

# Platinbasierte Chemotherapeutika - Vergleich der Wirkmechanismen und deren Einfluss auf Nierenzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

von der KIT Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)  
genehmigte

DISSERTATION

von  
Sarah Schoch  
aus  
Triberg

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer  
1. Referentin: PD Dr. Beate Köberle  
2. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers  
Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2019



---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass die Arbeit nicht anderweitig als Prüfungsarbeit oder als Dissertation bei einer anderen Fakultät verwendet wird oder wurde.

Karlsruhe, den 16. Mai 2019

Sarah Schoch





*"Even the smallest person can change the course of  
the future."*

Galadriel



---

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
Abstract . . . . .	5
<b>2 Einleitung</b>	<b>9</b>
2.1 Platinbasierte Chemotherapeutika - Eigenschaften der Strukturen klinisch angewandter Substanzen . . . . .	10
2.2 Cisplatin - der Pionier der platinbasierten Chemotherapeutika . . . . .	12
2.2.1 Wirkmechanismus . . . . .	12
2.2.2 Nebenwirkungen . . . . .	15
2.2.3 Resistenzen . . . . .	18
2.3 Carboplatin - Generation 2 der platinbasierten Chemotherapeutika . . . . .	21
2.4 Oxaliplatin - Generation 3 der platinbasierten Chemotherapeutika . . . . .	22
2.5 Platin(IV)-Komplexe - die neue Generation platinbasierter Chemotherapeutika? . . . . .	24
2.5.1 Platin(IV)-nitroxyl-Komplexe (PNCs) . . . . .	27
2.6 Platinbasierte Chemotherapeutika und deren Wirkungen in Nierenzellen . . . . .	30
2.6.1 Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität . . . . .	30
2.6.2 Carboplatin und Oxaliplatin - warum sie im Vergleich zu Cisplatin nicht nephrotoxisch sind . . . . .	35
<b>3 Fragestellung</b>	<b>37</b>
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>39</b>
4.1 Zellkultur . . . . .	39
4.1.1 Zelllinien und Kultivierungsbedingungen . . . . .	39

4.1.2	Kryokonservierung und Inkulturnahme von Zellen . . . . .	41
4.2	Platinbasierte Chemotherapeutika . . . . .	42
4.3	Zytotoxizitätsstudien . . . . .	43
4.3.1	Bestimmung der relativen Zellzahl . . . . .	43
4.3.2	Kolonieformationsassay . . . . .	44
4.4	Intrazelluläre Akkumulation . . . . .	44
4.4.1	Zellkultur . . . . .	44
4.4.2	Aufschluss der Zellpellets und Messung an der GF-AAS . . . . .	45
4.5	DNA-Platinierung . . . . .	45
4.5.1	DNA-Extraktion . . . . .	46
4.5.2	Messung an der ICP-MS . . . . .	47
4.6	Erstellung von Genexpressionsprofilen mittels Hochdurchsatz RT-qPCR . . . . .	48
4.6.1	Zellkultur . . . . .	48
4.6.2	RNA Isolation und Quantifizierung . . . . .	49
4.6.3	cDNA-Synthese . . . . .	50
4.6.4	Preamplifikation ( <i>specific target amplification</i> (STA)) und Exonukleaseverdau . . . . .	50
4.6.5	Primer und Probenvorbereitung . . . . .	51
4.6.6	Dynamic Array IFC qPCR Analyse . . . . .	52
4.6.7	Datenauswertung der Hochdurchsatz RT-qPCR . . . . .	52
4.7	Untersuchung des p53 Proteinlevels mittels Immunoblot . . . . .	53
4.7.1	Zellkultur . . . . .	53
4.7.2	Proteinextraktion . . . . .	54
4.7.3	Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	54
4.7.4	SDS-PAGE . . . . .	54
4.7.5	Proteintransfer . . . . .	55
4.7.6	Immunodetektion . . . . .	56
4.7.7	Semiquantitative Auswertung . . . . .	57
4.8	Bestimmung der Apoptose und Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie . . . . .	57
4.8.1	Zellkultur . . . . .	57
4.8.2	Zellzyklusverteilung . . . . .	58
4.8.3	Messung am Durchflusszytometer . . . . .	58
4.8.4	Apoptose . . . . .	58
4.8.5	Messung am Durchflusszytometer . . . . .	59
4.9	Bestimmung der relativen Caspasenaktivität . . . . .	60
4.9.1	Zellkultur . . . . .	60
4.9.2	Messung der relativen Caspasenaktivität . . . . .	61
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>63</b>
5.1	Vergleich der Wirkmechanismen von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin in A498 Zellen . . . . .	64

---

5.1.1	Zytotoxizitätsstudien . . . . .	64
5.1.2	Intrazelluläre Aufnahme und DNA-Platinierung . . . . .	66
5.1.3	Einfluss von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin auf p53 . . . . .	70
5.1.4	DNA-Schadensantwort und -Reparatur . . . . .	75
5.1.5	Zellzyklus und Proliferation . . . . .	78
5.1.6	Oxidative Stress- und Inflammationsantwort . . . . .	86
5.1.7	Induktion des Zelltods . . . . .	90
5.2	Aufklärung und Einordnung des Wirkmechanismus von PN149 . . . . .	96
5.2.1	Vergleich der Zytotoxizitätsstudien . . . . .	97
5.2.2	Intrazelluläre Aufnahme und DNA-Platinierung . . . . .	98
5.2.3	Einfluss von p53 . . . . .	101
5.2.4	DNA-Schadensantwort und -Reparatur . . . . .	104
5.2.5	Zellzyklus und Proliferation . . . . .	106
5.2.6	Oxidative Stress- und Inflammationsantwort . . . . .	108
5.2.7	Induktion des Zelltods . . . . .	111
5.3	Einfluss von platinbasierten Chemotherapeutika auf Nierennormalzellen . . . . .	114
5.3.1	Auswahl des <i>in vitro</i> Modells zur Untersuchung von Nephrotoxizität . . . . .	115
5.3.2	Zytotoxizität von platinbasierten Chemotherapeutika in ciPTEC Zellen . . . . .	116
5.3.3	Intrazelluläre Aufnahme platinbasierter Chemotherapeutika in ciPTEC Zellen . . . . .	118
5.3.4	Einfluss von platinbasierten Chemotherapeutika auf Transkriptionsfaktoren in ciPTEC Zellen . . . . .	120
5.3.5	DNA-Schadensantwort und -Reparatur in ciPTEC Zellen . . . . .	123
5.3.6	Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferation in ciPTEC Zellen . . . . .	126
5.3.7	Oxidative Stressantwort und Inflammationsmarker in ciPTEC Zellen . . . . .	128
5.3.8	Untersuchung apoptotischer Gene in ciPTEC Zellen . . . . .	132
5.3.9	Vergleich der Genexpressionsprofile von Cisplatin behandelten ciPTEC Zellen mit Nierennormalgewebe . . . . .	134
<b>6</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion</b>	<b>139</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>153</b>
A.1	Chemikalien . . . . .	153
A.2	Puffer und Lösungen . . . . .	155
A.3	Antikörper . . . . .	157
A.4	Verwendete Kits . . . . .	157
A.5	Verbrauchsmaterialien . . . . .	157
A.6	Instrumente und Software . . . . .	158
A.7	Genliste der Hochdurchsatz RT-qPCR . . . . .	159

<b>B Ergänzende Daten</b>	<b>161</b>
B.1 DNA-Platinierung in A498 Zellen . . . . .	161
B.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose in A498 Zellen nach Behandlung mit 200 $\mu$ M Carboplatin . . . . .	162
B.3 Untersuchungen der Wirkmechanismen von Cisplatin und PN149 in RT112 Zellen . .	163
B.3.1 Einfluss von p53 . . . . .	163
B.3.2 DNA-Schadensantwort und -Reparatur . . . . .	164
B.3.3 Zellzyklus und -Proliferation . . . . .	165
B.3.4 Oxidative Stressantwort und Inflammation . . . . .	167
B.3.5 Induktion des Zelltods . . . . .	169
B.4 Vergleich der intrazellulären Akkumulation von Cisplatin in unterschiedlichen Zellkulturmodellen . . . . .	171
<b>C Publikationsliste</b>	<b>173</b>
<b>D Danksagung</b>	<b>175</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>176</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
AGT	<i>O</i> <sup>6</sup> -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase
AKI	<i>acute kidney injury</i>
ARE	<i>antioxidative response element</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP7A/7B	<i>ATPase copper transporting alpha/beta</i>
ATR	<i>ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BAX	<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BBC3	<i>BCL2 binding component 3</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BRCA1/2	<i>breast cancer 1/2, DNA repair associated</i>
BTRC	<i>beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>
CAT	Katalase
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom
CDDP	Cisplatin
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CDKI	Cyclin-abhängige Kinaseinhibitorproteine
CFA	Kolonieformationsfähigkeit
CINV	<i>chemotherapy-induced nausea and vomiting</i>
ciPTEC	<i>conditionally immortalized proximal tubule cells</i>
Ctr1	<i>copper transporter 1</i>
Cyt C	Cytochrom C
DDB2	<i>damage-specific DNA binding protein 2</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>

---

DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DR5	<i>death receptor 5</i>
DSB	Doppelstrangbruch
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERCC1	<i>excision repair cross-complementation group 1</i>
ERCC2	<i>ERCC excision repair 2, TFIIH core complex helicase subunit</i>
ERCC4	<i>ERCC excision repair 4, endonuclease catalytic subunit</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKS	fetales Kälberserum
GADD45A	<i>growth arrest and DNA damage 45</i>
GF-AAS	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GGT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
GPX1/2	Glutathionperoxidase 1/2
GSH	Glutathion
GSR	<i>glutathion-disulfide reductase</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HMG1	<i>high mobility group 1</i>
HMOX1	Hämoxygenase 1
HR	homologe Rekombination
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
ICL	<i>interstrand crosslink</i>
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectroscopy</i>
IL-8	Interleukin 8
KEAP1	<i>kelch like ECH associated protein 1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MATE1	<i>multidrug and toxin extrusion protein</i>
MT	Metallothionein
MGMT	<i>O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
MMR	Mismatchreparatur
MSH2	<i>MutS homolog 2, DNA mismatch repair protein Msh2</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
OCT2	<i>organic cation transporter 2</i>
PARP1	<i>poly(ADP-ribose) polymerase 1</i>



---

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PLK3	<i>polo-like kinase 3</i>
PMAIP1	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
PNC	Platin(IV)-nitroxyl-Komplex
POLB	<i>DNA polymerase beta</i>
RAD51	<i>RAD51 recombinase</i>
RCC	<i>relative cell count</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RRM2B	<i>ribonucleotide reductase regulatory TP53 inducible subunit M2B</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEPP1	Selenoprotein 1
SIRT2	<i>sirtuin 2</i>
SLC	<i>solute carrier family</i>
SOD	Superoxiddismutase
STA	<i>specific target amplification</i>
SV40T	<i>SV40 large T antigen</i>
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyl
TNFRSF	TNF-Rezeptor Superfamilie
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factors</i>
XP	<i>xeroderma pigmentosum</i>
XPA	<i>XPA, DNA damage and recognition and repair factor</i>
XPC	<i>XPC complex subunit, DNA damage recognition and repair factor</i>



---

## Zusammenfassung

---

Krebs stellt eine äußerst komplexe Erkrankung dar, die gleichermaßen eine noch komplexere Behandlung beinhaltet. Nach kardiovaskulären Erkrankungen rangiert Krebs an zweiter Stelle in der Liste der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt. Um so wichtiger ist es, die Behandlung stetig weiterzuentwickeln und zu verbessern.

