich geringere Caspaseaktivität messbar. Cisplatin induziert nach 24 h und 48 h Behandlung bei beiden Zelllinien die höchste Aktivität der Caspasen 3 und 7. Zu späterem Zeitpunkt (72 h nach Zytostatikazugabe) ist die höchste Caspaseaktivität bei mit Carboplatin behandelten NRK-52E-Zellen messbar, wohingegen RGE-Zellen noch immer die höchste Aktivität nach Cisplatinbehandlung aufweisen.

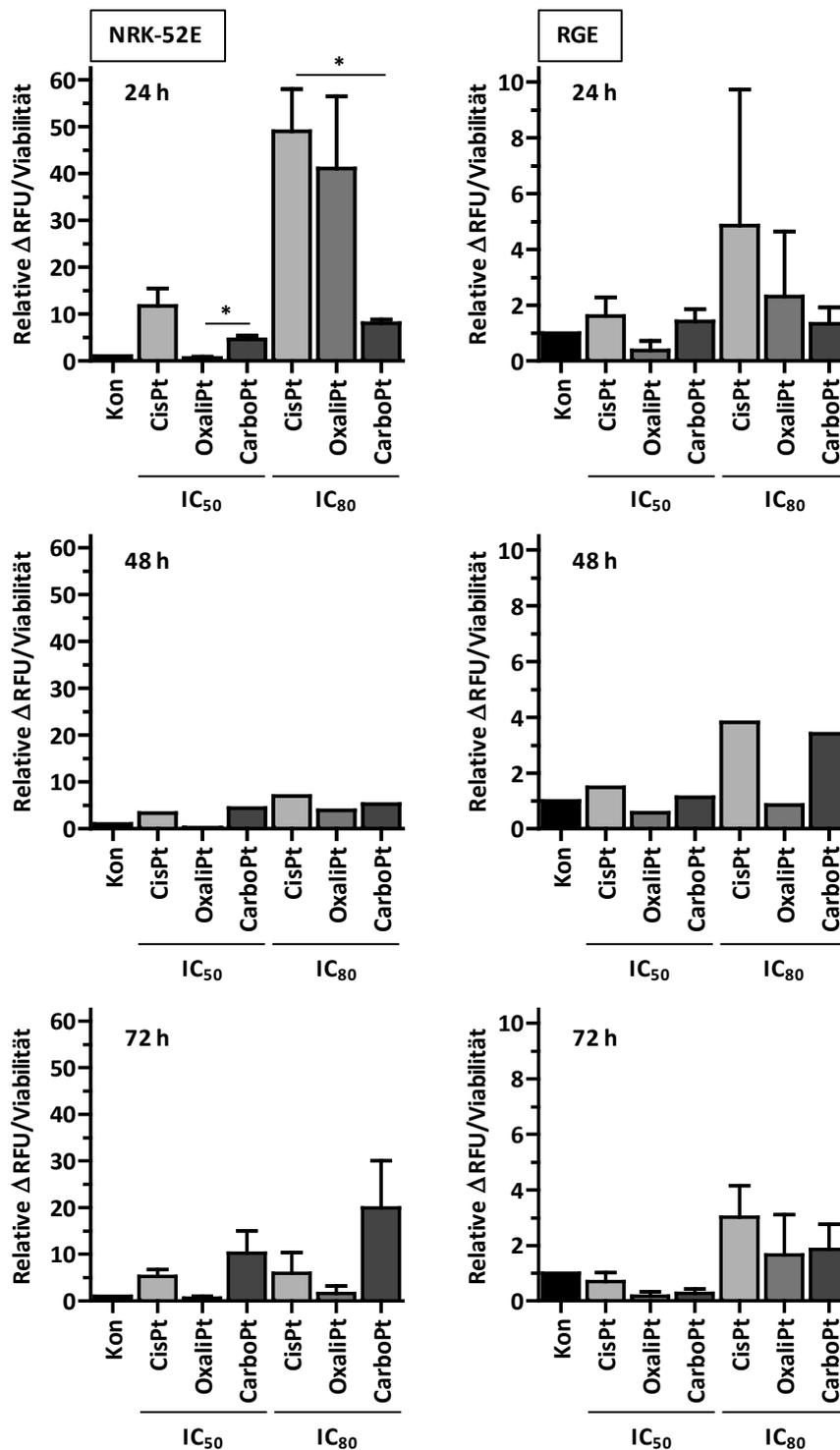
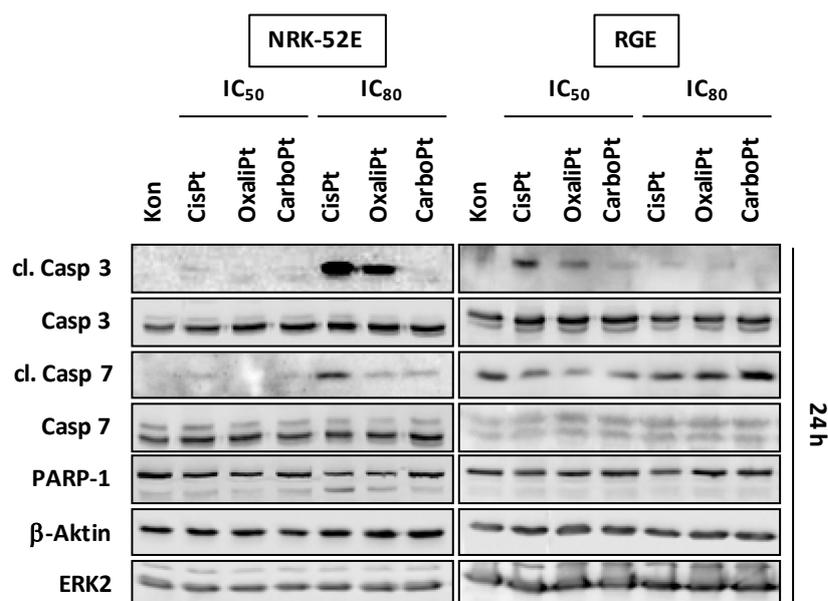


Abbildung 3.6: Fluoreszenzbasierte Analyse der Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mittels des Apo-ONE®-Assays fluorimetrisch bestimmt. Der Anstieg der Caspaseaktivität (Δ relative fluorescence unit; Δ RFU) wurde auf die mittels des Alamar Blue-Assays bestimmte Viabilität bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichungen als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle (Kon) (24 h, 72 h: n = 2, N = 3; 48 h: n = 1, N = 3). Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.6 des Anhangs zu entnehmen.

Zusätzlich zu diesen fluorimetrischen Aktivitätsmessungen wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 einzeln mittels Western Blot-Analysen überprüft. Dabei weist eine Spaltung der Proform der Caspasen auf deren Aktivierung hin. Außerdem wurde hier die Spaltung des DNA-Reparaturenzyms Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) detektiert, dessen Abbau durch die Caspase 3 einen wesentlichen Schritt des apoptotischen Zelltods darstellt. Aus diesen Western Blot-Analysen geht ebenfalls hervor, dass eine 24 h Behandlung der NRK-52E-Zellen mit der IC₈₀ von Cisplatin die höchste Caspaseaktivität, sowohl von Caspase 3 als auch von Caspase 7, zur Folge hat, gefolgt von der IC₈₀ von Oxaliplatin (Abbildung 3.7). Dies zeigt auch die Spaltung von PARP-1, welche am deutlichsten nach Cisplatinbehandlung mit der IC₈₀ an einer zusätzlich auftretenden Bande zu erkennen ist. Carboplatin hingegen induziert zu diesem Zeitpunkt nahezu keine Apoptose, gemessen an der Effektorcaspaseaktivität. Nach 48 h und 72 h Behandlung ist die aktivierte Caspase 7 kaum und Caspase 3 gar nicht detektierbar, allerdings tritt eine vermehrte PARP-1-Spaltung nach 48 h Carboplatinbehandlung auf. RGE-Zellen weisen nach 24 h Behandlung mit der IC₅₀ von Cis- bzw. Oxaliplatin mehr aktive Caspase 3 auf. Nach 48 h und 72 h Behandlung wird hier die Aktivität der Caspase 3 vor allem durch die IC₈₀ von Cisplatin induziert, wobei die Caspase 7 von allen drei verwendeten Platinverbindungen vermehrt aktiviert wird. Hier ist keine deutliche PARP-1-Spaltung zu erkennen.



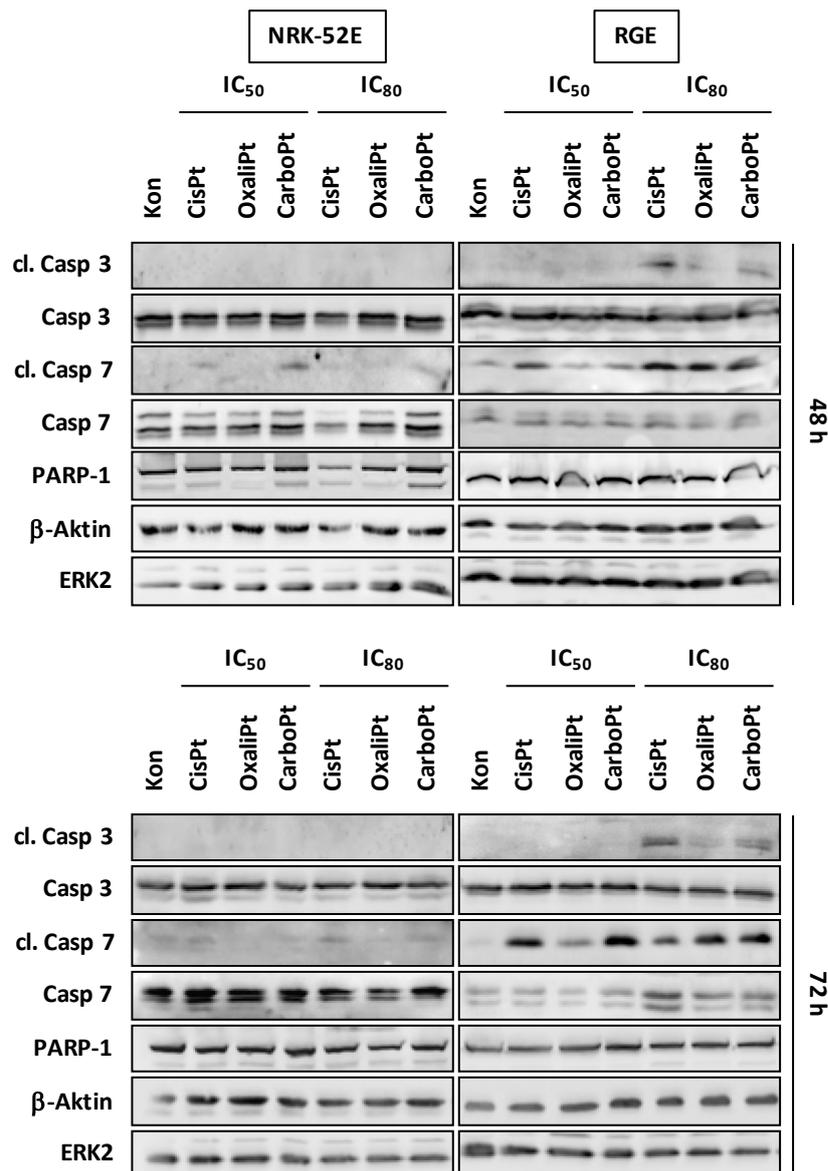


Abbildung 3.7: Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin mittels Western Blot-Analysen.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Caspaseaktivität mittels Western Blot-Analysen anhand des Nachweises der gespaltenen aktiven Caspasen (cl. Casp 3 und cl. Casp 7) sowie der gespaltenen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) analysiert. Die Expression des Zytoskelettproteins β-Aktin sowie der extrazellulär regulierten Kinase (ERK2) dienen als Ladekontrolle. Kon: unbehandelte Kontrolle.

Ergänzend wurden die Zellkerne beider Zelllinien nach 48 h Behandlung mit den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cis-, Oxali- oder Carboplatin mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt und die Anzahl der durch die Induktion der Apoptose fragmentierten Zellkerne bestimmt. Diese Quantifizierung bestätigt, dass bei Behandlung mit äquitoxischen Dosen bei NRK-52E-Zellen Cisplatin am stärksten Apoptose induziert (Abbildung 3.8). Bei RGE-Zellen überwiegt jedoch Carboplatin in der Apoptoseinduktion. Es fällt auf, dass während NRK-52E-Zellen nach Behandlung mit allen drei

Platinverbindungen Apoptose dosisabhängig induzieren, Carboplatinbehandlung bei RGE-Zellen bereits mit der IC_{50} die maximale Apoptoserate zur Folge hat und nach Cisplatinbehandlung mit der IC_{80} weniger apoptotische Zellkerne zu finden sind als nach Behandlung mit der IC_{50} . Dies steht nicht in Übereinstimmung mit den vorherigen Apo-ONE®-Assay- und Western Blot-Ergebnissen (Abbildungen 3.6 und 3.7). Die Ergebnisse unterstützen dennoch die Vermutung, dass die Apoptoseantworten der proximalen Tubulusepithel- sowie der glomerulären Endothelzellen auf die verwendeten Platinverbindungen sehr stark zelltyp- sowie agensspezifisch sind.

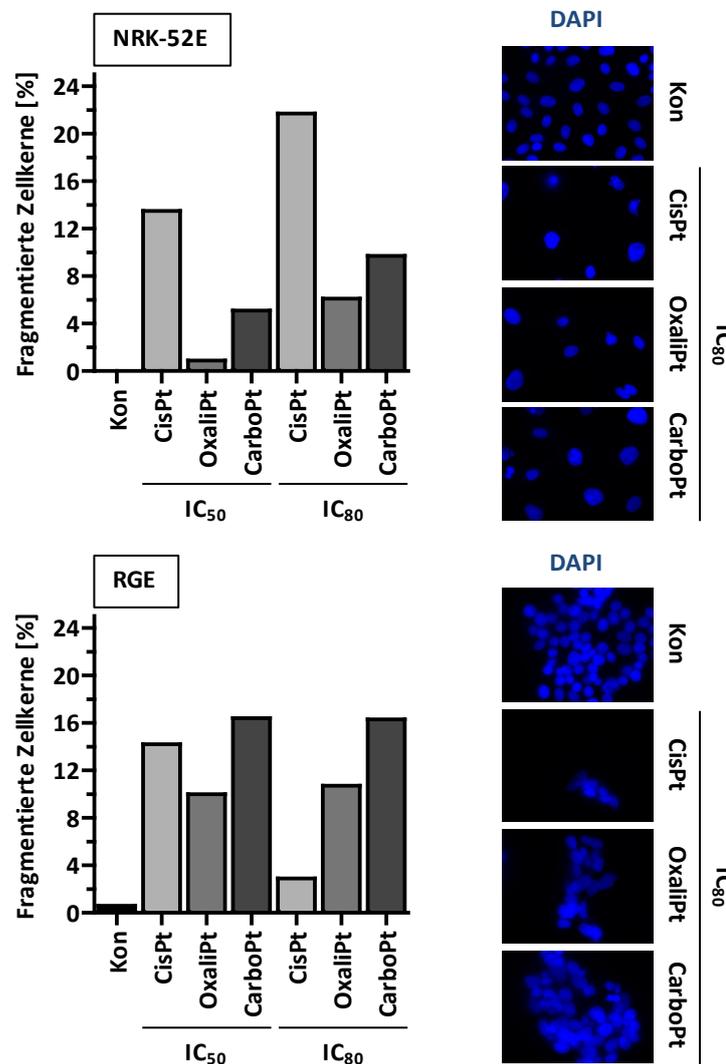
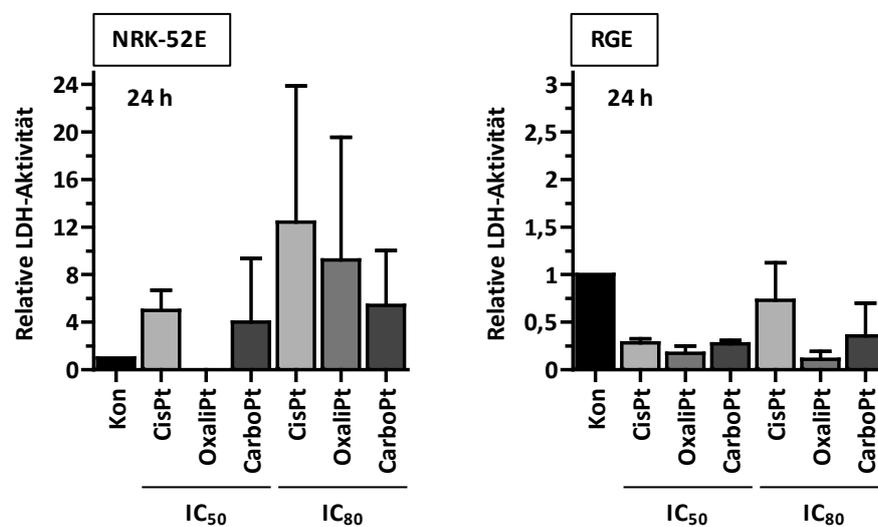


Abbildung 3.8: Induktion von apoptotischem Zelltod in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin anhand von fragmentierten Zellkernen.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 48 h mit den jeweiligen IC_{50} bzw. IC_{80} der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt und die Anzahl der fragmentierten Zellkerne quantifiziert. Dargestellt sind links die Anteile an fragmentierten Zellkernen als Mittelwerte sowie rechts exemplarische Fluoreszenzaufnahmen. Kon: unbehandelte Kontrolle (n = 1, N = 2). Es wurden jeweils

(je N) mehr als 100 Zellen gezählt. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.7 des Anhangs zu entnehmen.

Der Nachweis von nekrotischem Zelltod, der mit der Lyse der Zelle aufgrund von verringerter Membranintegrität einhergeht, erfolgte durch den Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay, bei welchem die Aktivität der aus dem Zytoplasma in das Kultivierungsmedium freigesetzten LDH bestimmt wird. Analog zu vorherigen Untersuchungen wurden NRK-52E- und RGE-Zellen für 24 h, 48 h und 72 h mit den Platinverbindungen behandelt und anschließend die LDH-Aktivität in dem Mediumüberstand durch Absorptionsmessungen quantifiziert. Bei NRK-52E-Zellen induziert die IC₈₀ von Cisplatin nach 24 h Behandlung die stärkste Freisetzung von LDH, Carboplatin die geringste (Abbildung 3.9). RGE-Zellen zeigen eine deutlich geringere LDH-Aktivität als NRK-52E-Zellen. Auch bei RGE-Zellen induziert die IC₈₀ von Cisplatin die stärkste Lyse, allerdings erst ab einer Behandlungsdauer von 48 h. Nach 24 h Behandlung sowie nach Inkubation mit Oxali- bzw. Carboplatin sowie mit der IC₅₀ von Cisplatin findet bei RGE-Zellen keine vermehrte Nekrose im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen statt.



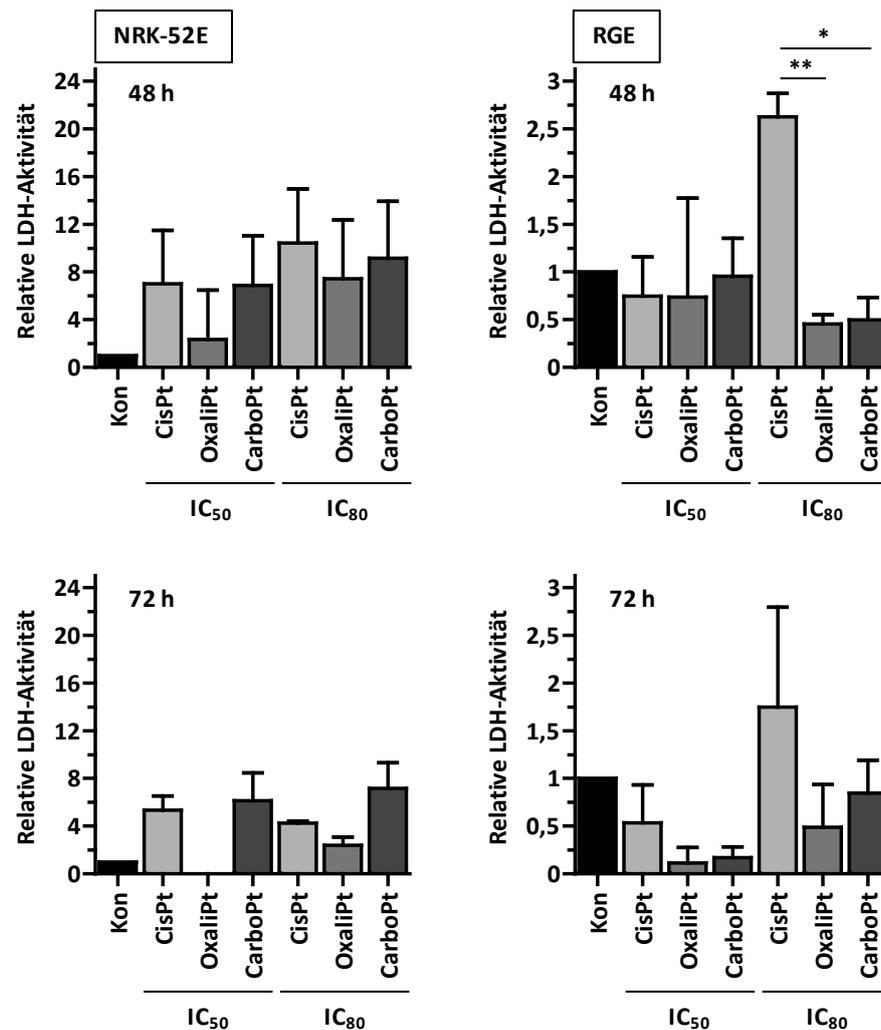


Abbildung 3.9: Induktion von nekrotischem Zelltod in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde im Überstand der Zellen die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) mittels des LDH-Assays quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichungen als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle (Kon) (n ≥ 2, N = 3). Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.8 des Anhangs zu entnehmen.

Auffällig sind die sehr ähnlichen Diagrammmuster der Apo-ONE®- und LDH-Assays (Abbildung 3.6 und 3.9) bei NRK-52E-Zellen. Folglich induzieren die Platinverbindungen besonders bei NRK-52E-Zellen in ähnlichem Maße Apoptose wie Nekrose, allenfalls mit einer leichten Präferenz für Apoptose nach 24 h Behandlung mit der IC₈₀ von Cis- bzw. Oxaliplatin (Abbildung 3.6). RGE-Zellen unterliegen mit Ausnahme einer Cisplatinbehandlung von 48 h oder 72 h lediglich apoptotischem Zelltod.

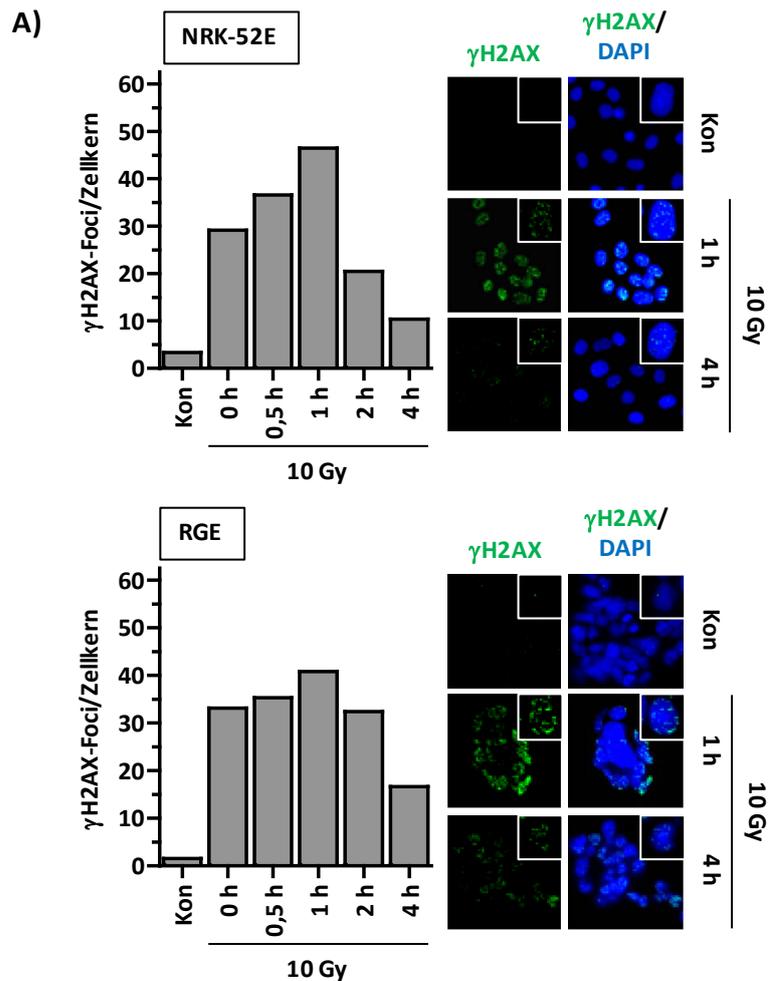
3.1.4 EINFLUSS DER PLATINVERBINDUNGEN AUF DIE DNA-SCHADENSINDUKTION UND -ANTWORT

Zellen antworten auf durch unterschiedliche Noxen verursachte DNA-Schäden mit der sogenannten DNA-Schadensantwort, welche die DNA-Reparatur, einen Zellzyklusarrest, der wiederum eine forcierte DNA-Reparatur ermöglicht, oder den programmierten Zelltod (Apoptose) zur Folge haben kann. Schlüsselenzyme dieser DNA-Schadensantwort stellen die Serin/Threonin-Proteinkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*) sowie die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKc) dar (Shiloh, 2001; Lavin *et al.*, 2005; Harper und Elledge, 2007). Während der DNA-Schadensantwort wird das Histon H2AX (*H2A histone family, member X*) an seinem Serin 139 phosphoryliert, wofür die oben genannten Kinasen verantwortlich sind. Das so phosphorylierte H2AX (γ H2AX) dient als etablierter Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) (Löbrich *et al.*, 2010; Valdiglesias *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit wurde zunächst die Bildung von DSBs in NRK-52E- und RGE-Zellen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung (*ionizing radiation*; IR) als prototypischer Noxe für die Induktion von DSBs und der DNA-Schadensantwort (Vignard *et al.*, 2013) untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt und im Anschluss daran die Anzahl an DSBs zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h nach Bestrahlung) mittels immunzytochemischer Färbung der γ H2AX-Foci quantifiziert. Diese Quantifizierung zeigt, dass die Zellantwort beider Zelllinien auf IR sehr ähnlich ist (Abbildung 3.10A). Bei beiden Zelllinien steigt die Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zellkern bis zu 1 h nach Bestrahlung auf ein Maximum an, um dann mit weiterer Postinkubationsdauer wieder abzufallen.

Um den Auswirkungen dieser DSBs auf die resultierenden zellulären Stressantworten weiter nachzugehen, wurden ausführliche Western Blot-Analysen, 1 h nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen (1 Gy, 5 Gy und 10 Gy), mit Proteinen, die in der DNA-Schadensantwort ATM und ATR nachgeschaltet sind (AKT (Serin/Threonin-Kinase; Proteinkinase B), Tumorsuppressorprotein P53, KAP1 (*KRAB-associated protein 1*), RPA32 (Replikationsprotein A2, 32 kDa Untereinheit), H2AX) durchgeführt. In die Analyse wurden zudem Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinases*;

MAPKs) (P38 und SAPK/JNK (stressaktivierte Proteinkinase/c-JUN N-terminale Kinase)) sowie das SAPK/JNK-Substrat c-JUN mit einbezogen. Die Ergebnisse zeigen dosisabhängige Phosphorylierungen von P53, KAP1, RPA32 und H2AX. Mit Ausnahme von RPA32, das bei RGE-Zellen nach 5 Gy und 10 Gy stärker aktiviert wird als bei NRK-52E-Zellen, treten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien auf (Abbildung 3.10B).



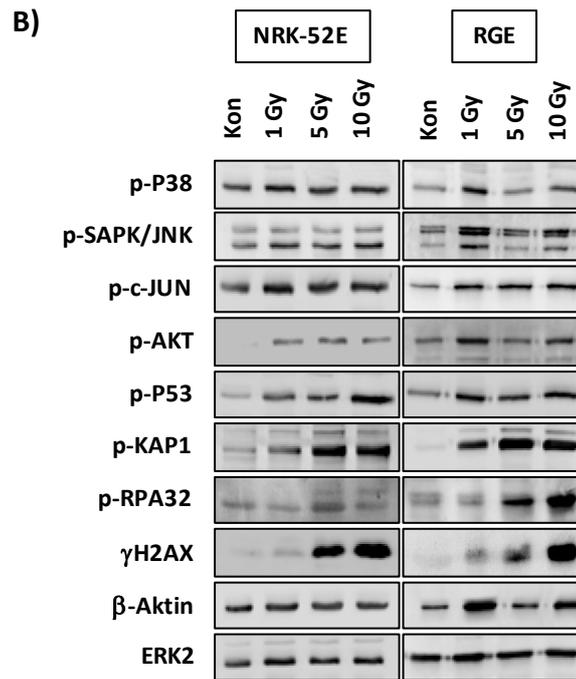


Abbildung 3.10: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) sowie Western Blot-Analysen der Stressantworten in Nierenzellen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung.

A) NRK-52E- und RGE-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt. Anschließend wurde die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ermittelt, indem die Anzahl an nukleären γ H2AX-Foci zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h) mittels immunzytochemischer Färbung quantifiziert wurde. Dargestellt sind links die Mittelwerte von jeweils mehr als 50 ausgezählten Zellkernen sowie rechts beispielhafte Fluoreszenzaufnahmen ($n = 1$, $N = 1$). Die der Abbildung zugrunde liegenden Mittelwerte sind Tabelle 8.9 des Anhangs zu entnehmen. B) NRK-52E- und RGE-Zellen wurden mit 1 Gy, 5 Gy oder 10 Gy bestrahlt. Anschließend wurde der Aktivierungsstatus der DNA-Schadensantwort 1 h nach der Bestrahlung mittels phosphospezifischer Antikörper in Western Blot-Analysen untersucht. Die Expression des Zytoskelettproteins β -Aktin sowie der extrazellulär regulierten Kinase (ERK2) dienen als Ladekontrolle. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Kon: unbehandelte Kontrolle; p-: phospho-; AKT: Serin/Threonin-Kinase; c-JUN: SAPK/JNK-Substrat; γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert; KAP1: *KRAB-associated protein 1*; P38: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; P53: Tumorsuppressorprotein; RPA32: Replikationsprotein A2, 32 kDa Untereinheit; SAPK/JNK: stressaktivierte Phosphokinase/c-JUN N-terminale Kinase.

Um die Bildung sowie Reparatur der DSBs nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin zu erfassen, wurde die Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zellkern nach 8 h Behandlung mit den jeweiligen IC_{50} bzw. IC_{80} der Platinverbindungen (entsprechend der Viabilitätsuntersuchungen in Abbildung 3.1A und Tabelle 3.1) sowie nach anschließender Postinkubation von 24 h ebenfalls mittels immunzytochemischer Färbung der γ H2AX-Foci quantifiziert. Es zeigte sich, dass alle verwendeten Platinverbindungen in beiden Zelllinien nach 8 h Behandlung DSBs induzieren und deren Bildung nach 24 h Postinkubation in Abwesenheit der Platinverbindungen noch weiter fortschreitet (Abbildung 3.11 und 3.12). Dabei induziert Cisplatin bei äquitoxischen Dosen nur geringfügig mehr DSBs als Oxali- bzw. Carboplatin. Im Vergleich zu NRK-52E-Zellen weisen RGE-Zellen bereits nach 8 h

mehr DSBs auf. Nach einer Postinkubation von 24 h ist die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zellkern bei RGE-Zellen mit Ausnahme von Oxaliplatin bereits bei der IC_{50} weiter erhöht (Abbildung 3.12). Bei NRK-52E-Zellen ist dies bei Behandlung mit der IC_{50} von Carboplatin und der IC_{80} von Cis-, Oxali- bzw. Carboplatin der Fall (Abbildung 3.11). Während NRK-52E-Zellen also eine Dosisabhängigkeit bei der Bildung von DSBs nach der Zytostatikabehandlung aufweisen, erreichen RGE-Zellen die maximale Anzahl an DSBs bereits bei Behandlung mit der IC_{50} .

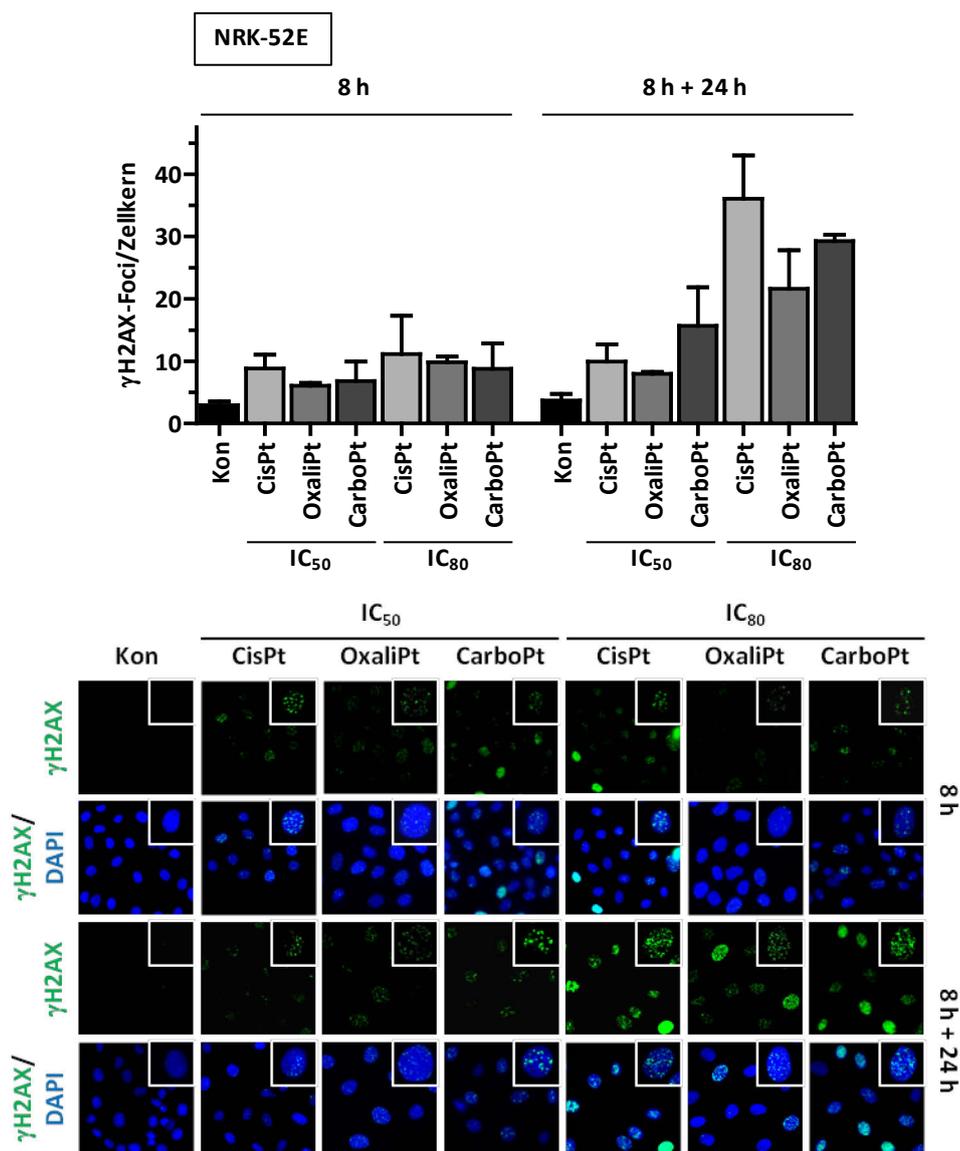


Abbildung 3.11: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) in NRK-52E-Zellen nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 8 h mit der IC_{50} bzw. IC_{80} von Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Teilweise folgte eine Postinkubations von 24 h in Abwesenheit der Platinverbindungen (8 h + 24 h). Anschließend wurde die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ermittelt, indem die Anzahl an nukleären γ H2AX-Foci mittels immunocytochemischer Färbung quantifiziert wurde. Der obere Teil der Abbildung zeigt Mittelwerte + Standardabweichungen der Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zellkern, der untere repräsentative Fluoreszenzaufnahmen. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Kon: unbehandelte

Kontrolle (CisPt, CarboPt: n = 3, N = 1; OxaliPt: n = 2, N = 1). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellkerne ausgezählt. Die der Abbildung zugrunde liegenden Mittelwerte sind Tabelle 8.10 des Anhangs zu entnehmen. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Platinverbindungen bei den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ sind nicht signifikant.

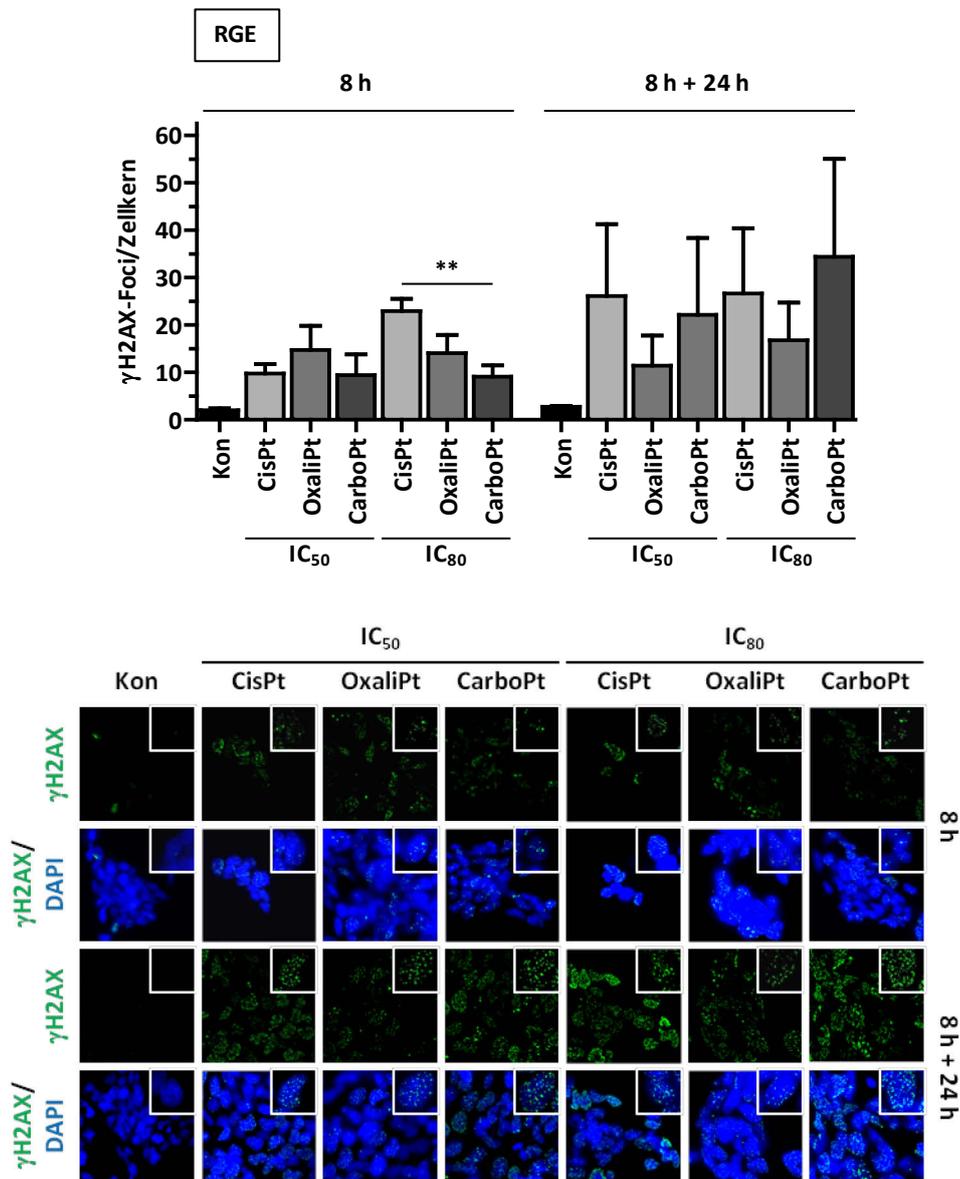


Abbildung 3.12: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) in RGE-Zellen nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

RGE-Zellen wurden für 8 h mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Teilweise folgte eine Postinkubation von 24 h in Abwesenheit der Platinverbindungen (8 h + 24 h). Anschließend wurde die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ermittelt, indem die Anzahl an nukleären γ H2AX-Foci mittels immunozytochemischer Färbung quantifiziert wurde. Der obere Teil der Abbildung zeigt Mittelwerte + Standardabweichungen der Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zellkern, der untere repräsentative Fluoreszenzaufnahmen. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Kon: unbehandelte Kontrolle (CisPt, CarboPt: n = 3, N = 1; OxaliPt: n = 2, N = 1). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellkerne ausgezählt. Die der Abbildung zugrunde liegenden Mittelwerte sind Tabelle 8.10 des Anhangs zu entnehmen.

Da die DNA-Schadensantworten auf ionisierende Strahlung bei beiden Zelllinien sehr ähnlich sind (Abbildung 3.10A), weisen die Unterschiede in den Antworten auf die

Behandlung mit den Platinverbindungen auf eine sehr starke Agensspezifität und nicht auf zelltypeigene Unterschiede in der Fähigkeit zur DNA-Schadensantwort hin.

Um der Agensspezifität in Bezug auf die DNA-Schadensantwort weiter nachzugehen, wurden ausführliche Western Blot-Analysen nach unterschiedlichen Expositionszeiten (8 h, 8 h gefolgt von 24 h Postinkubation in Abwesenheit der Platinverbindungen, 24 h, 48 h oder 72 h) mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin durchgeführt. Dabei lag der Fokus auf Proteinen, die in der DNA-Schadensantwort ATM und ATR nachgeschaltet sind. Die Abbildungen 3.13 und 3.14 zeigen die hochgradig spezifischen Ergebnisse dieser Western Blot-Analysen. Nach 8 h Behandlung mit der IC_{80} von Cis- bzw. Oxaliplatin werden in NRK-52E-Zellen das Tumorsuppressorprotein P53 sowie die Checkpointkinase 1 (CHK1) deutlich phosphoryliert (p-P53 und p-CHK1), die Checkpointkinase 2 (CHK2), die 32 kDa Untereinheit des Replikationsproteins A2 (RPA32) und das KRAB-assoziierte Protein 1 (KAP1) jedoch kaum aktiviert (p-CHK2, p-RPA32 und p-KAP1) (Abbildung 3.13). Carboplatin stimuliert nach 8 h lediglich die Phosphorylierung von CHK1. Diese wird hier auch bereits von der IC_{50} von Cisplatin induziert. Nach einer Postinkubation von 24 h in Abwesenheit der Platinverbindungen führen sowohl Cis- als auch Oxali- und Carboplatin zu einer vermehrten Phosphorylierung von CHK2, RPA32 und KAP1 in NRK-52E- sowie in RGE-Zellen, wobei Carboplatin bei ersteren am meisten p-CHK2 induziert. RGE-Zellen zeigen im Vergleich zu NRK-52E-Zellen eine stärkere Aktivierung von CHK1. Das Histon H2AX wird in beiden Zelllinien am meisten von Cisplatin phosphoryliert, was mit den vorherigen immunzytochemischen Färbungen der γ H2AX-Foci übereinstimmt. Diese Phosphorylierung tritt bei RGE-Zellen erst 24 h nach der Behandlung auf.