Eine effektive Behandlungsform stellt die platinbasierte Chemotherapie dar. Sie gilt heute als eine der am häufigsten eingesetzten Chemotherapieformen. Die zufällige Entdeckung ihres Pioniers Cisplatin brachte ein sehr großes Forschungsgebiet hervor, denn obwohl äußerst effektiv, bringt Cisplatin verschiedene Nachteile mit sich, die die Behandlung limitieren. Zu ihnen zählen Resistenzen sowie verschiedene Nebenwirkungen, die u.a. die dosislimitierende Nephrotoxizität beinhalten. Erstreben nach Verbesserungen der Therapie führten zur Entwicklung von Carboplatin und Oxaliplatin. Doch auch diese Substanzen sind in ihrer klinischen Anwendung limitiert. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Limitierungen aller drei Substanzen sind bis heute noch nicht vollständig erforscht.

Alle drei Substanzen unterscheiden sich strukturell voneinander. Diese Strukturunterschiede führen zu einer Anwendung in unterschiedlichen Tumorarten sowie zu unterschiedlichen Nebenwirkungen. Die Erforschung dieser Unterschiede ist essentiell für die Weiterentwicklung der Therapie, doch gerade hier mangelt es vor allem für Oxaliplatin, aber auch für Cisplatin und Carboplatin, an Daten. Deshalb erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine detaillierte Untersuchung der Wirkmechanismen der drei platinbasierten Chemotherapeutika, sowohl auf molekularer als auch auf funktioneller Ebene. Neben den Untersuchungen der Wirkmechanismen der bereits klinisch angewandten Substanzen galt es weiterhin, ein potentiell neues platinbasiertes Chemotherapeutikum auf dessen Wirkmechanismus hin zu untersuchen. Die Substanz PN149 stellt einen Platin(IV)-nitroxyl-Komplex dar

und zeigte in bisherigen Untersuchungen Potential zur Überwindung von Cisplatin-Resistenzen. Abschließend sollte der Mechanismus der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität untersucht werden und die Fragen geklärt werden, warum Carboplatin und Oxaliplatin keine Nierenschäden auslösen und ob PN149 gleichermaßen ein geringeres nephrotoxisches Potential besitzt.

Die Untersuchungen der Wirkmechanismen erfolgte in der Nierenkarzinomzelllinie A498. Zytotoxizitätsstudien offenbarten ein ähnliches zytotoxisches Potential von Cisplatin und Oxaliplatin. Carboplatin zeigte hingegen erst ab dem Einsatz einer im Vergleich zu Cisplatin 10-fachen Konzentration eine ähnliche zytotoxische Wirkung. Studien zur intrazellulären Akkumulation sowie zur DNA-Platinierung offenbarten Unterschiede zwischen allen drei Substanzen trotz vergleichbarer Zytotoxizität. Cisplatin zeigte bei gleicher Konzentration die höchste Akkumulation, wohingegen Carboplatin die geringste aufwies. Erst ab dem Einsatz einer im Vergleich zu Cisplatin 6-fachen Konzentration zeigte Carboplatin eine ähnliche Aufnahme zu Cisplatin. Auch bei der DNA-Platinierung wies Cisplatin den höchsten Gehalt auf. Die DNA-Platinierung von Carboplatin zeigte erhebliche Schwankungen. Aus der Literatur ist jedoch bereits bekannt, dass Carboplatin seinen Abgangsgruppen Liganden nur sehr langsam verliert und deshalb weniger reaktiv ist als Cisplatin und es dadurch länger dauert bis Carboplatin zu DNA-Schäden führt.

Obwohl Oxaliplatin eine deutlich niedrigere DNA-Platinierung aufwies, zeigte es in den Zytotoxizitätsstudien eine ähnliche Effektivität wie Cisplatin. Folglich scheinen Oxaliplatin-induzierte DNA-Schäden toxischer zu sein als Cisplatin-induzierte DNA-Schäden.

Aufgrund dieser Unterschiede wurden folgend Genexpressionsprofile wichtiger Signaltransduktionswege erstellt. Veränderungen auf molekularer Ebene wurden weiter auf funktioneller Ebene analysiert. Dabei zeigten sich nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanzen vor allem Veränderungen in p53-abhängigen Genen. Diese beinhalteten *MDM2*, den Gegenspieler von p53, DNA-Schadensantwort und -reparaturbeteiligte Gene wie *DDB2*, *GADD45A* und *RRM2B*, die Zellzyklus- und Proliferationsgene *CDKN1A*, *PLK3* und *PPM1D* sowie apoptosebeteiligte Gene *BBC3* und *PMAIP1*. Eine Untersuchung des p53-Proteinlevels offenbarte eine Erhöhung des Levels nach Behandlung mit den jeweiligen untersuchten Substanzen, wobei Oxaliplatin die deutlichste und Carboplatin die geringste Erhöhung zeigte.

Neben diesen Gemeinsamkeiten zeigte Oxaliplatin deutliche Unterschiede zu Cisplatin und Carboplatin in den Genexpressionsprofilen. Diese äußerten sich in einer veränderten Expression von DNA-Reparatur- sowie Zellzyklus- und Proliferationsgenen. Besonders die HR-beteiligten Gene *BRCA1*, *BRCA2* und *RAD51* wurden deutlich vermindert exprimiert. Die verminderte Expression dieser Gene könnte im Zusammenhang mit der verminderten Expression des zellzyklusbeteiligten Gens *E2F1* stehen.

Weiterhin führte Oxaliplatin zu einer vermehrten Expression von proliferationsbeteiligten Genen. Während Cisplatin und Carboplatin im Zuge der Zellzyklusverteilungsanalyse nach 24 h einen S-Phasenarrest und nach 48 h einen G<sub>2</sub>/M-Arrest offenbarten, führte eine Behandlung mit Oxaliplatin zu keiner Veränderung. Trotz der Unterschiede zwischen Oxaliplatin und Cisplatin bzw. Carboplatin induzierten alle drei Substanzen in einem vergleichbaren Maße die Apoptose.

Zusammenfassend induzierten Cisplatin und Carboplatin den Zelltod über vergleichbare Mechanismen. Für denselben Effekt musste Carboplatin aufgrund seiner langsameren Reaktionskinetik jedoch in höheren Konzentrationen eingesetzt werden. Im Vergleich dazu unterschied sich der Wirkmechanismus von Oxaliplatin deutlich zu Cisplatin und Carboplatin. Weitere Untersuchungen hierzu könnten eine Anwendung der Substanz in weiteren Tumorarten ermöglichen.

In weiteren Untersuchungen galt es, den Wirkmechanismus der neuen Substanz PN149 aufzuklären. Trotz struktureller Unterschiede zeigte sich, dass PN149 einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Cisplatin und Carboplatin ausübt. Gleichermäßen wie Cisplatin und Carboplatin induzierte PN149 den Zelltod über einen p53-abhängigen Mechanismus. Dabei kam es ebenfalls zu einem Zellzyklusarrest sowie der Induktion der Apoptose. Obwohl die Veränderung im p53-Proteinlevel nur gering ausgeprägt war, zeigte PN149 eine vergleichbare zytotoxische Wirkung wie Cisplatin.

Es zeigte sich jedoch auch, dass PN149 in einem deutlich höheren Ausmaß in die Zelle aufgenommen wird und dort auch vermehrt die DNA platinieren. Dennoch führten die vermehrten DNA-Schäden nicht zu einer höheren Effektivität. Ein Grund hierfür könnte das antioxidative Potential der Substanz sein, da beschrieben wird, dass Cisplatin zusätzlich zu den DNA-Schäden zu oxidativem Stress führt. In den durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch weder für Cisplatin noch für PN149 eine eindeutige Aussage über oxidativen Stress getroffen werden. Es zeigte sich lediglich, dass PN149 im Vergleich zu Cisplatin nicht zu einer vermehrten Expression des Inflammationsmarkers *IL-8* führte. Da Inflammationsprozesse im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen, könnte dies ein Hinweis auf eine verminderte Induktion von oxidativem Stress durch PN149 sein.

Weitere Untersuchungen sind folglich für PN149 noch von Nöten, um weitere Aussagen über das Potential der Substanz zu treffen.

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität. In der Klinik werden weder für Carboplatin noch für Oxaliplatin Nierenschäden festgestellt. Da postuliert wird, dass oxidativer Stress an der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität beteiligt ist, könnte PN149 aufgrund seines antioxidativen Potentials ebenfalls wie Carboplatin und Oxaliplatin nicht zu Nierenschäden führen. Die Untersuchungen hierzu erfolgten in konditional immortalisierten proximalen Tubuluszellen (ciPTEC). Es zeigte sich jedoch bereits anhand der Zytotoxizitätsstudien ein konträres Bild zur Klinik. Cisplatin zeigte zwar den niedrigsten  $IC_{50}$  Wert der klinisch angewandten Substanzen, dennoch waren auch Carboplatin, Oxaliplatin und PN149 deutlich zytotoxisch in ciPTEC Zellen, wobei PN149 die stärkste zytotoxische Wirkung aufwies.

Die weiteren Genexpressionsanalysen offenbarten weiterhin, dass alle vier Substanzen ähnliche Mechanismen in der Zelle auslösten. Diese Ergebnisse stehen folglich konträr den Ergebnissen in den A498 Zellen gegenüber, in denen Oxaliplatin im Vergleich zu den anderen Substanzen einen anderen Wirkmechanismus zeigte. Eine abschließende Evaluierung der ciPTEC Zellen mit Nierennormalgewebe zeigte, dass sich ciPTEC Zellen generell für Studien in Nierenzellen eignen.

Ein einfaches Zellkulturschalenmodell reicht für Nephrotoxizitätsstudien aber vermutlich nicht aus, da Untersuchungen in einem Transwellsystem zeigten, dass sich die Aufnahme von Cisplatin deutlich zu der Aufnahme von Zellen kultiviert in einer Zellkulturschale unterschied. Dies deutet demnach

daraufhin, dass Transportprozesse eine entscheidende Rolle in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität spielen.

Zusammenfassend lässt sich auf der Basis der erhobenen Daten keine Aussage über das nephrotoxische Potential der Substanzen treffen. Vor allem für PN149 müssten Untersuchungen in einem komplexeren Zellkultursystem, wie einem Transwellsystem oder einem *kidney-on-a-chip* durchgeführt werden.

---

## Abstract

Cancer represents a complex disease which implies an even more complex treatment. It ranges behind cardiovascular diseases as the second most common cause of death in the Western world. Therefore, it is important to constantly further develop and improve its treatment.

One of the most effective and most commonly used form of treatment are platinum-based chemotherapeutic agents. The accidental discovery of its pioneer cisplatin led to a huge research area. Even though highly effective, its use is limited due to different disadvantages. These include resistances and severe side effects like the dose limiting nephrotoxicity. Efforts of further improvement of cisplatin led to the development of carboplatin and oxaliplatin. Unfortunately, these compounds also bear limitations. Until today the underlying mechanisms of those limitations are still not fully understand.

The three clinically approved platinum-based compounds differ in their structures. Those structural differences result in a varying efficacy spectrum in different tumor species and in different side effects. The research of those differences is essential for a further development of the therapy. Nevertheless, regarding those differences data are lacking especially of oxaliplatin but also of cisplatin and carboplatin. Therefore, detailed investigations regarding the mode of action of the three platinum-based compounds have been carried out on the molecular and functional level in the present study. Besides the investigations of the clinically approved compounds, the mode of action of a potential new platinum-based chemotherapeutic agents was also investigated. This compound PN149 represents a platinum(IV)-nitroxyl complex which showed a great potential in previous studies on circumventing cisplatin-resistances. Finally, the mechanism of the cisplatin-induced nephrotoxicity was examined with regard to the questions why carboplatin and oxaliplatin do not induce renal damages and if PN149 bears a nephrotoxic potential.

The studies were carried out in the renal cell carcinoma cell line A498. Studies of the cytotoxicity revealed a similar cytotoxic potential of cisplatin and oxaliplatin whereas carboplatin only showed the same cytotoxic effect at the tenfold concentration of cisplatin. Despite of a similar cytotoxic effect the compounds differed between their intracellular accumulation and DNA platination. Using the same concentrations cisplatin showed the highest accumulation whereas carboplatin showed the lowest. Only until the usage of a sixfold concentration compared to cisplatin, carboplatin showed a comparable accumulation to cisplatin. Cisplatin also revealed the highest DNA platination of all three compounds. The DNA platination of carboplatin showed considerable variations between the replicates. However, it is known that carboplatin loses its leaving group significantly slower which results in a lower reactivity compared to cisplatin. Therefore, the formation of carboplatin-induced DNA lesions occurs rather slowly. Even though the DNA platination of oxaliplatin was considerably lower compared to cisplatin they exerted the same cytotoxic effect. Consequently, oxaliplatin-induced DNA lesions appear to be more toxic than cisplatin-induced DNA lesions.

On the basis of these findings gene expression profiles of important signal transduction pathways were generated. If changes occurred on the molecular level they were further analyzed on a func-

nal level. Changes occurred especially for p53 target genes after the treatment with the respective platinum-based compound. Those genes included *MDM2*, the opponent of p53, DNA damage and repair genes like *DDB2*, *GADD45A* and *RRM2B*, the cell cycle and proliferation genes *CDNK1A*, *PLK3* and *PPM1D* as well as the apoptotic genes *BBC3* and *PMAIP1*. The investigation of the p53 protein level showed an increase of the level after the treatment with the respective compound whereby oxaliplatin showed the highest and carboplatin the lowest increase.

Besides these similarities Oxaliplatin showed considerable differences to cisplatin and carboplatin regarding the gene expression profiles where it revealed changes in the expression of DNA repair as well as cell cycle and proliferation genes. Especially the HR involved genes *BRCA1*, *BRCA2* and *RAD51* showed a reduced expression. This reduction might be associated with a reduced expression of the cell cycle related gene *E2F1*. Furthermore, genes involved in proliferation showed an increased expression after incubation with oxaliplatin.

Regarding the cell cycle distribution cisplatin and carboplatin led to a S-phase block after 24 h post-incubation followed by a G<sub>2</sub>/M-phase arrest. In contrast, the treatment with oxaliplatin did not affect the cell cycle distribution. However, despite these differences between oxaliplatin and cisplatin or carboplatin all three platinum-based compounds induced the apoptosis in a similar manner.

In summary, cisplatin and carboplatin induced a similar mechanism that culminated in cell death. However, to achieve the same effect carboplatin had to be applied in higher concentrations due to its slower reaction kinetics. Oxaliplatin induced a clearly different mechanism compared to cisplatin and carboplatin. Further studies could allow an application of oxaliplatin in further tumor species.

In addition to the investigations of the mode of action of the clinically applied platinum-based chemotherapeutic agents, the mode of action of the new compound PN149 was examined. Despite structural differences, it was apparent that PN149 induced a similar mode of action compared to cisplatin and carboplatin. Similar to cisplatin and carboplatin it was shown that PN149 induced cell death via a p53 dependent mechanism which included a cell cycle arrest as well as an induction of apoptosis. Even though the increase of the p53 protein level was not strong PN149 showed a cytotoxic effect comparable to cisplatin.

Studies regarding intracellular accumulation and DNA platination revealed a greater extent for both parameters after treatment with PN149 compared to the other three compounds. Nevertheless, the greater amount of DNA lesions did not lead to a greater effectiveness. An explanation for this could be the antioxidative potential that lies within the structure of PN149, as cisplatin also leads to the induction of oxidative stress besides inducing DNA damage. However, the performed studies did not permit a concrete statement regarding the induction of oxidative stress by the platinum-based compounds. The only indication that was given was the increased expression of the inflammation marker *IL-8* after the treatment with cisplatin but not PN149 as there is a connection between inflammation and oxidative stress. Future studies need to further clarify the potential of PN149.

The final part of this work focused on the cisplatin-induced nephrotoxicity. Neither the treatment



---

with oxaliplatin nor with carboplatin result in renal damages. On the basis of the discussion, that oxidative stress is part of the cisplatin-induced nephrotoxicity it is postulated that PN149 does not induce renal damage due to its antioxidative potential. The studies were performed in conditionally immortalized proximal tubule cells (ciPTEC). However, cytotoxicity studies were in contradiction with the clinic. While cisplatin showed the lowest  $IC_{50}$  of the clinical applied compounds all the other compounds were also highly cytotoxic, whereby PN149 showed the strongest cytotoxic effect. The following gene expression analysis further revealed a similar mechanism of all four platinum-based compounds. Therefore, the obtained results of the ciPTEC cells are in contrast with the results of the A498 cells, where oxaliplatin caused a different mode of action. A final evaluation of the ciPTEC cells with patient-derived renal normal cells showed that this cell line is in general a suitable cell line for studies in renal cells. A simple cell culture dish model is however probably not an appropriate model to study nephrotoxicity. Investigations of the intracellular accumulation of cisplatin showed a high discrepancy between cells cultured in a cell culture dish and cells cultured in a transwell system. This might be an indication that transport processes play a pivotal role in the cisplatin-induced nephrotoxicity.

In summary, the obtained data are insufficient for any indications of the nephrotoxic potential of the compounds. Especially in case of PN149 further studies need to be carried out in a more complex cell culture system like a transwell system or a kidney-on-a-chip.



In ihrem letzten *World Cancer Report* bezifferte die WHO (*World Health Organization*) die Anzahl der neuen Krebsfälle auf 14 Mio sowie die Anzahl der durch Krebs verursachten Todesfälle auf 8 Mio weltweit im Jahr 2012 (Stewart und Wild, 2014). Die Tendenz ist dabei steigend. Um so essentieller ist es weiter an Behandlungsmöglichkeiten zu forschen. Prinzipiell gibt es drei Behandlungsformen bestehend aus der chirurgischen Entfernung des Tumors, der Behandlung mit Strahlentherapie sowie der medikamentösen Behandlung. Unter letztere fallen Chemotherapeutika. Diese spielen vor allem bei metastisierenden Tumoren eine wichtige Rolle (Ho et al., 2003).

Eine der wichtigsten und erfolgreichsten Chemotherapieformen ist die platinbasierte Chemotherapie. Ihr Erfolg basierte dabei nur auf einem Zufall. In seinen Untersuchungen an *Escherichia coli* und dem Einsatz von Platinelektroden entdeckte Barnett Rosenberg in den 1960ern eine Substanz, die das Zellwachstum hemmte. Als Ursache machte er dabei einen Platinkomplex ausfindig (Rosenberg et al., 1965). Damit war der Pionier der platinbasierten Chemotherapie Cisplatin geboren. Nur ein paar Jahre später wurde Cisplatin 1971 schon in der Klinik getestet. 1978 erhielt es letztlich die Zulassung durch die *US Food and Drug Administration* (FDA) (Kelland, 2007). Heute gibt es dank der Behandlung mit Cisplatin eine 95 %ige Erfolgsrate in der Behandlung von Hodentumoren (Johnstone et al., 2016). Trotz des Erfolges birgt die Cisplatin-Tumorbehandlung erhebliche Nachteile. Neben den üblichen Nebenwirkungen eines Chemotherapeutikums, wie Übelkeit und Erbrechen, stehen bei Cisplatin Resistenzen sowie als dosislimitierender Faktor die Nephrotoxizität im Vordergrund (Oun et al., 2018).