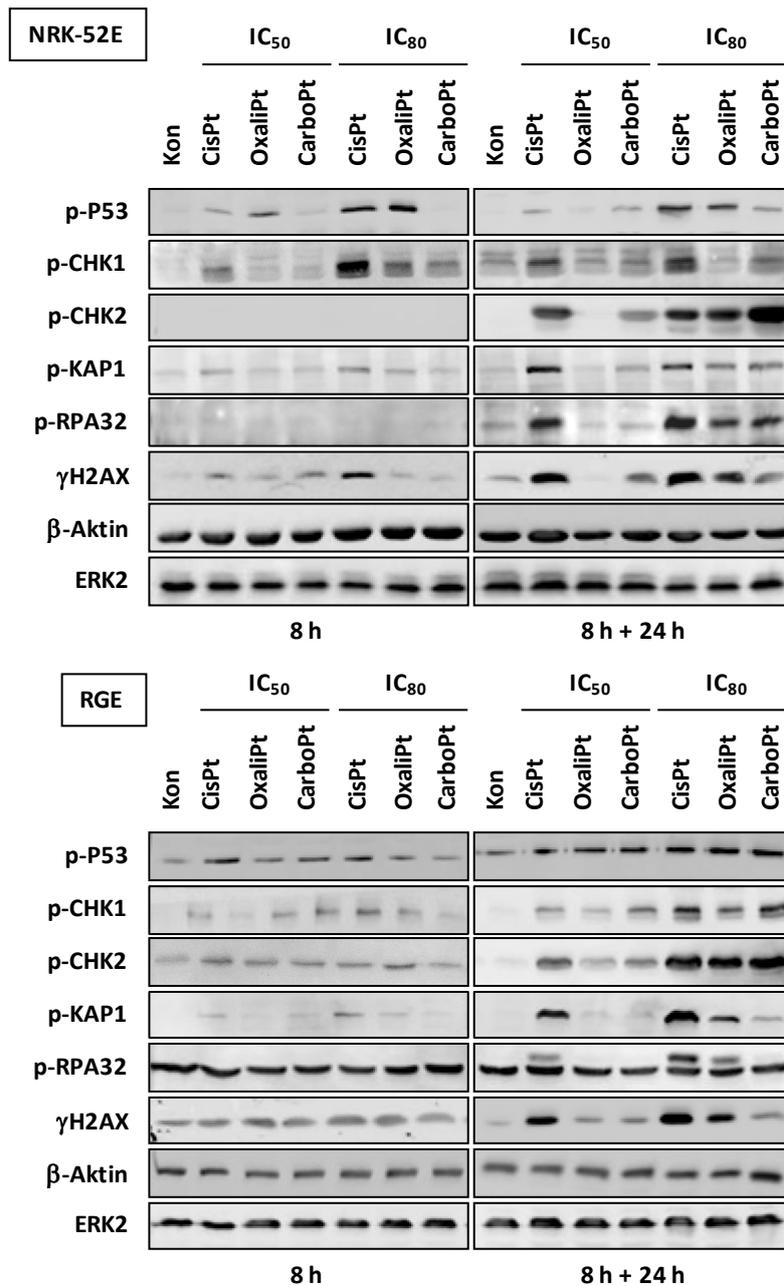


Abbildung 3.13: Aktivierung der DNA-Schadensantworten in Nierenzellen nach 8 h Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 8 h mit den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Teilweise folgte eine Postinkubation von 24 h in Abwesenheit der Platinverbindungen (8 h + 24 h). Anschließend wurde der Aktivierungsstatus von Mechanismen der DNA-Schadensantwort mittels phosphospezifischer Antikörper in Western Blot-Analysen untersucht. Die Expression des Zytoskelettproteins β-Aktin sowie der extrazellulär regulierten Kinase (ERK2) dienen als Ladekontrolle. Kon: unbehandelte Kontrolle; p-: phospho-; CHK: Checkpointkinase; γH2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert; KAP1: *KRAB-associated protein 1*; P53: Tumorsuppressorprotein; RPA32: Replikationsprotein A2, 32 kDa Untereinheit.

Die Western Blot-Analysen nach längeren Expositionszeiten, 24 h, 48 h bzw. 72 h Zytostatikabehandlung, bestätigen die bereits nach 8 h Behandlung erkennbaren substantiellen Unterschiede in der Aktivierung der DNA-Schadensantwort zwischen den verwendeten Platinverbindungen und den beiden Modellzelllinien (Abbildung 3.14).

Auffällig ist, dass Oxaliplatin bei NRK-52E-Zellen weder die Checkpointkinasen noch KAP1 oder RPA32 in annähernd ähnlichem Ausmaß aktiviert wie die anderen beiden Platinverbindungen, wohl aber P53 phosphoryliert.

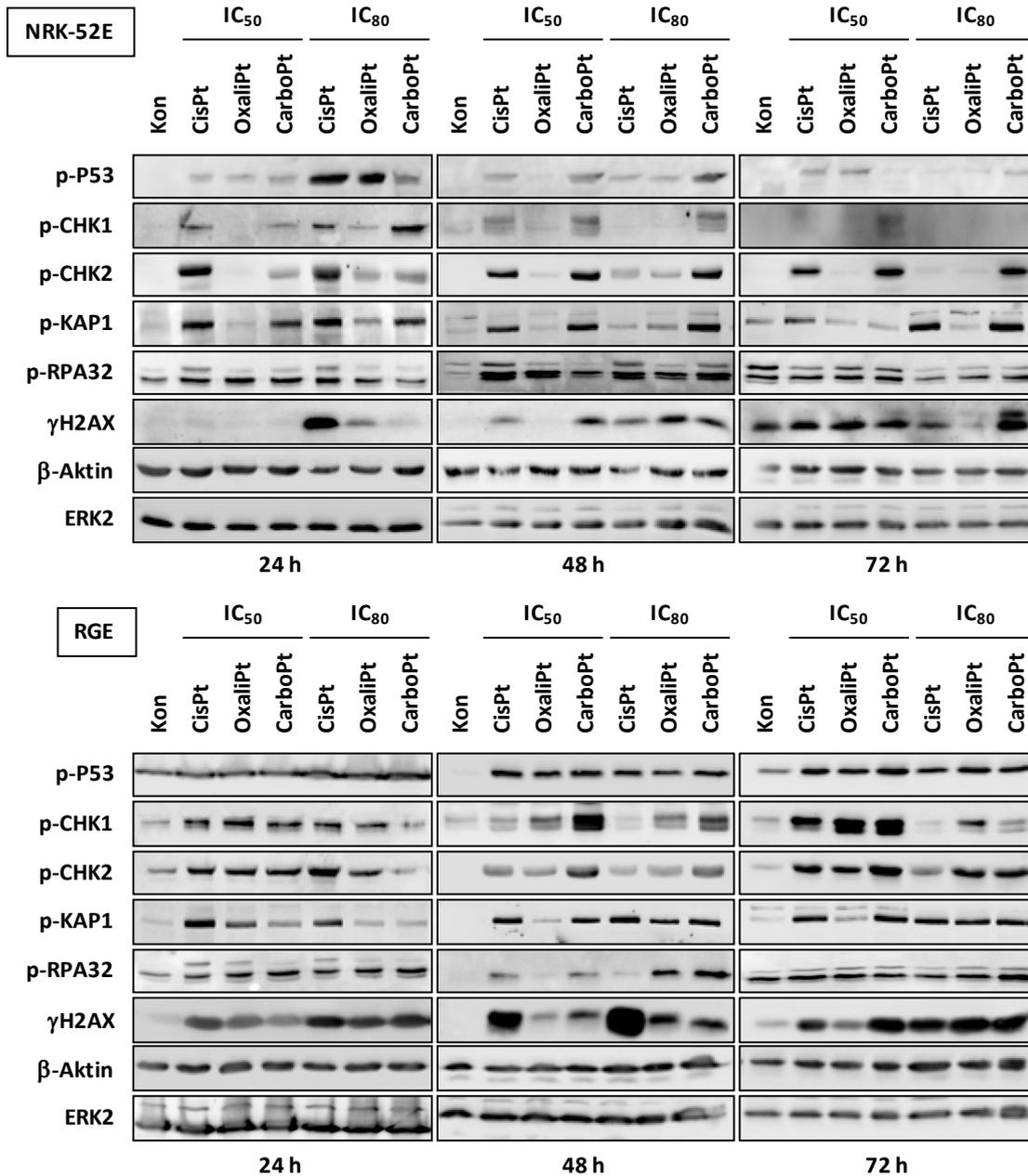


Abbildung 3.14: Aktivierung der DNA-Schadensantworten in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h, 48 h oder 72 h mit den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde der Aktivierungsstatus von Mechanismen der DNA-Schadensantwort mittels phosphospezifischer Antikörper in Western Blot-Analysen untersucht. Die Expression des Zytoskelettproteins β-Aktin sowie der extrazellulär regulierten Kinase (ERK2) dienen als Ladekontrolle. Kon: unbehandelte Kontrolle; p-: phospho-; CHK: Checkpointkinase; γH2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert; KAP1: *KRAB-associated protein 1*; P53: Tumorsuppressorprotein; RPA32: Replikationsprotein A2, 32 kDa Untereinheit.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der Western Blot-Analysen, dass die Aktivierung der DNA-Schadensantwort außerordentlich agens- sowie zelltypspezifisch ist. Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über diese komplexe DNA-Schadensantwort.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der durch die Platinverbindungen induzierten DNA-Schadensantwort in Nierenzellen.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 8 h, 24 h, 48 h oder 72 h mit den jeweiligen IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Teilweise erfolgte eine Postinkubation in Abwesenheit der Platinverbindungen (8 h + 24 h). Anschließend wurde der Aktivierungsstatus von Mechanismen der DNA-Schadensantwort mittels phosphospezifischer Antikörper in Western Blot-Analysen untersucht. Dargestellt ist das unterschiedliche Ausmaß der Aktivierung von Proteinen, die in die DNA-Schadensantwort der NRK-52E- und RGE-Zellen involviert sind im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (siehe Abbildung 3.13 und 3.14). -: kein Effekt; 0: schwacher Effekt; +: moderater Effekt; ++: starker Effekt; +++: sehr starker Effekt; p-: phospho-; CHK: Checkpointkinase; γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert; KAP1: *KRAB-associated protein 1*; P53: Tumorsuppressorprotein; RPA32: Replikationsprotein A2, 32 kDa Untereinheit.

		NRK-52E					RGE				
		8 h	8 h + 24 h	24 h	48 h	72 h	8 h	8 h + 24 h	24 h	48 h	72 h
p-P53	CisPt	++	++	+++	-	-	0	+	-	+	+
	OxaliPt	++	++	+++	-	-	0	+	-	+	+
	CarboPt	-	+	+	+	0	-	+	-	+	+
p-CHK1	CisPt	++	+	+	-	-	+	++	+	-	-
	OxaliPt	+	-	0	-	-	0	++	+	+	+
	CarboPt	0	0	++	+	-	-	++	-	++	0
p-CHK2	CisPt	-	++	++	0	-	0	++	++	0	0
	OxaliPt	-	++	+	0	-	0	++	+	0	++
	CarboPt	-	+++	+	++	++	-	++	-	+	++
p-RPA32	CisPt	-	++	+	-	-	-	+	+	+	-
	OxaliPt	-	+	-	-	-	-	0	0	0	-
	CarboPt	-	+	-	+	0	-	-	0	0	0
p-KAP1	CisPt	0	+	++	-	++	0	++	++	++	+
	OxaliPt	-	+	+	0	-	0	+	0	++	++
	CarboPt	-	+	++	++	+++	-	0	0	++	++
γ H2AX	CisPt	+	+++	++	+	-	-	++	++	+	+++
	OxaliPt	0	++	0	++	-	-	+	++	+	++
	CarboPt	0	0	-	++	++	-	0	++	+	+++

3.1.5 INDUKTION UND REPARATUR VON PLATIN-DNA-ADDUKTEN

Der im vorherigen Abschnitt gezeigte Einfluss der Platinverbindungen auf die DNA-Schadensantwort lässt sich auf die Ausbildung von Pt-DNA-Addukten zurückführen. Um auszuschließen, dass die zuvor gezeigte außerordentliche Agens- sowie Zelltypspezifität auf Unterschieden im Transport und daraus resultierend auf einem unterschiedlichen Ausmaß an initialen Pt-DNA-Addukten beruht, wurde die Gesamtzellplatinierung nach 4 h Behandlung mit den jeweiligen IC₈₀ von Cis-, Oxali- oder Carboplatin (entsprechend der

Viabilitätsuntersuchungen in Abbildung 3.1A und Tabelle 3.1) mittels induktiv gekoppelter Massenspektrometrie (*inductively coupled plasma mass spectrometry*; ICP-MS) gemessen (in Kooperation mit Dr. Maja Osmak, *Laboratory for Genotoxic Agents, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute* in Zagreb, Kroatien). Dabei zeigte sich, dass bei beiden Zelllinien am meisten Platin in den Zellen nach Behandlung mit Carboplatin zu finden ist (Abbildung 3.15). Die geringste Gesamtzellplatinierung wird nach Cisplatinbehandlung erreicht. Für Carboplatin zeigen RGE-Zellen im Vergleich zu NRK-52E-Zellen eine etwas erhöhte Gesamtzellplatinierung.

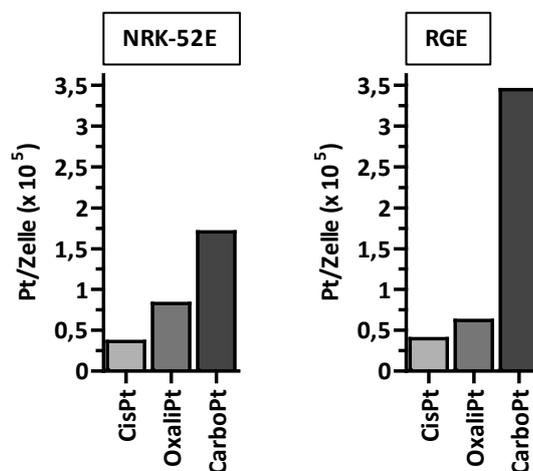
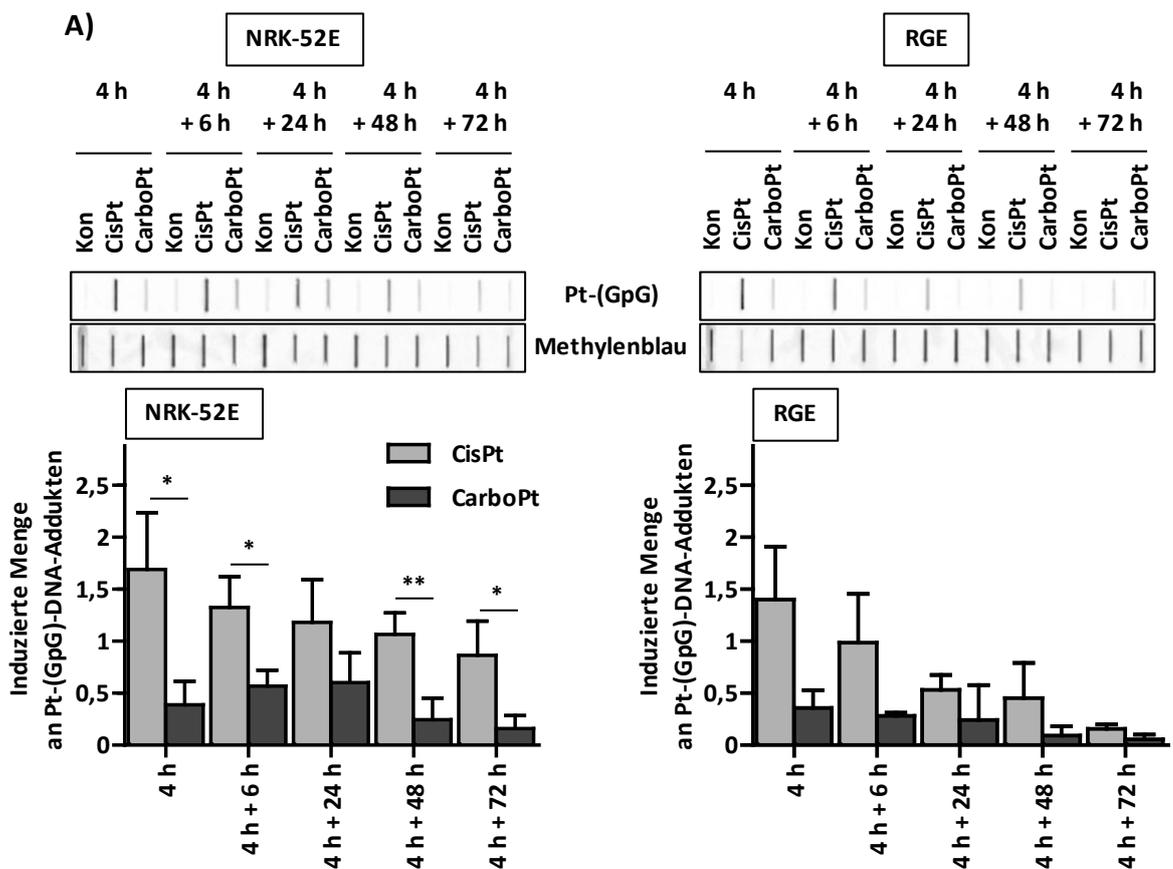


Abbildung 3.15: Analyse der Gesamtzellplatinierung von Nierenzellen nach Behandlung mit äquitoxischen Dosen von Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 4 h mit den jeweiligen IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Gesamtzellplatinierung mittels induktiv gekoppelter Massenspektrometrie (*inductively coupled plasma mass spectrometry*; ICP-MS) gemessen (in Kooperation mit Dr. Maja Osmak, *Laboratory for Genotoxic Agents, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute* in Zagreb, Kroatien). Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Experiments (n = 1, N = 3). Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.11 des Anhangs zu entnehmen.

Da Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen nach bisherigem Kenntnisstand die für die Zytotoxizität der Platinverbindungen relevantesten DNA-Addukte sind (Pinto und Lippard, 1985), wurden diese mittels Southwestern Blot-Analysen unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers untersucht. Die durch Oxaliplatin induzierten DNA-Intrastrangverknüpfungen unterscheiden sich strukturell von den durch Cis- oder Carboplatin gebildeten (Raymond *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Unterschiede werden sie durch den verwendeten Antikörper nicht erkannt und konnten somit bei den durchgeführten Southwestern Blot-Analysen nicht detektiert werden. Sowohl NRK-52E- als auch RGE-Zellen wurden für 4 h mit den jeweiligen IC₈₀ von Cis- oder Carboplatin behandelt, gefolgt von

unterschiedlich langer Postinkubation (6 h, 24 h, 48 h oder 72 h) in Abwesenheit der Platinverbindungen. Aus den anschließenden Southwestern Blot-Analysen ergab sich, dass eine Behandlung mit Cisplatin bei beiden Zelllinien zu deutlich mehr Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen führt als eine Carboplatinbehandlung (Abbildung 3.16A). Außerdem werden nach der Zytostatikaaufnahme vor allem in NRK-52E-Zellen Cisplatin-(GpG)-Intrastrangaddukte schneller gebildet als Carboplatin-(GpG)-Intrastrangaddukte. Weiterhin wurde die Reparatur der resultierenden Cisplatin-induzierten Intrastrangaddukte anhand der Abnahme der Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen mit zunehmender Postinkubation untersucht. Bei beiden Zelllinien nimmt die Menge an Cisplatin-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen mit fortschreitender Postinkubation ab, was für eine Reparatur dieser Addukte spricht (Abbildung 3.16B). Die Menge an verbliebenen Verknüpfungen ist nach 72 h Postinkubation bei RGE-Zellen geringer als bei NRK-52E-Zellen. Folglich scheinen RGE-Zellen die durch äquitoxische Cisplatinkonzentrationen induzierten Verknüpfungen effizienter zu reparieren als NRK-52E-Zellen.



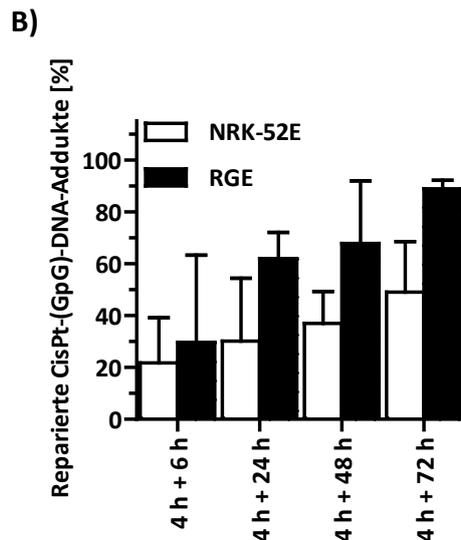


Abbildung 3.16: Bildung und Reparatur von Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten in Nierenzellen nach Behandlung mit Cis- oder Carboplatin.

A) NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 4 h mit den jeweiligen IC_{80} von Cisplatin (CisPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Teilweise folgte eine Postinkubation von bis zu 72 h in Abwesenheit der Platinverbindungen (4 h + 72 h). Anschließend wurde die Menge an Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten mittels Southwestern Blot-Analysen ermittelt. Die Autoradiographien wurden densitometrisch ausgewertet und die Signalintensität auf die der jeweiligen Methylenblaufärbung bezogen. Anschließend wurde die Signalintensität der DNA un behandelter Zellen (Kon) subtrahiert. Gezeigt sind exemplarische Southwestern Blots oben sowie Mittelwerte + Standardabweichungen der induzierten Menge an Pt-(GpG)-DNA-Addukten unten (NRK-52E: n = 3, N = 2-3; RGE: n = 2-3, N = 3). B) NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 4 h mit den IC_{80} von Cisplatin (CisPt) behandelt. Teilweise folgte eine Postinkubation von bis zu 72 h in CisPt-Abwesenheit (4 h + 72 h). Anschließend wurde die Menge an Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten mittels Southwestern Blot-Analysen ermittelt. Die Autoradiographien wurden densitometrisch ausgewertet und die Signalintensität auf die der jeweiligen Methylenblaufärbung bezogen. Anschließend wurde die Signalintensität der DNA un behandelter Zellen subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichungen als Prozent der reparierten CisPt-(GpG)-DNA-Addukte ausgehend von dem Adduktmaximum nach 4 h (n = 2-3, N = 3). Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind den Tabellen 8.12 und 8.13 des Anhangs zu entnehmen.

3.1.6 EXPRESSION VON CISPLATINSUSZEPTIBILITÄTSFAKTOREN

Neben der Nephrotoxizität als dosislimitierender Nebenwirkung einer chemotherapeutischen Behandlung mit Cisplatin stellt auch die Entwicklung von Cisplatinresistenz eines der Hauptprobleme bei der Behandlung vieler Krebserkrankungen dar (Galluzzi *et al.*, 2012). Eine mögliche Resistenzentwicklung gegenüber Platinverbindungen kann zum einen darin begründet sein, dass die Zytostatika nur unzureichend an die DNA gelangen. Dafür könnten unter anderem Transportprozesse verantwortlich sein. Zum anderen könnte eine verminderte Apoptoseinduktion, z. B. durch verstärkte DNA-Reparaturmechanismen, Resistenz verursachen (Kelland, 2007). Unter der Annahme, dass eben diese Faktoren auch die Sensitivität von Normalgewebszellen für die Zytotoxizität von Platinverbindungen beeinflussen, wurde die mRNA-Expression einiger ausgewählter

Faktoren, die mit Cisplatinresistenz von Tumorzellen in Verbindung gebracht werden (Galluzzi *et al.*, 2012), untersucht. Diese lassen sich in Apoptose- (*Bax* (*BCL2-associated protein*), *Bcl2* (*B-cell lymphoma 2*) und *Xiap* (*X-linked inhibitor of apoptosis*)), DNA-Reparatur- (*Csb* (*cockayne syndrome type B protein*), *Ercc1* (*excision-repair cross-complementing 1*), *Xpa* (*Xeroderma pigmentosum, complementation group A protein*) und *Xpg* (*Xeroderma pigmentosum, complementation group G protein*)) und Transportfaktoren (*Ctr1* (Kupfertransporter 1) und *Mrp2* (*multidrug resistance-associated protein 2*)) unterteilen. Um mögliche grundlegende Unterschiede der NRK-52E- und RGE-Zellen in der Expression dieser Faktoren aufzuzeigen, wurde die mRNA-Expression zunächst basal mittels Real-time PCR untersucht. Diese Analyse ergab, dass sich RGE- von NRK-52E-Zellen durch eine erhöhte mRNA-Expression des proapoptotischen *Bax* sowie der Nukleotid-exzisionsreparaturfaktoren *Xpa* und *Xpg* unterscheiden (Abbildung 3.17).

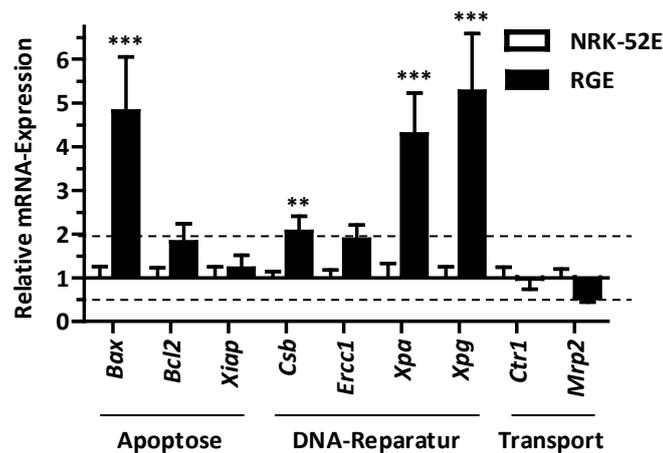


Abbildung 3.17: Basale mRNA-Expressionen ausgewählter Cisplatinresistenzfaktoren in Nierenzellen.

Die basale mRNA-Expression von Faktoren, die mit der Resistenz gegenüber Cisplatin in Tumorzellen assoziiert werden, wurde in NRK-52E- und RGE-Zellen mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Es wurde auf die relative mRNA-Expression der NRK-52E-Zellen normiert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichungen (n = 2, N = 2). Nur Expressionsveränderungen ≥ 2 bzw. $\leq 0,5$ (markiert durch eine unterbrochene Linie) werden als biologisch relevant betrachtet und wurden in die Statistik mit einbezogen. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.14 des Anhangs zu entnehmen. *: signifikante Unterschiede zwischen NRK-52E- und RGE-Zellen. *Bax*: *BCL2-associated protein*; *Bcl2*: *B-cell lymphoma 2*; *Csb*: *cockayne syndrome type B protein*; *Ctr1*: Kupfertransporter 1; *Ercc1*: *excision-repair cross-complementing 1*; *Mrp2*: *multidrug resistance-associated protein 2*; *Xiap*: *X-linked inhibitor of apoptosis*; *Xpa*: *Xeroderma pigmentosum, complementation group A protein*; *Xpg*: *Xeroderma pigmentosum, complementation group G protein*.

Nach 24 h Behandlung mit den jeweiligen IC_{80} von Cis-, Oxali- oder Carboplatin (entsprechend der Viabilitätsuntersuchungen in Abbildung 3.1A und Tabelle 3.1) zeigen sowohl NRK-52E- als auch RGE-Zellen eine erhöhte mRNA-Expression von *Bax* (Abbildung

3.18). Im Gegensatz zu RGE-Zellen, ist bei NRK-52E-Zellen die Expression des Nukleotid-exzisionsreparaturfaktors *Ercc1* nach Cis- bzw. Oxaliplatinbehandlung, nicht jedoch nach Carboplatinbehandlung, hochreguliert. RGE-Zellen reagieren auf eine Cis- bzw. Oxaliplatinbehandlung hingegen mit einer erhöhten mRNA-Expression des Importers *Ctr1*.

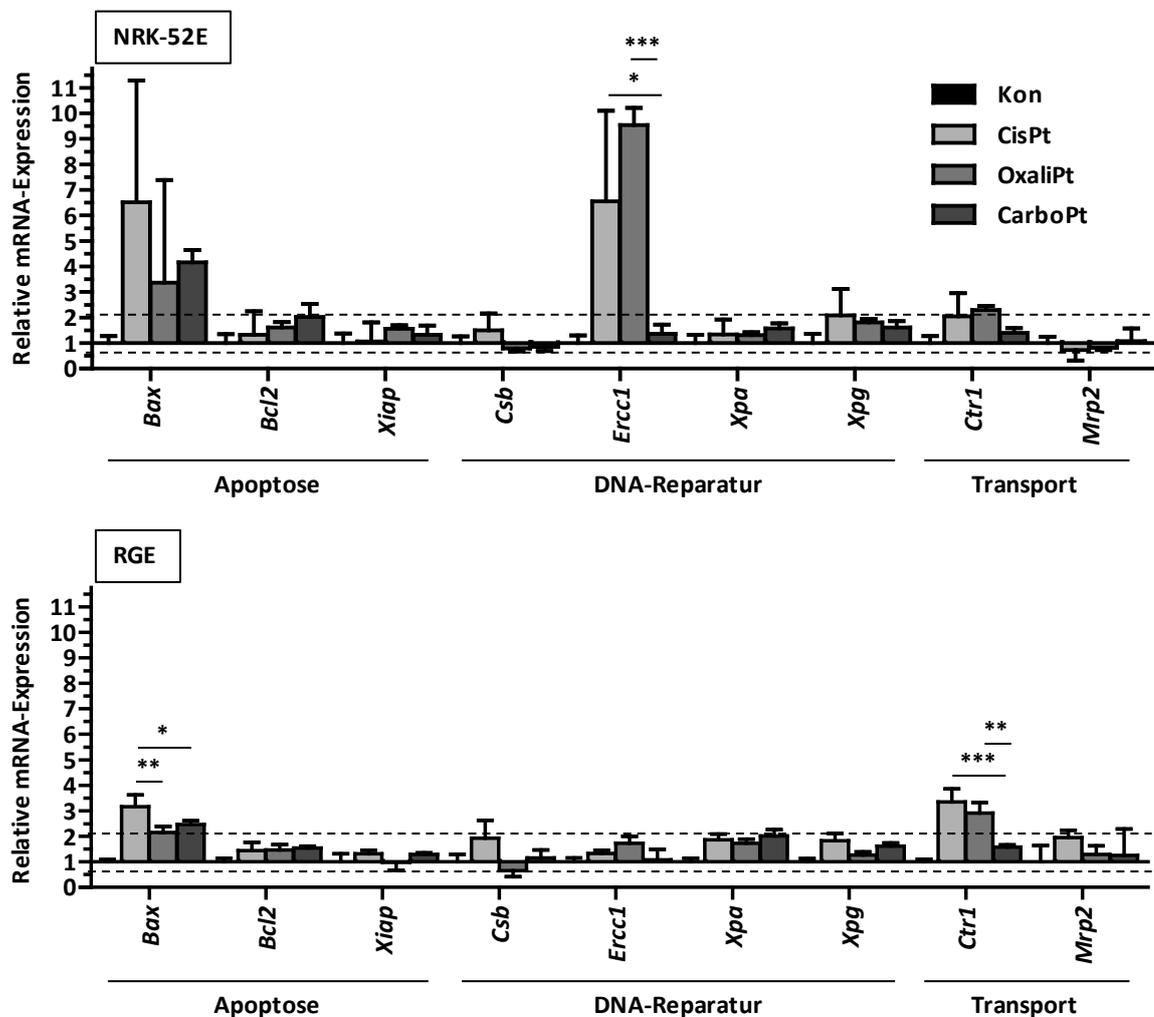


Abbildung 3.18: mRNA-Expression ausgewählter Cisplatin-suszeptibilitätsfaktoren in Nierenzellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h mit den jeweiligen IC_{80} der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Die mRNA-Expression von Faktoren, die mit der Resistenz gegenüber CisPt in Tumorzellen assoziiert werden, wurde mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Die relative mRNA Expression der unbehandelten Zellen (Kon) wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichungen ($n = 2$, $N = 2$). Nur Expressionsveränderungen ≥ 2 bzw. $\leq 0,5$ (markiert durch eine unterbrochene Linie) werden als biologisch relevant betrachtet und wurden in die Statistik mit einbezogen. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.15 des Anhangs zu entnehmen. *Bax*: BCL2-associated protein; *Bcl2*: B-cell lymphoma 2; *Csb*: cockayne syndrome type B protein; *Ctr1*: Kupfertransporter 1; *Ercc1*: excision-repair cross-complementing 1; *Mrp2*: multidrug resistance-associated protein 2; *Xiap*: X-linked inhibitor of apoptosis; *Xpa*: Xeroderma pigmentosum, complementation group A protein; *Xpg*: Xeroderma pigmentosum, complementation group G protein.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich proximale Tubulusepithelzellen und glomeruläre Endothelzellen hinsichtlich der Expression von Suszeptibilitätsfaktoren, die mit Cisplatinresistenz in Verbindung gebracht werden, unterscheiden.

3.2 PROTEKTION DER NIERENZELLEN VOR CISPLATIN-INDUZIERTER ZYTOTOXIZITÄT

3.2.1 MODULATION DER TOXIZITÄT DURCH LOVASTATIN

3.2.1.1 INHIBITION DER DNA-SCHADENSANTWORT DURCH LOVASTATIN

Aus früheren Arbeiten geht hervor, dass eine mittels Lovastatin vermittelte Inhibition der Isoprenylierung kleiner Ras homologer (RHO)-GTPasen zu einer verringerten Zytotoxizität des Anthrazyklins Doxorubicin bei Normalgewebszellen wie humanen Endothelzellen (HUVECs) (Damrot *et al.*, 2006) und Kardiomyblasten aus der Ratte (H9c2-Zellen) führt (Hülsenbeck *et al.*, 2011). Anlehnend daran wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer Lovastatinvorbehandlung auf die Zytotoxizität des Zytostatikums Cisplatin in proximalen Nierentubulusepithelzellen (NRK-52E-Zellen) untersucht. Dazu wurden Viabilitätsuntersuchungen mittels des Alamar Blue-Assays nach 24 h Vorbehandlung mit einer subtoxischen Dosis von Lovastatin (Abbildung 8.3 des Anhangs), anschließender Pulsbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin für 4 h und nachfolgender Postinkubation von 72 h in Cisplatinabwesenheit durchgeführt. Diese Analyse ergab, dass Lovastatin NRK-52E-Zellen zwar bei niedrige Dosen von Cisplatin für dieses sensitiviert, vor hohen Cisplatin Dosen aber signifikant schützt (Abbildung 3.19).

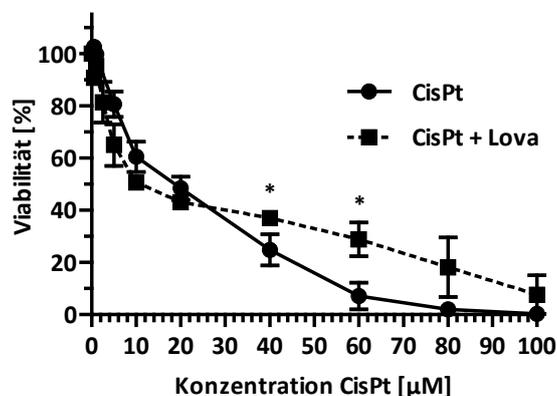


Abbildung 3.19: Viabilitätsuntersuchung von NRK-52E-Zellen nach Vorbehandlung mit Lovastatin und

anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 µM Lovastatin (Lova) vorbehandelt und anschließend für 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 72 h in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mittels des Alamar Blue-Assays untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten bzw. vorbehandelten Kontrolle (n = 3, N = 4). *: signifikante Unterschiede zwischen mit Lovastatin vorbehandelten und nicht vorbehandelten NRK-52E-Zellen. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.16 des Anhangs zu entnehmen.

Diese Protektion spiegelt sich in den nach Lovastatinvorbehandlung erhöhten IC₈₀ wieder (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Einfluss der Lovastatinvorbehandlung auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität von NRK-52E-Zellen.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 µM Lovastatin (Lova) vorbehandelt und anschließend für 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 72 h in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mittels des Alamar Blue-Assays untersucht. Aufgelistet sind die aus den Mittelwerten der Alamar Blue-Assays (Abbildung 3.19) resultierenden IC₅₀ und IC₈₀.

	IC ₅₀	IC ₈₀
CisPt	18 µM	45 µM
CisPt + Lova	10 µM	78 µM

Im Folgenden wurde der dieser Protektion zu Grunde liegende molekulare Mechanismus untersucht. Dazu wurde der Einfluss von Lovastatin auf den im ersten Teil dieser Arbeit ausführlich beschriebenen Cisplatin-induzierten Aktivierungsstatus der DNA-Schadensantwort nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender 4 h Behandlung mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (entsprechend Abbildung 3.19 und Tabelle 3.3) mittels Western Blot-Analysen untersucht. Die Western Blot-Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern zeigen, dass die Cisplatin-induzierte DNA-Schadensantwort nach Lovastatinvorbehandlung wesentlich und auf nahezu allen untersuchten Ebenen beeinflusst wird (Abbildung 3.20). Unmittelbar nach der Cisplatinbehandlung sowie 4 h danach zeigt sich eine dosisabhängige Stressantwort der NRK-52E-Zellen. Nach 24 h Postinkubation in Abwesenheit von Cisplatin ist die maximale DNA-Schadensantwort bereits nach Behandlung mit der IC₅₀ erreicht. Die Proteinmengen von p-ATM sowie p-ATR liegen erst nach 4 h Postinkubation über der Detektionsgrenze. Die Lovastatinvorbehandlung verhindert die Cisplatin-induzierte Phosphorylierung von ATM, ATR, P53, CHK1 und 2 sowie H2AX und KAP1 wesentlich unmittelbar sowie 4 h nach Zytostatikabehandlung. Auch nach 24 h Postinkubation sind wesentliche inhibitorische Effekte der Lovastatinvorbehandlung bezüglich der Aktivierung der DNA-Schadensantwort auf Ebene von p-

ATM, p-P53 sowie γ H2AX zu erkennen. Lediglich die Aktivierung von RPA32, dessen Phosphorylierung erst nach 24 h Postinkubation detektierbar ist, bleibt von der Lovastatinvorbehandlung unbeeinflusst. Die Phosphorylierung von CHK1 ist nach Lovastatinvorbehandlung im Vergleich zur reinen Cisplatinbehandlung nach 24 h Postinkubation erhöht. Zusätzlich zu diesem Einfluss auf die DNA-Schadensantwort zeigt die Lovastatinvorbehandlung auch Effekte auf die Aktivierung von MAPK-Signalwegen. So wird die Phosphorylierung von P38 sowie von SAPK/JNK inhibiert.

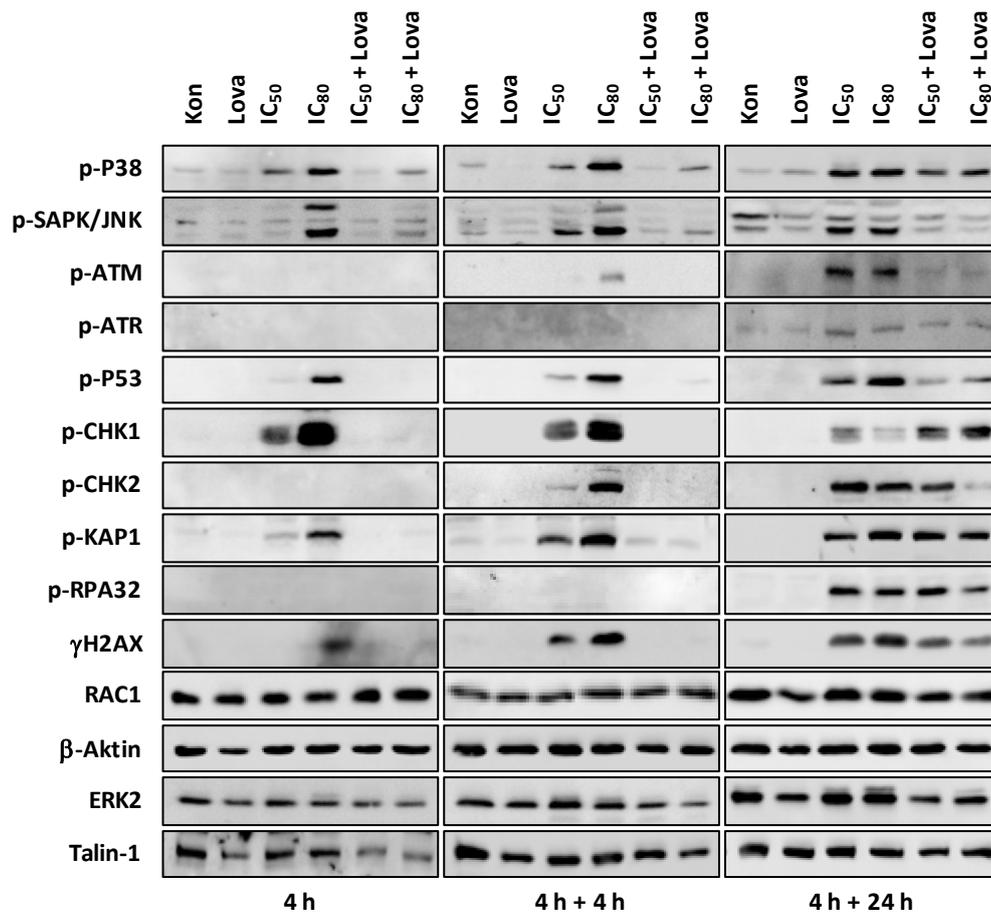


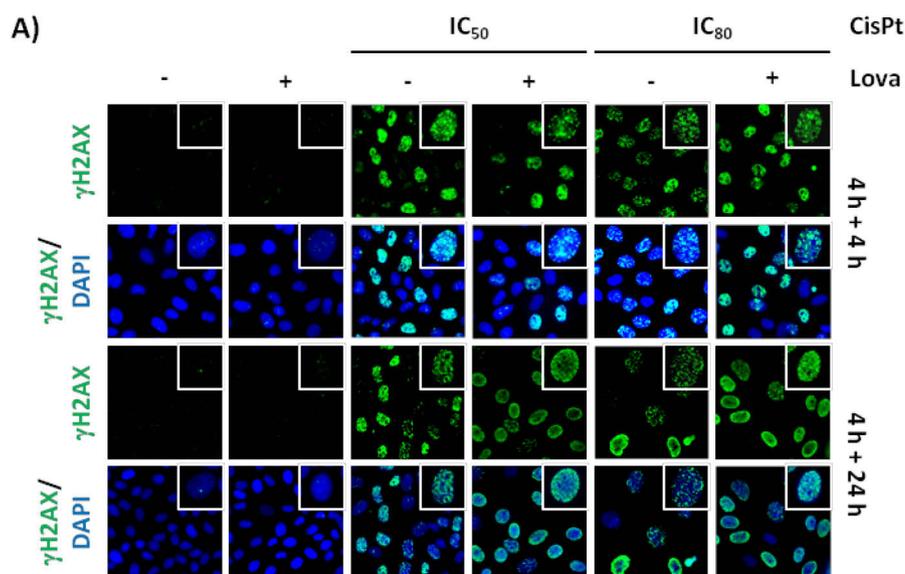
Abbildung 3.20: Lovastatin-vermittelte Protektion vor Cisplatin-induzierten Stressantworten in NRK-52E-Zellen anhand von Western Blot-Analysen.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 μ M Lovastatin (Lova) vorbehandelt und anschließend für 4 h mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) behandelt. Direkt anschließend (4 h) oder nach einer Postinkubation von 4 h (4 h + 4 h) oder 24 h (4 h + 24 h) in CisPt-Abwesenheit wurde der Aktivierungsstatus von Mechanismen der DNA-Schadensantwort sowie von MAPK-Signalwegen mittels phosphospezifischer Antikörper in Western Blot-Analysen untersucht. Die Expression der Zytoskelettproteine β -Aktin und Talin-1 sowie der extrazellulär regulierten Kinase (ERK2) dienen als Ladekontrolle. Kon: unbehandelte Kontrolle; p-: phospho-; ATM: *ataxia telangiectasia mutated*; ATR: *ataxia telangiectasia and RAD3 related*; CHK: Checkpointkinase; γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert; KAP1: *KRAB-associated protein 1*; RAC1: *RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1*; RPA32: Replikationsprotein A2, 32 kDa Untereinheit; P53: Tumorsuppressorprotein; SAPK/JNK: stressaktivierte Phosphokinase/c-JUN N-terminale Kinase.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Lovastatin Cisplatin-induzierte Stressantworten und insbesondere die DNA-Schadensantwort von NRK-52E-Zellen wesentlich inhibiert.