Aufgrund dessen gab es über die Jahre hinweg enorme Bemühungen, die Cisplatin-Tumorthherapie zu verbessern. Dabei stand und steht immer noch eine Strukturmodifizierung der Substanz im Vordergrund. Durch diese Bemühungen entstanden u.a. Carboplatin und Oxaliplatin. Beide Sub-

stanzen erhielten, wie Cisplatin, eine weltweite Zulassung.

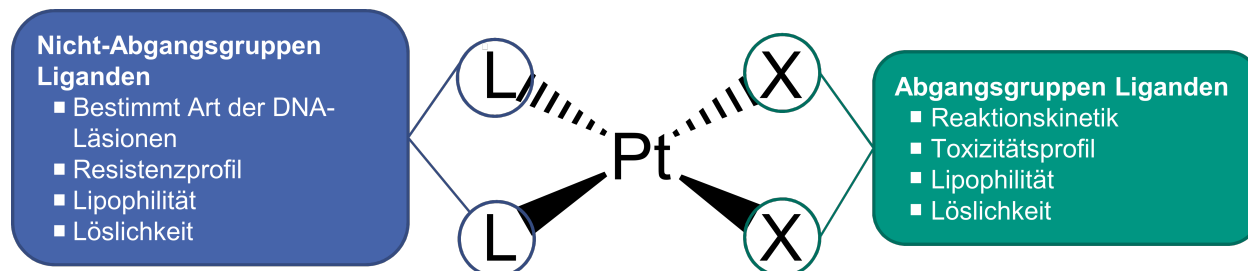
Carboplatin und Oxaliplatin weisen zwar keine Nephrotoxizität auf, dennoch führen auch sie neben Resistenzen zu dosislimitierenden Nebenwirkungen. Dabei gelten als dosislimitierende Nebenwirkungen die Myelosuppression im Falle von Carboplatin und die Neurotoxizität bei Oxaliplatin (Oun et al., 2018). Obwohl die Substanzen erhebliche Nebenwirkungen aufweisen, gehören sie mit zu den effektivsten Chemotherapeutika. Heute beinhalten etwa 50 % aller Chemotherapiebehandlungspläne eine dieser drei platinbasierten Substanzen (Apps et al., 2015). Der Erfolg spricht demnach für die Substanzklasse, weshalb die Forschung nach modifizierten Strukturen bis heute andauert. Um neue Strukturen entwickeln zu können gilt es, bisherige Strukturen in ihren Eigenschaften genau zu ergründen. Selbst für Cisplatin sind dessen Eigenschaften nach jahrzehntelanger Forschung noch nicht vollends aufgeklärt. Im Folgenden soll deshalb genauer auf die drei Substanzen eingegangen werden. Dabei liegt der Fokus vor allem auf deren Wirkmechanismus, den dosislimitierenden Nebenwirkungen und Resistenzen. Außerdem wird die neue platinbasierte Substanzklasse der Platin(IV)-Komplexe genauer durchleuchtet. Abschließend soll im Detail auf die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität eingegangen werden und die Frage beantwortet werden, warum Carboplatin und Oxaliplatin nicht nephrotoxisch wirken.

## 2.1 Platinbasierte Chemotherapeutika - Eigenschaften der Strukturen klinisch angewandter Substanzen

Die Grundstruktur platinbasierter Chemotherapeutika ist für alle Substanzen dieselbe (Abbildung 2.1). Die Komplexe weisen ein zentrales Platin(II) auf. In cis-Stellung besitzen sie weiterhin jeweils zwei Abgangsgruppen Liganden (X) sowie nicht-Abgangsgruppen Liganden (L). Trans-Isomere stellten sich als äußerst unwirksam heraus (Ho et al., 2003). Die Abgangsgruppen Liganden bestimmen die Reaktionskinetik sowie letztlich dadurch auch das Toxizitätsprofil der Substanz (Ho et al., 2003; Wheate et al., 2010). Platinbasierte Chemotherapeutika werden intravenös (i.v.) verabreicht. Aufgrund des Milieus im Blut bleiben die Substanzen weitestgehend in ihrer Urform. Sobald sie aber in die Zelle aufgenommen werden, ändert sich dieses Milieu. Außerhalb der Zelle liegt eine Chloridkonzentration von 100 mM vor, innerhalb der Zelle jedoch nur noch eine von 2 - 30 mM. Dadurch werden die Komplexe aquatisiert, d.h. ihre Abgangsgruppen werden durch Wassermoleküle ausgetauscht, wodurch die Substanzen letztlich zu reaktiven Elektrophilen umgewandelt werden (Cepeda et al., 2007; Wheate et al., 2010).

Die Kinetik dieses Vorgangs wird bestimmt durch die Art der Abgangsgruppe. Cisplatin (*cis*-Diammindichloroplatin-II, CDDP) besitzt zwei Chloridgruppen als Abgangsgruppen, welche als relativ labil gelten (Abbildung 2.2) (Ho et al., 2003). Dadurch bilden sich verhältnismäßig schnell Cisplatin-Aquakomplexe aus. Carboplatin (Diamminplatin(II)-cyclobutan-1,1-dicarboxylat) und Oxaliplatin (Oxalato[(1R,2R)-cyclohexandiamin]platin(II)) weisen mit ihren Chelatliganden dagegen eher stabile Abgangsgruppen auf (Abbildung 2.2), weshalb sie deutlich langsamer aquatisiert

werden (Johnstone et al., 2016). Auf dieser Basis wurde Carboplatin hin entwickelt. Durch die langsamere Aquisierung seiner 1,1-Cyclobutandicarboxylat-Gruppe führt es im Vergleich zu Cisplatin zu weniger toxischen Nebenwirkungen (Oun et al., 2018).



**Abbildung 2.1: Grundstruktur platinbasierter Chemotherapeutika.** Neben einem zentralen Platin(II) besitzen platinbasierte Chemotherapeutika jeweils zwei Abgangsgruppen Liganden (X) sowie zwei nicht-Abgangsgruppen Liganden (L). Die Wahl der Abgangsgruppe bestimmt vor allem die Reaktionskinetik sowie das Toxizitätsprofil der Substanz. Nicht-Abgangsgruppen Liganden sind dagegen vor allem für die Art der DNA-Schäden sowie das Resistenzprofil der Substanz verantwortlich. Beide Gruppen bestimmen weiterhin die Lipophilität sowie die Löslichkeit der Substanz (modifiziert nach Johnstone et al., 2016).

Die nicht-Abgangsgruppen Liganden bestimmen u.a. die Art der DNA-Läsion. Dadurch bestimmen sie auch letztlich das Resistenzprofil der Substanzen mit (Johnstone et al., 2016). Cisplatin und Carboplatin weisen beide zwei Aminogruppen auf. Folglich unterscheiden sich ihre DNA-Schäden nicht, wodurch Carboplatin nur für die Behandlung derselben Tumorarten wie Cisplatin angewandt werden kann (Wheate et al., 2010). Demnach besitzen sie weiterhin das gleiche Resistenzprofil. Oxaliplatin hingegen besitzt einen sogenannten DACH-Liganden (1,2-Diaminocyclohexyl) als nicht-Abgangsgruppe. Dieser DACH-Ligand erwies sich als nicht kreuzresistent zu Cisplatin (Misset et al., 2000). Untersuchungen zu Oxaliplatin-induzierten DNA-Schäden offenbarten deutlich sperrigere DNA-Läsionen, die zu einer anderen Verzerrung der DNA als Cisplatin führen, wodurch DNA-Reparatur Proteine nicht an den Schaden binden können (Faivre et al., 2003; Misset et al., 2000; Wheate et al., 2010). Dadurch reichen weniger DNA-Schäden aus, um dieselbe zytotoxische Wirkung wie Cisplatin aufweisen zu können (Faivre et al., 2003).

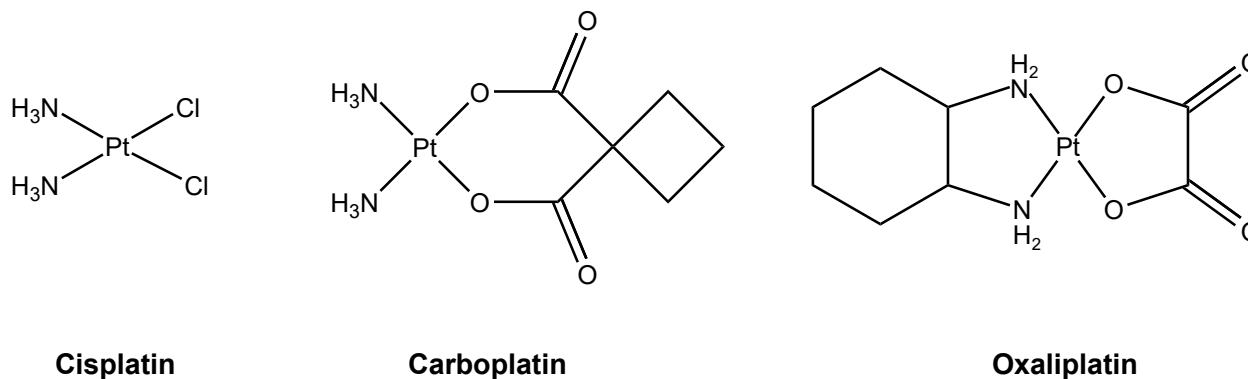


Abbildung 2.2: Strukturformeln von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.

Anhand der Grundstruktur aus Abbildung 2.1 werden weiterhin neue Platin(II)-Komplexe synthe-

tisiert. In den Fokus sind dabei Substanzen geraten, die Strukturen aufweisen, welche ein spezielles zelluläres Ziel haben. Dieses sogenannte *drug targeting* beinhaltet Strukturen, die z.B. den Glucose-Rezeptor oder Steroid-Rezeptoren als Ziel haben (Johnstone et al., 2016). Bisher finden diese Substanzen jedoch noch keine klinische Anwendung.