3.2.1.2 EINFLUSS VON LOVASTATIN AUF DIE INDUKTION VON DNA-SCHÄDEN

Um zu überprüfen, ob diese drastische Inhibition der DNA-Schadensantwort auf einer Reduktion der initialen DNA-Schäden beruht, wurde die Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen (*single-strand breaks*; SSBs) sowie an DSBs nach Lovastatinvorbehandlung und 4 h Pulsbehandlung mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (entsprechend der Viabilitätsuntersuchung in Abbildung 3.19 und Tabelle 3.3) sowie anschließender Postinkubation von 4 h oder 24 h in Cisplatinabwesenheit quantifiziert. Die Analyse der nukleären γ H2AX-Foci als Marker für DSBs zeigt eine dosisabhängige Zunahme an DSBs 4 h nach Cisplatinbehandlung (Abbildung 3.21A). Nach 24 h Postinkubation ist das Maximum an DSBs bereits mit der IC₅₀ erreicht, was mit der zuvor untersuchten DNA-Schadensantwort (Abbildung 3.20) übereinstimmt. Die Anzahl der nukleären γ H2AX-Foci wird durch Lovastatin zu keinem der untersuchten Zeitpunkte reduziert (Abbildung 3.21A). Dies bestätigen auch die Ergebnisse der analog durchgeführten neutralen und alkalischen Comet-Analysen (Abb. 3.21B), aus denen hervorgeht, dass Lovastatin 4 h bzw. 24 h nach Cisplatinbehandlung weder die Menge an SSBs noch an DSBs reduziert. Vielmehr wird die Menge an Strangbrüchen noch geringfügig erhöht.



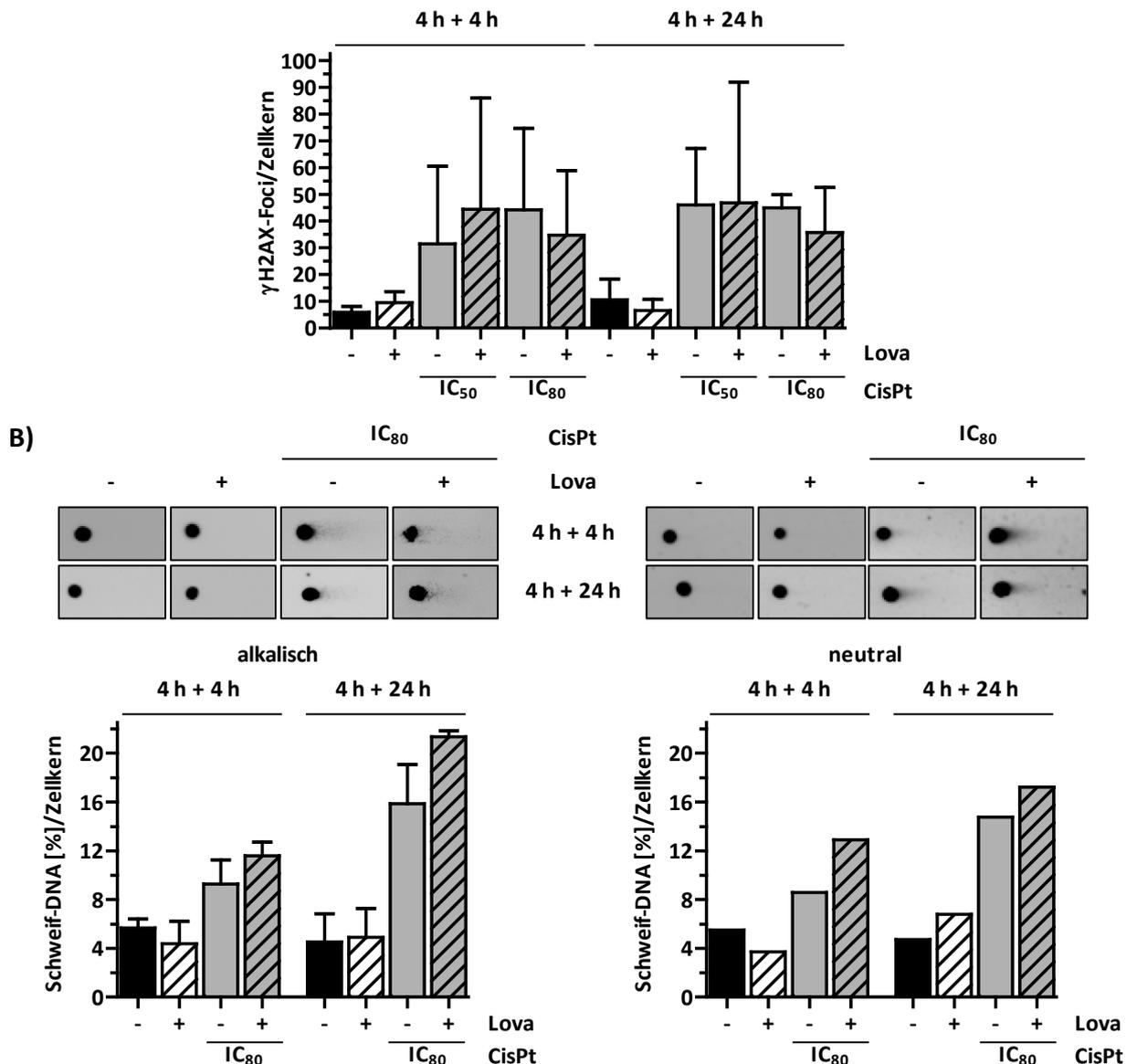


Abbildung 3.21: Einfluss der Lovastatinvorbehandlung auf die Cisplatin-induzierte Bildung von DNA-Strangbrüchen in NRK-52E-Zellen.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 μ M Lovastatin (Lova) vorbehandelt und anschließend für 4 h mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 4 h (4 h + 4 h) oder 24 h (4 h + 24 h) in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Menge an DNA-Strangbrüchen ermittelt, indem A) die Anzahl von nukleären γ H2AX-Foci mittels immunzytochemischer Färbung und B) der Anteil an Schweif-DNA mittels des alkalischen sowie neutralen Comet-Assays quantifiziert wurde. Der jeweils obere Teil der Abbildungen zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen bzw. repräsentative Aufnahmen der Zellkerne im Comet-Assay, der untere Mittelwerte + Standardabweichungen der Anzahl an γ H2AX-Foci bzw. des Anteils der Schweif-DNA in Prozent pro Zellkern (A) n = 3, N = 2; B) alkalisch: n = 2, N = 3; neutral: n = 1, N = 3). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellkerne ausgezählt. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol. Die Unterschiede zwischen CisPt und CisPt + Lova sind nicht signifikant. Die der Abbildung zugrunde liegenden Mittelwerte sind den Tabelle 8.17 und 8.18 des Anhangs zu entnehmen.

Anschließend wurde die Bildung der, als Hauptursache für die Toxizität von Cisplatin postulierten, Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen nach Vorbehandlung mit Lovastatin, 4 h Pulsbehandlung mit Cisplatin und anschließender Postinkubation von 4 h (4 h + 4 h) oder

24 h (4 h + 24 h) in Cisplatinabwesenheit mittels Southwestern Blot-Analyse quantifiziert. Diese Analyse ergab, dass die Anzahl Cisplatin-induzierter Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen durch Lovastatinvorbehandlung weder unmittelbar nach der Zytostatika-behandlung noch nach 4 h oder 24 h Postinkubation beeinflusst wird (Abbildung 3.22).

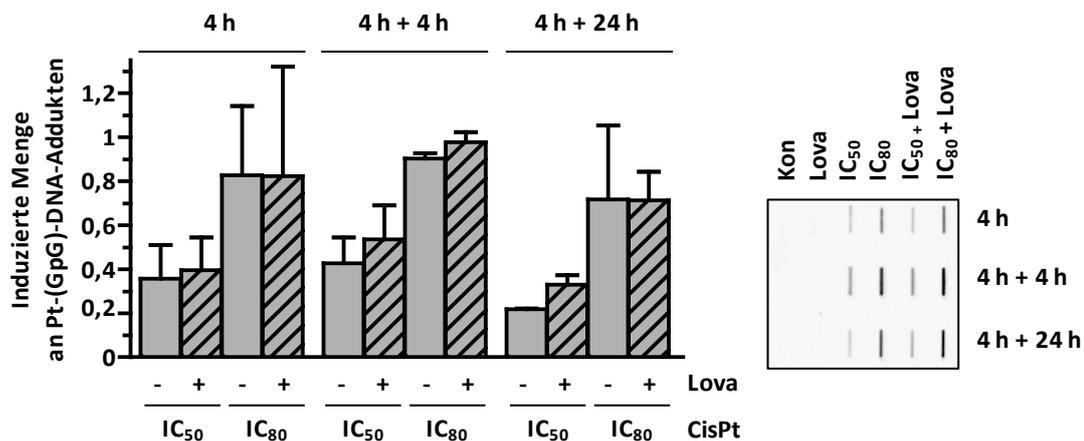


Abbildung 3.22: Einfluss der Lovastatinvorbehandlung auf die Cisplatin-induzierte Bildung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen in NRK-52E-Zellen.

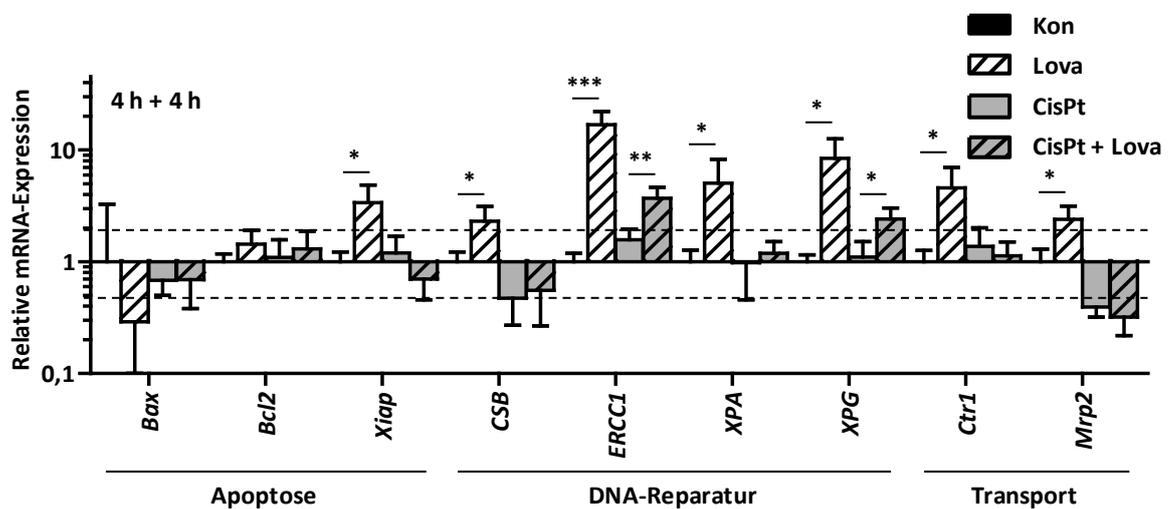
NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 µM Lovastatin (Lova) vorbehandelt und anschließend für 4 h mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) behandelt. Teilweise folgte eine Postinkubation von 4 h (4 h + 4 h) oder 24 h (4 h + 24 h) in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Menge an Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten mittels Southwestern Blot-Analyse ermittelt. Die Autoradiographien wurden densitometrisch ausgewertet und die Signalintensität auf die der jeweiligen Methylenblaufärbung bezogen. Anschließend wurde die Signalintensität der DNA unbehandelter Zellen (Kon) bzw. vorbehandelter Zellen subtrahiert. Gezeigt sind links Mittelwerte + Standardabweichungen der induzierten Menge an Pt-(GpG)-DNA-Addukten sowie rechts ein exemplarischer Southwestern Blot (n = 2, N = 2). Die Unterschiede zwischen CisPt und CisPt + Lova sind nicht signifikant. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.19 des Anhangs zu entnehmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lovastatinvorbehandlung keinen Einfluss auf die Ausbildung Cisplatin-induzierter DNA-Intrastrangverknüpfungen und die daraus resultierenden DNA-Strangbrüchen in NRK-52E-Zellen hat. Folglich beruht die inhibierte DNA-Schadensantwort (Abschnitt 3.2.1.1) vermutlich auf DNA-schadensunabhängigen Mechanismen.

3.2.1.3 EINFLUSS VON LOVASTATIN AUF DIE EXPRESSION VON CISPLATINSUSZEPTIBILITÄTS-FAKTOREN

Um mögliche Veränderungen in der Expression der bereits zuvor erwähnten Cisplatin-suszeptibilitätsfaktoren (Abschnitt 3.1.6) durch die Lovastatinvorbehandlung zu analysieren, wurde die mRNA-Expression nach 24 h Lovastatinvorbehandlung, 4 h Cisplatinexposition mit der IC₈₀ (entsprechend der Viabilitätsuntersuchung in Abbildung

3.19 und Tabelle 3.3) und anschließender 4 h oder 24 h (4 h + 4 h bzw. 4 h + 24 h) Postinkubation in Cisplatinabwesenheit mittels Real-time PCR untersucht. 4 h nach Cisplatininkubation (entspricht 8 h nach Lovastatinvorbehandlung) bewirkt Lovastatin bereits basal eine verringerte mRNA-Expression des proapoptotischen *Bax*, sowie eine erhöhte Expression des Inhibitors der Apoptose *Xiap* (Abbildung 3.23). Zudem erhöht Lovastatin die mRNA-Expression der Reparaturfaktoren *Csb*, *Ercc1*, *Xpa* und *Xpg*. Gleichzeitig wird auch die mRNA-Expression der Cisplatintransporter *Ctr1* und *Mrp2* durch Lovastatinvorbehandlung verstärkt. Cisplatin bewirkt eine verminderte mRNA-Expression von *Csb* sowie des Exporters *Mrp2*. Dies bleibt durch eine Lovastatinvorbehandlung unverändert. Die basalen Effekte von Lovastatin sind transient und nach 24 h Postinkubation nicht mehr zu detektieren. Mit Cisplatin behandelte NRK-52E-Zellen weisen nach 24 h Postinkubation eine erhöhte mRNA-Expression von *Bax* sowie der Reparaturgene *Ercc1* und *Xpg* und des Importers *Ctr1* auf. Die Cisplatin-induzierte mRNA-Expression von *Bax* und *Xpg* wird durch die Lovastatinvorbehandlung zwar geringfügig, jedoch signifikant, erhöht. Gleichzeitig reduziert Lovastatin die Cisplatin-induzierte mRNA-Expression des Exporters *Mrp2* 24 h nach der Zytostatikabehandlung.



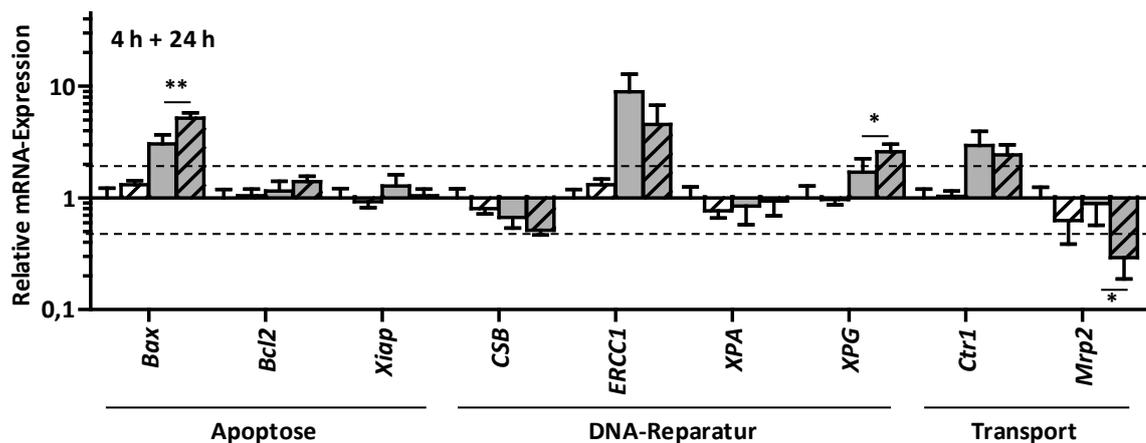


Abbildung 3.23: Einfluss der Lovastatinvorbehandlung auf die Cisplatin-induzierte Expression ausgewählter Cisplatinsuszeptibilitätsfaktoren in NRK-52E-Zellen.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 µM Lovastatin (Lova) vorbehandelt und anschließend für 4 h mit der IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 4 h (4 h + 4 h) oder 24 h (4 h + 24 h) in CisPt-Abwesenheit. Die mRNA-Expression von Faktoren, die mit der Resistenz gegenüber CisPt in Tumorzellen assoziiert werden, wurde mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Die relative mRNA-Expression der unbehandelten Zellen (Kon) wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichungen (n = 2, N = 2). Nur Expressionsveränderungen ≥ 2 bzw. ≤ 0,5 (markiert durch eine unterbrochene Linie) werden als biologisch relevant betrachtet und wurden in die Statistik mit einbezogen. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.20 des Anhangs zu entnehmen. *Bax*: BCL2-associated protein; *Bcl2*: B-cell lymphoma 2; *Csb*: cockayne syndrome type B protein; *Ctr1*: Kupfertransporter 1; *Ercc1*: excision-repair cross-complementing 1; *Mrp2*: multidrug resistance-associated protein 2; *Xiap*: X-linked inhibitor of apoptosis; *Xpa*: Xeroderma pigmentosum, complementation group A protein; *Xpg*: Xeroderma pigmentosum, complementation group G protein.

Zusammenfassend zeigen sowohl Lovastatin als auch Cisplatin zeitabhängige Veränderungen in der mRNA-Expression von Cisplatinsuszeptibilitätsfaktoren.

3.2.1.4 ZYTOPROTEKTION DURCH LOVASTATIN

Um zu untersuchen, ob die Lovastatin-vermittelte Modulation der Cisplatin-induzierten DNA-Schadensantwort (Abschnitt 3.2.1.1) physiologische Konsequenzen für die Zellviabilität hat, wurde diese nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Cisplatinbehandlung weiter analysiert. Eine Zytoprotektion durch Lovastatin bei hohen Cisplatin-dosen zeichnete sich bereits bei der unter Abschnitt 3.2.1.1 beschriebenen Viabilitätsuntersuchung (Abbildung 3.19 und Tabelle 3.3) ab. Auch nach einer kürzeren Postinkubation von 48 h in Cisplatinabwesenheit zeigt sich diese Zytoprotektion (Abbildung 8.4 des Anhangs).

Um die Zeitkinetik der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität detaillierter zu untersuchen, wurde die elektrische Impedanz nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender

Cisplatinbehandlung mit der IC_{80} (entsprechend der Viabilitätsuntersuchung in Abbildung 3.19 und Tabelle 3.3) in Echtzeit mittels des iCELLigence Systems analysiert. Die Auftragung des normalisierten Zellindex gegen die Zeit zeigt, dass mit Lovastatin vorbehandelte Zellen den maximalen Zellindex der Kontrollzellen überschreiten, Lovastatin folglich bereits basal die elektrische Impedanz beeinflusst (Abbildung 3.24A). Der Zellindex der mit Cisplatin behandelten Zellen fällt bereits nach etwa 6 h ab, was für eine rasch eintretende Zytotoxizität spricht. Eine vorausgehende Lovastatinvorbehandlung hat hingegen einen Graphenverlauf nahezu dem der Normalzellen zur Folge. Dieser zytoprotektive Effekt von Lovastatin ist auch mikroskopisch anhand von weniger abgelösten, toten Zellen sichtbar (Abbildung 3.24B).

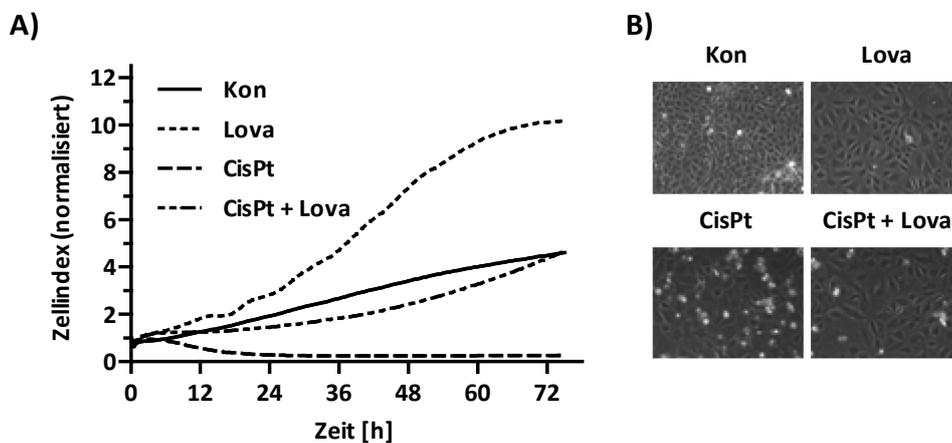


Abbildung 3.24: Protektion von NRK-52E-Zellen vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität durch Lovastatinvorbehandlung.

A) NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit $10 \mu\text{M}$ Lovastatin (Lova) vorbehandelt und anschließend für 4 h mit der IC_{80} von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 72 h in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Viabilität ermittelt, indem Veränderungen in der elektrischen Impedanz in Echtzeit mittels des iCELLigence Systems aufgezeichnet wurden. Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments. B) NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit $10 \mu\text{M}$ Lovastatin (Lova) vorbehandelt und für 4 h mit der IC_{80} von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 24 h in CisPt-Abwesenheit. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der NRK-52E-Zellen. Kon: unbehandelte Kontrolle.

Um zu überprüfen, ob der protektive Effekt auf einer Reduktion des apoptotischen Zelltods beruht oder mit Veränderungen in der Zellzyklusverteilung einhergeht, wurde diese mittels Durchflusszytometrie nach Lovastatinvorbehandlung, 4 h Behandlung mit Cisplatin und anschließender Postinkubation von 24 h (4 h + 24 h) oder 48 h (4 h + 48 h) in Cisplatinabwesenheit bestimmt. Dabei zeigte sich, dass eine Lovastatinvorbehandlung die durch Cisplatin dosisabhängig induzierte SubG1-Fraktion als Indikator für apoptotische Zellen zu beiden Zeitpunkten und für beide Konzentrationen wesentlich verringert

(Abbildung 3.25A und B). NRK-52E-Zellen antworten nach einer Lovastatinvorbehandlung auf die Cisplatingabe vermehrt mit einem G2/M-Block (Abbildung 3.25A und C).

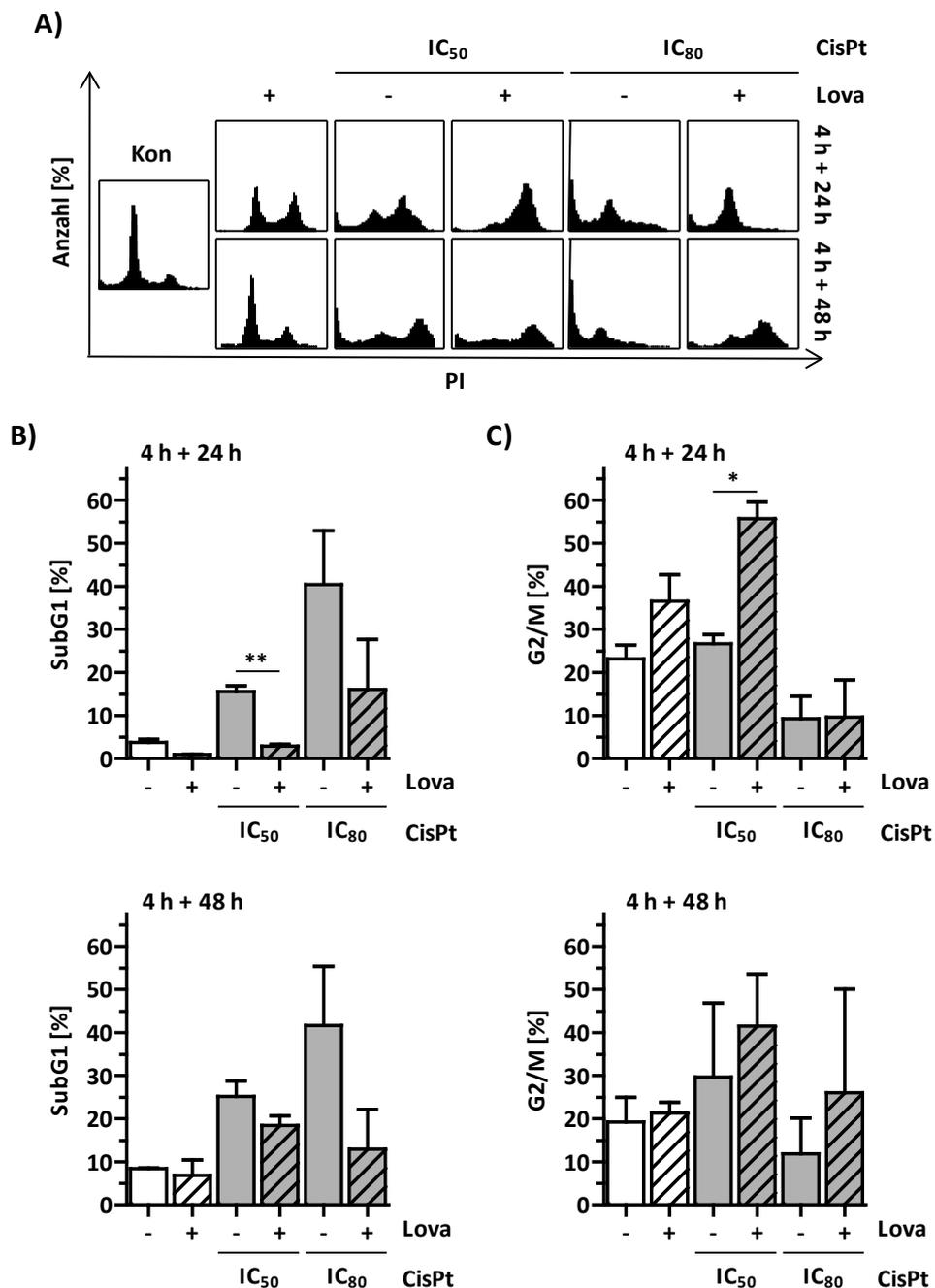


Abbildung 3.25: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Behandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 μ M Lovastatin (Lova) vorbehandelt und für 4 h mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 24 h (4 h + 24 h) oder 48 h (4 h + 48 h) in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers gemessen. Gezeigt sind A) exemplarische Zellzyklusverteilungen sowie B) und C) die quantitative Auswertung der Anteile an Zellen in der SubG1- sowie G2/M-Phase. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichungen in Prozent der gemessenen Gesamtzellzahl (n = 2, N = 2). Kon: unbehandelte Kontrolle. Die der Abbildung zugrunde liegenden Mittelwerte sind Tabelle 8.21 des Anhangs zu entnehmen.

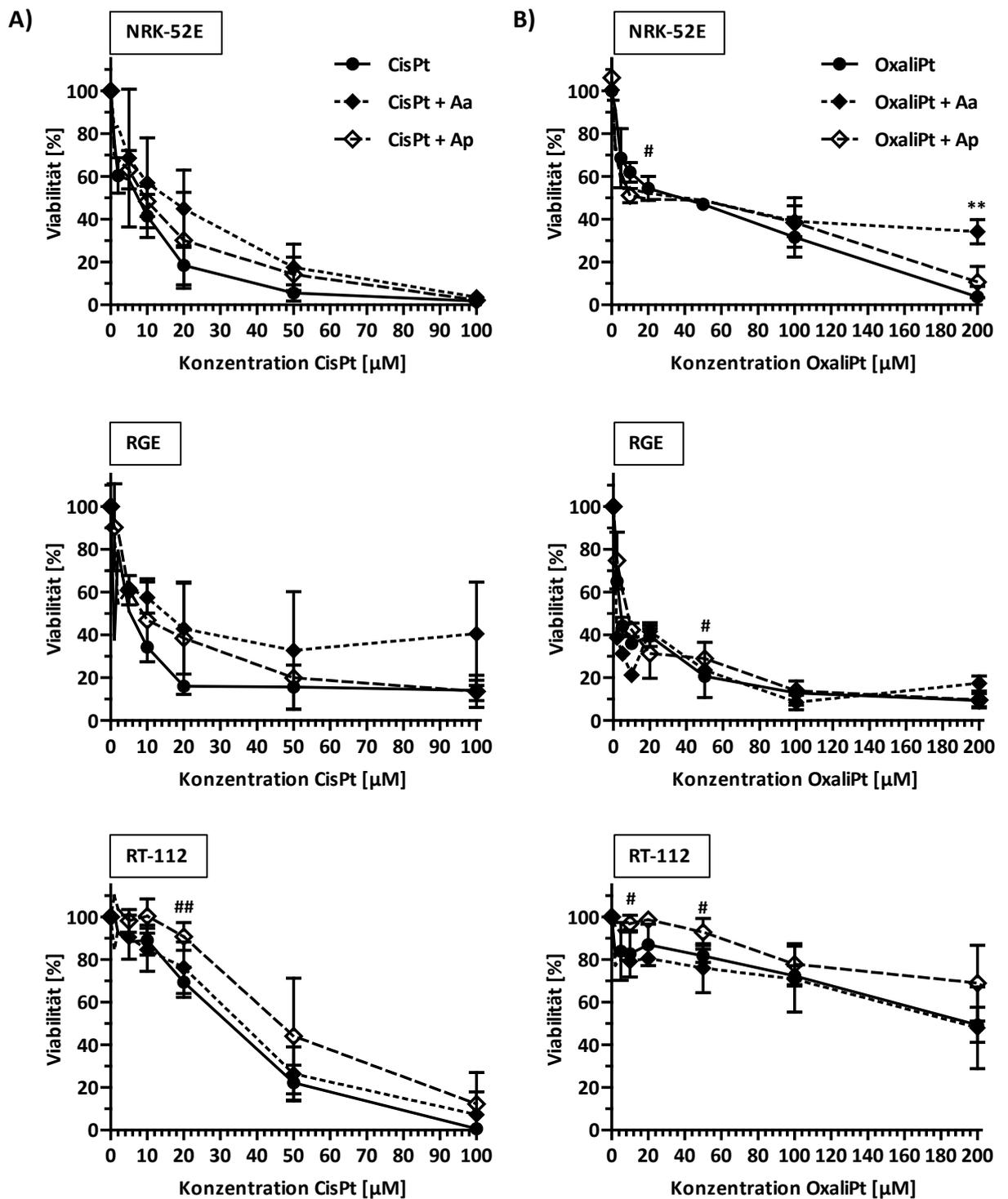
Zusammenfassend lässt sich anhand der Ergebnisse der Viabilitätsuntersuchungen und der Durchflusszytometrie sagen, dass eine Lovastatinvorbehandlung NRK-52E-Zellen vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität schützt ohne den direkten DNA-Schaden zu beeinflussen.

3.2.2 MODULATION DER TOXIZITÄT DURCH DIE SCHWAMMEXTRAKTE AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1

3.2.2.1 ZYTOPROTEKTION DURCH AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1

In einer vorausgehenden Arbeit hat sich gezeigt, dass ein Pool von Substanzen aus marinen Schwämmen zytoprotektiv bei Cisplatinexposition von NRK-52E-Zellen wirkt (Funk *et al.*, 2014). Um den Einfluss von den in diesem Pool vorhandenen Alkaloiden Aaptamin und Aeroplysinin-1 auf die Viabilität von NRK-52E-Zellen nach Behandlung mit Platinverbindungen zu ermitteln, wurden diese für 24 h mit subtoxischen Konzentrationen der Naturstoffe vorbehandelt. Viabilitätsuntersuchungen nach dieser Vorbehandlung und anschließender 48 h Kobehandlung mit dem entsprechenden Naturstoff und unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin ergaben, dass Aaptamin die Viabilität der NRK-52E-Zellen effizienter erhöht als Aeroplysinin-1 (Abbildung 3.26A). Aaptamin erhöht ebenfalls die Resistenz der RGE-Zellen gegenüber Cisplatin. Die resultierenden IC_{50} und IC_{80} sind Tabelle 3.4 (auf S. 101) zu entnehmen. Allerdings konnte weder bei NRK-52E- noch bei RGE-Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber Oxaliplatin festgestellt werden (Abbildung 3.26B). Dies spricht dafür, dass Aaptamin und Aeroplysinin-1 spezifische Effekte auf die Toxizitätsmechanismen von Cisplatin ausüben. Um zu überprüfen, ob dieser durch Aaptamin vermittelte protektive Effekt ausschließlich bei Normalgewebszellen zu finden ist oder ebenfalls Tumorzellen vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität geschützt werden, wurde die Viabilität der humanen Blasenurothelkarzinomzelllinie RT-112 ebenfalls nach Vorbehandlung mit Aaptamin bzw. Aeroplysinin-1 sowie anschließender Cis- oder Oxaliplatinkobehandlung mittels des MTT-Assays untersucht (Abbildung 3.26A und B). Diese Analysen ergaben, dass Aaptamin die Viabilität der RT-112-Zellen weder nach Cis- noch nach Oxaliplatinbehandlung wesentlich beeinflusst. Hier zeigt Aeroplysinin-1 jedoch einen moderaten Resistenzanstieg.

Eine Viabilitätsuntersuchung nach Behandlung von NRK-52E-Zellen mit unterschiedlichen Aaptaminkonzentrationen und der IC₈₀ von Cisplatin (entsprechend der Viabilitätsuntersuchung in Abbildung 3.1A und Tabelle 3.1) ergab, dass eine Konzentration von 1 μM Aaptamin ausreicht, um eine Resistenz gegenüber Cisplatin zu induzieren (Abbildung 3.26C) und sich der protektive Effekt bis zu einer Konzentration von 10 μM Aaptamin steigern lässt.



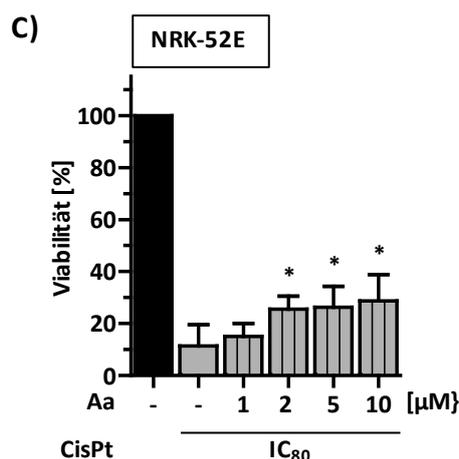


Abbildung 3.26: Viabilitätsuntersuchungen unterschiedlicher Zelltypen nach Vorbehandlung mit Aaptamin oder Aeroplysinin-1 und anschließender Dauerkobehandlung mit Cis- oder Oxaliplatin.

NRK-52E-, RGE- und RT-112-Zellen wurden für 24 h mit Aaptamin (Aa) bzw. Aeroplysinin-1 (Ap) (NRK-52E und RT-112: 2 μM; RGE: 1 μM) vorbehandelt und für 48 h mit Aa bzw. Ap und unterschiedlichen Konzentrationen von A) Cisplatin (CisPt) oder B) Oxaliplatin (OxaliPt) kobehandelt. Anschließend wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen mittels des MTT-Assays untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten bzw. vorbehandelten Kontrolle (NRK-52E: n = 3, N = 4; RGE: n = 2, N = 4; RT-112: n = 4, N = 4). *: Signifikanz CisPt + Aa vs. CisPt; #: Signifikanz CisPt + Ap vs. CisPt. C) NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Aaptamin (Aa) vorbehandelt und für 48 h mit Aa und der IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) kobehandelt. Anschließend wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen mittels des MTT-Assays untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten Kontrolle (n = 2-9, N = 4). *: Signifikanz CisPt + Aa vs. CisPt. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind den Tabellen 8.22 und 8.23 des Anhangs zu entnehmen.

Tabelle 3.4: Einfluss der Schwammextrakte Aaptamin und Aeroplysinin-1 auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität von Nierenzellen.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h mit Aaptamin (Aa) bzw. Aeroplysinin-1 (Ap) (NRK-52E: 2 μM; RGE: 1 μM) vorbehandelt und für 48 h mit Aa bzw. Ap und unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin (CisPt) kobehandelt. Anschließend wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen mittels des MTT-Assays untersucht. Aufgelistet sind die aus den Mittelwerten der MTT-Assays (Abbildung 3.26A) resultierenden IC₅₀ und IC₈₀. -: nicht bestimmt.

MTT	NRK-52E		RGE	
	IC ₅₀	IC ₈₀	IC ₅₀	IC ₈₀
CisPt	7 μM	19 μM	5 μM	17 μM
CisPt + Aa	16 μM	47 μM	15 μM	-
CisPt + Ap	9 μM	38 μM	9 μM	50 μM

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Alkaloid Aaptamin zwar Normalgewebsnierzellen vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität schützt, nicht aber Blasenurothelkarzinomzellen.

Um zu überprüfen, ob dieser protektive Effekt von Aaptamin auf die Nierenzellen mit einer Reduktion der Apoptose einhergeht, wurde die apoptotische Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden NRK-52E-Zellen abermals für 24 h mit

Aaptamin bzw. Aeroplysinin-1 vorbehandelt und anschließend für 48 h mit den Naturstoffen sowie der IC₅₀ oder IC₈₀ von Cisplatin kobehandelt. Bei der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse ergaben sich zwischen der Kobehandlung mit den Naturstoffen und der alleinigen Cisplatinbehandlung keine nennenswerten Unterschiede bezüglich der Induktion der SubG1-Fraktion als apoptotischer Zellpopulation (Abbildung 3.27).

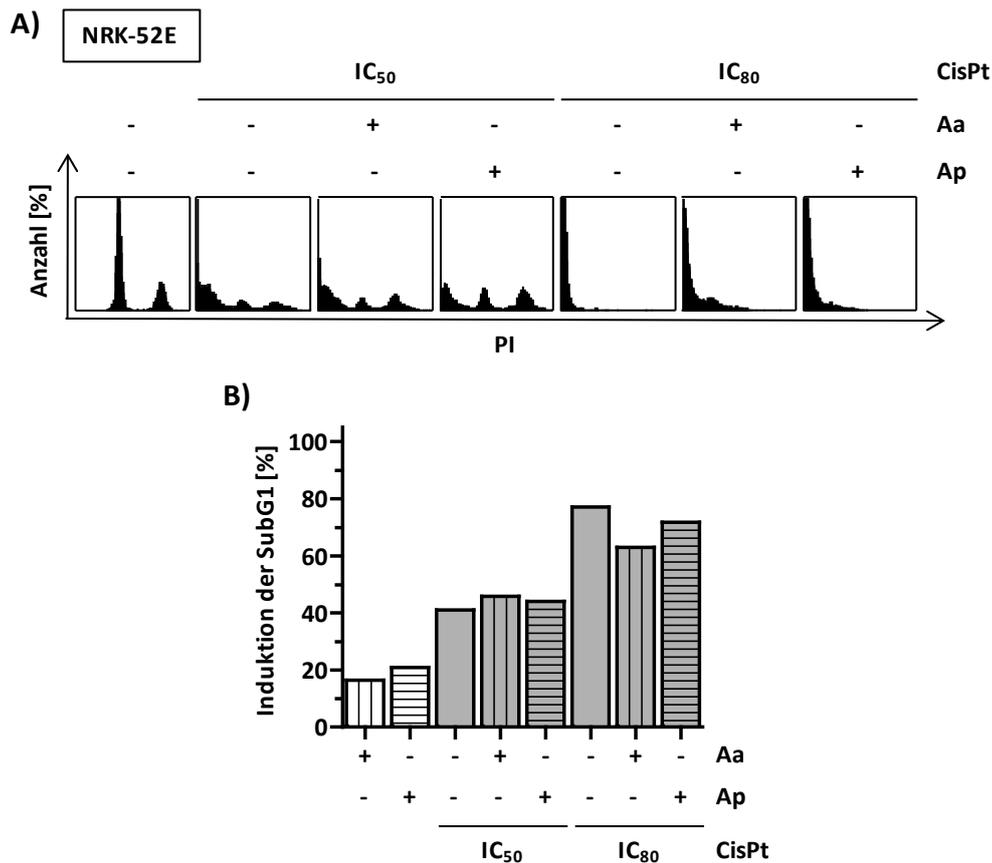


Abbildung 3.27: Einfluss von Aaptamin und Aeroplysinin-1 auf Cisplatin-induzierte Apoptose mittels durchflusszytometrischer Analyse.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 2 µM Aaptamin (Aa) bzw. Aeroplysinin-1 (Ap) vorbehandelt und für 48 h mit Aa bzw. Ap und der IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) kobehandelt. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers gemessen. Gezeigt sind A) exemplarische Zellzyklusverteilungen sowie B) die quantitative Auswertung der Induktion der SubG1-Fraktion. Dargestellt sind Mittelwerte der Duplikate in Prozent abzüglich des SubG1-Anteils der unbehandelten Kontrollzellen (n = 1, N = 2). Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.24 des Anhangs zu entnehmen.

Somit konnte die Protektion der NRK-52E-Zellen durch Aaptamin bzw. Aeroplysinin-1 nicht durch eine Reduktion der Apoptoseinduktion bestätigt werden.

3.2.2.2 EINFLUSS VON AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1 AUF DIE INDUKTION VON DNA-SCHÄDEN

Um die der Aaptamin-vermittelten Resistenz der Nierenzellen gegenüber Cisplatin zugrunde liegenden Mechanismen weiter aufzuklären, wurde die Menge an induzierten DNA-Schäden untersucht. Dazu wurde zunächst die Bildung von DSBs über die Anzahl der nukleären γ H2AX- und 53BP1-Foci mittels immunzytochemischer Färbungen nach 24 h Vorbehandlung mit Aaptamin bzw. Aeroplysinin-1 und anschließender 4 h Kobehandlung mit den Naturstoffen und der IC₈₀ von Cisplatin (entsprechend der Viabilitätsuntersuchung in Abbildung 3.1A und Tabelle 3.1) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl an DSBs durch die beiden Schwammextrakte nur marginal beeinflusst wird (Abbildung 3.28). Es sind lediglich weniger 53BP1-Foci nach Vorbehandlung mit Aeroplysinin-1 zu detektieren.

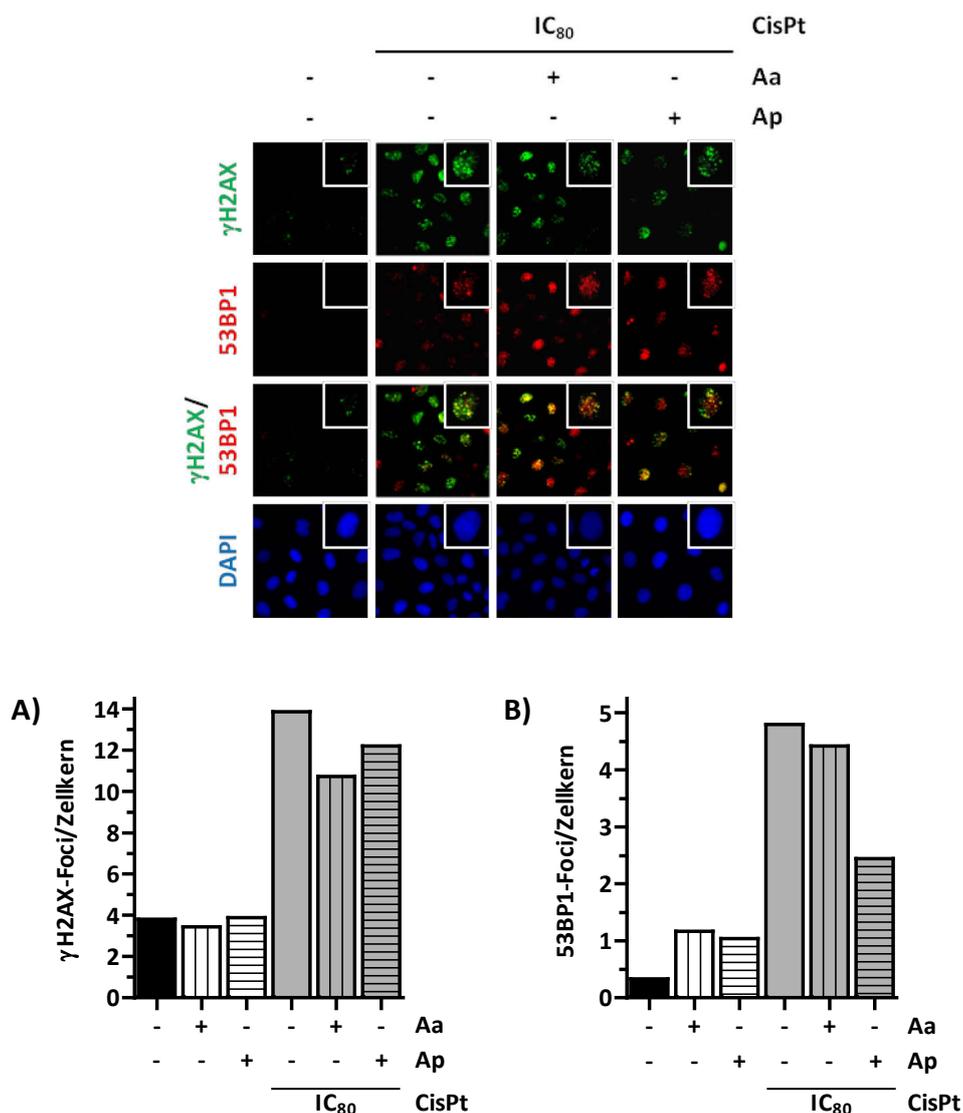


Abbildung 3.28: Fluoreszenzbasierte Quantifizierungen von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in NRK-

52E-Zellen nach Vorbehandlung mit Aaptamin oder Aeroplysinin-1 und anschließender Cisplatin-kobehandlung.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 2 µM Aaptamin (Aa) bzw. Aeroplysinin-1 (Ap) vorbehandelt und für 4 h mit Aa bzw. Ap und der IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) kobehandelt. Anschließend wurde die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ermittelt, indem die Anzahl von nukleären A) γH2AX- sowie B) 53BP1-Foci mittels immunzytochemischer Färbungen quantifiziert wurde. Der obere Teil der Abbildung zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen, der untere die Mittelwerte der Anzahl an Foci pro Zellkern (n = 1, N = 2). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellkerne ausgezählt. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.25 des Anhangs zu entnehmen.

Anschließend wurde die Bildung der Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen mittels Southwestern Blot-Analyse sowohl initial (unmittelbar nach der Zytostatikabehandlung; 4 h) als auch nach 24 h Postinkubation in Cisplatinabwesenheit (4 h + 24 h) quantifiziert. Diese Analyse ergab, dass die Anzahl an durch Cisplatin induzierten Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen weder von Aaptamin noch von Aeroplysinin-1 beeinflusst wird (Abbildung 3.29), was die vorhergegangenen Analysen der Bildung von DSBs bestätigt.

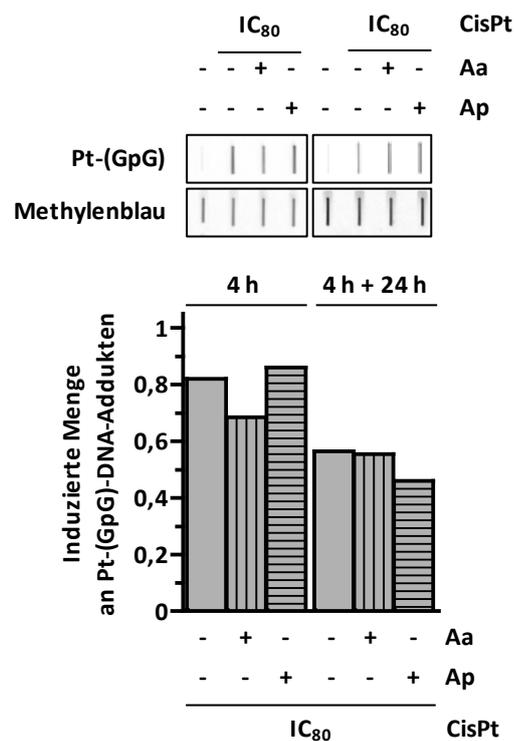


Abbildung 3.29: Einfluss von Aaptamin und Aeroplysinin-1 auf die Cisplatin-induzierte Bildung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen in NRK-52E-Zellen.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 2 µM Aaptamin (Aa) bzw. Aeroplysinin-1 (Ap) vorbehandelt und für 4 h mit Aa bzw. Ap und der IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) kobehandelt. Teilweise folgte eine Postinkubation von 24 h in CisPt-Abwesenheit (4 h + 24 h). Anschließend wurde die Menge an Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten mittels Southwestern Blot-Analyse ermittelt. Die Autoradiographien wurden densitometrisch ausgewertet und die Signalintensität auf die der jeweiligen Methyleneblaufärbung bezogen. Anschließend wurde die Signalintensität der DNA unbehandelter Zellen subtrahiert. Gezeigt sind oben exemplarische Southwestern Blots sowie unten Mittelwerte der Menge an induzierten Pt-(GpG)-DNA-Addukten (n = 1, N = 2). Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.26 des Anhangs zu entnehmen.

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Zytoprotektion der NRK-52E-Zellen durch die Alkaloide Aaptamin und Aeroplysinin-1 unabhängig von einer Reduktion der DNA-Intrastrangverknüpfungen sowie der dadurch resultierenden DSBs ist.

3.2.2.3 EINFLUSS VON AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1 AUF DIE DNA-SCHADENSANTWORT

Da ein Einfluss der Schwammextrakte Aaptamin und Aeroplysinin-1 auf den Transport von Cisplatin durch die vorausgegangene Analyse der DNA-Schäden (Abschnitt 3.2.2.2), unwahrscheinlich ist, beruhen die beobachteten zytoprotektiven Effekte (Abbildung 3.26) gegebenenfalls auf einer DNA-schadensunabhängig veränderten DNA-Schadensantwort. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde die Aktivierung einiger Schlüsselproteine der DNA-Schadensantwort sowie von MAPK-Signalwegen mittels Western Blot-Analysen nach 24 h Vorbehandlung mit Aaptamin bzw. Aeroplysinin-1 und anschließender Kobehandlung mit den Naturstoffen sowie der IC_{80} von Cisplatin (entsprechend der Viabilitätsuntersuchung in Abbildung 3.1A und Tabelle 3.1) für 8 h oder 48 h untersucht. Aus diesen Analysen ist ersichtlich, dass Aaptamin und Aeroplysinin-1 die DNA-Schadensantwort nur geringfügig verändern (Abbildung 3.30). Insbesondere zeigt sich nach Aeroplysinin-1-Vorbehandlung und nachfolgender Cisplatinbehandlung eine reduzierte Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins P53 (p-P53). Zudem ist die Aktivierung der Checkpointkinase 1 (p-CHK1) nach 8 h Cisplatinbehandlung sowohl durch Aaptamin als auch durch Aeroplysinin-1 verstärkt. Nach 48 h Behandlung wird die basale Expression des proapoptotischen Proteins BAX durch beide Schwammextrakte reduziert, wohingegen die Proteinmengen des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors P21, des phosphorylierten Histons H2AX (γ H2AX) sowie der phosphorylierten Stresskinase SAPK/JNK (p-SAPK/JNK) und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase P38 (p-P38) nicht nennenswert verändert sind. Auch die Cisplatin-induzierte Aktivierung der Caspase 7, die als Effektorcaspase bei apoptotischem Zelltod fungiert, sowie die PARP-1-Spaltung bleiben von den Naturstoffen unbeeinflusst. Dies bestätigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (Abbildung 3.27), bei denen die Induktion der Apoptose ebenfalls nicht reduziert ist. Zusammenfassend zeigt sich in diesen Western Blot-Analysen nur ein partieller Einfluss der Alkaloide Aaptamin und Aeroplysinin-1 auf die Mechanismen der DNA-Schadensantwort und der MAPK-Signalwege.

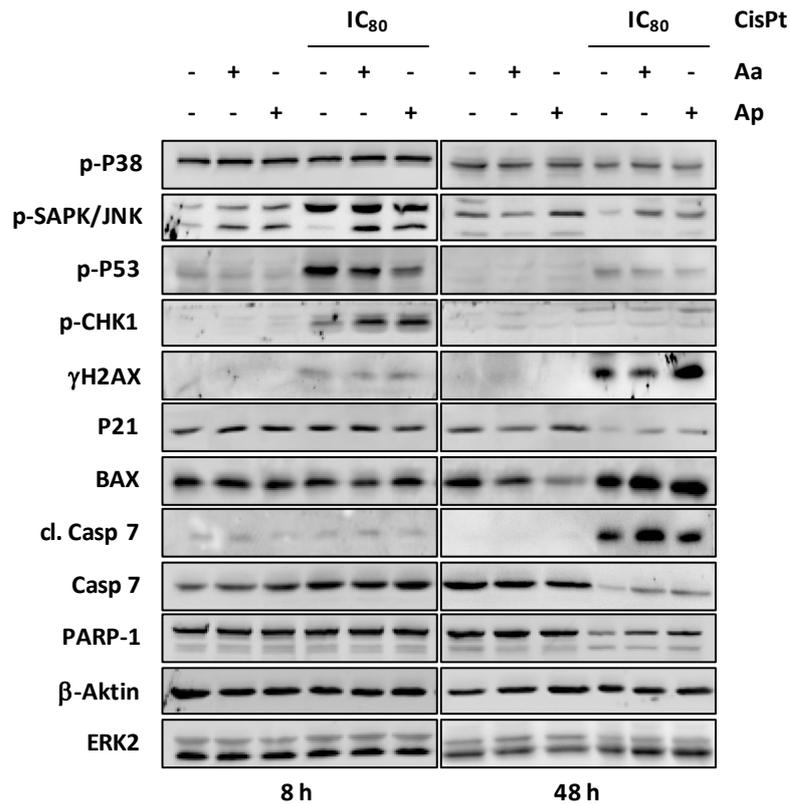


Abbildung 3.30: Cisplatin-induzierte Stressantworten in NRK-52E-Zellen nach Vorbehandlung mit Aaptamin oder Aeropylsinin-1 und anschließender Cisplatinkobehandlung anhand von Western Blot-Analysen.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 2 μ M Aaptamin (Aa) bzw. Aeropylsinin-1 (Ap) vorbehandelt und für 8 h oder 48 h mit Aa bzw. Ap und der IC_{80} von Cisplatin (CisPt) kobehandelt. Der Aktivierungsstatus von Mechanismen der DNA-Schadensantwort, der MAPK-Signalwege sowie mit Apoptose assoziierter Proteine wurde mittels phosphospezifischer Antikörper in Western Blot-Analysen untersucht. Die Expression des Zytoskelettproteins β -Aktin sowie der extrazellulär regulierten Kinase (ERK2) dienen als Ladekontrolle. p-: phospho-; Bax: *BCL2-associated protein*; Casp 7: Caspase 7; CHK: Checkpointkinase; cl. Casp 7: *cleaved* Caspase 7; γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert; P21: Inhibitor cyclinabhängiger Kinasen; P38: Mitogen-aktivierten Proteinkinase; P53: Tumorsuppressorprotein; PARP-1: Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1; SAPK/JNK: stressaktivierte Phosphokinase/c-JUN N-terminale Kinase.

Da vor allem Aaptamin einen zytoprotektiven Effekt bei der Viabilitätsuntersuchung der NRK-52E-Zellen gezeigt hat (Abbildung 3.26), in den Western Blot-Analysen aber kein wesentlicher Aaptamin-spezifischer Effekt erkennbar ist, lässt sich vermuten, dass die protektive Wirkung von Aaptamin unabhängig von Mechanismen der DNA-Schadensantwort oder der MAPK-Signalwege ist.

4 DISKUSSION

Die Platinverbindungen Cis-, Oxali- und Carboplatin werden in der Klinik als Chemotherapeutika zur Behandlung von einer Vielzahl solider Tumorarten verwendet. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Hauptanwendungsgebiete, die für Cis- und Carboplatin Tumore des Urogenitaltrakts sowie Kopf-Hals- und Lungentumore und für Oxaliplatin das Kolorektalkarzinom darstellen. Bei einer Chemotherapie wird außer dem Tumorgewebe zumeist auch Normalgewebe geschädigt. Als dosislimitierende Nebenwirkung von Cisplatin, dem prominentesten der drei oben genannten Platinverbindungen, ist die Nephrotoxizität zu nennen (Daugaard und Abildgaard, 1989; Hartmann *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2007). Dabei werden nach bisherigem Forschungsstand hauptsächlich proximale Nierentubuluszellen geschädigt (Arany und Safirstein, 2003; dos Santos *et al.*, 2012). Die außerordentliche Nephrotoxizität von Cisplatin beruht vermutlich unter anderem auf einer verstärkten Anreicherung des Zytostatikums in den Tubuluszellen durch gewebespezifische Transportmechanismen. Diese umfassen verschiedene, in der basolateralen Membran von proximalen Tubuluszellen lokalisierte, Transportproteine wie organische Kationen- oder Kupfertransporter (Ishida *et al.*, 2002; Ciarimboli *et al.*, 2005; Filipski *et al.*, 2009; Pabla *et al.*, 2009; Yonezawa und Inui, 2011). Durch die Transportprozesse werden in der Niere Platinkonzentrationen erreicht, die die Konzentration im Blut deutlich übersteigen (Rosenberg, 1985). So kann sich Cisplatin in den Tubuluszellen bis zur fünffachen Plasmakonzentration anreichern (Kuhlmann *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu Cisplatin werden die Platinverbindungen Oxaliplatin und vor allem Carboplatin als weniger nephrotoxisch eingestuft (Hartmann und Lipp, 2003). Die hier zugrunde liegenden, agensspezifischen, molekularen Mechanismen sind aber noch unzureichend untersucht. Neben den Tubuli stellen auch die Glomeruli hochsensitive Strukturen der Niere dar, die bei Nierenschäden nach Behandlung mit Aminoglykosiden und Cyclosporin eine wesentliche Rolle spielen (Remuzzi und Perico, 1995; Martinez-Salgado *et al.*, 2007). Inwiefern Glomeruli nun für die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität, insbesondere bei chronisch-toxischen Effekten bedeutsam sind, ist noch unklar.

4.1 VERGLEICH DER MOLEKULAREN WIRKUNG VON CIS-, OXALI- UND CARBOPLATIN AUF RENALE PROXIMALE TUBULUSEPITHEL- UND GLOMERULÄRE ENDOTHELZELLEN

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zytotoxizität und die ihr zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der drei Platinverbindungen Cis-, Oxali- und Carboplatin auf Nierenzellen ausführlich untersucht. Zudem wurden die in der Literatur als hauptsächliche Angriffspunkte für Cisplatin beschriebenen Zellen des proximalen Nierentubulus mit den vermeintlich weniger relevanten glomerulären Zellen hinsichtlich qualitativer sowie quantitativer Unterschiede in ihren Stressantworten nach Behandlung mit den Platinverbindungen verglichen. Als *in vitro*-Modellsystem dienten proximale Nierentubulusepithelzellen (NRK-52E-Zellen) sowie glomeruläre Endothelzellen (RGE-Zellen) aus der Ratte.

4.1.1 EINFLUSS DER PLATINVERBINDUNGEN AUF DIE ZELLVIABILITÄT

Die Bestimmung der IC_{50} (*inhibitory concentration 50 %*) sowie der IC_{80} (*inhibitory concentration 80 %*) von Cis-, Oxali- und Carboplatin (Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1) zeigte eine zunächst unerwartete, im Vergleich zu NRK-52E-Zellen erhöhte, Sensitivität der RGE-Zellen gegenüber allen drei Platinverbindungen. Demnach lässt sich spekulieren, dass glomeruläre Zellen generell sensitiver gegenüber den verwendeten Platinverbindungen sind als tubuläre. Dies gilt zunächst jedoch lediglich für die in dieser Arbeit analysierte *in vitro*-Situation. *In vivo* wurden tubuläre Epithelzellen eindeutig als hauptsächliches Angriffsziel von durch Cisplatin induzierten Nierenschäden identifiziert (Arany und Safirstein, 2003; Yao *et al.*, 2007; Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2012). Glomeruli waren bisher nur vereinzelt Gegenstand der Forschung hinsichtlich ihrer Bedeutung für akute sowie chronische Nephrotoxizität nach Cisplatinbehandlung (Kohn *et al.*, 2002; Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2011). So tritt vor allem im Rahmen von akuter Nephrotoxizität eine deutlich verringerte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) auf (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2011). *In vivo* könnten, zumindest theoretisch, unterschiedliche glomeruläre Zelltypen in ihrer Funktion durch Cisplatin beeinträchtigt werden. Podozyten, die das viszerale Blatt der Bowmanschen Kapsel in den Nierenkörperchen bilden, mit ihren Fortsätzen die Glomeruluskapillare umgreifen und so wesentlich an der Filterfunktion der Niere beteiligt sind, weisen lediglich eine sehr geringe Regenerationsfähig-

keit auf (Griffin *et al.*, 2003). Der Verlust von Podozyten ist für chronische Nierenerkrankungen, die mit einer Proteinurie einhergehen, wesentlich mitverantwortlich (Shankland, 2006; Asanuma *et al.*, 2007). Neben den Podozyten sind regenerationsfähige Endothelzellen aufgrund ihrer Barrierefunktion den höchsten Zytostatikakonzentrationen in der Niere ausgesetzt (Savage, 1994). So könnte man spekulieren, dass eine Schädigung des glomerulären Nierenendothels durch Behandlung mit den Platinverbindungen eine Dysfunktion hervorrufen könnte, die eine chronische Nierenfunktionsstörung zur Folge hätte. Diese Vermutung wird durch Studien von KOHN *et al.* unterstützt, die mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Meerschweinchennieren zeigten, dass Cisplatin vor allem in Kombination mit dem Aminoglykosid Gentamicin wesentliche Veränderungen in den Glomeruli von Meerschweinchennieren verursacht (Kohn *et al.*, 2002). Dabei werden unter anderem auch die Endothelzellen beeinflusst. Die unerwartet hohe Sensitivität der RGE-Zellen im Vergleich zu den NRK-52E-Zellen in dieser Arbeit könnte zudem mit den Endothelzeleigenschaften der ersteren zusammenhängen. Sollte dies der Fall sein, so deuten die Ergebnisse der Viabilitätsuntersuchungen eher auf Unterschiede zwischen Endothel- und Epithelzellen als zwischen tubulären und glomerulären Zellen hin.

Aus den Viabilitätsuntersuchungen in dieser Arbeit (Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1) geht auch hervor, dass beide Nierenzelllinien am sensitivsten gegenüber Cisplatin und am resistantesten gegenüber Carboplatin sind. Dies stimmt mit den bekannten Nebenwirkungen der Platinverbindungen überein. So ist für Cisplatin eine gravierende Nephrotoxizität dosislimitierend (Yao *et al.*, 2007), während für Oxaliplatin vor allem die kumulative Neurotoxizität (Hartmann und Lipp, 2003) und für Carboplatin die Myelosuppression (Wagstaff *et al.*, 1989) zu erwähnen ist. Allerdings gilt die unterschiedlich starke Zytotoxizität der Platinverbindungen in ähnlichem Maßstab auch für andere untersuchte Zelllinien wie humane Blasenurothelkarzinomzellen (RT-112-Zellen) und Kardiomyozyten aus der Ratte (H9c2-Zellen) (Abbildung 8.1 des Anhangs) und ist somit nicht nephrospezifisch. Möglicherweise ist dies, wie im Folgenden näher erläutert wird, mit einer unterschiedlichen Kinetik bei der Ausbildung zytotoxischer DNA-Addukte zu begründen.

Um die Cisplatin-spezifischen Stressantworten von den durch Oxali- oder Carboplatin induzierten abzugrenzen, wurden in dieser Arbeit zur Behandlung der Zellen äquitoxische Konzentrationen, die IC_{50} und IC_{80} der drei Platinverbindungen (entsprechend der Viabilitätsuntersuchungen in Abbildung 3.1A und Tabelle 3.1), verwendet. So sollten distinkte Stressantworten sowie die Beteiligung verschiedener molekularer Mechanismen an der Gesamtzytotoxizität besser abgeschätzt werden können.

4.1.2 UNTERSCHIEDE IN DER BILDUNG VON PLATIN-DNA-ADDUKTEN

Aus den durchgeführten Echtzeitzytotoxizitätsbestimmungen mittels Impedanzmessung (Abbildung 3.1B) geht vor allem hervor, dass die durch äquitoxische Konzentrationen von Carboplatin induzierte Zytotoxizität verspätet, mit einer Latenz von etwa 18 h bis 26 h im Vergleich zu Cis- bzw. Oxaliplatin, auftritt. Dies steht im Einklang mit (i) den Zelltoduntersuchungen (Abbildung 3.6), die ebenfalls eine verspätete Apoptoseinduktion nach Carboplatinbehandlung zeigen, sowie (ii) den Southwestern Blot-Analysen (Abbildung 3.16), aus denen hervorgeht, dass die für die Zytotoxizität ausschlaggebenden Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen nach äquitoxischer Carboplatinexposition ebenfalls verspätet auftreten. Die Gesamtzellplatinierungsmessungen (Abbildung 3.15) zeigen, dass dies unabhängig von Transporteffekten ist. Hier führt eine äquitoxische Carboplatinbehandlung im Vergleich zu Cis- bzw. Oxaliplatin eher noch zu einer erhöhten Zellplatinierung. Vermutlich ist demnach eher die bereits in anderen Studien thematisierte, verspätete Bildung der zytotoxischen DNA-Addukte nach Carboplatinbehandlung (Wagstaff *et al.*, 1989; Blommaert *et al.*, 1995) für die verzögerte Zytotoxizität verantwortlich, als dass Transporteffekte eine wesentliche Rolle dabei spielen. Zudem ist bekannt, dass sich das Spektrum an DNA-Addukten, die durch Cis- oder Carboplatin induziert werden, deutlich voneinander unterscheidet. So zeigten *in vitro*-Studien, dass Cisplatin zu bis zu 65 % 1,2-(GpG)-, zu bis zu 30 % 1,2-(ApG)- und zu bis zu 10 % 1,3-(GpNpG)-Intrastrangverknüpfungen ausbildet (Kartalou und Essigmann, 2001; Rabik und Dolan, 2007; Rebillard *et al.*, 2008). Oxaliplatinbehandlung zeigt ein ähnliches Spektrum an DNA-Addukten wie Cisplatin (Jennerwein *et al.*, 1989; Woynarowski *et al.*, 1998; Woynarowski *et al.*, 2000), wohingegen Carboplatin zu einer deutlich anderen Adduktverteilung führt. Hier werden zu etwa 36 % 1,3-(GpNpG)-, zu etwa 30 % 1,2-(GpG)- und zu etwa 15 % 1,2-(ApG)-Intrastrangverknüpfungen gebildet (Wagstaff *et al.*, 1989;

Blommaert *et al.*, 1995). Folglich könnte die reduzierte Zytotoxizität von Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ mit der Bildung unterschiedlicher DNA-Addukte zusammenhängen. Da Oxaliplatin-DNA-Addukte von dem in dieser Arbeit in den Southwestern Blot-Analysen (Abbildung 3.16) verwendeten Antikörper aufgrund ihrer zu Cisplatin-DNA-Addukten unterschiedlichen Struktur (Scheeff *et al.*, 1999) nicht detektiert werden können, lässt sich über deren Bildungskinetik hier nur spekulieren. Aus der Analyse der Gesamtzellplatinierung (Abbildung 3.15) geht hervor, dass eine äquitoxische Oxaliplatinbehandlung im Vergleich zu Cisplatin zu einer geringfügig vermehrten Zellplatinierung führt. Davon ausgehend, dass diese vermehrte Gesamtzellplatinierung eine erhöhte DNA-Adduktbildung mit sich bringt, die allerdings in den Echtzeitzytotoxizitätsbestimmungen (Abbildung 3.1B) zu gleicher und in den Trypanblaufärbungen (Abbildung 3.1C) sogar zu einer verringerten Zytotoxizität gegenüber Cisplatin führt, müssten Oxaliplatin-DNA-Addukte weniger zytotoxisch sein als Cisplatin-DNA-Addukte. Dies stimmt jedoch nicht mit vorherigen Untersuchungen überein, die zeigten, dass eine Oxaliplatinbehandlung weniger DNA-Addukte mit sich bringt als eine Cisplatinbehandlung, diese Addukte aber aufgrund ihrer komplexen DACH-Struktur die DNA-Synthese effizienter hemmen (Raymond *et al.*, 1998; Raymond *et al.*, 2002; Faivre *et al.*, 2003). Somit ist auch hier, ohne die Ergebnisse einer Oxaliplatin-DNA-Adduktmessung, davon auszugehen, dass die zu Cisplatin verschiedene Zytotoxizität von Oxaliplatin nicht auf Transportprozessen sondern eher auf Unterschieden in den DNA-Addukten beruht. Daraus schlussfolgernd resultiert die herausragende Zytotoxizität von Cisplatin möglicherweise aus Cisplatin-spezifischen DNA-Addukten und der nachfolgenden DNA-Schadensantwort.

4.1.3 VERÄNDERUNGEN IN DER ZELLYKLUSVERTEILUNG NACH BEHANDLUNG MIT DEN PLATINVERBINDUNGEN

Die Resultate der Zellzyklusanalyse der NRK-52E-Zellen (Abbildung 3.2) unterstützen die der Viabilitätsuntersuchungen (Abbildung 3.1). Auch hier ist Cisplatin die zytotoxischste der verwendeten Platinverbindungen, was aus der sehr stark erhöhten SubG1-Fraktion hervorgeht. Es zeigt sich ebenfalls die verspätet eintretende Zytotoxizität nach Carboplatinbehandlung. Im Gegensatz zu NRK-52E-Zellen akkumulieren RGE-Zellen nach Behandlung mit äquitoxischen Konzentrationen der Platinverbindungen in der G2/M-

Phase des Zellzyklus (Abbildung 3.3), was den zuvor gezeigten Viabilitätsuntersuchungen in gewisser Weise widerspricht. Zusammen mit den Trypanblaufärbungen (Abbildung 3.1C) deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die in den vorausgegangenen MTT-Assays (Abbildung 3.1A) gezeigte, erhöhte Sensitivität der RGE-Zellen im Vergleich zu NRK-52E-Zellen eher von einer verringerten mitochondrialen Aktivität herrührt als von vermehrtem Zelltod. Dies gilt es bei dem Vergleich der unterschiedlichen Zellantworten von NRK-52E- und RGE-Zellen auf die vermeintlich äquitoxischen Konzentrationen der Platinverbindungen zu bedenken.

Die Untersuchung des Zellzyklus zeigt, wie bereits erwähnt, wesentliche qualitative Unterschiede in den durch die Platinverbindungen induzierten Zellantworten von NRK-52E- und RGE-Zellen. Während NRK-52E-Zellen nach der Zytostatikaexposition vornehmlich Apoptose induzieren, reagieren RGE-Zellen mit einem blockierten Zellzyklus. Allerdings zeigen nachfolgend durchgeführte immunzytochemische Färbungen der NRK-52E-Zellen eine signifikante Zunahme der Zellpopulation in der G2/M-Phase des Zellzyklus nach Behandlung mit allen drei Platinverbindungen (Abbildung 3.4). Dies steht nicht in Einklang mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie (Abbildung 3.2). Ein blockierter Zellzyklus nach Exposition mit Cisplatin wurde bereits in früheren Arbeiten in Zusammenhang mit einer Induktion des Inhibitors cyclinabhängiger Kinasen P21^{WAF1} beschrieben (Arany und Safirstein, 2003). So zeigten z. B. MEGYESI *et al.* in einer *in vivo*-Studie mit P21-*Knockout*-Mäusen, dass eine P21^{WAF1}-Induktion Nierenzellen vor der Zellzyklusprogression und damit vor einer möglichen Apoptoseinduktion nach Cisplatinbehandlung bewahrt (Megyesi *et al.*, 1998). Dies kann sowohl P53-abhängig als auch –unabhängig erfolgen (Megyesi *et al.*, 1996). Da P21^{WAF1} vor allem den Zellzyklusübergang von der G1- zur S-Phase blockiert (Harada und Ogden, 2000), widerspricht dies dem bei der Behandlung der RGE-Zellen mit Cisplatin zu erkennenden Block in der G2/M-Phase. Allerdings beschreiben neuere Publikationen für P21^{WAF1} auch dessen Beteiligung an einem G2-Arrest (Ando *et al.*, 2001; Cmielova und Rezacova, 2011).

4.1.4 EINFLUSS DER PLATINVERBINDUNGEN AUF DIE INDUKTION VON APOPTOTISCHEM UND NEKROTISCHEM ZELLTOD

Es ist bekannt, dass Cisplatin sowohl Apoptose induziert als auch zu Nekrose führen kann (Ferrer *et al.*, 2003; Rabik und Dolan, 2007). Die Aktivierung der an der Apoptose als

Effektorcaspasen beteiligten Caspasen 3 und 7 wurde in dieser Arbeit zum einen mittels des Apo-ONE[®]-Assays und zum anderen separat via Western Blot-Analysen untersucht. Hierbei zeigte sich die stärkste Caspaseaktivierung bei NRK-52E-Zellen nach 24 h Behandlung mit der IC₈₀ von Cisplatin, gefolgt von Oxaliplatin (Abbildung 3.6 und 3.7). RGE-Zellen zeigen nach Platinbehandlung eine wesentlich schwächere Aktivierung der Caspaseaktivität im Apo-ONE[®]-Assay und lediglich eine moderate Spaltung der Procaspasen im Western Blot. Dies unterstützt die oben beschriebenen Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse, wobei die Initiation der Apoptose durch die Platinverbindungen hauptsächlich auf NRK-52E- und nicht auf RGE-Zellen zutrifft. Allerdings zeigen die Western Blot-Analysen auch, dass eine Carboplatinbehandlung ausschließlich bei RGE-Zellen zu einer moderaten Aktivierung der Caspase 7 führt. Eine weitere Bestätigung der verstärkten Induktion von Apoptose nach Cisplatinbehandlung bei NRK-52E-Zellen liefert die Quantifizierung der fragmentierten Zellkerne, die mit der Einleitung der Apoptose einhergehen, mittels DAPI-Färbung (Abbildung 3.8). Unerwartet hoch fällt hierbei die Anzahl an fragmentierten Zellkernen der RGE-Zellen nach Carboplatinbehandlung aus, was die zuvor erwähnten Western Blot-Ergebnisse bestätigt. Unklar bleibt jedoch, ob die in dieser Arbeit gezeigten Apoptoseantworten nach Cis-, Oxali- bzw. Carboplatinbehandlung über den extrinsischen oder intrinsischen Apoptoseweg ablaufen oder ob ein stressinduzierter Weg über das Endoplasmatische Retikulum unter Beteiligung der Caspase 12 (Liu und Baliga, 2005) eine wesentliche Rolle spielt. Lediglich die erhöhte mRNA-Expression des proapoptischen *Bax* (Abbildung 3.18) in beiden Zelllinien spricht für eine wesentliche Beteiligung des intrinsischen Apoptoseweges vor allem in NRK-52E-Zellen.

Die Nekroseuntersuchungen von NRK-52E-Zellen (Abbildung 3.9) zeigen ein sehr ähnliches Muster wie die vorausgegangene Apo-ONE[®]-Assays (Abbildung 3.6). Folglich induzieren die Platinverbindungen bei NRK-52E-Zellen Apoptose und Nekrose mit ähnlichem Ausmaß. Frühere Publikationen bestätigen, dass obwohl sich Apoptose und Nekrose in einigen wesentlichen morphologischen und biochemischen Charakteristika unterscheiden, sie auch simultan auftreten können (Eguchi *et al.*, 1997). So zeigten PESTELL *et al.*, dass nach Cisplatinbehandlung ein Teil der Population von Ovarialkarzinomzellen Apoptose induziert, während ein anderer Teil der Nekrose unterliegt (Pestell *et al.*, 2000). Aus einer Studie von LIEBERTHAL *et al.* geht hervor, dass hohe Dosen von Cisplatin bereits

kurzfristig zu Nekrose bei proximalen Tubulusepithelzellen der Maus führen, wohingegen eine längere Behandlung mit moderaten Dosen zur Induktion von Apoptose führt (Lieberthal *et al.*, 1996). Dies lässt sich mit den Untersuchungen der NRK-52E-Zellen in dieser Arbeit nicht bestätigen. Hier überwiegt nach einer längeren Behandlung (48 h bzw. 72 h) mit der IC_{50} von Cisplatin als moderater Dosis die Apoptoseinduktion nicht wesentlich gegenüber der Nekrose (Abbildung 3.6 und 3.9). Auch führt eine Behandlung mit der IC_{80} nicht zu wesentlich mehr Nekrose im Vergleich zu Apoptose. RGE-Zellen unterliegen Nekrose nur nach Cisplatinbehandlung (Abbildung 3.9). Hier könnte die obige Aussage von LIEBERTHAL *et al.* zutreffen: lediglich die IC_{80} von Cisplatin als hohe Dosis reicht aus, um Nekrose zu induzieren. Allerdings steigt der Nekroseanteil mit einer verlängerten Inkubation (48 h bzw. 72 h) an.

Nekrose kann als Folge einer nicht vollendeten Apoptoseinduktion eintreten (Gonzalez *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008). SANCHO-MARTINEZ *et al.* haben diese Zelltodmechanismen anhand von humanen Lymphom- und renalen Tubuluszellen dahingehend untersucht. Sie zeigten, dass pronekrotische Konzentrationen von Cisplatin die Apoptosemaschinerie früh aktivieren, sie aber auf Ebene der Effektorcaspasen blockieren. So kommt es zu einem Todesphänotyp, der der Nekrose ähnelt. Dabei werden BCL2- und mitochondrien-unabhängige Wege induziert (Sancho-Martinez *et al.*, 2011). Dies lässt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht bestätigen. Unter den Bedingungen, bei denen hier die deutlichste Nekrose zu detektieren ist, ist in den Western Blot-Analysen auch die stärkste Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 zu erkennen. Sie werden demnach nicht durch nekrotische Cisplatinkonzentrationen blockiert. Dies spricht bei der in dieser Arbeit dargestellten *in vitro*-Situation eher für die Induktion einer von der Apoptose unabhängigen Nekrose.

4.1.5 INDUKTION VON DNA-SCHÄDEN UND DER DNA-SCHADENSANTWORT

DNA-Schäden sind hauptverantwortlich für den Zelltod nach Exposition mit Platinverbindungen (Karasawa und Steyger, 2015). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Cis-, Oxali- und Carboplatin auf die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) sowie die nachfolgende Aktivierung der DNA-Schadensantwort intensiv untersucht. Ersteres wurde über die Bildung nukleärer γ H2AX-Foci als Surrogatmarker für DSBs (Olive, 2004; Löbrich *et al.*, 2010; Valdiglesias *et al.*, 2013), letzteres über Western

Blot-Analysen mittels phosphospezifischer Antikörper gegen Proteine, die in der DNA-Schadensantwort den Kinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*) nachgeschaltet sind, untersucht. NRK-52E- und RGE-Zellen antworten auf ionisierende Strahlung (*ionizing radiation*; IR) als prototypische Noxe für die Induktion von DSBs und der DNA-Schadensantwort (Vignard *et al.*, 2013) in ähnlicher Weise (Abbildung 3.10). Dies deutet auf eine nahezu identisch ablaufende DNA-Schadensantwort in beiden Zelllinien hin. Nach Exposition mit den Platinverbindungen zeigen sich allerdings wesentliche zelltyp- sowie agensspezifische Unterschiede (Abbildung 3.11 und 3.12). Die Bildung von DSBs als Folge der Behandlung mit Platinverbindungen tritt bei RGE-Zellen eher und bei niedrigeren Konzentrationen auf als bei NRK-52E-Zellen. Während NRK-52E-Zellen 24 h nach Ende der Zytostatikabehandlung noch eine Dosisabhängigkeit hinsichtlich der γ H2AX-Foci im Zellkern aufweisen, haben RGE-Zellen ihr Maximum bereits nach Behandlung mit der IC_{50} erreicht. Dies steht in Einklang mit den bei RGE-Zellen deutlich niedrigeren Werten für die IC_{50} und IC_{80} (Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1). Obwohl RGE-Zellen demnach sehr anfällig für die Bildung von DSBs nach Zytostatikaexposition sind, induzieren sie weniger Apoptose (Abbildung 3.6) als zu erwarten wäre (Roos und Kaina, 2013). Sie unterliegen aber auch weniger der Nekrose (Abbildung 3.9) als NRK-52E-Zellen. Stattdessen aktivieren RGE-Zellen eher Mechanismen der Zellzykluskontrolle, was aus den oben diskutierten Ergebnissen der Durchflusszytometrie (Abbildung 3.3) hervorgeht. Dies konnte mit weiteren Western Blot-Analysen, die im Folgenden näher diskutiert werden, bestätigt werden.

Die Effekte von Cis-, Oxali- und Carboplatin auf Mechanismen der DNA-Schadensantwort (Abbildung 3.13 und 3.14) sind außerordentlich komplex. Zudem weisen sie eine wesentliche Zelltyp- und Agensspezifität sowie eine Zeitabhängigkeit auf. Es zeigt sich, dass die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins P53 in NRK-52E-Zellen effektiver ist als bei RGE-Zellen. Möglicherweise liegen der erhöhten Zytotoxizität der RGE-Zellen (Abbildung 3.1) somit P53-unabhängige Mechanismen, auf die später weiter eingegangen wird, zugrunde. RGE-Zellen phosphorylieren die Checkpointkinasen 1 und 2 (CHK1 und CHK2) stärker als NRK-52E-Zellen, was für eine hocheffiziente Aktivierung der Checkpointkontrollmechanismen bei den Zellzyklusübergängen spricht. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie (Abbildung 3.3). Bei einem Vergleich äquitoxischer Dosen der drei Platinverbindungen ist Cisplatin in beiden Zelllinien am

effektivsten in der Aktivierung einer Vielzahl von DNA-Schadensantwortsmechanismen, was eine Erklärung für seine außerordentliche Nephrotoxizität darstellen könnte. Die DNA-Schadensantwort nach Carboplatinbehandlung unterscheidet sich vermutlich aufgrund der zuvor diskutierten, verspätet auftretenden Zytotoxizität von den anderen. Carboplatin stimuliert sehr effektiv CHK2, aber weniger CHK1, in NRK-52E-Zellen und induziert deutlich die Phosphorylierung beider Checkpointkinasen in RGE-Zellen. PABLA *et al.* zeigten, dass vor allem die P53-Aktivierung über den ATR-CHK2-Signalweg relevant für die Cisplatin-induzierte Apoptose in proximalen Nierentubuluszellen ist (Pabla *et al.*, 2008). Analog dazu zeigen auch die Ergebnisse dieser Arbeit eine Induktion von CHK2 nach Cis-, Oxali- bzw. Carboplatinbehandlung in NRK-52E- sowie RGE-Zellen, vor allem nach 8 h Zytostatikabehandlung gefolgt von 24 h Postinkubation in Abwesenheit der Platinverbindungen. Die Phosphorylierung des Chromatin-assoziierten Proteins KAP1 (*KRAB-associated protein 1*) nach Carboplatinbehandlung ist bevorzugt in NRK-52E-Zellen zu finden, wohingegen Cisplatin KAP1 in beiden Zelllinien in ähnlichem Ausmaß phosphoryliert. Diese unterschiedliche KAP1-Aktivierung nach Carboplatin könnte eine bessere Zugänglichkeit des Chromatins für Reparaturfaktoren in NRK-52E-Zellen zur Folge haben (Iyengar und Farnham, 2011; Sulli *et al.*, 2012). Eine mögliche Erklärung für die agens- und zelltypspezifischen Effekte der Platinverbindungen auf die DNA-Schadensantwort stellen die bereits zuvor diskutierten, qualitativ sowie quantitativ unterschiedlichen DNA-Addukte dar, die mit der Zeit gebildet sowie prozessiert werden und Mechanismen der DNA-Schadensantwort so unterschiedlich aktivieren könnten.

DNA-Reparaturmechanismen wirken der Gen- sowie Zytotoxizität der DNA-Addukte entgegen. Mittels der Expression des bei der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) der DNA-Intrastrangverknüpfungen beteiligten Reparaturproteins ERCC1 (*excision-repair cross-complementing 1*) kann z. B. die therapeutische Wirksamkeit von Cisplatin in Lungen- und Hodenkarzinomen (Köberle *et al.*, 1997; Köberle *et al.*, 1999; Masters und Köberle, 2003; Welsh *et al.*, 2004; Olausson *et al.*, 2006; Friboulet *et al.*, 2013) sowie bei Blasenkrebs (Bellmunt *et al.*, 2007; Ozcan *et al.*, 2013) vorhergesagt werden. Zudem dient die ERCC1-Expression der Vorhersage der Überlebensrate von Patienten mit Kolorektalkarzinomen, die mit Oxaliplatin und Fluoruracil behandelt wurden (Ishida *et al.*, 2002). Auch bei der Wirksamkeitsvorhersage der Carboplatinbehandlung spielt die Expression von ERCC1 eine wesentliche Rolle (Vilmar und Sorensen, 2009). Allerdings stellten FRIBOULET *et al.* mit ihrer

Studie die Verwendbarkeit von ERCC1 zur Vorhersage der Cisplatinwirksamkeit bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs in Frage (Friboulet *et al.*, 2013). In dieser Arbeit zeigen RGE-Zellen im Vergleich zu NRK-52E-Zellen eine höhere basale Expression dieses NER-Faktors (Abbildung 3.17). Zudem reparieren RGE-Zellen Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen, die für die Zytotoxizität hauptsächlich verantwortlich sind, schneller als NRK-52E-Zellen, wie aus den Southwestern Blot-Analysen nach Behandlung mit äquitoxischen Dosen der Platinverbindungen (Abbildung 3.16B) ersichtlich ist. Trotz ihrer erhöhten NER-Kapazität sind RGE-Zellen unerwartet sensitiv gegenüber der Exposition mit den Platinverbindungen. Dies scheint nicht mit der in der Real-time PCR auffälligen, höheren basalen mRNA-Expression des proapoptotischen *Bax* in Verbindung zu stehen, da die Induktion der Apoptose bei RGE-Zellen im Vergleich zu NRK-52E-Zellen (Abbildung 3.6), wie bereits erwähnt, nur sehr schwach ausfällt. Vielmehr scheint die effiziente, zuvor diskutierte Aktivierung der Checkpointmechanismen für die hohe Sensitivität der RGE-Zellen gegenüber den durch die Platinverbindungen induzierten Schäden verantwortlich zu sein. Diese Vermutung wird durch Studien von BROZOVIC *et al.* unterstützt, die zeigten, dass viele Cisplatin-DNA-Addukte und eine resultierende frühe DNA-Schadensantwort nicht zwangsläufig den Ausgang der Cisplatinbehandlung vorhersagen (Brozovic *et al.*, 2009). Vielmehr bestimmen die exakte Prozessierung der DNA-Schäden sowie eine späte Checkpointkontrolle das Ausmaß der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität. Nach Cis- bzw. Oxaliplatinbehandlung zeigen NRK-52E-Zellen eine deutliche Erhöhung der mRNA-Expression von *Ercc1* (Abbildung 3.18), was auf eine Aktivierung der NER hindeutet. Diese Zellantwort unterbleibt bei RGE-Zellen. Sie zeigen eher eine erhöhte Expression der mRNA des Kupfertransporters *Ctr1* (*solute carrier family 31, member 1; copper transporter 1*). Da CTR1 am Import der Platinverbindungen in die Zelle beteiligt ist (Ciarimboli *et al.*, 2005; Pabla *et al.*, 2009; Ciarimboli, 2014), ist diese Antwort tendenziell als toxisitätsfördernd zu beurteilen. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Gesamtzellplatinierung (Abbildung 3.14) keine erhöhten zellulären Platinwerte für RGE-Zellen im Vergleich zu NRK-52E-Zellen. Nennenswert ist zudem, dass eine äquitoxische Konzentration von Carboplatin weder die *Ercc1*- noch die *Ctr1*-mRNA-Expression induziert. So scheint die Carboplatin-induzierte Zytotoxizität, wie zuvor bereits diskutiert, nicht durch Transportprozesse beeinflusst zu sein.