## 2.2 Cisplatin - der Pionier der platinbasierten Chemotherapeutika

Als Vorreiter platinbasierter Chemotherapeutika ist Cisplatin bereits seit über 40 Jahren im Einsatz. Dabei kommt es vor allem in Hodentumoren, aber auch Blasen-, Ovarial-, Zervix- sowie Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zum Einsatz (Cepeda et al., 2007; Wheate et al., 2010). Nach i.v. Applikation entfaltet es seine Wirkung erst innerhalb der Zelle. Verschiedene Schritte führen dann letztlich dazu, dass die Tumorzelle den Zelltod einleitet. Diese Schritte sollen im Folgenden genauer diskutiert werden.

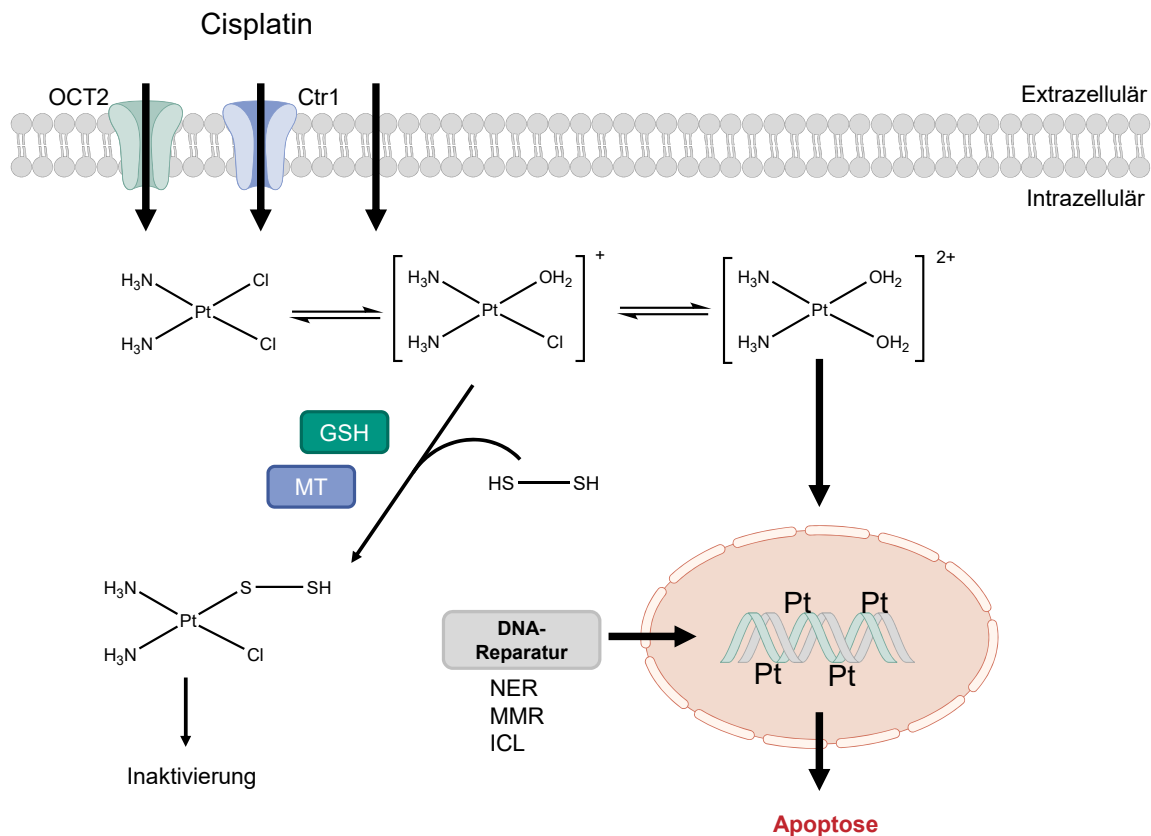
### 2.2.1 Wirkmechanismus

Der Wirkmechanismus von Cisplatin wurde über die Jahre hinweg in verschiedenen Tumorzelllinien untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass dieser äußerst komplex und deshalb bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Angefangen von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden bis hin zur Einleitung des Zelltodes beinhaltet der Wirkmechanismus von Cisplatin verschiedene Schritte, die letztlich aus einem komplexen Signalnetzwerk bestehen. Bevor Cisplatin aber überhaupt zu einem DNA-Schaden führt, muss es zunächst in die Zelle aufgenommen werden.

Die Aufnahme von Cisplatin soll sowohl über passive Diffusion als auch über aktiven Transport durch verschiedene Transporter stattfinden (Abbildung 2.3). Im Zuge des aktiven Transports sollen vor allem zwei Transporter maßgeblich an der intrazellulären Aufnahme von Cisplatin beteiligt sein. Hierzu zählen der Kupfertransporter 1 (Ctr1) sowie der organische Kationentransporter 2 (OCT2) (Burger et al., 2010; Hall et al., 2008).

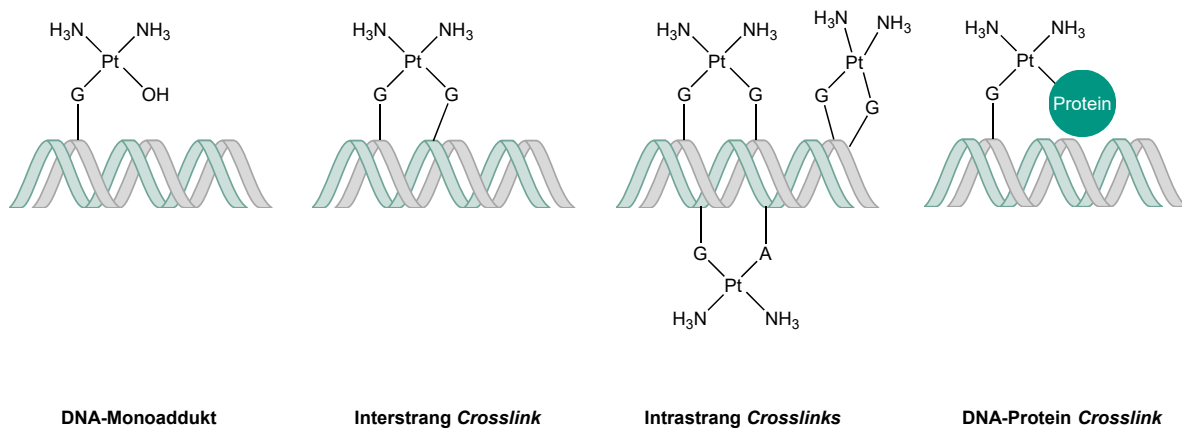
Sobald Cisplatin in der Zelle ist, findet der zuvor beschriebene Aquatisierungsschritt statt (Abbildung 2.3). Dabei kann sowohl die Monoaquaespezies  $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$  als auch die Diaquaespezies  $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$  entstehen (Cepeda et al., 2007). Beide Moleküle sind reaktive Elektrophile, die mit nukleophilen Gruppen von u.a. DNA, RNA oder Proteinen reagieren können. Nur ein Bruchteil des aufgenommenen Cisplatins bindet überhaupt an die DNA (Jamieson und Lippard, 1999). Der Großteil bindet an Proteine und andere zelluläre Komponenten. Ziel von Cisplatin sind vor allem thiolhaltige Biomoleküle. Dabei spielen vor allem Glutathion (GSH) und Metallothionein (MT) eine wichtige Rolle. Diese Bindung stellt jedoch einen Nachteil in der Effektivität der Substanz dar, da sie durch die Bindung inaktiv wird (Cepeda et al., 2007).

Der Anteil an Cisplatin, der in den Zellkern gelangt und dort an die DNA bindet, führt letztlich zur Entfaltung des toxischen Potentials der Substanz. Cisplatin kann dabei zur Bildung von



**Abbildung 2.3: Aufnahme von Cisplatin und dessen Schicksal innerhalb der Zelle.** Cisplatin kann sowohl über passive Diffusion als auch über aktiven Transport über den *organic cation transporter 2* (OCT2) und den Kupfertransporter 1 (Ctr1) aufgenommen werden. Aufgrund der niedrigen Chloridkonzentration innerhalb der Zelle findet eine Aquatisierung des Komplexes statt. Dabei können beide Chloridionen oder aber auch nur eines durch Wassermoleküle ersetzt werden. Das entstandene Elektrophil kann dann mit verschiedenen Makromolekülen in der Zelle reagieren. Bevorzugt bindet es hierbei an Disulfidgruppen wie von Glutathion oder Metallothionein. Dadurch erfolgt jedoch eine Inaktivierung der Substanz. Bindet Cisplatin an die DNA, werden zum einen DNA-Reparatursysteme aktiviert. Ist der Schaden aber zu groß, so wird zum anderen die Apoptose eingeleitet.

DNA-Monoaddukten, DNA-Interstrang und DNA-Intrastrang *Crosslinks* sowie zu DNA-Protein *Crosslinks* führen (Abbildung 2.4) (Jamieson und Lippard, 1999; Jordan und Carmo-Fonseca, 2000). Aufgrund der Zugänglichkeit und hohen Nukleophilie bindet Cisplatin vor allem an die N7-Position von Guanin und Adenin (Cepeda et al., 2007; Jamieson und Lippard, 1999). Mit 85 - 90 % an allen DNA-Schäden stellen 1,2-Intrastrang ApG (Adenin und Guanin) und GpG (Guanin und Guanin) *Crosslinks* den größten Anteil an Cisplatin-induzierten DNA-Schäden. Diese sollen außerdem größtenteils für die zytotoxische Wirkung verantwortlich sein (Siddik, 2003). Cisplatin-induzierte *Crosslinks* führen letztlich zu einer Verzerrung der DNA-Helix. Durch diese Verzerrung resultiert u.a. ein Entwinden der DNA, wobei der Grad der Entwindung von der Art des DNA-Schadens abhängt (Rabik und Dolan, 2007).



**Abbildung 2.4: Durch Cisplatin-induzierte DNA-Schäden.** Nach der Aquatisierung von Cisplatin kann dieses an Nucleophile wie die DNA binden. Dabei können DNA-Monoaddukte, Interstrang *Crosslinks*, Intrastrang *Crosslinks* sowie DNA-Protein *Crosslinks* entstehen.