In Abbildung 4.1 sind die wesentlichen qualitativen Effekte von Cis-, Oxali- und Carboplatin auf NRK-52E- sowie RGE-Zellen dieser Arbeit zusammengefasst.

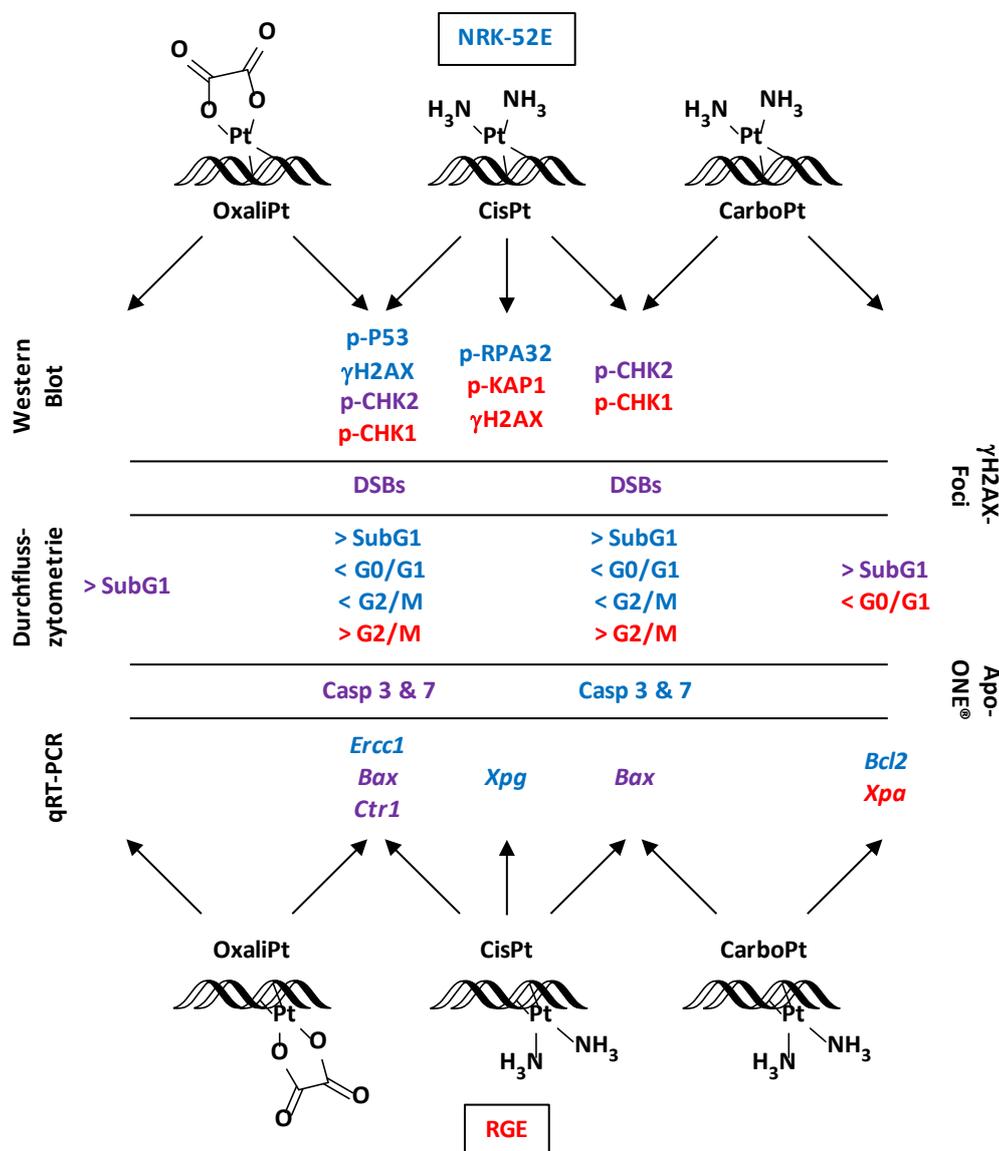


Abbildung 4.1: Zusammenfassung der molekularen Wirkung von Cis-, Oxali- und Carboplatin auf Nierenzellen.

In dieser Arbeit wurden NRK-52E- und RGE-Zellen mit äquitoxischen Konzentrationen von Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt, um agens- und zelltypspezifische Stressantworten zu untersuchen. Es folgte eine Vielzahl von unterschiedlichen Endpunktanalysen. In dieser Abbildung sind die wesentlichen qualitativen Ergebnisse der unterschiedlichen Stressantworten nach Behandlung mit den jeweiligen IC_{80} der Platinverbindungen (entsprechend der Viabilitätsuntersuchungen in Abbildung 3.1A und Tabelle 3.1) dargestellt. Gezeigt sind zum einen die Ergebnisse der Western Blot-Analysen zur Untersuchung der DNA-Schadensantwort mit mindestens einem starken, erhöhten Effekt gemäß Tabelle 3.2 nach 8 h Zytostatikabehandlung und anschließenden 24 h Postinkubation in Abwesenheit der Platinverbindungen (p-: phospho-; CHK: Checkpointkinase; γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert; KAP1: *KRAB-associated protein 1*; P53: Tumorsuppressorprotein; RPA32: Replikationsprotein A2, 32 kDa Untereinheit) (siehe Abbildung 3.13 sowie Tabelle 3.2). Die Ergebnisse der γ H2AX-Foci-Analyse nach gleicher Behandlungsdauer sind ebenfalls dargestellt (DSBs: Induktion von Doppelstrangbrüchen) (siehe Abbildung 3.11 und 3.12). Zum anderen sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Zellzyklusverteilung nach 48 h Zytostatikabehandlung (Durchflusszytometrie) dargestellt, die mindestens einem zweifachen Effekt (≥ 2 -fach bzw. $\leq 0,5$ -fach) entsprechen

(> SubG1: Erhöhung der als apoptotischen Zellpopulation angesehenen SubG1-Fraktion; < G0/G1: Verringerung der G0/G1-Fraktion; < G2/M: Verringerung der G2/M-Fraktion; > G2/M: Erhöhung der G2/M-Fraktion) (siehe Abbildung 3.2 und 3.3). Außerdem sind die Ergebnisse der fluoreszenzbasierten Analyse der Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 (Casp 3 & 7) (Apo-ONE®) (siehe Abbildung 3.6) sowie der mRNA-Expression ausgewählter Cisplatin-suszeptibilitätsfaktoren (qRT-PCR) nach 24 h Dauerbehandlung gezeigt (siehe Abbildung 3.18). Hier sind nur Effekte ≥ 2 -fach aufgeführt (*Bax*: *BCL2-associated protein*; *Bcl2*: *B-cell lymphoma 2*; *Ctr1*: Kupfertransporter 1; *Ercc1*: *excision-repair cross-complementing 1*; *Xpa*: *Xeroderma pigmentosum, complementation group A protein*; *Xpg*: *Xeroderma pigmentosum, complementation group G protein*). In blau sind NRK-52E-zellspezifische Effekte dargestellt, in rot RGE-zellspezifische. Violett hebt Effekte hervor, die für beide Zelllinien gelten.

4.1.6 WEITERE MÖGLICHE MECHANISMEN, DIE DER ZYTOTOXIZITÄT DER PLATINVERBINDUNGEN ZUGRUNDE LIEGEN KÖNNTEN

Obwohl für Cisplatin die Bindung an DNA als hauptsächlicher, zytotoxischer Mechanismus anerkannt wird, sind vermutlich auch DNA-schadensunabhängige Zelltod- bzw. Überlebensmechanismen an dessen zytotoxischem Potenzial beteiligt. So kann z. B. die Phosphorylierung von Stresskinasen wie JNK (c-JUN N-terminale Kinase) sowohl DNA-schadensabhängig, als auch -unabhängig erfolgen. DAMROT *et al.* zeigten, dass eine blockierte Replikation in Folge von UV-Schäden zu einer Aktivierung der JNK führt (Damrot *et al.*, 2009). Dies konnte für Cisplatin-induzierte DNA-Schäden von HELBIG *et al.* bestätigt werden (Helbig *et al.*, 2011). Zudem war die Induktion von DNA-schadensunabhängigen Stressantworten durch Cisplatinexposition bereits Bestandteil weiterer kontroverser Studien. MANSOURI *et al.* zeigten in einem Vergleich von Cisplatin-sensitiven und -resistenten Ovarialkarzinomzellen, dass die Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPK) JNK, P38 und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) bei der Apoptose-induktion durch Cisplatin eine wesentliche Rolle spielen (Mansouri *et al.*, 2003). Dabei zeigten Cisplatin-sensitive Zellen im Vergleich zu resistenten eine verlängerte Aktivierung von JNK und P38, welche die Apoptose fördert. Eine Inhibition von JNK und P38 in den sensitiven Zellen hatte eine verringerte Apoptoseinduktion zur Folge (Mansouri *et al.*, 2003). Hingegen zeigten PEREIRA *et al.*, dass eine P38-Inhibition Tumorzellen (Mamma- und Kolorektalkarzinomzellen) für Cisplatin-induzierte Apoptose sensitiviert, indem reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) vermehrt induziert werden, was wiederum den JNK-Signalweg aktiviert (Pereira *et al.*, 2013). NEHME *et al.* vermuteten zudem, dass die Kinasen JNK und c-ABL (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) Teil der Signalwege sind, die aktiviert werden, wenn Proteine der Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair*; MMR) Cisplatin-DNA-Addukte erkennen (Nehme *et al.*, 1997). Außerdem haben sie die Aktivierung dieser MAPKs nach Cis- bzw. Oxaliplatinbehandlung

untersucht. Im Gegensatz zu Cisplatin aktivierte Oxaliplatin weder JNK noch c-ABL. Sie schlussfolgerten daraus, dass Cis- und Oxaliplatinaddukte unterschiedlich detektiert werden. So spielt das MMR-System eine wesentliche Rolle bei der Erkennung von Cisplatinaddukten, nicht aber bei Oxaliplatinaddukten (Nehme *et al.*, 1999). Neben Proteinen der MMR und der zuvor bereits erwähnten NER können auch nukleäre *high mobility group* (HMG) Proteine an 1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen binden (Zamble und Lippard, 1995; Gonzalez *et al.*, 2001; Rabik und Dolan, 2007). Dies sind kleine, Chromatin-assoziierte Nicht-Histon-Proteine, die an der Genregulation sowie der Erhaltung der Chromatinstruktur beteiligt sind. Einige von ihnen spielen vermutlich eine wesentliche Rolle bei der Cis- bzw. Carboplatin-induzierten Zytotoxizität. So ist die Sensitivität von Hodenkrebs gegenüber Cisplatin auf die vermehrte Anwesenheit von HMG-Proteinen zurückzuführen (Zamble *et al.*, 2002). Auch sensitiviert eine Überexpression von HMG1 Brustkrebszellen gegenüber Cisplatin (He *et al.*, 2000). Die Bindung von HMG-Proteinen verhindert den replikativen Bypass (Vaisman *et al.*, 1999), der sonst eine Replikation der DNA über den DNA-Schaden hinweg ermöglicht. Einige HMG-Proteine blockieren Transkriptionsfaktoren und verhindern so Transkription sowie Replikation. Dies wiederum führt zu Apoptoseinduktion (Siddik, 2003). Ein anderer Ansatz geht davon aus, dass HMG-Proteine, die an Cisplatin-DNA-Addukte gebunden haben, deren Reparatur behindern, indem sie den DNA-Schaden vor NER-Mechanismen abschirmen (Huang *et al.*, 1994; Reeves und Adair, 2005). Persistenterere DNA-Addukte führen dann ebenso zu vermehrtem Zelltod. Wie schon für MMR-Proteine beschrieben, binden auch HMG-Proteine besser an Cis- bzw. Carboplatin-DNA-Addukte als an Oxaliplatin-DNA-Addukte (Vaisman *et al.*, 1999). Auch mittels dieser HMG-Proteine ließe sich folglich die außerordentliche Zytotoxizität von Cisplatin im Gegensatz zu Oxaliplatin, nicht aber die geringe und verspätet auftretende Zytotoxizität von Carboplatin in dieser Arbeit erklären.

Außerdem gibt es Studien, die zeigen, dass Cisplatin auch mitochondriale DNA-Schäden verursacht, die wesentlich an dessen Zytotoxizität beteiligt sind (Marullo *et al.*, 2013; Wisnovsky *et al.*, 2013). Dabei scheint vor allem die resultierende Induktion von ROS eine wesentliche Rolle zu spielen. Für Carboplatin ist eine geringere Bildung von ROS bekannt (Marullo *et al.*, 2013), sodass prinzipiell dessen geringere Zytotoxizität in dieser Arbeit auch daher rühren könnte. Zudem bindet das hydrierte, hoch reaktive Cisplatin vor allem

an schwefelhaltige Moleküle wie Glutathion (GSH) (Fuertes *et al.*, 2003; Karasawa *et al.*, 2013), was ebenso zu mitochondrialem, oxidativem Stress sowie Fehlfunktionen durch Lipidperoxidation führen kann (Kruidering *et al.*, 1997). Auch werden antioxidative Enzyme wie die Glutathion-S-Transferase, Glutathionperoxidase und die Superoxid-dismutase inhibiert (Sadzuka *et al.*, 1992; Khyriam und Prasad, 2002), was wiederum zu einer erhöhten Menge an ROS in den Zellen führt.

Des Weiteren gibt es Studien, die in Ergänzung zu ROS nitrosativen Stress für die Cisplatinzytotoxizität verantwortlich machen. So erhöht Cisplatin die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (*inducible nitric oxide synthase*; iNOS) (Mukhopadhyay *et al.*, 2010). Die Überexpression dieser iNOS führt zu vermehrter Bildung von Stickstoffmonoxid, das zusammen mit dem Hyperoxidanion zu Peroxynitrit reagiert. Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit stellen zusammen als reaktive Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*; RNS) hochreaktive Verbindungen, ähnlich wie ROS, dar. Auch diese RNS könnten an der unterschiedlich ausgeprägten Zytotoxizität der Platinverbindungen in dieser Arbeit beteiligt sein. Zudem wäre auch eine Beteiligung von inflammatorischen Prozessen z. B. über den *tumor necrosis factor* α (TNF- α) (Zhang *et al.*, 2007) denkbar.

Da NRK-52E-Zellen nach Behandlung mit den Platinverbindungen zwar weniger DSBs aufweisen als RGE-Zellen, aber mehr Apoptose induzieren, könnten auch dabei einige der genannten DNA-schadensunabhängige Mechanismen eine wesentliche Rolle spielen.

4.1.7 ZUSAMMENFASSUNG DER MOLEKULAREN WIRKUNG VON CIS-, OXALI- UND CARBOPLATIN AUF RENALE PROXIMALE TUBULUSEPITHEL- UND GLOMERULÄRE ENDOTHELZELLEN

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass neben Schäden an tubulären Epithelzellen, auch Beeinträchtigungen der glomerulären Endothelzellen an der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität als Nebenwirkung einer Chemotherapie beteiligt sein könnten. Die extensive Aktivierung der DNA-Schadensantwort durch Cisplatin geht mit seinem außerordentlich zytotoxischen Potenzial auf Nierenzellen einher. Während proximale Tubulusepithelzellen nach Behandlung mit den Platinverbindungen vor allem Apoptose induzieren, aktivieren glomeruläre Endothelzellen nach Exposition mit äqui-

toxischen Konzentrationen vor allem Checkpointkontrollmechanismen, die zu Zellzyklusarrest und somit zu einer möglicherweise verlängerten DNA-Reparatur der zytotoxischen Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen führen. Die durch die Platinverbindungen induzierten Mechanismen der DNA-Schadensantwort sind unerwartet komplex und zeigen eine außerordentliche Zelltyp- sowie Agensspezifität (siehe Abbildung 4.1). Wie bereits in mehreren Studien zusammengefasst (Siddik, 2003; Kelland, 2007; Rabik und Dolan, 2007; Karasawa und Steyger, 2015), kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden, dass der durch die Platinverbindungen induzierten Zytotoxizität eine Vielzahl von Mechanismen zugrunde liegen. Von den drei untersuchten Platinverbindungen Cis-, Oxali- und Carboplatin ist letzteres durch eine verspätet auftretende Zytotoxizität charakterisiert, die im Wesentlichen auf Kinetikunterschieden in der Bildung der zytotoxischen DNA-Addukte zu beruhen scheint. In dieser Arbeit zeigten sich außerordentlich komplexe agens- und zelltypspezifische Zellantworten der proximalen Tubulusepithel- und glomerulären Endothelzellen auf eine Behandlung mit äquitoxischen Dosen von Cis-, Oxali- oder Carboplatin. Dabei ist zu bisherigem Zeitpunkt noch unklar, ob die zelltypspezifischen Unterschiede auf der unterschiedlichen Lokalisation in der Niere (proximaler Tubulus *versus* Glomerulus) oder auf Unterschieden zwischen Epithel- und Endothelzellen beruhen. Dennoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die bisher im Hinblick auf die Nephrotoxizität nur geringfügig untersuchten Glomeruli neben den proximalen Tubuli einen weiteren Angriffspunkt für mögliche nephroprotektive Strategien darstellen könnten.

4.2 PHARMAKOLOGISCHE STRATEGIEN ZUR PROTEKTION VON NIERENZELLEN VOR CISPLATIN-INDUZIRTER ZYTOTOXIZITÄT

Obwohl die Verwendbarkeit von Cisplatin durch seine, bereits in Abschnitt 4.1 diskutierte, schwerwiegende akute Nephrotoxizität limitiert ist (Arany und Safirstein, 2003; Kawai *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2007), existieren bisher nur wenige Strategien zur Nephroprotektion bei einer Cisplatinchemotherapie. Im Wesentlichen beziehen sich diese Ansätze auf eine ausreichende Hydrierung und somit einer Stimulation der Diurese. Weitere Ansätze mit pharmakologischen Modulatoren zeigten ebenfalls nephroprotektive Effekte. So konnte beispielsweise *in vivo* eine Verbesserung mit verschiedenen Antioxidanzien wie Desferrioxamin (Kadikoylu *et al.*, 2004), Inhibitoren organischer Kationentransporter wie

Cimetidin (Katsuda *et al.*, 2010) oder der Inhibition der γ -Glutamyltranspeptidase mittels eines nicht-kompetitiven Inhibitors (Hanigan *et al.*, 1994) erreicht werden. Allerdings werden (mit Ausnahme von Cimetidin, das in der oben genannten Studie die Antitumoraktivität von Cisplatin auf Osteosarkomzellen nicht beeinflusste (Katsuda *et al.*, 2010)) bei Verwendung dieser nephroprotektiven Substanzen Normalgewebszellen ebenso wie Tumorzellen geschützt, was diese Strategien für die klinische Verwendung limitiert.

Da vor allem für Cisplatin eine außerordentliche Nephrotoxizität beschrieben ist, stellte sich in dieser Arbeit die Frage nach der pharmakologischen Modulierbarkeit der Cisplatin-induzierten Stressantwort bei proximalen Nierentubuluszellen, die zumeist als Hauptangriffspunkt der Nephrotoxizität diskutiert werden (Arany und Safirstein, 2003). Um möglichst kurzfristig, ohne längere präklinische Studien, Abhilfe bei der dosislimitierenden Nephrotoxizität nach Cisplatinbehandlung zu schaffen, wurde sich in dieser Arbeit der bereits in der Klinik als Lipidsenker verwendeten Substanz Lovastatin zugewandt (Abschnitt 4.2.1). Neben ihrer lipidsenkenden Eigenschaft zeigen Statine protektive Effekte auf Normalgewebe: so schützen sie *in vitro* wie *in vivo* vor durch ionisierende Strahlung sowie durch Anthrazykline induzierter Toxizität (Damrot *et al.*, 2006; Nübel *et al.*, 2006; Ostrau *et al.*, 2009; Hülsenbeck *et al.*, 2011; Henninger *et al.*, 2015). In einigen dieser Studien konnte zudem eine Lovastatin-induzierte Protektion vor DNA-Schäden gezeigt werden (Damrot *et al.*, 2006; Hülsenbeck *et al.*, 2011). Somit lässt sich spekulieren, dass Statine möglicherweise noch weitreichendere protektive Effekte aufweisen und gegebenenfalls auch DNA-Schäden sowie die DNA-Schadensantwort als wesentliche Faktoren der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität (siehe Abschnitt 4.1) beeinflussen. Da einige Studien zudem antitumorigene Wirkungen von Statinen zeigten (Agarwal *et al.*, 1999; Agarwal *et al.*, 2002; Graaf *et al.*, 2004; Cafforio *et al.*, 2005; Fritz, 2005), könnten sie möglicherweise das therapeutische Fenster für Cisplatin-basierte Chemotherapien erweitern.

4.2.1 PROTEKTION VOR CISPLATIN-INDUZIRTER TOXIZITÄT DURCH LOVASTATIN

Für die Statine Simvastatin, Pravastatin sowie Rosuvastatin wurden bereits protektive Effekte gegenüber Cisplatin-induzierter Nephrotoxizität *in vivo* gezeigt (Iseri *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; An *et al.*, 2011; Fujieda *et al.*, 2011; Khoshnoud *et al.*, 2011;

Maheshwari *et al.*, 2013). Diese basieren nach bisheriger Annahme hauptsächlich auf antioxidativen sowie antiinflammatorischen Effekten, worauf im späteren Verlauf dieser Diskussion weiter eingegangen wird. Keine dieser Studien befasste sich bisher jedoch mit den direkten DNA-Schäden sowie der DNA-Schadensantwort nach Cisplatinbehandlung.

In dieser Arbeit wurde sich darauf aufbauend der Frage gewidmet, ob die in Abschnitt 4.1 diskutierte, spezifische Stressantwort von NRK-52E-Zellen auf eine Cisplatinbehandlung mittels des Lipidsenkers Lovastatin moduliert werden kann und dies gegebenenfalls zytoprotektive Effekte zur Folge hat.

4.2.1.1 INHIBITION DER CISPLATIN-INDUZIERTEN DNA-SCHADENSANTWORT

Mechanismen der DNA-Schadensantwort als komplexes Signalsystem, das durch DSBs sowie Replikationsstress aktiviert wird, sind wesentlich für das Zellschicksal mitverantwortlich (Harper und Elledge, 2007). Während der DNA-Schadensantwort wird entweder ein Zellzyklusarrest induziert, der DNA-Reparatur und damit das Zellüberleben ermöglicht oder es wird über Caspasen Apoptose eingeleitet (siehe Abbildung 1.4). Da diese DNA-Schadensantwort wesentlich durch Cisplatin-induzierte DNA-Schäden aktiviert wird (siehe Abschnitt 4.1), stellte sich die Frage ob sie möglicherweise einen Angriffspunkt für nephroprotektive Strategien darstellen könnte und eine Modulation der DNA-Schadensantwort somit protektive Effekte auf Nierenzellen hätte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde der Einfluss von Lovastatin auf die Aktivierung der DNA-Schadensantwort von NRK-52E-Zellen ausführlich analysiert, indem ATM- und ATR-katalysierte Phosphorylierungsreaktionen sowie die Aktivierung von MAPK-Signalwegen mit phosphospezifischen Antikörpern mittels Western Blot-Analysen untersucht wurden. Dabei konnte eine nahezu vollständige Reduktion der ansonsten dosisabhängigen DNA-Schadensantwort auf Ebene von p-ATM, p-ATR, p-P53, p-CHK1, p-CHK2 und p-KAP1 unmittelbar sowie 4 h nach der Cisplatinbehandlung gezeigt werden (Abbildung 3.20). Auch nach 24 h Postinkubation in Cisplatinabwesenheit ist die DNA-Schadensantwort noch reduziert, allerdings in geringerem Ausmaß. Diese inhibitorischen Effekte auf die Cisplatin-induzierte DNA-Schadensantwort könnten (i) auf einer direkten Interaktion von Lovastatin mit Mechanismen der DNA-Schadensantwort oder (ii) auf einer Reduktion von initialen DNA-Schäden beruhen.

4.2.1.2 EINFLUSS VON LOVASTATIN AUF DIE BILDUNG UND REPARATUR VON CISPLATIN-INDUZIERTEN DNA-SCHÄDEN

Die im Rahmen der durchgeführten Western Blot-Analysen beobachtete Reduktion von γ H2AX nach Lovastatinvorbehandlung deutet zunächst auf verminderte DNA-Schäden hin. Um dem weiter nachzugehen, wurde der Einfluss der Lovastatinvorbehandlung auf die Bildung von Cisplatin-induzierten DNA-Strangbrüchen anhand der Induktion von nukleären γ H2AX-Foci sowie eines alkalischen und neutralen Comet-Assays analysiert. Zudem wurde die Menge an Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen mittels Southwestern Blot-Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Lovastatinvorbehandlung eher zu einer Erhöhung der Menge an DNA-Strangbrüchen führt als sie zu reduzieren (Abbildung 3.21 und 3.22). Ähnliches wurde auch von COETSEE *et al.* für Statine beobachtet, die zeigten, dass Prava-, Simva- und Atorvastatin DNA-Schäden in murinen Großhirnen induzieren (Coetsee *et al.*, 2008). Somit basiert der in dieser Arbeit gezeigte zyto-protective Effekt von Lovastatin auf NRK-52E-Zellen nicht auf einer unmittelbaren Reduktion des DNA-Schadens. Die eingangs beschriebenen, nach Lovastatinvorbehandlung verringerten γ H2AX-Signale in den Western Blot-Analysen scheinen demnach eher von einer weniger geblockten Replikation oder Transkription herzurühren (Dickey *et al.*, 2009; Redon *et al.*, 2011) als von einer reduzierten Anzahl an DSBs. In *in vivo*-Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass Lovastatin IR-induzierte proinflammatorische und -fibrotische Antworten sowie Zelltod in Normalgewebe inhibiert, aber die DNA-Schadensinduktion nicht beeinflusst (Ostrau *et al.*, 2009). Zudem zeigten *in vitro*-Analysen mit humanen Hepatomzellen (HepG2-Zellen) (Ostrau *et al.*, 2009) und Endothelzellen (HUVECs) (Nübel *et al.*, 2006) keine Verminderung der durch IR induzierten γ H2AX-Foci nach Lovastatinbehandlung. Die Untersuchungen zu den DNA-Addukten und -Strangbrüchen in dieser Arbeit zeigen keine, durch Lovastatin geförderte, Reparatur, wie von OSTRU *et al.* für IR beschrieben worden ist (Ostrau *et al.*, 2009). Lovastatin zeigte in bisherigen Studien außerdem zytoprotective Effekte gegen das Anthrazyklin Doxorubicin in HUVECs (Wartlick *et al.*, 2013) sowie in Kardiomyoblasten aus der Ratte (H9c2-Zellen) (Hülsenbeck *et al.*, 2011). Dies ging mit einer verminderten Inhibition der Topoisomerase II durch Doxorubicin und, im Gegensatz zu den Daten dieser Arbeit, mit einer nachfolgenden Reduktion von DSBs einher (Hülsenbeck *et al.*, 2011; Wartlick *et al.*, 2013). Abhängig von dem Toxizität-induzierenden Agens scheinen Statine also entweder initiale DNA-Schäden

zu verringern und somit nachfolgend die DNA-Schadensantwort zu beeinflussen oder mit anderen Mechanismen zu interagieren. Da in dieser Arbeit die gesamte, Cisplatin-induzierte, ATM und ATR nachgeschaltete DNA-Schadensantwort durch die Lovastatinvorbehandlung deutlich reduziert wird, ohne dass aber der direkte DNA-Schaden beeinflusst wird, könnte das Target für Lovastatin gegebenenfalls auf Ebene der DNA-Schadenserkenkung, wie z. B. dem MRN-Komplex, zu finden sein. Dieser besteht aus den Proteinen MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 und NBS1 (Nibrin) und dient als Detektor von DSBs (Lavin *et al.*, 2005). Der MRN-Komplex ermöglicht so die Bindung von ATM an DSBs (Bakkenist und Kastan, 2003). MAHMOUDI *et al.* zeigten bereits, dass Atorvastatin die DNA-Schadensreparatur in Zellen der glatten Muskulatur nach Behandlung mit dem Topoisomerase II-Hemmer Etoposid oder oxidativem Stress durch Stabilisierung von NBS1 beschleunigen kann (Mahmoudi *et al.*, 2008). So wäre auch möglich, dass die Zytrotektion durch Lovastatin vor Cisplatin auf einer Beeinflussung des MRN-Komplexes beruht. Nach der Bindung von ATM an den DSB dissoziiert das zunächst inaktive ATM-Dimer in Monomere, die autophosphoryliert werden (Bakkenist und Kastan, 2003). Diese Dissoziations- und Autophosphorylierungsschritte könnten ebenfalls ein mögliches Target für Lovastatin darstellen.

Die mRNA-Expressionsanalyse von Cisplatin-suszeptibilitätsfaktoren, die vermutlich mit Apoptose, DNA-Reparatur und Transport in Verbindung stehen (Abbildung 3.23), zeigt vor allem 8 h nach der Lovastatinvorbehandlung eine antiapoptotische Prädisposition mit reduzierter *Bax*- und erhöhter *Xiap*-mRNA-Expression. Außerdem ist die mRNA-Expression von DNA-Reparaturfaktoren, vor allem von *Ercc1*, das in die NER involviert ist (siehe auch Abschnitt 4.1), erhöht, sodass bereits zu Beginn der Cisplatinbehandlung eine erhöhte Reparaturkapazität vorhanden zu sein scheint. Diese Hypothese konnte mittels der Doppelstrangbruchanalysen sowie der Southwestern Blot-Analyse der DNA-Intrastrangverknüpfungen nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung stellt die simultan erhöhte mRNA-Expression der Transporter, vor allem des Cisplatinimporters *Ctr1* (Ishida *et al.*, 2002) dar. So gelangt eine erhöhte Menge an Cisplatin in die Zelle, was zu vermehrten DNA-Schäden führen kann. Zwar ist die mRNA-Expression des Cisplatinexporters *Mrp2* (Rabik und Dolan, 2007) ebenfalls erhöht, allerdings in geringerem Ausmaß als die des Importers *Ctr1*. Zudem ist die Veränderung der oben genannten Cisplatin-suszeptibilitätsfaktoren transienter Natur und bereits 24 h nach der Zytostatika-

behandlung nicht mehr zu detektieren. Da sich die Veränderungen in der mRNA-Expression offensichtlich nicht auf die Reparatur der Cisplatin-induzierten Intrastrangverknüpfungen bzw. der Strangbrüche auswirken, zumindest nicht bis 24 h nach der Behandlung, scheint diese transiente Erhöhung der mRNA-Mengen der Reparaturfaktoren nicht von physiologischer Relevanz zu sein.

4.2.1.3 EINFLUSS VON LOVASTATIN AUF DIE CISPLATIN-INDUZIERT ZYTOTOXIZITÄT

Die Viabilitätsuntersuchungen zeigen dennoch, dass Lovastatin vor Zytotoxizität, die durch hohe Dosen von Cisplatin induziert wird, schützt (Abbildung 3.19). Bei niedrigen Cisplatin Dosen ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Dies könnte auf ein bereits bekanntes Lovastatin-induziertes Proliferationsdefizit (O'Donnell *et al.*, 1993) zu Beginn der Zytostatikabehandlung zurückzuführen sein, sodass die inhibierte Zytotoxizität von einem Proliferationseffekt durch Lovastatin überlagert sein könnte. Die Ergebnisse der Echtzeituntersuchungen mittels Impedanz zeigen, dass die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität nahezu vollständig durch die Lovastatinvorbehandlung aufgehoben wird (Abbildung 3.24). Die Tatsache, dass Lovastatin basal das erreichbare Maximum des normalisierten Zellindex über das in den unbehandelten Kontrollzellen erhöht, könnte auf eine veränderte Zellmorphologie und damit einer veränderten Impedanz (O'Donnell *et al.*, 1993; Maddala *et al.*, 2001) zurückzuführen sein. Die reduzierte Zytotoxizität von Cisplatin nach der Lovastatinvorbehandlung geht mit einer reduzierten SubG1-Fraktion als apoptotischer Zellpopulation einher (Abbildung 3.25). Die Zellen befinden sich nach der Lovastatinvorbehandlung vermehrt in einem G2/M-Phasenarrest.

Abbildung 4.2 zeigt ein mögliches Modell der Lovastatin-vermittelten Protektion vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität, wonach Lovastatin die DNA-Schadensantwort nachfolgend zu den DNA-Schäden inhibiert. Dadurch werden nachgeschaltete Prozesse wie Apoptose, Zellzyklusprogression und möglicherweise auch die DNA-Reparatur gehemmt. Letzteres wurde in dieser Arbeit nicht näher analysiert.

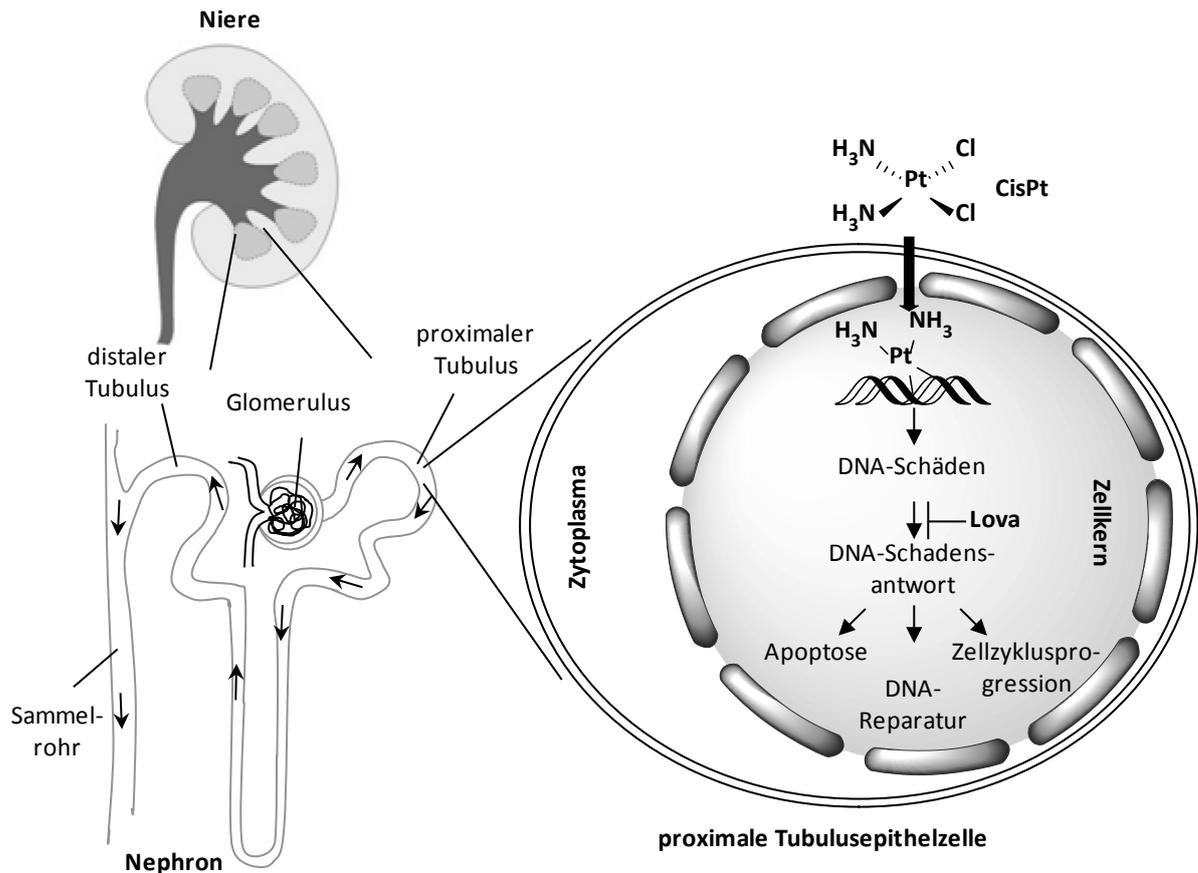


Abbildung 4.2: Modell der Inhibition der Cisplatin-induzierten DNA-Schadensantwort von proximalen Tubulusepithelzellen durch Lovastatin.

Aus den in dieser Arbeit gezeigten Daten ergibt sich die Hypothese, dass Lovastatin (Lova) proapoptische Cisplatin (CisPt)-induzierte Mechanismen der DNA-Schadensantwort nachgeschaltet von initialen DNA-Schäden in proximalen Tubulusepithelzellen hemmt. Dadurch werden möglicherweise nachfolgende Mechanismen der Apoptose und DNA-Reparatur gehemmt sowie der Zellzyklus arretiert.

4.2.1.4 WEITERE MÖGLICHE MECHANISMEN, DIE DER ZYTOPROTEKTION DURCH LOVASTATIN ZUGRUNDE LIEGEN KÖNNTEN

Wie einleitend bereits erwähnt, gibt es einige *in vivo*-Studien, die protektive Effekte von Statinen auf die durch Platinverbindungen induzierte Nephrotoxizität zeigen. Zum Beispiel schützt Simvastatin Nieren *in vivo*, indem es Lipidperoxidation und Fibrose inhibiert, den Glutathionpool erhöht sowie die neutrophile Infiltration unterdrückt (Iseri *et al.*, 2007; Khoshnoud *et al.*, 2011). Geringe Dosen von Pravastatin verbessern Cisplatin-induzierte Fehlfunktion und Proteinurie, indem die Menge an P53- sowie TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)-positiven, apoptotischen Zellen reduziert wird (Fujieda *et al.*, 2011). Weiterhin wirkt es antioxidativ (Fujieda *et al.*, 2011). Hohe Dosen von Pravastatin unterdrücken Cisplatin-induzierten oxidativen und nitrosativen Stress sowie die P38-Aktivierung (An *et al.*, 2011). Zudem verringert Pravastatin renale Schäden, die

durch Carboplatin induziert werden *in vitro* sowie *in vivo*, indem die ROS-Produktion gehemmt wird (Chen *et al.*, 2010). Kleine RAS-homologe (RHO)-GTPasen, und vor allem RAC1 (*RAS (rat sarcoma)-related C3 botulinum toxin substrate 1*) sind hauptsächliche Targets für pleiotrope Statineffekte (Rashid *et al.*, 2009). Der in dieser Arbeit gezeigte zytoprotektive Effekt von Lovastatin könnte theoretisch also auch durch eine Reduktion von ROS als Folge einer Inhibition von RAC1 bedingt sein. TAKEMOTO *et al.* zeigten, dass Statine einer Herzhypertrophie über antioxidative Mechanismen, die eine Inhibition von RAC1 beinhalten, vorbeugen können (Takemoto *et al.*, 2001). Auch MAACK *et al.* zeigten, dass eine verringerte RAC1-Aktivität vor ROS schützen kann (Maack *et al.*, 2003). Gegen diese Vermutung sprechen die Ergebnisse des Comet-Assays dieser Arbeit, welcher indirekt auch oxidativen Stress erfasst (Fang *et al.*, 2015). Zudem wurde in früheren *in vitro*-Arbeiten die Induktion von ROS nach Behandlung mit Doxorubicin nicht durch Lovastatin beeinflusst (Damrot *et al.*, 2006; Hülsenbeck *et al.*, 2011). Des Weiteren könnte Lovastatin die durch Cisplatin induzierte Überexpression der iNOS hemmen (siehe auch Abschnitt 4.1), wie es für Pravastatin bereits *in vivo* gezeigt wurde (An *et al.*, 2011).

Ungeklärt und für weitere Untersuchungen offen bleibt jedoch, wie genau Lovastatin die Mechanismen der DNA-Schadensantwort beeinflusst. Bisher wird, wie bereits zuvor erwähnt, davon ausgegangen, dass insbesondere die Inhibition von RAC1 für die pleiotropen Effekte der Statine verantwortlich ist (Rashid *et al.*, 2009). Daraus folgt die Hypothese, dass RAC1 auch an der in dieser Arbeit gezeigten Regulation der DNA-Schadensantwort durch Lovastatin beteiligt sein könnte. So wurde bereits gezeigt, dass die Funktion von RAC1 für die durch Topoisomerase II-Inhibitoren stimulierte DNA-Schadensantwort von wesentlicher Bedeutung ist (Hülsenbeck *et al.*, 2012; Wartlick *et al.*, 2013). In dieser Arbeit konnten jedoch keine Effekte des RAC1-spezifischen Inhibitors EHT1864 auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität gezeigt werden (Abbildung 8.5 des Anhangs). Daraus lässt sich schließen, dass andere RHO-GTPasen als RAC1 an der in dieser Arbeit untersuchten Cisplatin-stimulierten DNA-Schadensantwort beteiligt sein müssen oder RHO-GTPase-unabhängige Mechanismen zugrunde liegen. Aus Arbeiten von FRISAN *et al.* und GUERA *et al.* geht hervor, dass die durch Bakterientoxine induzierte DNA-Schadensantwort mit der RHO-GTPase RHOA, deren Isoprenylierung ebenfalls von Lovastatin gehemmt wird, assoziiert ist (Frisan *et al.*, 2003; Guerra *et al.*, 2011). So könnte

auch eine RHOA-Inhibition ausschlaggebend für die gezeigten Lovastatineffekte auf die DNA-Schadensantwort sein.

4.2.1.5 ZUSAMMENFASSUNG DER PROTEKTIVEN EFFEKTE VON LOVASTATIN AUF DIE CISPLATIN-INDUZIERTE ZYTOTOXIZITÄT VON NIERENZELLEN

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich zusammenfassen, dass die Reduktion der DNA-Schadensantwort in Ergänzung zu den in vorherigen Studien gezeigten antiinflammatorischen und antioxidativen Effekten von Statinen eine wichtige Rolle in der Lovastatin-vermittelten Protektion vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität zu spielen scheint. Die Resultate dieser Arbeit führen zu der Schlussfolgerung, dass Lovastatin klinisch nützlich sein könnte, um die dosislimitierende Nephrotoxizität von Cisplatin-basierten Chemotherapien zu mildern.

4.2.2 EINFLUSS DER SCHWAMMEXTRAKTE AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1 AUF DIE CISPLATIN-INDUZIERTE TOXIZITÄT

Naturstoffe wurden in letzter Zeit sowohl im Rahmen einer Monotherapie als auch in Kombination mit weiteren Chemotherapeutika vermehrt hinsichtlich ihres antitumorigenen Potenzials diskutiert (Spatafora und Tringali, 2012; Mohan *et al.*, 2013). Obwohl Naturstoffe meist als natürlich auftretende Antioxidanzien beschrieben werden (Repetto und Llesuy, 2002), wurden neben der Inhibition von Topoisomerasen (Shao *et al.*, 1999) sowie antiinvasiver Effekte auf Tumorzellen (Bracke *et al.*, 2008) vor allem die Induktion von ROS in Anwesenheit von Übergangsmetallionen wie Kupfer (Hadi *et al.*, 2007) als Gründe für ihr antitumorigenes Potenzial beschrieben. Bisher wurden zytoprotektive Aspekte von Naturstoffen gegen unerwünschte Nebenwirkungen von Chemotherapeutika wie den Platinverbindungen nur unzureichend untersucht. In dieser Arbeit wurde sich deshalb ausblickend der Frage gewidmet, ob sich proximale Tubulusepithelzellen mit den mechanistisch noch wenig untersuchten Alkaloiden aus marinen Schwämmen Aaptamin und Aeroplysinin-1 vor Cisplatin-induzierter Nephrotoxizität schützen lassen.

Bekannt ist bereits, dass das Alkaloid Aaptamin P53-unabhängig eine Induktion von P21^{WAF1} in Zellen der chronisch myeloischen Leukämie (CML) bewirkt (Jin *et al.*, 2011). Eine Aaptamin-induzierte, P53-unabhängige Aktivierung des P21-Promotors begleitet von

einem G2/M-Arrest wurde zudem in Osteosarkomzellen beschrieben (Aoki *et al.*, 2006). Aus Proteom-basierten Studien geht hervor, dass Aaptamin mit MYC (*avian myelocytomatosis viral oncogene*) sowie P53 interferiert (Dyshlovoy *et al.*, 2014). Das zweite in dieser Arbeit verwendete Alkaloid Aeroplysinin-1 inhibiert den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) in Brustkrebszellen (Kreuter *et al.*, 1990), wirkt antiproliferativ in humanen Epithelzellen des Zervixkarzinoms (HeLa-Zellen) und inhibiert die Expression inflammatorischer Zytokine (Martinez-Poveda *et al.*, 2012; Martinez-Poveda *et al.*, 2013). Da sowohl der von Aeroplysinin-1 beeinflusste EGF-Signalweg (Benhar *et al.*, 2002) als auch P53 (Jiang und Dong, 2008) bzw. P21^{WAF1} (Koster *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011), die von Aaptamin adressiert werden, eine Rolle in der Cisplatin-Sensitivität von Zellen spielen, könnten sowohl Aaptamin als auch Aeroplysinin-1 für die Vermittlung einer Cisplatinresistenz in Normalgewebiszellen bedeutsam sein. In Anlehnung an diese Hypothese konnten Aaptamin und Aeroplysinin-1 in vorausgehenden Arbeiten als bioaktive Bestandteile eines Pools aus mehreren Schwammextrakten als potenzielle Modulatoren der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität identifiziert werden (Funk *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse von Viabilitätsuntersuchungen der NRK-52E-Zellen in dieser Arbeit zeigen, dass Aaptamin die Resistenz von Nierenzellen gegenüber Cisplatin stärker beeinflusst als Aeroplysinin-1 (Abbildung 3.26 und Tabelle 3.4). Diese Resistenz ist spezifisch für Cisplatin und ist für Oxaliplatin weder in NRK-52E- noch in RGE-Zellen zu finden. Hier tritt eher eine Sensitivierung auf. Um einen möglichen, in der Klinik unerwünschten, zytoprotektiven Effekt der Alkaloide auf Tumorzellen auszuschließen, wurden humane Blasenurothelkarzinomzellen (RT-112-Zellen) in die Viabilitätsuntersuchungen miteinbezogen. Diese ergaben, dass Aaptamin den durch Cis- bzw. Oxaliplatin induzierten Viabilitätsverlust bei RT-112-Zellen nicht kompensieren kann. Aeroplysinin-1 hingegen bewirkt eine etwas höhere Resistenz gegenüber den Platinverbindungen bei RT-112-Zellen. Die Aktivität von Aaptamin wurde von DYSHLOVOY *et al.* bereits in Cisplatin-resistenten embryonalen Karzinomzellen (NT2-R-Zellen) und den entsprechenden Wildtypzellen (NT2-Zellen) untersucht. Dabei zeigte sich, dass Cisplatin-resistente Zellen ebenso sensitiv gegenüber Aaptamin sind wie Wildtypzellen, was eine Aaptaminbehandlung von Cisplatin-resistenten Tumoren ermöglicht (Dyshlovoy *et al.*, 2014). Zudem zeigte Aaptamin in dieser Studie eher eine antiproliferative Aktivität als eine effiziente Induktion von

Apoptose. Dies stimmt mit der nicht verringerten SubG1-Fraktion (Abbildung 3.27) sowie der unveränderten Expression der Effektorcaspase 7 in den Western Blot-Analysen (Abbildung 3.30) trotz der deutlichen protektiven Effekte in den Viabilitätsuntersuchungen dieser Arbeit überein.

4.2.2.1 EINFLUSS VON AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1 AUF DIE INDUKTION VON CISPLATIN-INDUZIERTEN DNA-SCHÄDEN UND DIE DNA-SCHADENSANTWORT

Mechanistisch basiert die Cisplatinresistenz von Tumorzellen vermutlich neben Detoxifizierungs-, DNA-Reparatur- sowie Zelltodmechanismen unter anderem auf dem Cisplatintransport (verringertes Import sowie erhöhter Export) (Galluzzi *et al.*, 2012). Cisplatin dient als Substrat für eine Reihe von Importern und Exportern (Liedert *et al.*, 2003; Owatari *et al.*, 2007; Yonezawa und Inui, 2011) (siehe auch Abschnitt 4.1). Einige dieser Transporter interagieren auch mit Oxaliplatin (Yonezawa und Inui, 2011), andere sind agensspezifisch (Kool *et al.*, 1997). Da Aaptamin ausschließlich vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität schützt und keine Kreuzresistenz zu Oxaliplatin zeigt, ist unwahrscheinlich, dass die Zytoprotektion durch Aaptamin auf Wechselwirkungen mit substratüberlappenden Transportern beruht. Um diese Hypothese zu unterstützen, wurde die Bildung von DNA-Schäden sowie die DNA-Schadensantwort unmittelbar nach der Behandlung mit Cisplatin bestimmt. Dafür wurden abermals nukleäre γ H2AX-Foci als Surrogatmarker für DSBs (Olive, 2004) analysiert. Es zeigte sich, dass Aaptamin die Menge an DNA-Addukten sowie an initialen nukleären γ H2AX-Foci nach Cisplatinbehandlung nicht nennenswert beeinflusst. Folglich hat Aaptamin keinen Einfluss auf Import- oder Exportmechanismen von Cisplatin. Der Ansatzpunkt des zytoprotektiven Effekts liegt vermutlich auch hier eher im Anschluss an den Import und der Induktion des DNA-Schadens in der nachfolgenden DNA-Schadensantwort.

Bisher wurde der Einfluss von Aaptamin und Aeroplysinin-1 auf zelluläre Stressantworten lediglich in wenigen Studien untersucht (Kreuter *et al.*, 1990; Aoki *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2011). Es gibt keine Studien darüber, inwiefern Aaptamin oder Aeroplysinin-1 die DNA-Schadensantwort in Nierentubulusepithelzellen aktivieren bzw. gentoxisch-induzierte Stressantworten modulieren können. In dieser Arbeit wurde nun diesbezüglich mittels Western Blot-Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht, ob Aaptamin bzw. Aeroplysinin-1 ein ausgewähltes Spektrum an DNA-Stressantwortmechanismen

stimulieren kann. Dabei wurde der Fokus abermals auf Mechanismen der DNA-Schadensantwort sowie auf die MAPK-Signalwege gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Cisplatin-induzierte Aktivierung des Tumorsuppressors P53 durch Aaptamin und mehr noch durch Aeroplysinin-1 inhibiert wird (Abbildung 3.30). Im Gegensatz dazu wird die Aktivierung von CHK1 nach Cisplatinbehandlung durch beide Alkaloide begünstigt, was einen Zellzyklusarrest und so möglicherweise eine verlängerte Reparaturphase zur Folge hat. Aus den Western Blot-Analysen lässt sich schlussfolgern, dass die beiden Alkaloide Aaptamin und Aeroplysinin-1 lediglich geringfügige, spezifische Effekte auf Mechanismen der durch Cisplatin induzierten DNA-Schadensantwort auf Normalgewebszellen ausüben. Entgegen den Erwartungen konnte in dieser Arbeit kein Einfluss von Aaptamin auf p21^{WAF1} gezeigt werden.

4.2.2.2 ZUSAMMENFASSUNG DER EFFEKTE VON AAPTAMIN UND AEROPLYSININ-1 AUF DIE CISPLATIN-INDUZIERT ZYTOTOXIZITÄT VON NIERENZELLEN

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vor allem das Alkaloid Aaptamin agensspezifisch sowohl proximale Tubulusepithelzellen als auch glomeruläre Endothelzellen, jedoch keine Blasenurothelkarzinomzellen, vor Cisplatinzytotoxizität schützt. Dies ist unabhängig von einer reduzierten Bildung zytotoxischer DNA-Addukte und resultiert daher vermutlich von einer Interaktion mit der Cisplatin-induzierten DNA-Schadensantwort oder DNA-schadensunabhängigen Mechanismen. Aeroplysinin-1 zeigt wesentlich geringere zytoprotektive Effekte in den Viabilitätsuntersuchungen. Zusammengenommen mit den Studien von DYSHLOVOY *et al.*, wonach Aaptamin toxisch bei Cisplatin-resistenten Tumoren wirkt (Dyshlovoy *et al.*, 2014), zeigt die Zytoprotektion von Normalzellen in dieser Arbeit, dass Aaptamin das therapeutische Fenster für Cisplatin-basierte Chemotherapien wesentlich erweitern könnte.

5 AUSBLICK

Der erste Teil dieser Arbeit zeigt *in vitro* eine unerwartet hohe Sensitivität von glomerulären Endothelzellen (RGE-Zellen) gegenüber Platinverbindungen, die einigen *in vivo*-Studien widerspricht (Arany und Safirstein, 2003; Yao *et al.*, 2007). Um zu überprüfen, ob die erhöhte Sensitivität der RGE-Zellen im Vergleich zu tubulären NRK-52E-Zellen durch verminderte mitochondriale Aktivität oder tatsächlich durch erhöhte Zytotoxizität bedingt ist, wären Viabilitätsuntersuchungen, die unabhängig von der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen sind, erforderlich. Dazu wäre neben dem in dieser Arbeit bereits gezeigten LDH-Assay ein Neutralrot-Assay (Löwik *et al.*, 1993) zu empfehlen. Dieser beruht darauf, dass lebende Zellen den basischen Farbstoff 2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin (Neutralrot) in die Lysosomen aufnehmen. Zudem bleibt durch Untersuchungen weiterer Endothel- bzw. Epithelzelllinien zu überprüfen, ob die beobachteten Unterschiede möglicherweise eher in dem Gewebeursprung der Zellen (Endothel *versus* Epithel) begründet liegen oder tatsächlich einen Vergleich von Glomerulus und Tubulus widerspiegeln. Anbieten würden sich hierfür glomeruläre Epithelzellen wie z. B. SGE1-Zellen (Kawaguchi *et al.*, 1994).

Da eine erhöhte Gesamtzellplatinierung, wie sie in dieser Arbeit für Carboplatin gemessen wurde, aufgrund von intrazellulären Detoxifizierungsprozessen nicht zwangsläufig zu einer vermehrten DNA-Platinierung führen muss, sollte diese nach Behandlung mit äquivalenten Konzentrationen der Platinverbindungen ergänzend z. B. mittels ICP-MS gemessen werden. Zudem wäre es für zukünftige vergleichende Southwestern Blot-Analysen von Vorteil auch Oxaliplatin-DNA-Addukte detektieren zu können, was einen entsprechenden Antikörper erforderlich machen würde.

Die der Apoptoseinduktion zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Es ist bekannt, dass Cisplatin unter anderem den extrinsischen Apoptoseweg über Todesrezeptoren in der Membran aktiviert (Karasawa und Steyger, 2015). Um zu überprüfen, ob der gezeigten Apoptoseantwort nach Cis-, Oxali- bzw. Carboplatinbehandlung dieser extrinsische Apoptoseweg zugrunde liegt oder Apoptose eher über den intrinsischen Weg unter Beteiligung der Mitochondrien aktiviert wird, könnten z. B. TNF-defiziente Nierenzellen verwendet werden. Sofern der extrinsische Weg hier wesentlich an der Apoptose beteiligt ist, sollten diese Zellen

resistent gegenüber Platinverbindungen sein (Tsuruya *et al.*, 2003). Zudem ließe sich die Aktivität der Caspasen 8 und 9 als beteiligte Enzyme an dem extrinsischen bzw. intrinsischen Apoptosesignalweg z.B. mittels Western Blot-Analysen untersuchen.

Allgemein wäre die Beteiligung von DNA-schadensunabhängigen Mechanismen an der Gesamtzytotoxizität der Platinverbindungen zu bestimmen. So bliebe z. B. anlehnend an Studien, die eine Beteiligung von mitochondrialen DNA-Schäden an der Cisplatin-zytotoxizität zeigten (Marullo *et al.*, 2013; Wisnovsky *et al.*, 2013) zu überprüfen, inwiefern bei äquitoxischen Konzentrationen der verschiedenen Platinverbindungen solche Läsionen relevant sind. Dazu wären eine Mitochondrienisolation, z. B. mittels Dichtegradientenzentrifugation, und eine anschließende quantitative Erfassung der mitochondrialen DNA-Addukte angebracht. Indirekt ließe sich so zudem der Einfluss von DNA-Reparatur auf die Prozessierung von Pt-DNA-Addukten (genomische *versus* mitochondriale DNA-Addukte) studieren, da Mitochondrien NER-unfähig sind (Blasiak *et al.*, 2013). Um den Beitrag der DNA-Schäden an der Gesamtzytotoxizität unabhängig von gegebenenfalls überlagernden ROS-Ereignissen zu untersuchen, könnten Zellen zusätzlich mit Antioxidanzien wie N-Acetylcystein, wofür bereits eine Protektion vor Cisplatin-induzierter Nephrotoxizität gezeigt worden ist (Dickey *et al.*, 2005), behandelt werden. Die Beteiligung verschiedener Proteininteraktionen an der Zytotoxizität der Platinverbindungen ließe sich mittels eines Pulldown-Assays anlehnend an Studien von KARASAWA *et al.* untersuchen (Karasawa *et al.*, 2013). In dem Zusammenhang wäre z. B. zu überprüfen, ob sich RGE- und NRK-52E-Zellen in der Expression des *heat shock proteins 90* (HSP90) unterscheiden, da eine erhöhte HSP90-Expression mit Cisplatin-sensitivität einhergeht (Karasawa *et al.*, 2013). Um die Relevanz der NER bei der Reparatur von Platin-DNA-Addukten im Vergleich zwischen tubulären NRK-52E- und glomerulären RGE-Zellen weiter zu analysieren, könnten Faktoren der NER (sowohl spezifisch für TC- als auch für GG-NER) in beiden Zelllinien z. B. mittels *small interfering RNAs* (siRNAs) herunter reguliert werden und anschließend Veränderungen in der durch die Platinverbindungen induzierten Zellantworten überprüft werden.

Um ein mögliches Target für die Lovastatin-vermittelte Zytoprotektion gegenüber Cisplatin zu identifizieren, sollte die DNA-Schadenserkennung auf Ebene des MRN-Komplexes weiter untersucht werden. Möglicherweise könnten dafür immunzyto-

chemische Färbungen (Foci-Analysen) von MRE11, Rad50 und NBS1 hilfreich sein. Um mögliche Einflüsse von Lovastatin auf den Cisplatintransport weiter auszuschließen, wäre abermals die Bestimmung der Gesamtzellplatinierung mittels ICP-MS sinnvoll. Auch wäre eine Überprüfung der ROS-Beteiligung an der Lovastatin-vermittelten Protektion vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität z. B. mit einem 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF)-Assay (Held und Newick, 2009) hilfreich. Zudem wurde bisher nicht überprüft, ob die Lovastatin-vermittelte Zytoprotektion Cisplatin-spezifisch ist oder auch auf andere Platinverbindungen wie Oxali- und Carboplatin übertragbar ist. Des Weiteren wäre hinsichtlich einer klinischen Anwendbarkeit auszuschließen, dass Lovastatin ähnlich protektive Effekte auf die Cisplatin-induzierte DNA-Schadensantwort von Tumorzellen hat. Zu überprüfen bliebe auch, ob die protektive Wirkung von Lovastatin auf proliferierende Zellen in der Zellkultur beschränkt ist, oder, was klinisch von weitaus größerer Relevanz wäre, auch nichtproliferierende Nierenzellen *in vivo* vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität schützen kann, wie es für Simvastatin, Pravastatin und Rosuvastatin bereits ansatzweise gezeigt worden ist (Iseri *et al.*, 2007; An *et al.*, 2011; Maheshwari *et al.*, 2013). Hierfür wären weitere Versuche mit nichtproliferierenden Nierenzellen sowie *in vivo*-Studien mit nachfolgender Untersuchung der DNA-Schadensantwort renaler Zellen erforderlich. Um eine mögliche Beteiligung der RHO-GTPase RHOA, für welche bereits eine Beteiligung an der DNA-Schadensantwort gezeigt worden ist (Frisan *et al.*, 2003), an der Lovastatin-vermittelten Zytoprotektion zu überprüfen, wäre die Verwendung von Hemmstoffen RHOA-vermittelter Signalwege, wie z. B. dem *RHO-associated coiled-coil-containing protein kinase* (ROCK)-Inhibitor Y-27632 (Ishizaki *et al.*, 2000), denkbar.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stressantworten auf Behandlung mit verschiedenen Platinverbindungen außerordentlich agens- und zelltypspezifisch sowie zeitabhängig sind. Folglich wären für die Analyse der molekularen Mechanismen der Aaptamin-vermittelten Cisplatinresistenz weiterführende Studien, die ein breiteres Spektrum sowie weitere Zeitpunkte der DNA-Schadensantwortsmechanismen umfassen, durchzuführen. So könnte womöglich ein Target für die Aaptamin-vermittelte Zytoprotektion gegenüber Cisplatin-induzierter Zytotoxizität identifiziert und damit ein Modell für die grundlegenden Mechanismen entwickelt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Platinverbindungen, wie die in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin, werden in der onkologischen Klinik als Chemotherapeutika zur Behandlung diverser solider Tumorarten verwendet. Hauptanwendungsgebiet von Cis- und Carboplatin stellen dabei Tumore des Urogenitaltrakts sowie Kopf-Hals- und Lungentumore dar, während Oxaliplatin hauptsächlich zur Behandlung von Kolorektalkarzinomen verwendet wird. Die drei Platinverbindungen unterscheiden sich zudem hinsichtlich ihrer dosislimitierenden Nebenwirkungen. Für Cisplatin ist diesbezüglich eine starke Nephrotoxizität zu nennen, wobei nach bisherigem Kenntnisstand vor allem proximale Nierentubuluszellen geschädigt werden. Oxali- und vor allem Carboplatin gelten als weniger nephrotoxisch.

In dieser Arbeit wurde die molekulare Wirkung der drei oben genannten Platinverbindungen auf Nierenzellen untersucht. Dazu wurden renale proximale Tubulusepithelzellen (NRK-52E-Zellen) mit glomerulären Endothelzellen (RGE-Zellen) als *in vitro*-Modellsysteme hinsichtlich ihrer qualitativen sowie quantitativen Unterschiede in den Stressantworten nach Behandlung mit äquitoxischen Konzentrationen von Cis-, Oxali- oder Carboplatin verglichen. Der Fokus der Analysen wurde dabei vor allem auf, der Zytotoxizität durch die Platinverbindungen möglicherweise zugrunde liegende, DNA-schadensabhängige Mechanismen und insbesondere auf die resultierende DNA-Schadensantwort gelegt. Die Analysen ergaben, dass Cisplatin die Viabilität von NRK-52E- sowie RGE-Zellen am effizientesten beeinflusst. Carboplatin-induzierte Zytotoxizität tritt mit einer zeitlichen Latenz im Vergleich zu Cis- und Oxaliplatin auf, die vermutlich auf verspätet gebildeten Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen beruht. RGE-Zellen sind gegenüber allen drei Platinverbindungen sensitiver als NRK-52E-Zellen. Während in NRK-52E-Zellen Caspase-vermittelt Apoptose induziert wird, reagieren RGE-Zellen auf eine Behandlung mit äquitoxischen Dosen der Platinverbindungen bevorzugt mit einem G2/M-Phasenarrest. Die Aktivierung der DNA-Schadensantwort ist außerordentlich agens- und zelltypspezifisch sowie zeitabhängig. Die deutlichste Stimulation der DNA-Schadensantwort erfolgt in beiden Zelltypen nach Cisplatinbehandlung. Die Reparatur der zytotoxischen Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen ist in RGE-Zellen effizienter als in NRK-52E-Zellen. Eine erhöhte Reparaturkapazität der RGE-Zellen zeigt sich auch in einer vermehrten, basalen mRNA-Expression von Nukleotidexzisionsreparaturfaktoren. Aus den

Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass neben tubulären Zellen auch glomeruläre Zellen ein relevantes Target für Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität darstellen könnten. Die Mechanismen, welche der Zytotoxizität nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin zugrunde liegen, sind zudem hochgradig agens- sowie zelltypspezifisch.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit mögliche pharmakologische Modulatoren der Cisplatinempfindlichkeit gesucht, um Nierenzellen vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität zu schützen. In diesem Rahmen wurde der Einfluss des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Lovastatin auf die DNA-Schadensantwort von Cisplatin in NRK-52E-Zellen analysiert. Die Analysen ergaben, dass Lovastatin die Cisplatin-induzierte DNA-Schadensantwort, vor allem auf Ebene von p-ATM, p-P53, p-CHK1, p-CHK2 sowie p-KAP1, wesentlich inhibiert. Diese verringerte DNA-Schadensantwort geht nicht mit einer verringerten Anzahl an initialen DNA-Schäden, gemessen anhand der Bildung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen sowie von DNA-Strangbrüchen, einher. So lässt sich schlussfolgern, dass Lovastatin NRK-52E-Zellen vermutlich unabhängig von initialen DNA-Schäden vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität schützt. Hinsichtlich klinischer Anwendung zeigen die Daten, dass Lovastatin somit nützlich sein könnte, um Cisplatin-induzierter, dosis-limitierender Nephrotoxizität entgegenzuwirken. Des Weiteren wurden ausgewählte Substanzen aus marinen Schwämmen (Aaptamin und Aeroplysinin-1) hinsichtlich einer möglichen Protektion der Nierenzellen vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität untersucht. Dabei ergab sich, dass Aaptamin ausschließlich Resistenz gegenüber Cisplatin, aber nicht gegenüber Oxaliplatin vermitteln kann. Zudem werden Tumorzellen nicht vor Cisplatin-zytotoxizität geschützt. Die Protektion durch Aaptamin basiert nicht auf einer reduzierten Bildung von DNA-Schäden. Aaptamin und Aeroplysinin-1 beeinflussen die Cisplatin-induzierte DNA-Schadensantwort (p-P53 und p-CHK1) nur marginal. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass das Alkaloid Aaptamin Cisplatin-induzierte Schäden in Nierenzellen verbessert, der zugrunde liegende molekulare Mechanismus aber noch ungeklärt ist. Folglich könnte Aaptamin möglicherweise ein weiteres Werkzeug darstellen, um das therapeutische Fenster der Cisplatin-basierten Chemotherapie zu erweitern.

SUMMARY

Platinating agents, including cisplatin, oxaliplatin and carboplatin, are frequently used in the oncological clinic as chemotherapeutics for the treatment of various types of solid tumors. Cis- and carboplatin are extensively used in the therapy of urogenital as well as head and neck and lung cancers, whereas oxaliplatin is particularly useful for colorectal cancer treatment. The three platinating agents further differ in their dose-limiting adverse effects. The clinically most relevant adverse effect associated with cisplatin treatment is nephrotoxicity, where mainly cells of the proximal tubules are affected. Oxaliplatin and especially carboplatin are considered to be less nephrotoxic.

In this work, the molecular effect of the three aforementioned platinating agents on normal kidney cells was analyzed. To this end, renal proximal tubular epithelial cells (NRK-52E cells) were compared with glomerular endothelial cells (RGE cells) as *in vitro* model systems regarding their qualitative as well as quantitative differences in the stress responses after treatment with equitoxic concentrations of cis-, oxali- or carboplatin. The main focus of the analyses laid on DNA-damage related mechanisms, which are believed to be most relevant for cytotoxicity induced by platinating agents, in particular on the DNA damage response (DDR). The analyses showed that out of the various platinating agents tested cisplatin reduces the viability of NRK-52E and RGE cells most efficiently. Carboplatin-induced cytotoxicity occurs with a time-delay in comparison to cis- and oxaliplatin, which is presumably related to a retarded formation of Pt-(GpG) intrastrand crosslinks. RGE cells are more sensitive towards all three platinating agents than NRK-52E cells. While there is efficient caspase-mediated apoptosis in NRK-52E cells, RGE cells favour a G2/M-phase arrest when treated with equitoxic concentrations of the platinating agents. The activation of the DDR is strikingly agent- and cell type-specific as well as time-dependent. The most substantial stimulation of the DDR in both cell lines is provoked by cisplatin. The repair of Pt-(GpG)-intrastrand crosslinks is more efficient in RGE than in NRK-52E cells. A higher repair capacity of RGE cells is also reflected by high mRNA-expression levels of nucleotide excision repair factors. From the results of this work it is concluded, that apart from tubular cells, glomerular cells might also be a relevant target for cisplatin-induced nephrotoxicity. Moreover, the mechanisms involved in the cytotoxicity of cis-, oxali- or carboplatin are exceptionally agent- and cell type-specific.

A further aim of this work was to find possible pharmacological modulators to protect kidney cells from cisplatin-induced cytotoxicity. Therefore, the influence of the HMG-CoA-reductase inhibitor lovastatin on the DDR of NRK-52E cells after cisplatin treatment was analyzed. The data show that lovastatin has extensive inhibitory effects on the cisplatin-induced DDR, as reflected on the level of p-ATM, p-P53, p-CHK1, p-CHK2 and p-KAP1 in western blot-analyses. This mitigation of cisplatin-induced DDR by lovastatin is independent of the initial formation of DNA damage as demonstrated by the analysis of Pt-(GpG)-intrastrand crosslink and DNA-strand break formation. Therefore it is concluded that Lovastatin protects NRK-52E cells from cisplatin-induced cytotoxicity independently from initial DNA damage. With respect to the clinic, the data indicate that lovastatin might be useful to mitigate cisplatin-induced nephrotoxicity. Moreover, two substances of marine sponges (aaptamine and aeroplysinin-1) were investigated as to their potency to protect normal rat kidney cells from cisplatin-induced cytotoxicity. The data show that aaptamine specifically confers resistance to cisplatin, but not to oxaliplatin. Moreover, cytoprotection was exclusively observed in normal cells. Protection by aaptamine does not rest on a reduced formation of DNA damage. Aaptamine and aeroplysinin-1 affect the cisplatin-stimulated DDR (p-P53 and p-CHK1) only marginally. The analyses show that the spongean alkaloid aaptamine alleviates cisplatin-induced damage in normal rat kidney cells. Therefore, aaptamine might be a further useful tool to widen the therapeutic window of cisplatin-based therapeutic regimen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Agarwal, B., Bhendwal, S., Halmos, B., Moss, S. F., Ramey, W. G. und Holt, P. R. (1999). Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 5(8): 2223-2229.
- Agarwal, B., Halmos, B., Feoktistov, A. S., Protiva, P., Ramey, W. G., Chen, M., Pothoulakis, C., Lamont, J. T. und Holt, P. R. (2002). Mechanism of lovastatin-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Carcinogenesis* 23(3): 521-528.
- Aktories, K., Forth, W. und Allgaier, C. (2009). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München, Elsevier: 929-984.
- Alberts, D. S. und Noel, J. K. (1995). Cisplatin-associated neurotoxicity: can it be prevented? *Anticancer Drugs* 6(3): 369-383.
- Alcindor, T. und Beauger, N. (2011). Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol* 18(1): 18-25.
- Aleksunes, L. M., Goedken, M. J., Rockwell, C. E., Thomale, J., Manautou, J. E. und Klaassen, C. D. (2010). Transcriptional regulation of renal cytoprotective genes by Nrf2 and its potential use as a therapeutic target to mitigate cisplatin-induced nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 335(1): 2-12.
- Ali, I., Wani, W. A., Saleem, K. und Haque, A. (2013). Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem* 13(2): 296-306.
- An, Y., Xin, H., Yan, W. und Zhou, X. (2011). Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity by pravastatin in mice. *Exp Toxicol Pathol* 63(3): 215-219.
- Ando, T., Kawabe, T., Ohara, H., Ducommun, B., Itoh, M. und Okamoto, T. (2001). Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J Biol Chem* 276(46): 42971-42977.
- Aoki, S., Kong, D., Suna, H., Sowa, Y., Sakai, T., Setiawan, A. und Kobayashi, M. (2006). Aaptamine, a spongy alkaloid, activates p21 promoter in a p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 342(1): 101-106.
- Arany, I. und Safirstein, R. L. (2003). Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 23(5): 460-464.
- Armstrong, S. A., Hannah, V. C., Goldstein, J. L. und Brown, M. S. (1995). CAAX geranylgeranyl transferase transfers farnesyl as efficiently as geranylgeranyl to RhoB. *J Biol Chem* 270(14): 7864-7868.
- Arnold, C. R., Abdelmoez, A., Thurner, G., Debbage, P., Lukas, P., Skvortsov, S. und Skvortsova, I. (2014). Rac1 as a multifunctional therapeutic target to prevent and combat cancer metastasis. *Oncoscience* 1(8): 513-521.

- Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Takagi, M., Kodama, F. und Tomino, Y. (2007). The role of podocytes in proteinuria. *Nephrology (Carlton)* 12 Suppl 3: S15-20.
- Bagnardi, V., Blangiardo, M., La Vecchia, C. und Corrao, G. (2001). Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Res Health* 25(4): 263-270.
- Baik, M. H., Friesner, R. A. und Lippard, S. J. (2003). Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine? *J Am Chem Soc* 125(46): 14082-14092.
- Bakkenist, C. J. und Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421(6922): 499-506.
- Bancroft, D. P., Lepre, C. A. und Lippard, S. J. (1990). Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA. *J. Am. Chem. Soc* 112: 6860–6871.
- Bardeleben, R. V., Dunkern, T., Kaina, B. und Fritz, G. (2002). The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin protects cells from the antineoplastic drugs doxorubicin and etoposide. *Int J Mol Med* 10(4): 473-479.
- Bellmunt, J., Paz-Ares, L., Cuello, M., Cecere, F. L., Albiol, S., Guillem, V., Gallardo, E., Carles, J., Mendez, P., De La Cruz, J. J., Taron, M., Rosell, R. und Baselga, J. (2007). Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol* 18(3): 522-528.
- Bellon, S. F., Coleman, J. H. und Lippard, S. J. (1991). DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 30(32): 8026-8035.
- Benhar, M., Engelberg, D. und Levitzki, A. (2002). Cisplatin-induced activation of the EGF receptor. *Oncogene* 21(57): 8723-8731.
- Berenblum, I. (1941). The mechanism of carcinogenesis: A study of the significance of carcinogenic actions and related phenomena. *Cancer Research* 1: 807-814.
- Berger, D. P., Engelhardt, M. und Mertelsmann, R. (2008). Das Blaue Buch Chemotherapie-Manual Hämatologie und Internistische Onkologie. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Berndt, N., Hamilton, A. D. und Sebti, S. M. (2011). Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11(11): 775-791.
- Bishop, A. L. und Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2: 241-255.
- Blasiak, J., Glowacki, S., Kauppinen, A. und Kaarniranta, K. (2013). Mitochondrial and nuclear DNA damage and repair in age-related macular degeneration. *Int J Mol Sci* 14(2): 2996-3010.

- Blommaert, F. A., Van Dijk-Knijnenburg, H. C., Dijt, F. J., Den Engelse, L., Baan, R. A., Berends, F. und Fichtinger-Schepman, A. M. (1995). Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells. *Biochemistry* 34(26): 8474-8480.
- Bohr, V. A., Smith, C. A., Okumoto, D. S. und Hanawalt, P. C. (1985). DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 40(2): 359-369.
- Bopp, A., Wartlick, F., Henninger, C., Kaina, B. und Fritz, G. (2013). Rac1 modulates acute and subacute genotoxin-induced hepatic stress responses, fibrosis and liver aging. *Cell Death Dis* 4: e558.
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49(17): 4682-4689.
- Bowling, J. J., Pennaka, H. K., Ivey, K., Wahyuono, S., Kelly, M., Schinazi, R. F., Valeriote, F. A., Graves, D. E. und Hamann, M. T. (2008). Antiviral and anticancer optimization studies of the DNA-binding marine natural product aptamine. *Chem Biol Drug Des* 71(3): 205-215.
- Brabec, V., Reedijk, J. und Leng, M. (1992). Sequence-dependent distortions induced in DNA by monofunctional platinum(II) binding. *Biochemistry* 31(49): 12397-12402.
- Bracke, M. E., Vanhoecke, B. W., Derycke, L., Bolca, S., Possemiers, S., Heyerick, A., Stevens, C. V., De Keukeleire, D., Depypere, H. T., Verstraete, W., Williams, C. A., Mckenna, S. T., Tomar, S., Sharma, D., Prasad, A. K., Depass, A. L. und Parmar, V. S. (2008). Plant polyphenolics as anti-invasive cancer agents. *Anticancer Agents Med Chem* 8(2): 171-185.
- Branzei, D. und Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(4): 297-308.
- Brozovic, A., Damrot, J., Tsaryk, R., Helbig, L., Nikolova, T., Hartig, C., Osmak, M., Roos, W. P., Kaina, B. und Fritz, G. (2009). Cisplatin sensitivity is related to late DNA damage processing and checkpoint control rather than to the early DNA damage response. *Mutat Res* 670(1-2): 32-41.
- Burger, H., Zoumaro-Djayoon, A., Boersma, A. W., Helleman, J., Berns, E. M., Mathijssen, R. H., Loos, W. J. und Wiemer, E. A. (2010). Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2). *Br J Pharmacol* 159(4): 898-908.
- Cafforio, P., Dammacco, F., Gernone, A. und Silvestris, F. (2005). Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 26(5): 883-891.
- Cann, K. L. und Dellaire, G. (2011). Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem Cell Biol* 89(1): 45-60.

- Capizzi, R. L. (1999). Amifostine reduces the incidence of cumulative nephrotoxicity from cisplatin: laboratory and clinical aspects. *Semin Oncol* 26(2 Suppl 7): 72-81.
- Casey, P. J., Thissen, J. A. und Moomaw, J. F. (1991). Enzymatic modification of proteins with a geranylgeranyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(19): 8631-8635.
- Chen, H. H., Chen, T. W. und Lin, H. (2010). Pravastatin attenuates carboplatin-induced nephrotoxicity in rodents via peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated heme oxygenase-1. *Mol Pharmacol* 78(1): 36-45.
- Chen, H. H. und Kuo, M. T. (2010). Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs* 2010.
- Chirino, Y. I. und Pedraza-Chaverri, J. (2009). Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol* 61(3): 223-242.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P. und Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193(1-2): 3-34.
- Ciarimboli, G. (2014). Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. *Anticancer Res* 34(1): 547-550.
- Ciarimboli, G., Deuster, D., Knief, A., Sperling, M., Holtkamp, M., Edemir, B., Pavenstadt, H., Lanvers-Kaminsky, C., Am Zehnhoff-Dinnesen, A., Schinkel, A. H., Koepsell, H., Jurgens, H. und Schlatter, E. (2010). Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *Am J Pathol* 176(3): 1169-1180.
- Ciarimboli, G., Ludwig, T., Lang, D., Pavenstadt, H., Koepsell, H., Piechota, H. J., Haier, J., Jaehde, U., Zisowsky, J. und Schlatter, E. (2005). Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* 167(6): 1477-1484.
- Cmielova, J. und Rezacova, M. (2011). p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [corrected]. *J Cell Biochem* 112(12): 3502-3506.
- Coetsee, T. N., Pretorius, P. J., Terre'blanche, G. und Bergh, J. J. (2008). Investigating the potential neuroprotective effects of statins on DNA damage in mouse striatum. *Food Chem Toxicol* 46(9): 3186-3192.
- Cohen, S. M. und Lippard, S. J. (2001). Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 67: 93-130.
- Columbano, A. (1995). Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem* 58(2): 181-190.
- Cordoba, R., Tormo, N. S., Medarde, A. F. und Plumet, J. (2007). Antiangiogenic versus cytotoxic activity in analogues of aeropylsinin-1. *Bioorg Med Chem* 15(15): 5300-5315.

- Corsini, A., Maggi, F. M. und Catapano, A. L. (1995). Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res* 31(1): 9-27.
- Cuadrado, A., Martin-Moldes, Z., Ye, J. und Lastres-Becker, I. (2014). Transcription factors NRF2 and NF-kappaB are coordinated effectors of the Rho family, GTP-binding protein RAC1 during inflammation. *J Biol Chem* 289(22): 15244-15258.
- D'amours, D., Sallmann, F. R., Dixit, V. M. und Poirier, G. G. (2001). Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 114(Pt 20): 3771-3778.
- Damrot, J., Helbig, L., Roos, W. P., Barrantes, S. Q., Kaina, B. und Fritz, G. (2009). DNA replication arrest in response to genotoxic stress provokes early activation of stress-activated protein kinases (SAPK/JNK). *J Mol Biol* 385(5): 1409-1421.
- Damrot, J., Nübel, T., Epe, B., Roos, W. P., Kaina, B. und Fritz, G. (2006). Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide. *Br J Pharmacol* 149(8): 988-997.
- Daugaard, G. und Abildgaard, U. (1989). Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Cancer Chemother Pharmacol* 25(1): 1-9.
- De Laat, W. L., Jaspers, N. G. und Hoeijmakers, J. H. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 13(7): 768-785.
- De Wit, R. (1999). Treatment of disseminated non-seminomatous testicular cancer: the European experience. *Semin Surg Oncol* 17(4): 250-256.
- Dickey, D. T., Wu, Y. J., Muldoon, L. L. und Neuwelt, E. A. (2005). Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. *J Pharmacol Exp Ther* 314(3): 1052-1058.
- Dickey, J. S., Redon, C. E., Nakamura, A. J., Baird, B. J., Sedelnikova, O. A. und Bonner, W. M. (2009). H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma* 118(6): 683-692.
- Dimitroulakos, J., Ye, L. Y., Benzaquen, M., Moore, M. J., Kamel-Reid, S., Freedman, M. H., Yeger, H. und Penn, L. Z. (2001). Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 7(1): 158-167.
- Dos Santos, N. A., Carvalho Rodrigues, M. A., Martins, N. M. und Dos Santos, A. C. (2012). Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch Toxicol* 86(8): 1233-1250.
- Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M. und Modrich, P. (1996). Human MutSalpha recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13): 6443-6447.

- Dyshlovoy, S. A., Venz, S., Shubina, L. K., Fedorov, S. N., Walther, R., Jacobsen, C., Stonik, V. A., Bokemeyer, C., Balabanov, S. und Honecker, F. (2014). Activity of aaptamine and two derivatives, demethyloxyaaptamine and isoaptamine, in cisplatin-resistant germ cell cancer. *J Proteomics* 96: 223-239.
- Eguchi, Y., Shimizu, S. und Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57(10): 1835-1840.
- Eisenhauer, E., Swerton, K., Sturgeon, J., Fine, S. und O'reilly, S. (1990). Carboplatin: Current Perspectives and Future Directions. Philadelphia, WB Saunders Company.
- Ekholm, S., Albrechtsson, U. und Tylene, U. (1983). Bronchial artery infusion of mitomycin C in carcinoma of the lung. *Cardiovasc Intervent Radiol* 6(2): 86-96.
- Endo, A., Kuroda, M. und Tsujita, Y. (1976). ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)* 29(12): 1346-1348.
- Engel, C. und Fischer, C. (2015). Breast cancer risks and risk prediction models. *Breast Care (Basel)* 10(1): 7-12.
- Epstein, M. und Campese, V. M. (2005). Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on renal function. *Am J Kidney Dis* 45(1): 2-14.
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420(6916): 629-635.
- Faivre, S., Chan, D., Salinas, R., Woynarowska, B. und Woynarowski, J. M. (2003). DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 66(2): 225-237.
- Fang, L., Neutzner, A., Turtschi, S., Flammer, J. und Mozaffarieh, M. (2015). Comet assay as an indirect measure of systemic oxidative stress. *J Vis Exp*(99): e52763.
- Feleszko, W., Mlynarczyk, I., Balkowiec-Iskra, E. Z., Czajka, A., Switaj, T., Stoklosa, T., Giermasz, A. und Jakobisiak, M. (2000). Lovastatin potentiates antitumor activity and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin in three tumor models in mice. *Clin Cancer Res* 6(5): 2044-2052.
- Ferrer, M., Izeboud, T., Ferreira, C. G., Span, S. W., Giaccone, G. und Kruyt, F. A. (2003). Cisplatin triggers apoptotic or nonapoptotic cell death in Fanconi anemia lymphoblasts in a concentration-dependent manner. *Exp Cell Res* 286(2): 381-395.
- Fichtinger-Schepman, A. M., Van Der Veer, J. L., Den Hartog, J. H., Lohman, P. H. und Reedijk, J. (1985). Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 24(3): 707-713.
- Filipski, K. K., Mathijssen, R. H., Mikkelsen, T. S., Schinkel, A. H. und Sparreboom, A. (2009). Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 86(4): 396-402.

- Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R. D. und Howell, S. B. (1996). The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 56(21): 4881-4886.
- Fling, S. P. und Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155(1): 83-88.
- Friboulet, L., Olausson, K. A., Pignon, J. P., Shepherd, F. A., Tsao, M. S., Graziano, S., Kratzke, R., Douillard, J. Y., Seymour, L., Pirker, R., Filipits, M., Andre, F., Solary, E., Ponsonnailles, F., Robin, A., Stoclin, A., Dorvault, N., Commo, F., Adam, J., Vanhecke, E., Saulnier, P., Thomale, J., Le Chevalier, T., Dunant, A., Rousseau, V., Le Teuff, G., Brambilla, E. und Soria, J. C. (2013). ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 368(12): 1101-1110.
- Friboulet, L., Postel-Vinay, S., Sourisseau, T., Adam, J., Stoclin, A., Ponsonnailles, F., Dorvault, N., Commo, F., Saulnier, P., Salome-Desmoulez, S., Pottier, G., Andre, F., Kroemer, G., Soria, J. C. und Olausson, K. A. (2013). ERCC1 function in nuclear excision and interstrand crosslink repair pathways is mediated exclusively by the ERCC1-202 isoform. *Cell Cycle* 12(20): 3298-3306.
- Friedberg, E. C. (2006). DNA repair and mutagenesis. Washington D.C., ASM Press.
- Friedberg, E. C., Bardwell, A. J., Bardwell, L., Feaver, W. J., Kornberg, R. D., Svejstrup, J. Q., Tomkinson, A. E. und Wang, Z. (1995). Nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: its relationship to specialized mitotic recombination and RNA polymerase II basal transcription. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 347(1319): 63-68.
- Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Stenerlow, B. und Thelestam, M. (2003). The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell Microbiol* 5(10): 695-707.
- Fritz, G. (2005). HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as anticancer drugs (review). *Int J Oncol* 27(5): 1401-1409.
- Fritz, G., Brachetti, C. und Kaina, B. (2003). Lovastatin causes sensitization of HeLa cells to ionizing radiation-induced apoptosis by the abrogation of G2 blockage. *Int J Radiat Biol* 79(8): 601-610.
- Fritz, G., Henninger, C. und Hülsenbeck, J. (2011). Potential use of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as radioprotective agents. *Br Med Bull* 97: 17-26.
- Fuertes, M. A., Alonso, C. und Perez, J. M. (2003). Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* 103(3): 645-662.