Erleidet eine Zelle DNA-Schäden, bestimmen verschiedene Vorgänge ihr weiteres Schicksal. Die Zelle kann versuchen, die Schäden zu reparieren oder aber sie entscheidet, dass der Schaden zu groß ist und leitet die Apoptose ein. Letzteres ist der gewünschte Ausgang einer Tumorbehandlung mit Cisplatin. Bevor die Apoptose eingeleitet werden kann, müssen aber zunächst weitere Vorgänge in der Zelle stattfinden. Erster wichtiger Schritt ist dabei die Bindung von DNA-Schadenserkennungsproteinen an den DNA-Schaden. Hierzu zählen im Falle von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden das Mismatch Reparaturprotein (MMR) MSH2, das Teil des MutS $\alpha$ -Komplexes ist, der Nucleotidexzisionsreparatur (NER) Komplex XPA-RPA, die *high mobility group 1* und *2* (HMG1/2) Proteine, der *human RNA polymerase I transcription upstream binding factor* (hUBF), Histon H1 sowie das *TATA binding protein* (TBP) (Siddik, 2003; Wang und Lippard, 2005). Durch die Bindung der Proteine werden zum einen weitere *downstream* Signaltransduktoren aktiviert, zum anderen können sie aber auch zu einer Inhibierung der DNA-Reparatur führen. HMG1 kann u.a. zu einer Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 führen. Gleichzeitig kann die Bindung von HMG1 aber auch zu einer Inhibierung von DNA-Reparaturprozessen führen (Cepeda et al., 2007; Gonzalez et al., 2001; Jamieson und Lippard, 1999; Wang und Lippard, 2005).

Generell sind an der Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden verschiedene Reparatursysteme beteiligt. Intrastrang *Crosslinks* werden vorzugsweise durch die NER repariert, wohingegen Interstrang *Crosslinks* durch die *interstrand crosslink* (ICL) Reparatur repariert werden. Die ICL Reparatur besteht aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener DNA-Reparatursysteme wie der NER, der Doppelstrangbruch (DSB) Reparatur sowie der Translesionssynthese (Roos und Kaina, 2013). Ein weiteres wichtiges beteiligtes Reparatursystem scheint die MMR zu sein. Indem MMR Proteine während des *replicative bypass* an Cisplatin-induzierte DNA-Schäden binden, entsteht ein *futile cycling*, d.h. der Schaden persistiert und kann zu einem Strangbruch mutieren (Kwekel et al., 2005).



Versucht eine Zelle einen DNA-Schaden zu beheben, so wird normalerweise ein Zellzyklusarrest hervorgerufen, damit die Zelle mehr Zeit zum Reparieren des Schadens erhält (Vermeulen et al., 2003). Es zeigte sich, dass nach Cisplatin-induzierten DNA-Schäden zunächst ein S-Phasenarrest, gefolgt von einem G<sub>2</sub>/M-Phasenarrest induziert wird (Siddik, 2003; Sorenson und Eastman, 1988). Ein Zellzyklusarrest sowie eine vermehrte DNA-Reparatur stellen jedoch ein Hindernis in der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin dar, deshalb sollte der DNA-Schaden so exzessiv sein, dass die Zelle mit der Reparatur überfordert ist und stattdessen die Apoptose einleitet.

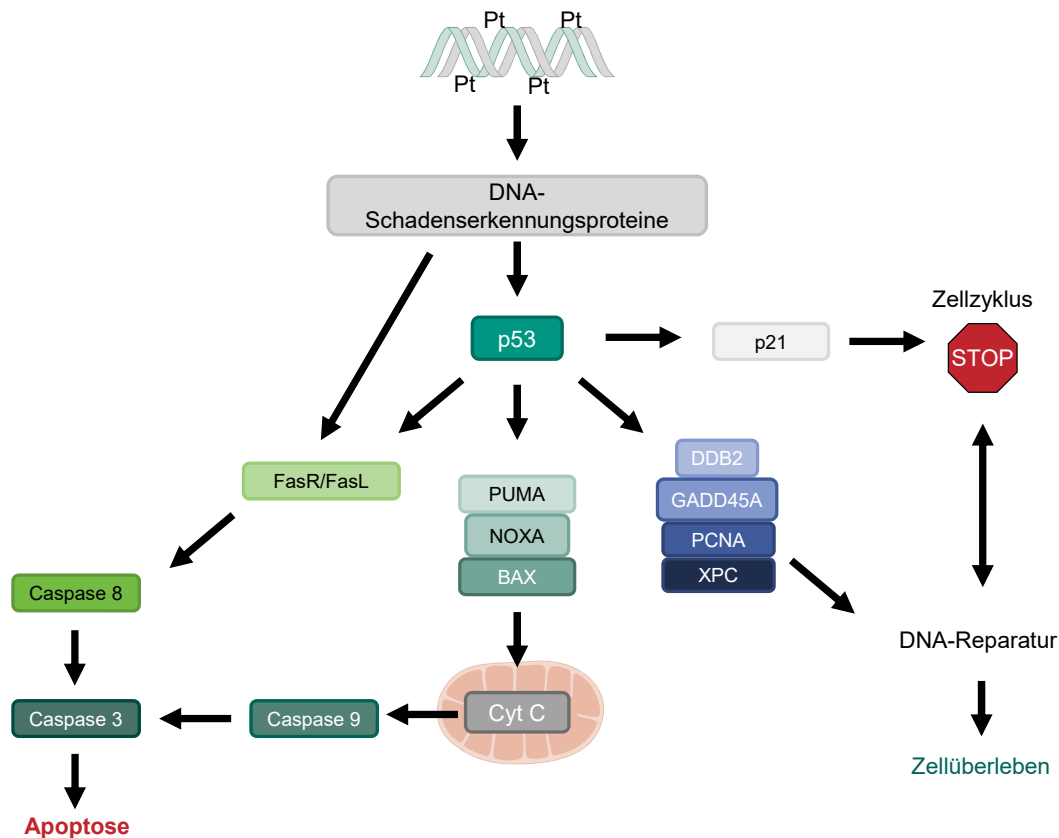
Ein wichtiges Protein, das abwägt, ob sich eine Reparatur des Schadens lohnt oder ob die Zelle in die Apoptose geht, ist p53, weshalb es auch Wächter des Genoms genannt wird. Es entscheidet folglich über das Schicksal einer Zelle. Auch im Zuge des Wirkmechanismus von Cisplatin kommt p53 eine wichtige Rolle zu. Aktiviert wird es dabei u.a. von ATM und ATR entweder direkt oder über die Kinasen Chk1 und Chk2 (Roos und Kaina, 2013; Siddik, 2003). P53 kann *downstream* dann Proteine aktivieren, die das Zellüberleben sichern sollen. Hierzu zählen Proteine des Zellzyklus wie p21 aber auch DNA-Reparaturbeteiligte Proteine wie GADD45A, PCNA, DDB2 oder XPC (Abbildung 2.5) (Cepeda et al., 2007; Jamieson und Lippard, 1999; Wang und Lippard, 2005). Gleichmaßen kann es aber auch Proteine aktivieren, welche die Apoptose einleiten. Dabei werden Proteine der sogenannten Bcl-2-Familie induziert. Hierzu gehören die proapoptotischen Proteine BAX, PUMA sowie NOXA (Jiang et al., 2006; Gonzalez et al., 2001). Alle drei Proteine sind am sogenannten intrinsischen Apoptoseweg beteiligt, welcher über die Mitochondrien abläuft. Eine vermehrte Aktivierung dieser Proteine führt zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Dadurch tritt u.a. Cytochrom C (Cyt C) in das Cytosol über und bildet dort mit APAF1 und der Caspase 9 ein sogenanntes Apoptosom (Fulda und Debatin, 2006). Caspase 9 ist eine Initiator Caspase, die weiter die Effektor Caspase 3 aktiviert, die letztlich den weiteren Vorgang der Apoptose einleitet (Gonzalez et al., 2001).

Neben dem intrinsischen Weg kann Cisplatin aber auch den extrinsischen Apoptoseweg einleiten. Dabei wird die Apoptose über sogenannte Todesrezeptoren durch Ligandenbindung eingeleitet (Fulda und Debatin, 2006). Cisplatin kann hier sowohl p53-abhängig als auch -unabhängig über den Fas-Rezeptor/Fas-Liganden (FasR/FasL) die Caspase 8 und schließlich die Caspase 3 aktivieren (Micheau et al., 1997; Gonzalez et al., 2001).

Neben der Signaltransduktion über p53 spielen weiterhin die MAPK, JNK sowie ERK Signalwege eine Rolle, die aber wiederum mit dem p53-Signalweg zusammenhängen können (Gonzalez et al., 2001; Wang und Lippard, 2005).

### 2.2.2 Nebenwirkungen

Jedes Chemotherapeutikum bringt verschiedene Nebenwirkungen mit sich. Diese entstehen aufgrund der schlechten Selektivität der Substanzen zwischen Tumorzellen und normalen Zellen. Die vorhandene geringe Selektivität, die sie mit sich bringen, beruht auf der Grundlage des hohen Nährstoffbedarfs den Tumorzellen aufweisen. Dadurch weisen sie generell eine vermehrte Aufnahme auf.



**Abbildung 2.5: Signaltransduktion nach Cisplatin-induzierten DNA-Schäden.** Cisplatin-induzierte DNA-Schäden führen über DNA-Schadenserkennungsproteine zu einer Aktivierung von p53. P53 kann wiederum einen Zellzyklusarrest über p21 auslösen bzw. gleichzeitig DNA-Reparaturproteine aktivieren. Sind die Schäden nicht sehr exzessiv, kann die Zelle so ihr Zellüberleben garantieren. Ist der Schaden jedoch zu groß, kann p53 verschiedene proapoptotische Proteine induzieren, die über die Aktivierung verschiedener Caspasen letztlich zur Einleitung der Apoptose führen.

Deshalb sind vor allem sich vermehrt teilende Zellen von Nebenwirkungen betroffen. Darunter fallen insbesondere Schleimhautzellen von Mund, Hals, Magen und Darm. Dies erklärt die Übelkeit und das Erbrechen, auch bekannt als *chemotherapy-induced nausea and vomiting* (CINV), die eine Chemotherapie mit sich bringt (Nurgali et al., 2018; Oun et al., 2018).