- Fujieda, M., Morita, T., Naruse, K., Hayashi, Y., Ishihara, M., Yokoyama, T., Toma, T., Ohta, K. und Wakiguchi, H. (2011). Effect of pravastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 30(7): 603-615.
- Funk, F., Krüger, K., Henninger, C., Wätjen, W., Proksch, P., Thomale, J. und Fritz, G. (2014). Spongian alkaloids protect rat kidney cells against cisplatin-induced cytotoxicity. *Anticancer Drugs* 25(8): 917-929.
- Furuta, T., Ueda, T., Aune, G., Sarasin, A., Kraemer, K. H. und Pommier, Y. (2002). Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res* 62(17): 4899-4902.
- Futterman, L. G. und Lemberg, L. (2004). Statin pleiotropy: fact or fiction? *Am J Crit Care* 13(3): 244-249.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M. und Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31(15): 1869-1883.
- Garcia-Fernandez, L. F., Losada, A., Alcaide, V., Alvarez, A. M., Cuadrado, A., Gonzalez, L., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Fernandez-Sousa, J. M., Munoz, A. und Sanchez-Puelles, J. M. (2002). Aplidin induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C delta. *Oncogene* 21(49): 7533-7544.
- Gelasco, A. und Lippard, S. J. (1998). NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry* 37(26): 9230-9239.
- Goldstein, J. L. und Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343(6257): 425-430.
- Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C. und Perez, J. M. (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 59(4): 657-663.
- Gore, M. E., Fryatt, I., Wiltshaw, E., Dawson, T., Robinson, B. A. und Calvert, A. H. (1989). Cisplatin/carboplatin cross-resistance in ovarian cancer. *Br J Cancer* 60(5): 767-769.
- Graaf, M. R., Richel, D. J., Van Noorden, C. J. und Guchelaar, H. J. (2004). Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. *Cancer Treat Rev* 30(7): 609-641.
- Griffin, S. V., Petermann, A. T., Durvasula, R. V. und Shankland, S. J. (2003). Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. *Nephrol Dial Transplant* 18 Suppl 6: vi8-13.
- Grundy, S. M. (1978). Cholesterol metabolism in man. *West J Med* 128(1): 13-25.

- Gu, J., Zhu, S., Li, X., Wu, H., Li, Y. und Hua, F. (2014). Effect of amifostine in head and neck cancer patients treated with radiotherapy: a systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials. *PLoS One* 9(5): e95968.
- Guerra, L., Guidi, R., Slot, I., Callegari, S., Sompallae, R., Pickett, C. L., Astrom, S., Eisele, F., Wolf, D., Sjogren, C., Masucci, M. G. und Frisan, T. (2011). Bacterial genotoxin triggers FEN1-dependent RhoA activation, cytoskeleton remodeling and cell survival. *J Cell Sci* 124(Pt 16): 2735-2742.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S. X. und Dunphy, W. G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* 14(21): 2745-2756.
- Gurley, L. R., Walters, R. A., Barham, S. S. und Deaven, L. L. (1978). Heterochromatin and histone phosphorylation. *Exp Cell Res* 111(2): 373-383.
- Hadi, S. M., Bhat, S. H., Azmi, A. S., Hanif, S., Shamim, U. und Ullah, M. F. (2007). Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. *Semin Cancer Biol* 17(5): 370-376.
- Haefner, B. (2003). Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today* 8(12): 536-544.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
- Hanigan, M. H., Gallagher, B. C., Taylor, P. T., Jr. und Large, M. K. (1994). Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase activity by acivicin in vivo protects the kidney from cisplatin-induced toxicity. *Cancer Res* 54(22): 5925-5929.
- Harada, K. und Ogden, G. R. (2000). An overview of the cell cycle arrest protein, p21(WAF1). *Oral Oncol* 36(1): 3-7.
- Harper, J. W. und Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28(5): 739-745.
- Hart, M. G., Garside, R., Rogers, G., Stein, K. und Grant, R. (2013). Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev* 4: CD007415.
- Hartmann, J. T., Kollmannsberger, C., Kanz, L. und Bokemeyer, C. (1999). Platinum organ toxicity and possible prevention in patients with testicular cancer. *Int J Cancer* 83(6): 866-869.
- Hartmann, J. T. und Lipp, H. P. (2003). Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother* 4(6): 889-901.
- Haydont, V., Gilliot, O., Rivera, S., Bourgier, C., Francois, A., Aigueperse, J., Bourhis, J. und Vozenin-Brotans, M. C. (2007). Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68(5): 1471-1482.

- He, Q., Liang, C. H. und Lippard, S. J. (2000). Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 5768-5772.
- Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., Kolb, H. J., Pralle, H., Hossfeld, D. K., Queisser, W., Löffler, H., Heinze, B., Georgii, A. und Et Al. (1993). Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood* 82(2): 398-407.
- Helbig, L., Damrot, J., Hülsenbeck, J., Köberle, B., Brozovic, A., Osmak, M., Fiket, Z., Kaina, B. und Fritz, G. (2011). Late activation of stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases triggered by cisplatin-induced DNA damage in repair-defective cells. *J Biol Chem* 286(15): 12991-13001.
- Held, P. und Newick, K. (2009). Using BioTek's Synergy HT Reader to Measure Reactive Oxygen Species (ROS) Generation in Stimulated Cells. *Biotechniques* 46(1): 61-62.
- Henzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P. und Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106(6): 348-360.
- Henninger, C., Hülsenbeck, S., Wenzel, P., Brand, M., Hülsenbeck, J., Schad, A. und Fritz, G. (2015). Chronic heart damage following doxorubicin treatment is alleviated by lovastatin. *Pharmacol Res* 91: 47-56.
- Hilger, R. A., Scheulen, M. E. und Strumberg, D. (2002). The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25(6): 511-518.
- Hinterding, K., Knebel, A., Herrlich, P. und Waldmann, H. (1998). Synthesis and biological evaluation of aeropylsinin analogues: a new class of receptor tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 6(8): 1153-1162.
- Hirst, A. M., Simms, M. S., Mann, V. M., Maitland, N. J., O'connell, D. und Frame, F. M. (2015). Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. *Br J Cancer* 112(9): 1536-1545.
- Hoferlin, L. A., Oleinik, N. V., Krupenko, N. I. und Krupenko, S. A. (2011). Activation of p21-Dependent G1/G2 Arrest in the Absence of DNA Damage as an Antiapoptotic Response to Metabolic Stress. *Genes Cancer* 2(9): 889-899.
- Hortobagyi, G. N. (2005). Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 353(16): 1734-1736.
- Hostetter, A. A., Osborn, M. F. und Derosé, V. J. (2012). RNA-Pt adducts following cisplatin treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Chem Biol* 7(1): 218-225.

- Hryniuk, W. M. und Bertino, J. R. (1969). Treatment of leukemia with large doses of methotrexate and folinic acid: clinical-biochemical correlates. *J Clin Invest* 48(11): 2140-2155.
- Hu, Q., Luo, T., Zhong, X., He, P., Tian, T. und Zheng, H. (2015). Application status of tamoxifen in endocrine therapy for early breast cancer. *Exp Ther Med* 9(6): 2207-2212.
- Huang, J. C., Zamble, D. B., Reardon, J. T., Lippard, S. J. und Sancar, A. (1994). HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22): 10394-10398.
- Hülsenbeck, J., Henninger, C., Schad, A., Lackner, K. J., Kaina, B. und Fritz, G. (2011). Inhibition of Rac1 signaling by lovastatin protects against anthracycline-induced cardiac toxicity. *Cell Death Dis* 2: e190.
- Hülsenbeck, S. C., Schorr, A., Roos, W. P., Huelsenbeck, J., Henninger, C., Kaina, B. und Fritz, G. (2012). Rac1 protein signaling is required for DNA damage response stimulated by topoisomerase II poisons. *J Biol Chem* 287(46): 38590-38599.
- Iden, S. und Collard, J. G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(11): 846-859.
- Iseri, S., Ercan, F., Gedik, N., Yuksel, M. und Alican, I. (2007). Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology* 230(2-3): 256-264.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J. und Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22): 14298-14302.
- Ishizaki, T., Uehata, M., Tamechika, I., Keel, J., Nonomura, K., Maekawa, M. und Narumiya, S. (2000). Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* 57(5): 976-983.
- Iyengar, S. und Farnham, P. J. (2011). KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome. *J Biol Chem* 286(30): 26267-26276.
- Jamieson, E. R. und Lippard, S. J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 99(9): 2467-2498.
- Jennerwein, M. M., Eastman, A. und Khokhar, A. (1989). Characterization of adducts produced in DNA by isomeric 1,2-diaminocyclohexaneplatinum(II) complexes. *Chem Biol Interact* 70(1-2): 39-49.
- Jerremalm, E., Hedeland, M., Wallin, I., Bondesson, U. und Ehrsson, H. (2004). Oxaliplatin degradation in the presence of chloride: identification and cytotoxicity of the monochloro monooxalato complex. *Pharm Res* 21(5): 891-894.
- Jiang, M. und Dong, Z. (2008). Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 327(2): 300-307.

- Jiang, M., Wei, Q., Pabla, N., Dong, G., Wang, C. Y., Yang, T., Smith, S. B. und Dong, Z. (2007). Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 73(9): 1499-1510.
- Jin, M., Zhao, W., Zhang, Y., Kobayashi, M., Duan, H. und Kong, D. (2011). Antiproliferative effect of aaptamine on human chronic myeloid leukemia K562 cells. *Int J Mol Sci* 12(11): 7352-7359.
- Judson, I. und Kelland, L. R. (2000). New developments and approaches in the platinum arena. *Drugs* 59 Suppl 4: 29-36; discussion 37-28.
- Jung, Y. und Lippard, S. J. (2007). Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev* 107(5): 1387-1407.
- Kadikoylu, G., Bolaman, Z., Demir, S., Balkaya, M., Akalin, N. und Enli, Y. (2004). The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol* 23(1): 29-34.
- Karasawa, T., Sibrian-Vazquez, M., Strongin, R. M. und Steyger, P. S. (2013). Identification of cisplatin-binding proteins using agarose conjugates of platinum compounds. *PLoS One* 8(6): e66220.
- Karasawa, T. und Steyger, P. S. (2015). An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. *Toxicol Lett* 237(3): 219-227.
- Kartalou, M. und Essigmann, J. M. (2001). Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res* 478(1-2): 1-21.
- Katsuda, H., Yamashita, M., Katsura, H., Yu, J., Waki, Y., Nagata, N., Sai, Y. und Miyamoto, K. (2010). Protecting cisplatin-induced nephrotoxicity with cimetidine does not affect antitumor activity. *Biol Pharm Bull* 33(11): 1867-1871.
- Kawaguchi, M., Kawashima, F., Ohshima, K., Kawaguchi, S. und Wada, H. (1994). Immunocytochemical characterization and identification of SGE1, a rat glomerular epithelial cell line. *Pathobiology* 62(5-6): 283-291.
- Kawai, Y., Taniuchi, S., Okahara, S., Nakamura, M. und Gemba, M. (2005). Relationship between cisplatin or nedaplatin-induced nephrotoxicity and renal accumulation. *Biol Pharm Bull* 28(8): 1385-1388.
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7(8): 573-584.
- Khan, S. A., Priyamvada, S., Khan, W., Khan, S., Farooq, N. und Yusufi, A. N. (2009). Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacol Res* 60(5): 382-391.
- Khoshnoud, M. J., Moghbel, B. N. A., Geramizadeh, B. und Niknahad, H. (2011). Effect of Simvastatin on Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Male Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 7(3): 165-173.

- Khynriam, D. und Prasad, S. B. (2002). Changes in glutathione-related enzymes in tumor-bearing mice after cisplatin treatment. *Cell Biol Toxicol* 18(6): 349-358.
- Kim, S., Yazici, Y. D., Calzada, G., Wang, Z. Y., Younes, M. N., Jasser, S. A., El-Naggar, A. K. und Myers, J. N. (2007). Sorafenib inhibits the angiogenesis and growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice. *Mol Cancer Ther* 6(6): 1785-1792.
- Kinsella, B. T., Erdman, R. A. und Maltese, W. A. (1991). Carboxyl-terminal isoprenylation of ras-related GTP-binding proteins encoded by *rac1*, *rac2*, and *ralA*. *J Biol Chem* 266(15): 9786-9794.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14(22): 5579-5588.
- Köberle, B., Grimaldi, K. A., Sunter, A., Hartley, J. A., Kelland, L. R. und Masters, J. R. (1997). DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer* 70(5): 551-555.
- Köberle, B., Masters, J. R., Hartley, J. A. und Wood, R. D. (1999). Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol* 9(5): 273-276.
- Koch, G., Benz, C., Schmidt, G., Olenik, C. und Aktories, K. (1997). Role of Rho protein in lovastatin-induced breakdown of actin cytoskeleton. *J Pharmacol Exp Ther* 283(2): 901-909.
- Kohn, S., Fradis, M., Ben-David, J., Zidan, J. und Robinson, E. (2002). Nephrotoxicity of combined treatment with cisplatin and gentamicin in the guinea pig: glomerular injury findings. *Ultrastruct Pathol* 26(6): 371-382.
- Kojda, G. (2002). Pharmakologie, Toxikologie systematisch. Bremen [u.a.], UNI-MED-Verl.
- Kool, M., De Haas, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Van Eijk, M. J., Juijn, J. A., Baas, F. und Borst, P. (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57(16): 3537-3547.
- Koster, R., Di Pietro, A., Timmer-Bosscha, H., Gibcus, J. H., Van Den Berg, A., Suurmeijer, A. J., Bischoff, R., Gietema, J. A. und De Jong, S. (2010). Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *J Clin Invest* 120(10): 3594-3605.
- Koulman, A., Proksch, P., Ebel, R., Beekman, A. C., Van Uden, W., Konings, A. W., Pedersen, J. A., Pras, N. und Woerdenbag, H. J. (1996). Cytotoxicity and mode of action of aeroplysinin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *J Nat Prod* 59(6): 591-594.

- Kreisberg, R. A. (1991). Reductase inhibitor therapy of hypercholesterolemia. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 102: 153-163; discussion 163-155.
- Kreuter, M. H., Bernd, A., Holzmann, H., Müller-Klieser, W., Maidhof, A., Weissmann, N., Kljajic, Z., Batel, R., Schröder, H. C. und Müller, W. E. (1989). Cytostatic activity of aeroplysinin-1 against lymphoma and epithelioma cells. *Z Naturforsch C* 44(7-8): 680-688.
- Kreuter, M. H., Leake, R. E., Rinaldi, F., Müller-Klieser, W., Maidhof, A., Müller, W. E. und Schröder, H. C. (1990). Inhibition of intrinsic protein tyrosine kinase activity of EGF-receptor kinase complex from human breast cancer cells by the marine sponge metabolite (+)-aeroplysinin-1. *Comp Biochem Physiol B* 97(1): 151-158.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. und Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60: 619-642.
- Kruidering, M., Van De Water, B., De Heer, E., Mulder, G. J. und Nagelkerke, J. F. (1997). Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther* 280(2): 638-649.
- Kuhlmann, M. K., Burkhardt, G. und Köhler, H. (1997). Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 12(12): 2478-2480.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lange, O. F., Haase, K. D. und Scheef, W. (1987). Simultaneous radio- and chemotherapy of inoperable brain tumours. *Radiother Oncol* 8(4): 309-314.
- Lardizabal, J. A. und Deedwania, P. C. (2010). Benefits of statin therapy and compliance in high risk cardiovascular patients. *Vasc Health Risk Manag* 6: 843-853.
- Larghi, E. L., Bohn, M. L. und Kaufman, T. S. (2009). Aaptamine and related products. Their isolation, chemical synthesis, and biological activity. *Tetrahedron* 65: 4257-4282.
- Larson, C. A., Blair, B. G., Safaei, R. und Howell, S. B. (2009). The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs. *Mol Pharmacol* 75(2): 324-330.
- Lavin, M. F., Kozlov, S., Gueven, N., Peng, C., Birrell, G., Chen, P. und Scott, S. (2005). Atm and cellular response to DNA damage. *Adv Exp Med Biol* 570: 457-476.
- Lee, S., Moon, S. O., Kim, W., Sung, M. J., Kim, D. H., Kang, K. P., Jang, Y. B., Lee, J. E., Jang, K. Y., Lee, S. Y. und Park, S. K. (2006). Protective role of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid in cisplatin-induced renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 21(8): 2085-2095.

- Liao, H., Winkfein, R. J., Mack, G., Rattner, J. B. und Yen, T. J. (1995). CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol* 130(3): 507-518.
- Liao, J. K. und Laufs, U. (2005). Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 89-118.
- Lieberthal, W., Triaca, V. und Levine, J. (1996). Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 270(4 Pt 2): F700-708.
- Liedert, B., Materna, V., Schadendorf, D., Thomale, J. und Lage, H. (2003). Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. *J Invest Dermatol* 121(1): 172-176.
- Liedert, B., Plum, D., Schellens, J. und Thomale, J. (2006). Adduct-specific monoclonal antibodies for the measurement of cisplatin-induced DNA lesions in individual cell nuclei. *Nucleic Acids Res* 34(6): e47.
- Liu, H. und Baliga, R. (2005). Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 16(7): 1985-1992.
- Ljungman, M. (2010). The DNA damage response--repair or despair? *Environ Mol Mutagen* 51(8-9): 879-889.
- Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A. A., Barton, O. und Jeggo, P. A. (2010). gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 9(4): 662-669.
- Lotze, M. T. und Demarco, R. A. (2004). Dying dangerously: Necrotic cell death and chronic inflammation promote tumor growth. *Discov Med* 4(24): 448-456.
- Löwik, C. W., Alblas, M. J., Van De Ruit, M., Papapoulos, S. E. und Van Der Pluijm, G. (1993). Quantification of adherent and nonadherent cells cultured in 96-well plates using the supravital stain neutral red. *Anal Biochem* 213(2): 426-433.
- Luqmani, Y. A. (2005). Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract* 14 Suppl 1: 35-48.
- Maack, C., Kartes, T., Kilter, H., Schafers, H. J., Nickenig, G., Böhm, M. und Laufs, U. (2003). Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation* 108(13): 1567-1574.
- Macaron, C., Leach, B. H. und Burke, C. A. (2015). Hereditary colorectal cancer syndromes and genetic testing. *J Surg Oncol* 111(1): 103-111.

- Maddala, R. L., Reddy, V. N. und Rao, P. V. (2001). Lovastatin-induced cytoskeletal reorganization in lens epithelial cells: role of Rho GTPases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(11): 2610-2615.
- Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., Gemma, A., Harada, M., Yoshizawa, H., Kinoshita, I., Fujita, Y., Okinaga, S., Hirano, H., Yoshimori, K., Harada, T., Ogura, T., Ando, M., Miyazawa, H., Tanaka, T., Saijo, Y., Hagiwara, K., Morita, S. und Nukiwa, T. (2010). Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 362(25): 2380-2388.
- Mah, L. J., El-Osta, A. und Karagiannis, T. C. (2010). gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24(4): 679-686.
- Maheshwari, R. A., Sailor, G. U., Patel, L. und Balaraman, R. (2013). Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity by statins. *Indian J Pharmacol* 45(4): 354-358.
- Mahmoudi, M., Gorenne, I., Mercer, J., Figg, N., Littlewood, T. und Bennett, M. (2008). Statins use a novel Nijmegen breakage syndrome-1-dependent pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 103(7): 717-725.
- Mansouri, A., Ridgway, L. D., Korapati, A. L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z. H., Mills, G. B. und Claret, F. X. (2003). Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 278(21): 19245-19256.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., MCGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C., Laface, D. M. und Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182(5): 1545-1556.
- Martinez-Poveda, B., Garcia-Vilas, J. A., Cardenas, C., Melgarejo, E., Quesada, A. R. und Medina, M. A. (2013). The brominated compound aeroplysinin-1 inhibits proliferation and the expression of key pro-inflammatory molecules in human endothelial and monocyte cells. *PLoS One* 8(1): e55203.
- Martinez-Poveda, B., Rodriguez-Nieto, S., Garcia-Caballero, M., Medina, M. A. und Quesada, A. R. (2012). The antiangiogenic compound aeroplysinin-1 induces apoptosis in endothelial cells by activating the mitochondrial pathway. *Mar Drugs* 10(9): 2033-2046.
- Martinez-Salgado, C., Lopez-Hernandez, F. J. und Lopez-Novoa, J. M. (2007). Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicol Appl Pharmacol* 223(1): 86-98.
- Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S. S. und Doetsch, P. W. (2013). Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One* 8(11): e81162.

- Masters, J. R. und Köberle, B. (2003). Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* 3(7): 517-525.
- Materna, V., Liedert, B., Thomale, J. und Lage, H. (2005). Protection of platinum-DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells. *Int J Cancer* 115(3): 393-402.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K. und Elledge, S. J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19): 10389-10394.
- Matsushima, H., Yonemura, K., Ohishi, K. und Hishida, A. (1998). The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med* 131(6): 518-526.
- Mckenna, W. G., Muschel, R. J., Gupta, A. K., Hahn, S. M. und Bernhard, E. J. (2002). Farnesyltransferase inhibitors as radiation sensitizers. *Semin Radiat Oncol* 12(3 Suppl 2): 27-32.
- Megyesi, J., Safirstein, R. L. und Price, P. M. (1998). Induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. *J Clin Invest* 101(4): 777-782.
- Megyesi, J., Udvarhelyi, N., Safirstein, R. L. und Price, P. M. (1996). The p53-independent activation of transcription of p21 WAF1/CIP1/SDI1 after acute renal failure. *Am J Physiol* 271(6 Pt 2): F1211-1216.
- Mello, J. A., Acharya, S., Fishel, R. und Essigmann, J. M. (1996). The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem Biol* 3(7): 579-589.
- Mello, J. A., Lippard, S. J. und Essigmann, J. M. (1995). DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum(II) and its trans isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo. *Biochemistry* 34(45): 14783-14791.
- Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G. und Reeves, W. B. (2010). Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)* 2(11): 2490-2518.
- Mohan, A., Narayanan, S., Sethuraman, S. und Krishnan, U. M. (2013). Combinations of plant polyphenols & anti-cancer molecules: a novel treatment strategy for cancer chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem* 13(2): 281-295.
- Mohn, C., Kalayda, G. V., Hacker, H. G., Gutschow, M., Metzger, S. und Jaehde, U. (2010). Contribution of glutathione and MRP-mediated efflux to intracellular oxaliplatin accumulation. *Int J Clin Pharmacol Ther* 48(7): 445-447.
- Moore, D. H., Blessing, J. A., Dunton, C., Buller, R. E. und Reid, G. C. (1999). Dactinomycin in the treatment of recurrent or persistent endometrial carcinoma: A Phase II study of the Gynecologic Oncology Group. *Gynecol Oncol* 75(3): 473-475.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Muggia, F. M. (1989). Overview of carboplatin: replacing, complementing, and extending the therapeutic horizons of cisplatin. *Semin Oncol* 16(2 Suppl 5): 7-13.
- Mukherjee, S. (2010). *The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer*. New York, Scribner.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Pan, H., Patel, V., Mukhopadhyay, B., Batkai, S., Gao, B., Hasko, G. und Pacher, P. (2010). Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress, and cell death in nephropathy. *Free Radic Biol Med* 48(3): 457-467.
- Nakatsu, Y., Asahina, H., Citterio, E., Rademakers, S., Vermeulen, W., Kamiuchi, S., Yeo, J. P., Khaw, M. C., Saijo, M., Kodo, N., Matsuda, T., Hoeijmakers, J. H. und Tanaka, K. (2000). XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J Biol Chem* 275(45): 34931-34937.
- Nehme, A., Baskaran, R., Aebi, S., Fink, D., Nebel, S., Cenni, B., Wang, J. Y., Howell, S. B. und Christen, R. D. (1997). Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. *Cancer Res* 57(15): 3253-3257.
- Nehme, A., Baskaran, R., Nebel, S., Fink, D., Howell, S. B., Wang, J. Y. und Christen, R. D. (1999). Induction of JNK and c-Abl signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells. *Br J Cancer* 79(7-8): 1104-1110.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. und Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res* 59(6): 365-378.
- Norbury, C. J. und Zhivotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23(16): 2797-2808.
- Nübel, T., Damrot, J., Roos, W. P., Kaina, B. und Fritz, G. (2006). Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 12(3 Pt 1): 933-939.
- O'brien, J., Wilson, I., Orton, T. und Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267(17): 5421-5426.
- O'donnell, M. P., Kasiske, B. L., Kim, Y., Atluru, D. und Keane, W. F. (1993). Lovastatin inhibits proliferation of rat mesangial cells. *J Clin Invest* 91(1): 83-87.
- Odom, L. F., Morse, H., Tubergen, D. G. und Blake, M. (1988). Long-term survival of children with acute non-lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 16(4): 248-254.

- Ohizumi, Y., Kajiwar, A., Nakamura, H. und Kobayashi, J. (1984). Alpha-adrenoceptor blocking action of aaptamine, a novel marine natural product, in vascular smooth muscle. *J Pharm Pharmacol* 36(11): 785-786.
- Olaussen, K. A., Dunant, A., Fouret, P., Brambilla, E., Andre, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H. H., Stahel, R., Sabatier, L., Pignon, J. P., Tursz, T., Le Chevalier, T. und Soria, J. C. (2006). DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 355(10): 983-991.
- Olive, P. L. (2004). Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods Cell Biol* 75: 355-373.
- Olive, P. L. und Banath, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1(1): 23-29.
- Olive, P. L. und Banath, J. P. (2009). Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytometry B Clin Cytom* 76(2): 79-90.
- Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* 121: 321-349.
- Ostrau, C., Hülsenbeck, J., Herzog, M., Schad, A., Torzewski, M., Lackner, K. J. und Fritz, G. (2009). Lovastatin attenuates ionizing radiation-induced normal tissue damage in vivo. *Radiother Oncol* 92(3): 492-499.
- Owatari, S., Akune, S., Komatsu, M., Ikeda, R., Firth, S. D., Che, X. F., Yamamoto, M., Tsujikawa, K., Kitazono, M., Ishizawa, T., Takeuchi, T., Aikou, T., Mercer, J. F., Akiyama, S. und Furukawa, T. (2007). Copper-transporting P-type ATPase, ATP7A, confers multidrug resistance and its expression is related to resistance to SN-38 in clinical colon cancer. *Cancer Res* 67(10): 4860-4868.
- Ozcan, M. F., Dizdar, O., Dincer, N., Balci, S., Guler, G., Gok, B., Pektas, G., Seker, M. M., Aksoy, S., Arslan, C., Yalcin, S. und Balbay, M. D. (2013). Low ERCC1 expression is associated with prolonged survival in patients with bladder cancer receiving platinum-based neoadjuvant chemotherapy. *Urol Oncol* 31(8): 1709-1715.
- Ozols, R. F., Bundy, B. N., Greer, B. E., Fowler, J. M., Clarke-Pearson, D., Burger, R. A., Mannel, R. S., Degeest, K., Hartenbach, E. M. und Baergen, R. (2003). Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 21(17): 3194-3200.
- Pabla, N., Huang, S., Mi, Q. S., Daniel, R. und Dong, Z. (2008). ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 283(10): 6572-6583.
- Pabla, N., Murphy, R. F., Liu, K. und Dong, Z. (2009). The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 296(3): F505-511.

- Panier, S. und Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(1): 7-18.
- Pereira, L., Igea, A., Canovas, B., Dolado, I. und Nebreda, A. R. (2013). Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. *EMBO Mol Med* 5(11): 1759-1774.
- Pestell, K. E., Hobbs, S. M., Titley, J. C., Kelland, L. R. und Walton, M. I. (2000). Effect of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line. *Mol Pharmacol* 57(3): 503-511.
- Pinto, A. L. und Lippard, S. J. (1985). Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochim Biophys Acta* 780(3): 167-180.
- Preiß, J., Dornoff, W., Schmieder, A., Honecker, F. und Claßen, J. (2014). Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2014/2015.
- Prestayko, A. W., D'aoust, J. C., Issell, B. F. und Crooke, S. T. (1979). Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat Rev* 6(1): 17-39.
- Price, B. A. und Peters, N. H. (1992). Treatment of metastatic testicular tumours with bleomycin, etoposide, cisplatin and vincristine (BEPV). *J R Soc Med* 85(11): 674-678.
- Quist-Paulsen, P. (2010). Statins and inflammation: an update. *Curr Opin Cardiol* 25(4): 399-405.
- Rabik, C. A. und Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33(1): 9-23.
- Ramesh, G. und Reeves, W. B. (2005). p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1): F166-174.
- Rao, S., Lowe, M., Herliczek, T. W. und Keyomarsi, K. (1998). Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53. *Oncogene* 17(18): 2393-2402.
- Rashid, M., Tawara, S., Fukumoto, Y., Seto, M., Yano, K. und Shimokawa, H. (2009). Importance of Rac1 signaling pathway inhibition in the pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Circ J* 73(2): 361-370.
- Raymond, E., Chaney, S. G., Taamma, A. und Cvitkovic, E. (1998). Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 9(10): 1053-1071.
- Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J. und Cvitkovic, E. (2002). Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 1(3): 227-235.
- Rebillard, A., Lagadic-Gossmann, D. und Dimanche-Boitrel, M. T. (2008). Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. *Curr Med Chem* 15(26): 2656-2663.

- Redon, C. E., Nakamura, A. J., Martin, O. A., Parekh, P. R., Weyemi, U. S. und Bonner, W. M. (2011). Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging (Albany NY)* 3(2): 168-174.
- Reed, E. (1998). Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 24(5): 331-344.
- Reeves, R. und Adair, J. E. (2005). Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair (Amst)* 4(8): 926-938.
- Remuzzi, G. und Perico, N. (1995). Cyclosporine-induced renal dysfunction in experimental animals and humans. *Kidney Int Suppl* 52: S70-74.
- Repetto, M. G. und Llesuy, S. F. (2002). Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* 35(5): 523-534.
- Rice, J. A., Crothers, D. M., Pinto, A. L. und Lippard, S. J. (1988). The major adduct of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA bends the duplex by approximately equal to 40 degrees toward the major groove. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(12): 4158-4161.
- Rich, T., Allen, R. L. und Wyllie, A. H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407(6805): 777-783.
- Rikitake, Y. und Liao, J. K. (2005). Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 97(12): 1232-1235.
- Rivory, L. P. (2002). New drugs for colorectal cancer – mechanisms of action. *Australian Prescriber* 25(5): 108-110.
- Robert Koch-Institut und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister E. V. (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010. Berlin. 9. Ausgabe.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. und Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273(10): 5858-5868.
- Roos, W. P. und Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett* 332(2): 237-248.
- Rosenberg, B. (1985). Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* 55(10): 2303-2306.
- Rosenberg, B., Renshaw, E., Vancamp, L., Hartwick, J. und Drobnik, J. (1967). Platinum-induced filamentous growth in Escherichia coli. *J Bacteriol* 93(2): 716-721.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., Grimley, E. B. und Thomson, A. J. (1967). The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum(IV) complexes. *J Biol Chem* 242(6): 1347-1352.
- Rosenberg, B., Vancamp, L. und Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 205: 698-699.

- Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J. E. und Mansour, V. H. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222(5191): 385-386.
- Russo, A., Esposito, D., Catillo, M., Pietropaolo, C., Crescenzi, E. und Russo, G. (2013). Human rpL3 induces G(1)/S arrest or apoptosis by modulating p21 (waf1/cip1) levels in a p53-independent manner. *Cell Cycle* 12(1): 76-87.
- Sadzuka, Y., Shoji, T. und Takino, Y. (1992). Mechanism of the increase in lipid peroxide induced by cisplatin in the kidneys of rats. *Toxicol Lett* 62(2-3): 293-300.
- Safirstein, R., Miller, P., Dikman, S., Lyman, N. und Shapiro, C. (1981). Cisplatin nephrotoxicity in rats: defect in papillary hypertonicity. *Am J Physiol* 241(2): F175-185.
- Saif, M. W. und Reardon, J. (2005). Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Ther Clin Risk Manag* 1(4): 249-258.
- Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., Maroun, J. A., Ackland, S. P., Locker, P. K., Pirodda, N., Elfring, G. L. und Miller, L. L. (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 343(13): 905-914.
- Sanchez-Gonzalez, P. D., Lopez-Hernandez, F. J., Lopez-Novoa, J. M. und Morales, A. I. (2011). An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 41(10): 803-821.
- Sancho-Martinez, S. M., Piedrafita, F. J., Cannata-Andia, J. B., Lopez-Novoa, J. M. und Lopez-Hernandez, F. J. (2011). Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis. *Toxicol Sci* 122(1): 73-85.
- Saris, C. P., Van De Vaart, P. J., Rietbroek, R. C. und Blommaert, F. A. (1996). In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. *Carcinogenesis* 17(12): 2763-2769.
- Sarker, A. H., Tsutakawa, S. E., Kostek, S., Ng, C., Shin, D. S., Peris, M., Campeau, E., Tainer, J. A., Nogales, E. und Cooper, P. K. (2005). Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome. *Mol Cell* 20(2): 187-198.
- Sasco, A. J., Secretan, M. B. und Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* 45 Suppl 2: S3-9.
- Savage, C. O. (1994). The biology of the glomerulus: endothelial cells. *Kidney Int* 45(2): 314-319.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D. A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S. R., Simmons, A., Clines, G. A., Sartiel, A., Gatti, R. A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M. F., Jaspers, N. G., Taylor, A. M., Arlett, C. F., Miki, T., Weissman, S. M., Lovett, M.,

- Collins, F. S. und Shiloh, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268(5218): 1749-1753.
- Schachter, M. (2005). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol* 19(1): 117-125.
- Scheeff, E. D., Briggs, J. M. und Howell, S. B. (1999). Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 56(3): 633-643.
- Schmitz, A. A., Govek, E. E., Bottner, B. und Van Aelst, L. (2000). Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* 261(1): 1-12.
- Scholzen, T. und Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182(3): 311-322.
- Shankland, S. J. (2006). The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 69(12): 2131-2147.
- Shao, R. G., Cao, C. X., Zhang, H., Kohn, K. W., Wold, M. S. und Pommier, Y. (1999). Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes. *EMBO J* 18(5): 1397-1406.
- Shen, Y. C., Lin, T. T., Sheu, J. H. und Duh, C. Y. (1999). Structures and cytotoxicity relationship of isoaptamine and aptamine derivatives. *J Nat Prod* 62(9): 1264-1267.
- Shi, Y., Felley-Bosco, E., Marti, T. M. und Stahel, R. A. (2012). Differential effects of lovastatin on cisplatin responses in normal human mesothelial cells versus cancer cells: implication for therapy. *PLoS One* 7(9): e45354.
- Shi, Y., Moon, M., Dawood, S., Mcmanus, B. und Liu, P. P. (2011). Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz* 36(4): 296-305.
- Shiloh, Y. (2001). ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 11(1): 71-77.
- Shrivastav, M., De Haro, L. P. und Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 18(1): 134-147.
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22(47): 7265-7279.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. und Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1): 184-191.
- Sit, S. T. und Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 124(Pt 5): 679-683.

- Sledge, G. W., Neuberg, D., Bernardo, P., Ingle, J. N., Martino, S., Rowinsky, E. K. und Wood, W. C. (2003). Phase III trial of doxorubicin, paclitaxel, and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer: an intergroup trial (E1193). *J Clin Oncol* 21(4): 588-592.
- Smith, G. C., Cary, R. B., Lakin, N. D., Hann, B. C., Teo, S. H., Chen, D. J. und Jackson, S. P. (1999). Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11134-11139.
- Smith, G. C. und Jackson, S. P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13(8): 916-934.
- Spatafora, C. und Tringali, C. (2012). Natural-derived polyphenols as potential anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem* 12(8): 902-918.
- Student (1908). The Probable Error of a Mean. *Biometrika* 6(1): 1–25.
- Sulli, G., Di Micco, R. und D'adda Di Fagagna, F. (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* 12(10): 709-720.
- Takahara, P. M., Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A. und Lippard, S. J. (1995). Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* 377(6550): 649-652.
- Takamatsu, S., Hodges, T. W., Rajbhandari, I., Gerwick, W. H., Hamann, M. T. und Nagle, D. G. (2003). Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *J Nat Prod* 66(5): 605-608.
- Takemoto, M., Node, K., Nakagami, H., Liao, Y., Grimm, M., Takemoto, Y., Kitakaze, M. und Liao, J. K. (2001). Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 108(10): 1429-1437.
- Tannock, I. F. und Rotin, D. (1989). Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res* 49(16): 4373-4384.
- Thomas, J. P., Lautermann, J., Liedert, B., Seiler, F. und Thomale, J. (2006). High accumulation of platinum-DNA adducts in strial marginal cells of the cochlea is an early event in cisplatin but not carboplatin ototoxicity. *Mol Pharmacol* 70(1): 23-29.
- Thune, I. und Furberg, A. S. (2001). Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site-specific. *Med Sci Sports Exerc* 33(6 Suppl): S530-S550; discussion S609-510.
- Tobias, J., Buxton, E. J., Blackledge, G., Mould, J. J., Monaghan, J., Spooner, D. und Chetiyawardana, A. (1990). Neoadjuvant bleomycin, ifosfamide and cisplatin in cervical cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 26 Suppl: S59-62.
- Treskes, M., Nijtmans, L. G., Fichtinger-Schepman, A. M. und Van Der Vijgh, W. J. (1992). Effects of the modulating agent WR2721 and its main metabolites on the

- formation and stability of cisplatin-DNA adducts in vitro in comparison to the effects of thiosulphate and diethyldithiocarbamate. *Biochem Pharmacol* 43(5): 1013-1019.
- Tsukamoto, S., Yamanokuchi, R., Yoshitomi, M., Sato, K., Ikeda, T., Rotinsulu, H., Mangindaan, R. E., De Voogd, N. J., Van Soest, R. W. und Yokosawa, H. (2010). Aaptamine, an alkaloid from the sponge *Aaptos suberitoides*, functions as a proteasome inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 20(11): 3341-3343.
- Tsuruya, K., Ninomiya, T., Tokumoto, M., Hirakawa, M., Masutani, K., Taniguchi, M., Fukuda, K., Kanai, H., Kishihara, K., Hirakata, H. und Iida, M. (2003). Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int* 63(1): 72-82.
- Vaisman, A., Lim, S. E., Patrick, S. M., Copeland, W. C., Hinkle, D. C., Turchi, J. J. und Chaney, S. G. (1999). Effect of DNA polymerases and high mobility group protein 1 on the carrier ligand specificity for translesion synthesis past platinum-DNA adducts. *Biochemistry* 38(34): 11026-11039.
- Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M. und Bonassi, S. (2013). gammaH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res* 753(1): 24-40.
- Van Cruchten, S. und Van Den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31(4): 214-223.
- Vignard, J., Mirey, G. und Salles, B. (2013). Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol* 108(3): 362-369.
- Vilmar, A. und Sorensen, J. B. (2009). Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) in platinum-based treatment of non-small cell lung cancer with special emphasis on carboplatin: a review of current literature. *Lung Cancer* 64(2): 131-139.
- Vogelstein, B., Lane, D. und Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408(6810): 307-310.
- Von Pawel, J., Schiller, J. H., Shepherd, F. A., Fields, S. Z., Kleisbauer, J. P., Chrysson, N. G., Stewart, D. J., Clark, P. I., Palmer, M. C., Depierre, A., Carmichael, J., Krebs, J. B., Ross, G., Lane, S. R. und Gralla, R. (1999). Topotecan versus cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine for the treatment of recurrent small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 17(2): 658-667.
- Wagstaff, A. J., Ward, A., Benfield, P. und Heel, R. C. (1989). Carboplatin. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of cancer. *Drugs* 37(2): 162-190.
- Waldman, A. und Kritharides, L. (2003). The pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors: their role in osteoporosis and dementia. *Drugs* 63(2): 139-152.

- Wang, D., Hara, R., Singh, G., Sancar, A. und Lippard, S. J. (2003). Nucleotide excision repair from site-specifically platinum-modified nucleosomes. *Biochemistry* 42(22): 6747-6753.
- Wartlick, F., Bopp, A., Henninger, C. und Fritz, G. (2013). DNA damage response (DDR) induced by topoisomerase II poisons requires nuclear function of the small GTPase Rac. *Biochim Biophys Acta* 1833(12): 3093-3103.
- Welsh, C., Day, R., Mcgurk, C., Masters, J. R., Wood, R. D. und Köberle, B. (2004). Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer* 110(3): 352-361.
- Williams, S. D., Birch, R., Einhorn, L. H., Irwin, L., Greco, F. A. und Loehrer, P. J. (1987). Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N Engl J Med* 316(23): 1435-1440.
- Wisnovsky, S. P., Wilson, J. J., Radford, R. J., Pereira, M. P., Chan, M. R., Laposa, R. R., Lippard, S. J. und Kelley, S. O. (2013). Targeting mitochondrial DNA with a platinum-based anticancer agent. *Chem Biol* 20(11): 1323-1328.
- Woynarowski, J. M., Chapman, W. G., Napier, C., Herzig, M. C. und Juniewicz, P. (1998). Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Mol Pharmacol* 54(5): 770-777.
- Woynarowski, J. M., Faivre, S., Herzig, M. C., Arnett, B., Chapman, W. G., Trevino, A. V., Raymond, E., Chaney, S. G., Vaisman, A., Varchenko, M. und Juniewicz, P. E. (2000). Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol Pharmacol* 58(5): 920-927.
- Xia, X., Ma, Q., Li, X., Ji, T., Chen, P., Xu, H., Li, K., Fang, Y., Weng, D., Weng, Y., Liao, S., Han, Z., Liu, R., Zhu, T., Wang, S., Xu, G., Meng, L., Zhou, J. und Ma, D. (2011). Cytoplasmic p21 is a potential predictor for cisplatin sensitivity in ovarian cancer. *BMC Cancer* 11: 399.
- Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N. und Nugent, K. (2007). Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* 334(2): 115-124.
- Yilmaz, U., Polat, G., Anar, C. und Halilcolar, H. (2011). Carboplatin plus etoposide for extensive stage small-cell lung cancer: an experience with AUC 6 doses of carboplatin. *Indian J Cancer* 48(4): 454-459.
- Yonezawa, A. und Inui, K. (2011). Organic cation transporter OCT/SLC22A and H(+)/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochem Pharmacol* 81(5): 563-568.
- Yonezawa, A., Masuda, S., Yokoo, S., Katsura, T. und Inui, K. (2006). Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J Pharmacol Exp Ther* 319(2): 879-886.

- Yu, Y., Arora, A., Min, W., Roifman, C. M. und Grunebaum, E. (2009). EdU incorporation is an alternative non-radioactive assay to [(3)H]thymidine uptake for in vitro measurement of mice T-cell proliferations. *J Immunol Methods* 350(1-2): 29-35.
- Zamble, D. B. und Lippard, S. J. (1995). Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci* 20(10): 435-439.
- Zamble, D. B., Mikata, Y., Eng, C. H., Sandman, K. E. und Lippard, S. J. (2002). Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. *J Inorg Biochem* 91(3): 451-462.
- Zamble, D. B., Mu, D., Reardon, J. T., Sancar, A. und Lippard, S. J. (1996). Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry* 35(31): 10004-10013.
- Zdraveski, Z. Z., Mello, J. A., Farinelli, C. K., Essigmann, J. M. und Marinus, M. G. (2002). MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA. *J Biol Chem* 277(2): 1255-1260.
- Zhang, B., Ramesh, G., Norbury, C. C. und Reeves, W. B. (2007). Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int* 72(1): 37-44.
- Zhang, L. J., Hao, Y. Z., Hu, C. S., Ye, Y., Xie, Q. P., Thorne, R. F., Hersey, P. und Zhang, X. D. (2008). Inhibition of apoptosis facilitates necrosis induced by cisplatin in gastric cancer cells. *Anticancer Drugs* 19(2): 159-166.
- Zhou, B. B. und Bartek, J. (2004). Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 4(3): 216-225.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. und Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274(17): 11549-11556.
- Zou, L. und Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300(5625): 1542-1548.

8 ANHANG

8.1 ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN

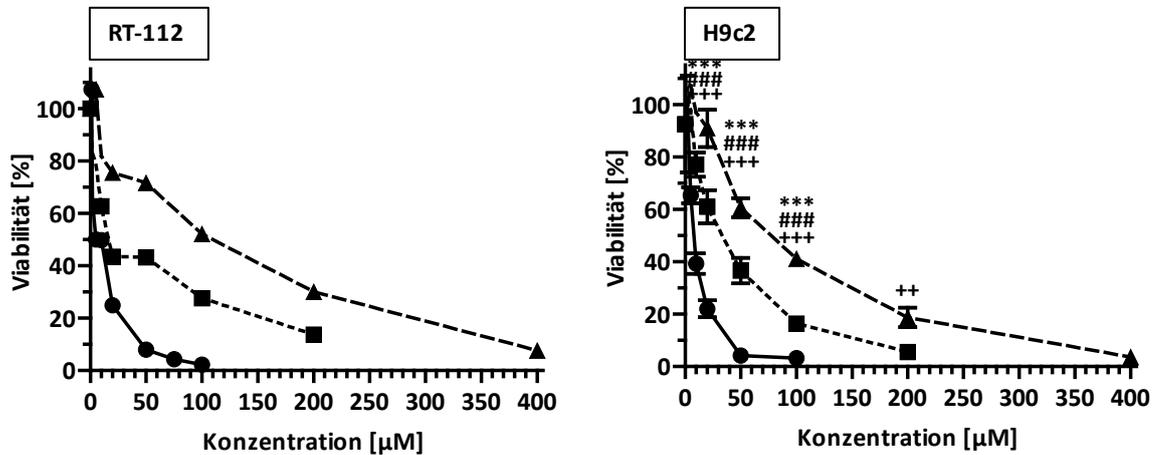


Abbildung 8.1: Zytotoxische Effekte der Platinverbindungen in nicht-renalen Zellen.

RT-112- und H9c2-Zellen wurden für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) und Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen mittels des MTT-Assays untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten Kontrolle (RT-112: n = 1, N = 4; H9c2: n = 3, N = 4). *: Signifikanz CisPt vs. OxaliPt; #: Signifikanz CisPt vs. CarboPt; +: Signifikanz OxaliPt vs. CarboPt.

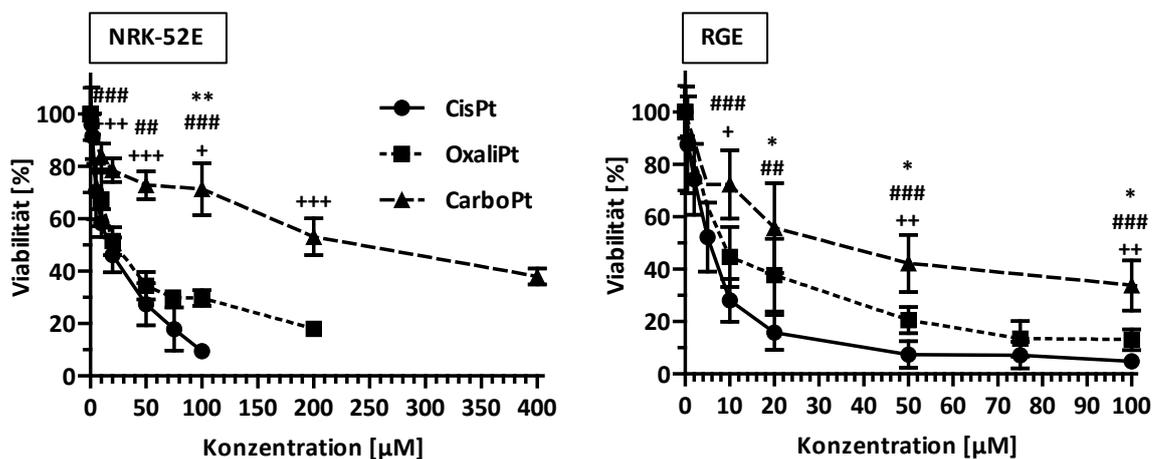


Abbildung 8.2: Zytotoxische Effekte einer Pulsbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin in NRK-52E- und RGE-Zellen.

NRK-52E- sowie RGE-Zellen wurden für 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) und Carboplatin (CarboPt) behandelt, gefolgt von einer Postinkubation von 72 h in Abwesenheit der Platinverbindungen. Anschließend wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen mittels des MTT-Assays untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten Kontrolle (NRK-52E: n = 3, N = 4; RGE: n = 4, N = 4). *: Signifikanz CisPt vs. OxaliPt; #: Signifikanz CisPt vs. CarboPt; +: Signifikanz OxaliPt vs. CarboPt.

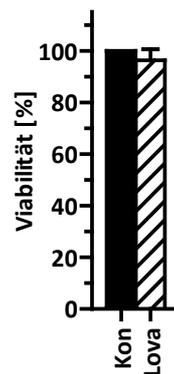


Abbildung 8.3: Viabilitätsuntersuchung von NRK-52E-Zellen nach Behandlung mit Lovastatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 μM Lovastatin (Lova) behandelt und für 76 h in Abwesenheit des Statins postinkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mittels des Alamar Blue-Assays untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten Kontrolle (n = 3, N = 4).

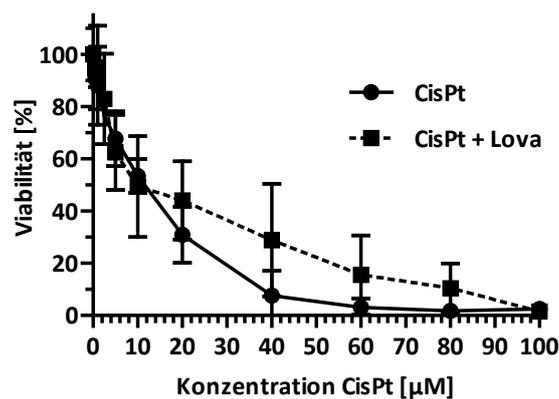


Abbildung 8.4: Viabilitätsuntersuchung von NRK-52E-Zellen nach Vorbehandlung mit Lovastatin, anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin und nachfolgenden 48 h Postinkubation.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 μM Lovastatin (Lova) vorbehandelt und anschließend für 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 48 h in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mittels des Alamar Blue-Assays untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm der Standardabweichungen in Prozent der un- bzw. vorbehandelten Kontrolle (n = 3, N = 4).

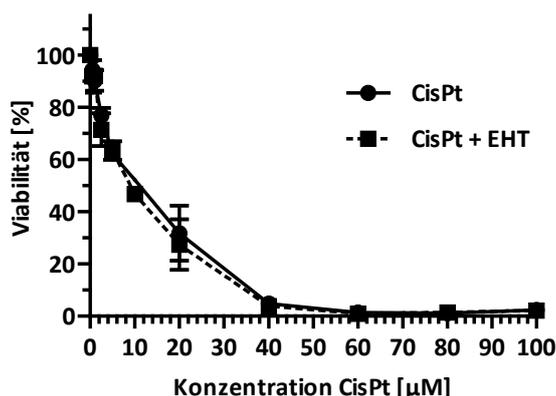


Abbildung 8.5: Einfluss einer EHT-Vorbehandlung auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität.

NRK-52E-Zellen wurden für 4 h mit 20 µM EHT1864 (EHT) vorbehandelt und für 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 48 h in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen mittels des Alamar Blue-Assays untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten Kontrolle (n = 3, N = 4).

8.2 AUFLISTUNG DER DEN ABILDUNGEN ZUGRUNDE LIEGENDEN DATEN

Tabelle 8.1: Daten der MTT-Assays von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) und Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen mittels des MTT-Assays untersucht. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.1A zugrunde liegenden Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten Kontrolle (NRK-52E: n = 5, N = 4; RGE: n = 3, N = 4).

Konzentration [µM]	NRK-52E			RGE		
	CisPt [%]	OxaliPt [%]	CarboPt [%]	CisPt [%]	OxaliPt [%]	CarboPt [%]
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	92,7 \pm 4,4	-	-	91,1 \pm 11,3	-	-
2	80,5 \pm 7,3	74,2 \pm 8,6	-	73,5 \pm 11,7	72,8 \pm 21,8	-
5	62,1 \pm 8,5	53,8 \pm 9	83,1 \pm 7,4	54,4 \pm 4,1	41,1 \pm 13,3	81,7 \pm 13,6
10	48,6 \pm 6,8	46,3 \pm 6,4	79,6 \pm 7,8	35 \pm 16,5	35,3 \pm 6,6	60,8 \pm 11,2
20	29,2 \pm 8	36,9 \pm 4,1	68,7 \pm 6,5	15,9 \pm 13	24,8 \pm 9,0	52,0 \pm 8,7
50	6,2 \pm 5,1	-	-	6,7 \pm 4,0	10,6 \pm 5,5	23,8 \pm 3,9
75	3,7 \pm 3,4	-	-	4,9 \pm 2,5	6,9 \pm 1,9	-
100	3,6 \pm 1,4	23,9 \pm 8,7	46,7 \pm 7,1	4,5 \pm 1,4	4,7 \pm 0,8	10,2 \pm 2,6
200	-	7,4 \pm 5,2	16,0 \pm 5,8	-	3,8 \pm 2,0	4,1 \pm 2,2
400	-	-	6,2 \pm 6,6	-	-	0,5 \pm 1,3

Tabelle 8.2: Daten der Trypanblau-Assays von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 72 h mit den jeweiligen IC₅₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Anzahl an lebenden Zellen mittels des Trypanblau-Assays bestimmt. Die Anzahl der lebenden Zellen zum Zeitpunkt der

Zytostatikazugabe (Kon 1) wurde auf 100 % gesetzt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.1C zugrunde liegenden Mittelwerte (n = 1, N = 3). Kon 2: unbehandelte Kontrolle nach 72 h Behandlung.

	NRK-52E	RGE
Kon 1	100 %	100 %
Kon 2	707 %	707 %
CisPt	69 %	69 %
OxaliPt	155 %	155 %
CarboPt	101 %	101 %

Tabelle 8.3: Daten der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h, 48 h oder 72 h mit den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers ermittelt. Aufgelistet sind die der Abbildungen 3.2B und 3.3B zugrunde liegenden Mittelwerte in Prozent der gemessenen Gesamtzellzahl (n ≥ 1, N = 2). Kon: unbehandelte Kontrolle.

NRK-52E	24 h			48 h			72 h		
	SubG1 [%]	G0/G1 [%]	G2/M [%]	SubG1 [%]	G0/G1 [%]	G2/M [%]	SubG1 [%]	G0/G1 [%]	G2/M [%]
Kon	3,7	57,3	22,1	13,2	65,0	17,0	4,1	71,7	19,7
CisPt	19,7	28,2	20,4	71,7	13,4	9,5	73,9	9,8	6,5
IC₅₀ OxaliPt	6,9	67,1	20,4	18,0	63,6	15,1	4,2	63,9	22,2
CarboPt	8,9	40,4	25,9	50,0	30,5	13,9	59,3	18,1	14,1
CisPt	44,9	23,7	12,3	87,3	10,4	1,6	70,7	11,6	9,1
IC₈₀ OxaliPt	33,9	35,7	14,5	76,1	15,4	6,0	66,3	18,3	8,4
CarboPt	6,7	39,5	28,9	67,7	22,2	7,2	73,1	11,5	9,9

RGE	24 h			48 h			72 h		
	SubG1 [%]	G0/G1 [%]	G2/M [%]	SubG1 [%]	G0/G1 [%]	G2/M [%]	SubG1 [%]	G0/G1 [%]	G2/M [%]
Kon	2,6	61,4	15,6	1,9	75,3	12,3	3,3	64,3	13,0
CisPt	3,2	25,4	25,6	5,0	33,2	42,2	8,0	15,9	34,3
IC₅₀ OxaliPt	2,0	44,1	23,8	2,8	56,1	25,1	2,5	41,9	25,2
CarboPt	2,8	38,1	22,4	6,2	39,2	33,5	9,4	14,2	38,7
CisPt	4,5	39,8	16,7	3,2	55,4	24,8	13,9	33,8	19,3
IC₈₀ OxaliPt	4,2	30,2	24,7	4,0	39,3	34,9	6,6	13,5	39,2
CarboPt	2,5	36,9	24,8	4,6	34,6	38,5	7,1	13,4	43,6

Tabelle 8.4: Daten der immunzytochemischen Analysen der mitotischen Aktivität von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h mit den jeweiligen IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Anzahl an phospho-Histon 3 (p-H3)- und Zentromerprotein F (CENP-F)-positiven Zellen nach immunzytochemischen Färbungen bestimmt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.4 zugrunde liegenden Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 2, N = 2). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellen gezählt. Kon: unbehandelte Kontrolle.

	NRK-52E		RGE	
	p-H3	CENP-F	p-H3	CENP-F
	[%]	[%]	[%]	[%]
Kon	16,3 ± 4,2	22,5 ± 1	5,1 ± 2,5	12,6 ± 4,0
CisPt	6,9 ± 2,6	42,7 ± 1,1	2,4 ± 0,6	9,1 ± 4,7
OxaliPt	3,2 ± 4,5	52,9 ± 0,6	1 ± 0,7	9,9 ± 8
CarboPt	13,8 ± 4,1	38,7 ± 2,7	2,2 ± 3,1	16,2 ± 3,3

Tabelle 8.5: Daten der immunzytochemischen Analysen der Proliferation von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h mit den jeweiligen IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Anzahl an KI-67-positiven Zellen nach immunzytochemischer Färbung bestimmt. Außerdem wurden die Zellen mit 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) behandelt und die EdU-Inkorporation mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.5. zugrunde liegenden Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 2, N = 2). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellen gezählt. Kon: unbehandelte Kontrolle.

	NRK-52E		RGE	
	EdU	KI-67	EdU	KI-67
	[%]	[%]	[%]	[%]
Kon	54,3 ± 2,7	90,4 ± 79,4	49,2 ± 3,0	89,5 ± 12,2
CisPt	54,3 ± 9,8	69,5 ± 60,8	42,8 ± 3,7	85,5 ± 9,1
OxaliPt	27,7 ± 6,5	72,9 ± 77,4	57,7 ± 3,3	91,4 ± 12,2
CarboPt	58,6 ± 2,1	85 ± 69,8	68,2 ± 14,4	84,1 ± 18,4

Tabelle 8.6: Daten der Apo-ONE®-Assays von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h, 48 h bzw. 72 h mit den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mittels des Apo-ONE®-Assays fluorimetrisch bestimmt. Der Anstieg der Caspaseaktivität (Δ relative fluorescence unit; Δ RFU) wurde auf die mittels des Alamar Blue-Assays bestimmte Viabilität bezogen. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.6 zugrunde liegenden Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle (Kon) (24 h, 72 h: n = 2, N = 3; 48 h: n = 1, N = 3).

	NRK-52E			RGE		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
	[Δ RFU/ Viabilität]					
Kon	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
CisPt	11,8 ± 3,7	3,4	5,2 ± 1,5	1,6 ± 0,7	1,5	0,7 ± 0,3
IC₅₀ OxaliPt	0,6 ± 0,3	0,2	0,6 ± 0,4	0,4 ± 0,4	0,6	0,2 ± 0,1
CarboPt	4,6 ± 0,8	4,4	10,2 ± 4,9	1,4 ± 0,4	1,1	0,3 ± 0,2
CisPt	49,1 ± 9,0	7,0	5,9 ± 4,4	4,9 ± 4,9	3,8	3,0 ± 1,1
IC₈₀ OxaliPt	41,1 ± 15,4	3,9	1,6 ± 1,6	2,3 ± 2,3	0,9	1,7 ± 1,4
CarboPt	8,1 ± 0,8	5,3	20 ± 10,1	1,3 ± 0,6	3,4	1,9 ± 0,9

Tabelle 8.7: Daten der DAPI-Färbungen von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 48 h mit den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt und die Anzahl der fragmentierten Zellkerne quantifiziert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.8 zugrunde liegenden Mittelwerte. Kon: unbehandelte Kontrolle (n = 1, N = 2). Es wurden jeweils (je N) mehr als 100 Zellen gezählt.

	NRK-52E	RGE
	[%]	[%]
Kon	0	0,6
IC₅₀ CisPt	13,5	14,2
OxaliPt	0,9	10
CarboPt	5,1	16,4
IC₈₀ CisPt	21,7	2,9
OxaliPt	6,1	10,7
CarboPt	9,7	16,3

Tabelle 8.8: Daten der LDH-Assays von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit den jeweiligen IC₅₀ bzw. IC₈₀ der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde im Überstand der Zellen die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) mittels des LDH-Assays quantifiziert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.9 zugrunde liegenden Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle (Kon) (n ≥ 2, N = 3).

	NRK-52E			RGE		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Kon	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
IC₅₀ CisPt	5 ± 1,7	7 ± 4,5	5,3 ± 1,2	0,3 ± 0	0,7 ± 0,4	0,5 ± 0,4
OxaliPt	0 ± 0	2,3 ± 4,1	0 ± 0	0,2 ± 0,1	0,7 ± 1	0,1 ± 0,2
CarboPt	4,0 ± 5,3	6,9 ± 4,2	6,1 ± 2,3	0,3 ± 0	1 ± 0,4	0,2 ± 0,1
IC₈₀ CisPt	12,4 ± 11,4	10,5 ± 4,5	4,2 ± 0,2	0,7 ± 0,4	2,6 ± 0,2	1,7 ± 1,0
OxaliPt	9,2 ± 10,3	7,4 ± 4,9	2,4 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,4
CarboPt	5,4 ± 4,6	9,1 ± 4,8	7,2 ± 2,2	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,3

Tabelle 8.9: Daten der γH2AX-Foci-Analysen von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Bestrahlung.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt. Anschließend wurde die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ermittelt, indem die Anzahl an nukleären γH2AX-Foci pro Zellkern zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h) mittels immunzytochemischer Färbung quantifiziert wurde. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.10A zugrunde liegenden Mittelwerte. Kon: unbehandelte Kontrolle (n = 1, N = 1). Es wurden mehr als 50 Zellkerne ausgezählt.

	NRK-52E	RGE
Kon	3,4	1,6
0 h	29,1	33,1
0,5 h	36,6	35,4
1 h	46,5	40,8
2 h	20,5	32,4
4 h	10,4	16,7

Tabelle 8.10: Daten der γ H2AX-Foci-Analysen von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 8 h mit den jeweiligen IC_{50} bzw. IC_{80} der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Teilweise folgte der Behandlung eine Postinkubation von 24 h in Abwesenheit der Platinverbindungen (8 h + 24 h). Anschließend wurde die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ermittelt, indem die Anzahl von nukleären γ H2AX-Foci pro Zellkern mittels immunocytochemischer Färbungen quantifiziert wurde. Aufgelistet sind die der Abbildungen 3.11 und 3.12 zugrunde liegenden Mittelwerte \pm der Standardabweichung. Kon: unbehandelte Kontrolle (CisPt, CarboPt: n = 3, N = 1; OxaliPt: n = 2, N = 1). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellkerne ausgezählt.

	NRK-52E		RGE	
	8 h	8 h + 24 h	8 h	8 h + 24 h
Kon	2,9 \pm 0,6	3,7 \pm 1	14,7 \pm 5,1	2,7 \pm 0,2
IC₅₀ CisPt	8,8 \pm 2,2	9,9 \pm 2,8	9,4 \pm 4,4	26,1 \pm 15,2
OxaliPt	6,1 \pm 0,4	8 \pm 0,3	22,9 \pm 2,6	11,4 \pm 6,4
CarboPt	6,8 \pm 3,1	15,7 \pm 6,2	14,1 \pm 3,9	22,2 \pm 16,2
IC₈₀ CisPt	11,2 \pm 6,1	36,1 \pm 7	9,1 \pm 2,4	26,7 \pm 13,8
OxaliPt	9,8 \pm 0,9	22,2 \pm 16,2	21,6 \pm 6,2	16,8 \pm 7,9
CarboPt	8,8 \pm 4,1	26,7 \pm 13,8	29,2 \pm 1	34,4 \pm 20,7

Tabelle 8.11: Daten der massenspektrometrischen Gesamtzellplatinierungsanalysen von NRK-52E- und RGE-Zellen nach Behandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 4 h mit den jeweiligen IC_{80} der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Anschließend wurde die Gesamtzellplatinierung mittels induktiv gekoppelter Massenspektrometrie (*inductively coupled plasma mass spectrometry*; ICP-MS) gemessen (in Kooperation mit Dr. Maja Osmak, *Laboratory for Genotoxic Agents, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute* in Zagreb, Kroatien). Aufgelistet sind die der Abbildung 3.15 zugrunde liegenden Mittelwerte (n = 1, N = 3).

	NRK-52E	RGE
CisPt	0,36	0,40
OxaliPt	0,83	0,62
CarboPt	1,71	3,45

Tabelle 8.12: Daten der Southwestern Blot-Analysen zur Bildung von Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten in NRK-52E- und RGE-Zellen nach Behandlung mit Cis- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden über 4 h mit den jeweiligen IC_{80} der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Teilweise folgte eine Postinkubation von bis zu 72 h in Abwesenheit der Platinverbindungen (4 h + 72 h). Anschließend wurde die Menge an Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten mittels Southwestern Blot-Analysen ermittelt. Die Autoradiographien wurden densitometrisch ausgewertet und die Signalintensität auf die der jeweiligen Methylenblaufärbung bezogen. Anschließend wurde die Signalintensität der DNA unbehandelter Zellen subtrahiert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.16A zugrunde liegenden Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 3, N = 2).

	NRK-52E		RGE	
	CisPt	CarboPt	CisPt	CarboPt
4 h	1,69 \pm 0,54	0,39 \pm 0,23	1,4 \pm 0,51	0,36 \pm 0,17
4 h + 6 h	1,32 \pm 0,3	0,57 \pm 0,15	0,98 \pm 0,47	0,28 \pm 0,03
4 h + 24 h	1,18 \pm 0,41	0,6 \pm 0,29	0,53 \pm 0,14	0,24 \pm 0,34
4 h + 48 h	1,06 \pm 0,21	0,24 \pm 0,21	0,45 \pm 0,34	0,09 \pm 0,09
4 h + 72 h	0,86 \pm 0,33	0,16 \pm 0,12	0,16 \pm 0,05	0,06 \pm 0,05

Tabelle 8.13: Daten der Southwestern Blot-Analysen zur Reparatur von Cisplatin-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten in NRK-52E- und RGE-Zellen.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 4 h mit der jeweiligen IC_{80} von Cisplatin (CisPt) behandelt. Teilweise folgte eine Postinkubation von bis zu 72 h in CisPt-Abwesenheit (4 h + 72 h). Anschließend wurde die Menge an Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten mittels Southwestern Blot-Analysen ermittelt. Die Autoradiographien wurden densitometrisch ausgewertet und die Signalintensität auf die der jeweiligen Methylenblaufärbung bezogen. Anschließend wurde die Signalintensität der DNA un behandelter Zellen subtrahiert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.16B zugrunde liegenden Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Prozent der reparierten CisPt-(GpG)-DNA-Addukte ausgehend von dem Adduktmaximum nach 4 h ($n = 3, N = 2$).

	NRK-52E [%]	RGE [%]
4 h + 6 h	21,69 \pm 17,47	29,63 \pm 33,6
4 h + 24 h	30,1 \pm 24,28	61,95 \pm 10,12
4 h + 48 h	36,99 \pm 12,29	67,75 \pm 24,18
4 h + 72 h	48,99 \pm 19,58	88,88 \pm 3,25

Tabelle 8.14: Daten der basalen mRNA-Expressionen von Cisplatinsuszeptibilitätsfaktoren in NRK-52E- und RGE-Zellen.

Die basale mRNA-Expression von Faktoren, die mit der Resistenz gegenüber Cisplatin in Tumorzellen assoziiert werden, wurde in NRK-52E- und RGE-Zellen mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Es wurde auf die relative mRNA-Expression der NRK-52E-Zellen normiert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.17 zugrunde liegenden Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 2, N = 2$).

	NRK-52E	RGE
<i>Bax</i>	1 \pm 0,3	4,8 \pm 1,2
<i>Bcl2</i>	1 \pm 0,2	1,8 \pm 0,4
<i>Xiap</i>	1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,3
<i>Csb</i>	1 \pm 0,1	2,1 \pm 0,3
<i>Ercc1</i>	1 \pm 0,2	1,9 \pm 0,3
<i>Xpa</i>	1 \pm 0,3	4,3 \pm 0,9
<i>Xpg</i>	1 \pm 0,2	5,3 \pm 1,3
<i>Ctr1</i>	1 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2
<i>Mrp2</i>	1 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1

Tabelle 8.15: Daten der mRNA-Expressionen von Cisplatinsuszeptibilitätsfaktoren in NRK-52E- und RGE-Zellen nach Dauerbehandlung mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin.

NRK-52E- und RGE-Zellen wurden für 24 h mit den jeweiligen IC_{80} der Platinverbindungen Cisplatin (CisPt), Oxaliplatin (OxaliPt) oder Carboplatin (CarboPt) behandelt. Die mRNA-Expression von Faktoren, die mit der Resistenz gegenüber CisPt in Tumorzellen assoziiert werden, wurde mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Die relative mRNA Expression der un behandelten Zellen (Kon) wurde auf 1 gesetzt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.18 zugrunde liegenden Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 2, N = 2$).

	NRK-52E				RGE			
	Kon	CisPt	OxaliPt	CarboPt	Kon	CisPt	OxaliPt	CarboPt
<i>Bax</i>	1 ± 0,3	6,5 ± 4,8	3,4 ± 4	4,2 ± 0,5	1 ± 0,1	3,2 ± 0,5	2,2 ± 0,2	2,5 ± 0,2
<i>Bcl2</i>	1 ± 0,3	1,3 ± 0,9	1,6 ± 0,2	2,0 ± 0,5	1 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,1
<i>Xiap</i>	1 ± 0,4	1,1 ± 0,7	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,4	1 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,3 ± 0,1
<i>Csb</i>	1 ± 0,3	1,5 ± 0,7	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1 ± 0,3	1,9 ± 0,7	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,3
<i>Ercc1</i>	1 ± 0,3	6,6 ± 3,5	9,5 ± 0,7	1,4 ± 0,4	1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,3	1,1 ± 0,4
<i>Xpa</i>	1 ± 0,3	1,3 ± 0,6	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,3
<i>Xpg</i>	1 ± 0,4	2,1 ± 1	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1 ± 0,1	1,8 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1
<i>Ctr1</i>	1 ± 0,3	2 ± 0,9	2,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1 ± 0,1	3,4 ± 0,5	2,9 ± 0,4	1,6 ± 0,1
<i>Mrp2</i>	1 ± 0,3	0,7 ± 0,4	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,5	1 ± 0,6	1,9 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,3 ± 1,0

Tabelle 8.16: Daten der Alamar Blue-Assays von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 µM Lovastatin (Lova) vorbehandelt und für 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 72 h in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mittels des Alamar Blue-Assays untersucht. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.19 zugrunde liegenden Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten bzw. vorbehandelten Kontrolle (n = 3, N = 4).

Konzentration [µM]	CisPt [%]	CisPt + Lova [%]
0	100,0	100,0
0,5	102,5 ± 1,2	90,7 ± 2,8
1	99,7 ± 1,4	95,2 ± 1,5
2,5	92,1 ± 3,1	81,3 ± 7,8
5	80,6 ± 4,9	65,0 ± 8,0
10	60,4 ± 5,8	50,6 ± 2,1
20	48,4 ± 4,5	43,0 ± 1,5
40	24,8 ± 5,9	37,0 ± 2,8
60	7,2 ± 5,1	28,8 ± 6,5
80	2,0 ± 2,3	18,1 ± 11,4
100	0,2 ± 0,1	7,7 ± 7,4

Tabelle 8.17: Daten der γH2AX-Foci-Analyse von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 µM Lovastatin (Lova) vorbehandelt und für 4 h mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 4 h (4 h + 4 h) oder 24 h (4 h + 24 h) in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBS) ermittelt, indem die Anzahl von nukleären γH2AX-Foci pro Zellkern mittels immunzytochemischer Färbung quantifiziert wurde. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.21A zugrunde liegenden Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 3, N = 2). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellkerne ausgezählt. Kon: unbehandelte Kontrolle.

	4 h + 4 h	4 h + 24 h
Kon	5,9 ± 2,2	10,6 ± 7,8
Lova	9,5 ± 4,1	6,6 ± 4,1
IC₅₀	31,5 ± 29,0	46 ± 21,1
IC₅₀ + Lova	44,4 ± 41,6	46,7 ± 45,2
IC₈₀	44,1 ± 30,5	44,9 ± 5,0
IC₈₀ + Lova	34,7 ± 24,2	35,7 ± 16,9

Tabelle 8.18: Daten der Comet-Analysen von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 µM Lovastatin (Lova) vorbehandelt und für 4 h mit der IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 4 h (4 h + 4 h) oder 24 h (4 h + 24 h) in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Menge an DNA-Strangbrüchen ermittelt, indem der Anteil an Schweif-DNA pro Zellkern mittels des alkalischen sowie neutralen Comet-Assays quantifiziert wurde. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.21B zugrunde liegenden Mittelwerte ± Standardabweichungen (alkalisch: n = 2, N = 3; neutral: n = 1, N = 3). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellkerne ausgezählt. Kon: unbehandelte Kontrolle.

	alkalisch		neutral	
	4 h + 4 h	4 h + 24 h	4 h + 4 h	4 h + 24 h
Kon	5,7 ± 0,7	4,5 ± 2,3	5,5	4,7
Lova	4,4 ± 1,8	4,9 ± 2,4	3,7	6,8
CisPt	9,3 ± 2,0	15,9 ± 3,2	8,6	14,8
CisPt + Lova	11,6 ± 1,1	21,3 ± 0,5	12,9	17,2

Tabelle 8.19: Daten der Southwestern Blot-Analyse von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 µM Lovastatin (Lova) vorbehandelt und für 4 h mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) behandelt. Teilweise folgte eine Postinkubation von 4 h (4 h + 4 h) oder 24 h (4 h + 24 h) in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Menge an Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten mittels Southwestern Blot-Analysen ermittelt. Die Autoradiographien wurden densitometrisch ausgewertet und die Signalintensität auf die der jeweiligen Methylenblaufärbung bezogen. Anschließend wurde die Signalintensität der DNA un behandelter Zellen subtrahiert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.22 zugrunde liegenden Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 2, N = 2).

	4 h	4 h + 4 h	4 h + 24 h
IC₅₀	0,36 ± 0,15	0,43 ± 0,12	0,22 ± 0
IC₅₀ + Lova	0,83 ± 0,31	0,9 ± 0,02	0,72 ± 0,34
IC₈₀	0,4 ± 0,15	0,54 ± 0,16	0,33 ± 0,04
IC₈₀ + Lova	0,82 ± 0,5	0,98 ± 0,05	0,71 ± 0,13

Tabelle 8.20: Daten der mRNA-Expression von NRK-52E-Zellen nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 µM Lovastatin (Lova) vorbehandelt und für 4 h mit der IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 4 h (4 h + 4 h) oder 24 h (4 h + 24 h) in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die mRNA-Expression von Faktoren, die mit der Resistenz gegenüber CisPt in Tumorzellen assoziiert werden, mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Die relative mRNA-Expression der un behandelten Zellen (Kon) wurde auf 1 gesetzt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.23 zugrunde liegenden Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 2, N = 2).

	4 h + 4 h				4 h + 24 h			
	Kon	Lova	CisPt	CisPt + Lova	Kon	Lova	CisPt	CisPt + Lova
<i>Bax</i>	1 ± 2,3	0,3 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,3	1 ± 0,2	1,3 ± 0,1	3 ± 0,6	5,2 ± 0,6
<i>Bcl2</i>	1 ± 0,2	1,4 ± 0,5	1,1 ± 0,5	1,3 ± 0,6	1 ± 0,2	1 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,2
<i>Xiap</i>	1 ± 0,2	3,4 ± 1,5	1,2 ± 0,5	0,7 ± 0,2	1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1 ± 0,2
<i>Csb</i>	1 ± 0,2	2,3 ± 0,8	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3	1 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1
<i>Ercc1</i>	1 ± 0,2	16,8 ± 5,2	1,6 ± 0,4	3,7 ± 0,9	1 ± 0,2	1,3 ± 0,2	8,9 ± 3,8	4,5 ± 2,2
<i>Xpa</i>	1 ± 0,3	5,0 ± 3,2	1,0 ± 0,5	1,2 ± 0,3	1 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,2
<i>Xpg</i>	1 ± 0,2	8,4 ± 4,1	1,1 ± 0,4	2,4 ± 0,6	1 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,6	2,6 ± 0,4
<i>Ctrl</i>	1 ± 0,3	4,6 ± 2,4	1,4 ± 0,6	1,1 ± 0,4	1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	2,9 ± 1,0	2,4 ± 0,6
<i>Mrp2</i>	1 ± 0,3	2,4 ± 0,8	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,3 ± 0,1

Tabelle 8.21: Daten der Zellzyklusanalyse von NRK-52E-Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Lovastatinvorbehandlung und anschließender Pulsbehandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 10 µM Lovastatin (Lova) vorbehandelt und für 4 h mit der IC₅₀ bzw. IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) behandelt. Es folgte eine Postinkubation von 24 h (4 h + 24 h) oder 48 h (4 h + 48 h) in CisPt-Abwesenheit. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers gemessen. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.25B und C zugrunde liegenden Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 2, N = 2). Kon: unbehandelte Kontrolle.

	4 h + 24 h		4 h + 48 h	
	SubG1 [%]	G2/M [%]	SubG1 [%]	G2/M [%]
Kon	3,7 ± 0,7	23,2 ± 3,2	8,4 ± 0,1	19,2 ± 5,7
Lova	0,9 ± 0,1	36,6 ± 6,1	6,8 ± 3,6	21,3 ± 2,5
IC₅₀	15,6 ± 1,3	26,7 ± 2,1	25,2 ± 3,5	29,7 ± 17,2
IC₅₀ + Lova	2,9 ± 0,4	55,7 ± 3,8	18,4 ± 2,2	41,5 ± 12,1
IC₈₀	40,4 ± 12,6	9,3 ± 5,2	41,7 ± 13,7	11,8 ± 8,3
IC₈₀ + Lova	16,1 ± 11,6	9,6 ± 8,7	12,9 ± 9,3	26,0 ± 24,0

Tabelle 8.22: Daten der MTT-Assays von NRK-52E-, RGE- und RT-112-Zellen nach Aaptamin- oder Aeroplysinin-1-Vorbehandlung und anschließender Kobehandlung mit Cis- oder Oxaliplatin.

NRK-52E-, RGE- und RT-112-Zellen wurden für 24 h mit Aaptamin (Aa) bzw. Aeroplysinin-1 (Ap) (NRK-52E und RT-112: 2 µM, RGE: 1 µM) vorbehandelt und für 48 h mit Aa bzw. Ap und unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin (CisPt) bzw. Oxaliplatin (OxaliPt) kobehandelt. Anschließend wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen mittels des MTT-Assays untersucht. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.26A und B zugrunde liegenden Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten bzw. vorbehandelten Kontrolle (NRK-52E: n = 3, N = 4; RGE: n = 2, N = 4; RT-112: n = 4, N = 4).

Konzentration [μM]	NRK-52E			RGE		
	CisPt	CisPt + Aa	CisPt + Ap	CisPt	CisPt + Aa	CisPt + Ap
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
0	100	100	100	100	100	100
1	76,2 \pm 11,4	82,63 \pm 28,71	70,11 \pm 11,74	37,95 \pm 5,49	88,28 \pm 8,88	90,26 \pm 20,27
2	60,4 \pm 8,2	83,32 \pm 42,4	67,82 \pm 22,47	79,24 \pm 22,68	54,94 \pm 1,32	88,57 \pm 17,37
5	58,5 \pm 9,3	68,55 \pm 32,2	63,1 \pm 8,93	51,15 \pm 3,73	61,83 \pm 10,22	60,81 \pm 6,82
10	41,5 \pm 10	57,01 \pm 21	48,29 \pm 7,02	34,33 \pm 2,29	57,43 \pm 7,33	46,86 \pm 19,4
20	18,4 \pm 9,1	44,9 \pm 17,98	30,14 \pm 22,45	16,08 \pm 2,09	42,83 \pm 21,26	38,49 \pm 26,23
50	5,6 \pm 3,8	17,52 \pm 10,85	14,19 \pm 8,09	15,66 \pm 10,19	32,75 \pm 27,54	19,89 \pm 1,46
100	1,8 \pm 2,0	3,6 \pm 2,25	2,08 \pm 2,71	14,08 \pm 4,7	40,53 \pm 24,09	13,64 \pm 7,48

RT-112			
Konzentration [μM]	CisPt [%]	CisPt + Aa [%]	CisPt + Ap [%]
0	100	100	100
1	101,09 \pm 15,38	84,48 \pm 20,76	109,85 \pm 16,95
2	92,54 \pm 12,56	93,52 \pm 17,58	103,63 \pm 9,42
5	88,3 \pm 7,67	90,45 \pm 10,38	98,1 \pm 5,31
10	89,05 \pm 7,03	84,58 \pm 10,04	100,28 \pm 8,04
20	69,4 \pm 7,08	76,16 \pm 12,11	90,7 \pm 6,51
50	22,2 \pm 8,14	26,35 \pm 12,68	44,09 \pm 27,08
100	0,64 \pm 0,43	7,31 \pm 10,66	12,25 \pm 14,7

Konzentration [μM]	NRK-52E			RGE		
	OxaliPt	OxaliPt + Aa	OxaliPt + Ap	OxaliPt	OxaliPt + Aa	OxaliPt + Ap
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
0	100	100	100	100	100	100
1	91,1 \pm 16,1	72,8 \pm 1,3	73,8 \pm 13	65 \pm 13,7	38,6 \pm 2,5	74,7 \pm 13,3
2	68,5 \pm 13,7	58,6 \pm 5,3	61,9 \pm 4,1	44,2 \pm 4	31,3 \pm 10,7	60,9 \pm 7
5	61,9 \pm 4,6	54,2 \pm 4	51 \pm 3,3	36 \pm 4,4	21,3 \pm 2,4	42,3 \pm 3,2
10	54,4 \pm 5,6	52,1 \pm 1,6	49,3 \pm 3,5	39,4 \pm 4,9	41,6 \pm 4,1	31,3 \pm 11,6
20	47 \pm 1,2	48,8 \pm 7,6	48,8 \pm 5,2	20,7 \pm 1,5	23,6 \pm 12,9	28,9 \pm 0,2
50	31,6 \pm 9,2	39 \pm 7,2	38,5 \pm 11,5	12,8 \pm 5,7	8,4 \pm 3,4	13,8 \pm 2,2
100	3,7 \pm 4,9	34,2 \pm 5,6	10,7 \pm 7,3	9,3 \pm 3,4	17,3 \pm 3,5	9,6 \pm 3,1

Konzentration [μM]	RT-112		
	OxaliPt	OxaliPt + Aa	OxaliPt + Ap
	[%]	[%]	[%]
0	100	100	100
1	81,6 \pm 15,6	77,3 \pm 12,7	95,4 \pm 23,5
2	83,8 \pm 13,6	79,8 \pm 12,4	92,6 \pm 17,1
5	82,6 \pm 10,9	79,2 \pm 13,5	96,8 \pm 3,9
10	86,9 \pm 9,7	80,4 \pm 12,6	98,6 \pm 2,2
20	81,7 \pm 3,1	75,9 \pm 11,5	92,8 \pm 6,4
50	72,3 \pm 4,7	70,8 \pm 15,4	77,7 \pm 9,6
100	49,3 \pm 8,2	47,9 \pm 19,1	68,9 \pm 17,8

Tabelle 8.23: Daten des MTT-Assays von NRK-52E-Zellen nach Aaptaminvorbehandlung und anschließender Kobehandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Aaptamin (Aa) vorbehandelt und für 48 h mit Aa und der IC_{80} von Cisplatin (CisPt) kobehandelt. Anschließend wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen mittels des MTT-Assays untersucht. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.26C zugrunde liegenden Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der unbehandelten Kontrolle (Kon) (n = 2-9, N = 4).

	[%]
Kon	100
CisPt	11,4 \pm 8,2
CisPt + 1 μM Aa	15,0 \pm 5,1
CisPt + 2 μM Aa	25,5 \pm 5,0
CisPt + 5 μM Aa	26,2 \pm 8,0
CisPt + 10 μM Aa	28,6 \pm 10,2

Tabelle 8.24: Daten der SubG1-Analysen von NRK-52E-Zellen nach Aaptamin- oder Aeroplysinin-1-Vorbehandlung und anschließender Kobehandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 2 μM Aaptamin (Aa) bzw. Aeroplysinin-1 (Ap) vorbehandelt und für 48 h mit Aa bzw. Ap und der IC_{50} bzw. IC_{80} von Cisplatin (CisPt) kobehandelt. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers gemessen. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.27 zugrunde liegenden Mittelwerte (n = 1, N = 2).

	SubG1 [%]
Aa	16,4
AP	20,9
IC_{50}	41,0
IC_{50} + Aa	45,7
IC_{50} + Ap	24,0
IC_{80}	77,1
IC_{80} + Aa	63,0
IC_{80} + Ap	71,8

Tabelle 8.25: Daten der γ H2AX- und 53BP1-Foci-Analysen von NRK-52E-Zellen nach Aaptamin- oder Aeroplysinin-1-Vorbehandlung und anschließender Kobehandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 2 μ M Aaptamin (Aa) bzw. Aeroplysinin-1 (Ap) vorbehandelt und für 4 h mit Aa bzw. Ap und der IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) kobehandelt. Anschließend wurde die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ermittelt, indem die Anzahl von nukleären γ H2AX- sowie 53BP1-Foci mittels immunzytochemischen Färbungen quantifiziert wurde. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.28 zugrunde liegenden Mittelwerte (n = 1, N = 2). Es wurden jeweils (je N) mehr als 50 Zellkerne ausgezählt. Kon: unbehandelte Kontrolle.

	γ H2AX- 53BP1-	
	Foci	Foci
Kon	3,8	0,3
Aa	3,4	1,2
Ap	3,9	1,0
CisPt	13,9	4,8
CisPt + Aa	10,7	4,4
CisPt + Ap	12,2	2,4

Tabelle 8.26: Daten der Southwestern Blot-Analysen von NRK-52E-Zellen nach Aaptamin- oder Aeroplysinin-1-Vorbehandlung und anschließender Kobehandlung mit Cisplatin.

NRK-52E-Zellen wurden für 24 h mit 2 μ M Aaptamin (Aa) bzw. Aeroplysinin-1 (Ap) vorbehandelt und für 4 h mit Aa bzw. Ap und der IC₈₀ von Cisplatin (CisPt) kobehandelt. Teilweise folgte eine Postinkubation von 24 h (4 h + 24 h). Anschließend wurde die Menge an Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangaddukten mittels Southwestern Blot-Analysen ermittelt. Die Autoradiographien wurden densitometrisch ausgewertet und die Signalintensität auf die der jeweiligen Methylenblaufärbung bezogen. Anschließend wurde die Signalintensität der DNA unbehauelter Zellen subtrahiert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.29 zugrunde liegenden Mittelwerte (n = 1, N = 2).

	4 h	4 h + 4 h
CisPt	0,82 \pm 0,04	0,57 \pm 0,15
CisPt + Aa	0,69 \pm 0,12	0,55 \pm 0,04
CisPt + Ap	0,86 \pm 0,01	0,46 \pm 0,04

8.3 PUBLIKATIONEN

Aus Prioritätsgründen wurden Teile dieser Arbeit bereits publiziert.

8.3.1 LISTE DER PUBLIKATIONEN

Funk, F., Krüger, K., Henninger, C., Wätjen, W., Proksch, P., Thomale, J. und Fritz, G. (2014). Spongian alkaloids protect rat kidney cells against cisplatin-induced cytotoxicity. *Anticancer Drugs* 25(8): 917-929.

Krüger, K., Thomale, J., Stojanović, N., Osmak, M., Henninger, C., Bormann, S. und Fritz, G. (2015). Platinum-induced kidney damage: Unraveling the DNA damage response (DDR) of renal tubular epithelial and glomerular endothelial cells following platinum injury. *Biochimica et Biophysica Acta* 1853: 685-698.

Krüger, K., Ziegler, V., Hartmann, C., Henninger, C., Thomale, J., Schupp, N. und Fritz, G. Lovastatin prevents cisplatin-induced activation of pro-apoptotic DNA damage response (DDR) of renal tubular epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. In Press, Accepted manuscript.