Weiterhin zählen Haarfollikel zu sich vermehrt teilenden Zellen, wodurch es bei Chemotherapien zu Haarausfall am ganzen Körper kommt. Da sich auch Haarfollikel im Ohr befinden, kann es u.a. aufgrund dessen zu Ototoxizität kommen. Weiterhin kann die Blutbildung im Knochenmark beeinflusst werden, das sich in einer Myelosuppression äußern kann (Oun et al., 2018).

Leber und Niere stellen respektive Detoxifizierungsorgan und Ausscheidungsorgan dar, wodurch es deshalb zu einer vermehrten Anhäufung von Chemotherapeutika in diesen Organen kommen kann. Deshalb können Behandlungen mit Chemotherapeutika zu Hepatotoxizität bzw. Nephrotoxizität führen. Generell gibt es bis zu 40 verschiedene Nebenwirkungen, die bei einer Behandlung auftreten können (Oun et al., 2018). Welche Nebenwirkungen letztlich auftreten, hängt u.a. von

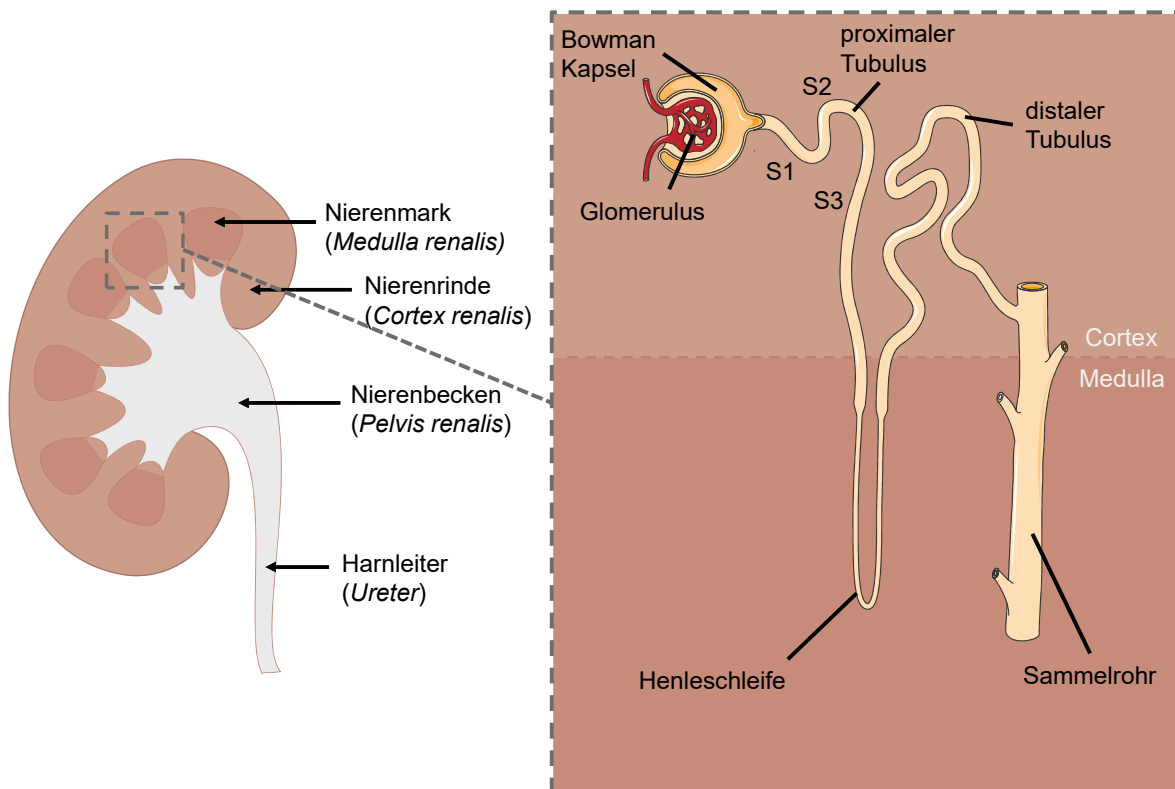
der Dosis, aber auch der Reaktivität der Substanz ab. Jedes platinbasierte Chemotherapeutikum besitzt eine sogenannte dosislimitierende Nebenwirkung, d.h. die Nebenwirkung ist so stark, dass eine Dosissteigerung zur weiteren Behandlung nicht möglich ist (Oun et al., 2018). Im Falle von Cisplatin ist dies die Nephrotoxizität. Jeder dritte Patient ist bei einer Behandlung mit Cisplatin von renalen Schäden betroffen (Pabla et al., 2008). Nephrotoxizität ist dabei ein Überbegriff für verschiedene Schäden, die in der Niere auftreten können. Am schwerwiegendsten sind dabei akute Nierenschäden (AKI), auch bekannt als akutes Nierenversagen, die in 20 - 30 % der Patienten auftreten können (Miller et al., 2010). Eine AKI geht einher mit einer verminderten glomerulären Filtrationsrate (GFR), einem erhöhten Serum Kreatinin- sowie erniedrigtem Serum Magnesium- und Natriumspiegel (Pabla et al., 2008).

Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität tritt in der funktionellen Einheit der Niere, dem Nephron auf (Abbildung 2.6). Dabei ist vor allem der proximale Tubulus, genauer das S3 Segment betroffen (Sahni et al., 2009). Der genaue Wirkmechanismus ist bis heute noch nicht genau geklärt. Mögliche Ursachen werden in Kapitel 2.6.1 besprochen. Um das Risiko einer Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität zu senken, kommen verschiedene Möglichkeiten zum Einsatz. Vor allem eine exzessive Hydratation mit Kochsalzlösung wird heute vermehrt angewandt. Ohne Hydratation erlitten früher 70 % der Patienten renale Schäden (Launay-Vacher et al., 2008). Weitere Möglichkeiten stellen eine Gabe von Antiemetika, um weiteren Flüssigkeitsverlust durch Erbrechen zu verhindern, sowie eine Supplementierung von Magnesium und anderen Nahrungsergänzungsmitteln dar. Studien hierzu zweifeln jedoch die Wirksamkeit dieser Applikationen an. Weiterhin werden vor jeder Behandlung die renalen Funktionen überprüft. Hierbei wird u.a. die GFR sowie der Kreatininspiegel kontrolliert (Launay-Vacher et al., 2008; Oun et al., 2018).

Patienten, die während einer Cisplatin Behandlung Nierenschäden erleiden mussten, leiden auch noch nach der Behandlung unter Folgeschäden, da sich die Niere nicht mehr vollständig regenerieren kann (Barabas et al., 2008; Pabla et al., 2008).

Neben der Nephrotoxizität können bei einer Behandlung mit Cisplatin außerdem Nebenwirkungen im Gastrointestinaltrakt auftreten. Weiterhin kann es zu Myelosuppression, Ototoxizität und Neurotoxizität kommen (Barabas et al., 2008). Ototoxizität beinhaltet Schäden am Innenohr, die zu einem beidseitigem Hörverlust führen können. Der Hörverlust tritt vor allem bei höheren Frequenzen ( $> 4$  kHz) auf und stellt sich als irreversibel heraus (Rybak et al., 2009). Insbesondere kann es bei Kindern während einer Cisplatin Behandlung zu Hörverlusten kommen (Oun et al., 2018; Rybak et al., 2009). Dabei liegt die Inzidenz zwischen 26 und 90 % (Knight et al., 2005). Kinder unter 5 Jahren zeigen dabei die höchste Inzidenz (Li et al., 2004). Warum vor allem Kinder davon betroffen sind, ist bis heute unklar. Verantwortlich für die Ototoxizität werden u.a. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie eine vermehrte Aufnahme in Zellen der Cochlea gemacht (Sheth et al., 2017). Bisher gibt es keine effektive Methode, um eine Cisplatin-induzierte Ototoxizität zu verhindern (Oun et al., 2018).

Myelosuppression und Neurotoxizität können zwar auch als Nebenwirkungen einer Cisplatin Behandlung auftreten, sie spielen aber eine wichtigere Rolle in den Nebenwirkungen von Carboplatin



**Abbildung 2.6: Aufbau der Niere und Lokalisation sowie Feinbau des Nephrons.** Die funktionalen Einheiten der Niere, die Nephrene, befinden sich sowohl im Nierenmark als auch in der Nierenrinde. Aufgebaut ist ein Nephron aus einem Nierenkörperchen, bestehend aus Bowman Kapsel und Glomerulus, sowie einem Tubulusapparat aus proximalem und distalem Tubulus sowie der dazwischen liegenden Henleschleife. Der proximale Tubulus ist eingeteilt in drei Segmente (S1-3). Durch Cisplatin verursachte renale Schäden treten vor allem im S3 Segment auf.

und Oxaliplatin, weshalb im späteren Verlauf noch einmal genauer darauf eingegangen wird. Nebenwirkungen im Gastrointestinaltrakt beinhalten insbesondere die bereits erwähnte CINV. Etwa 90 % aller Patienten leiden unter Übelkeit und Erbrechen während einer Behandlung mit Cisplatin (Oun et al., 2018). Eine Befragung von Patienten, die mit Cisplatin behandelt wurden, offenbarte eine starke Aversion der Patienten gegenüber der CINV, die als äußerst unangenehm empfunden wurde (Sun et al., 2005). Cisplatin führt in Zellen des Gastrointestinaltrakts zu einer Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin (5-HT), das dann an Serotoninrezeptoren im zentralen und peripheren Nervensystem binden kann und so zu Übelkeit und Erbrechen führen kann. Eine CINV kann deshalb durch Rezeptorantagonisten reduziert werden (Oun et al., 2018).

### 2.2.3 Resistenzen

Neben der dosislimitierenden Nebenwirkung von Cisplatin stellen Resistenzen eine weitere Limitierung in der Tumorbehandlung mit Cisplatin dar. Diese können dem Tumor bereits innewohnen

oder aber sich während einer Behandlung erst entwickeln. So komplex sich der Wirkmechanismus der Substanz darstellt, so komplex sind folglich auch Resistenzen. Diese entstehen durch Veränderungen an den beteiligten Mechanismen der antineoplastischen Wirkung der Substanz (Abbildung 2.7). Galluzzi und Kollegen teilen diese ein in *pre-target*, *on-target*, *post-target* und *off-target* Mechanismen (Galluzzi et al., 2012, 2014).

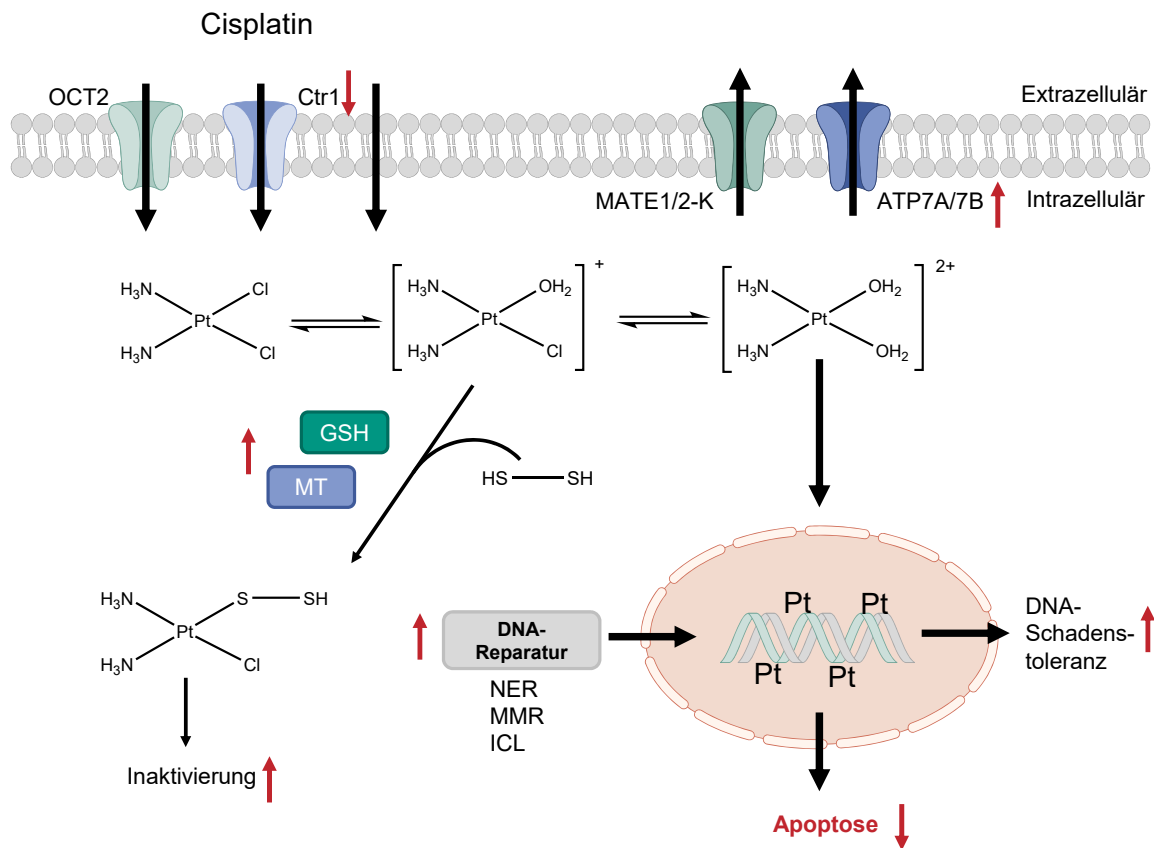
Unter *pre-target* Mechanismen fallen zum einen eine verringerte intrazelluläre Akkumulation, zum anderen eine erhöhte Detoxifizierung durch thiolhaltige Proteine bzw. Peptide wie GSH und MT. *On-target* Mechanismen beinhalten Veränderungen im Umgang der Zelle mit Cisplatin-induzierten DNA-Schäden, wobei hier eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität und eine erhöhte DNA-Schadenstoleranz auftreten können. *Post-target* Mechanismen stellen Veränderungen in der Signaltransduktionskaskade nach einem DNA-Schaden dar, wie z.B. Proteine, die an der Apoptose beteiligt sind. Bezüglich *off-target* Mechanismen zeigte sich, dass auch Veränderungen an Signalwegen, die nicht direkt am Wirkmechanismus von Cisplatin beteiligt sind, zu Resistenzen gegenüber Cisplatin führen können (Galluzzi et al., 2012, 2014).

Resistente Tumoren weisen normalerweise Veränderungen in mehreren Mechanismen auf, nur in sehr seltenen Fällen ist nur ein einziger Mechanismus involviert (Siddik, 2003). Dies erschwert es zusätzlich, Möglichkeiten zu finden, um Cisplatin-Resistenzen zu überwinden. Um so wichtiger ist es, die Mechanismen genau zu untersuchen und zu verstehen.

Zu Veränderungen in der Akkumulation von Cisplatin tragen sowohl Influx- als auch Effluxtransporter bei. Bisherige Untersuchungen deuten daraufhin, dass dabei die Kupfertransporter Ctr1 und ATP7A und ATP7B eine Rolle spielen (Kuo et al., 2007). In einer Cisplatin-resistenten Lungentumorzelllinie sowie einer resistenten Blasentumorzelllinie konnte die Resistenz auf eine verminderte Expression, einhergehend mit einer verminderten Akkumulation von Cisplatin, des Ctr1 zurückgeführt werden (Song et al., 2004; Cetriz et al., 2017). Eine verminderte Akkumulation kann allerdings auch auf einen erhöhten Efflux zurückzuführen sein. Hierbei zeigten mehrere Studien Veränderungen in der Expression von ATP7A und/oder ATP7B, die zu einer verminderten Akkumulation von Cisplatin in resistenten Tumorzellen beitragen (Kalayda et al., 2008; Katano et al., 2002; Nakayama et al., 2002; Yoshizawa et al., 2007).

Innerhalb der Zelle kann Cisplatin durch thiolhaltige Proteine und Peptide detoxifiziert werden. Studien zeigten, dass sowohl GSH als auch MT vermehrt in Cisplatin-resistenten Tumorzelllinien exprimiert werden können (Bedford et al., 1987; Kasahara et al., 1991; Meijer et al., 1992; Mellish et al., 1993; Surowiak et al., 2007).

Eine verminderte Akkumulation sowie eine erhöhte Detoxifizierung von Cisplatin führen gleichermaßen zu weniger DNA-Schäden. Folglich ist die Substanz weniger effektiv in den Tumorzellen. Eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität kann weiterhin zu einer vermehrten Reparatur von DNA-Schäden führen, wodurch die Effektivität ebenfalls eingeschränkt sein kann. Der Großteil von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden wird durch die NER repariert. Dabei sind mindestens 20 verschiedene Proteine an diesem Reparaturweg beteiligt (Galluzzi et al., 2012). Eine wichtige Rolle in Cisplatin-Resistenzen spielen vor allem ERCC1 (*excision repair cross-complementation group 1*) bzw. der



**Abbildung 2.7: Mögliche Mechanismen, die einer Cisplatin-Resistenz zugrundeliegen können.** Cisplatin-Resistenzen können durch eine veränderte intrazelluläre Akkumulation entstehen. Dabei können Influxtransporter, wie z.B. der Kupfertransporter 1 (Ctr1), vermindert exprimiert werden. Gleichzeitig können aber Effluxsysteme zu einer vermehrten Ausschleusung der Substanz führen. Außerdem kann es zu einer erhöhten Detoxifizierung und damit Inaktivierung durch thiolhaltige Proteine bzw. Peptide kommen. Weitere Mechanismen beinhalten eine vermehrte Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden sowie eine erhöhte DNA-Schadenstoleranz der Zelle. Veränderungen in der Expression von apoptotischen Genen können auch ihren Teil zu einer Cisplatin-Resistenz beitragen.

ERCC1/XPF (*xeroderma pigmentosum*) Komplex und XPA. In verschiedenen Studien konnte eine Korrelation zwischen einer Überexpression von *ERCC1* bzw. *ERCC1/XPF* und *XPA* und einer Cisplatin-Resistenz festgestellt werden (Britten et al., 2000; Dabholkar et al., 1994; Ferry et al., 2000; Usanova et al., 2010).

Im Vergleich zu einer gesteigerten Reparaturkapazität der NER kann eine verminderte bzw. fehlende Reparatur durch die MMR zu Cisplatin-Resistenzen beitragen. Eine verminderte Expression des DNA-Schadenserkennungspoteins MSH2 führt zum Ausbleiben der weiteren Signaltransduktionskaskade. Dadurch ist Cisplatin z.B. resistent in Kolonkarzinomen, da diese häufig MMR-defizient sind (Kweekel et al., 2005).

Zu einer erhöhten DNA-Schadenstoleranz tragen das *replicative bypass* bzw. darin involvierte Polymerasen bei, die vermehrt in Cisplatin-resistenten Tumoren exprimiert sein können (Köberle et al., 2010).

All diese Mechanismen führen zu einer verminderten Induktion der Apoptose. Aber auch Veränderungen an apoptosebeteiligten Proteinen können zu einem Ausbleiben der Apoptose beitragen. Zum einen können hier p53-Mutationen zu Resistenzen beitragen, da p53 eine Schlüsselrolle in der Cisplatin-induzierten Apoptose einnimmt. Ergebnisse von verschiedenen Studien stehen sich hier allerdings konträr gegenüber, da manche einen Zusammenhang zwischen einer Cisplatin-Resistenz und einer p53-Mutation zeigten (Branch et al., 2000; O'Connor et al., 1997), andere aber nicht (Burger et al., 1997; de Feudis et al., 1997; Schoch et al., 2018). Weiterhin kann es zu einer vermehrten Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie BCL-2 oder XIAP kommen (Köberle et al., 2010; Siddik, 2003).

Neben diesen speziellen Mechanismen dürfen auch nicht die extrinsischen Faktoren, die einen Tumor beeinflussen, vernachlässigt werden. Damit sind vor allem die Tumervaskulatur, die die Durchblutung eines Tumors beeinflusst, sowie die extrazelluläre Matrix, d.h. Strukturproteine, die den Tumor umgeben, gemeint. Diese können im Allgemeinen zu einer Resistenz gegenüber einem Chemotherapeutikum beitragen.

### 2.3 Carboplatin - Generation 2 der platinbasierten Chemotherapeutika

Die Entdeckung von Rosenberg brachte einen großen Forschungsbereich ins Rollen. Dabei entstand u.a. eine Forschungsgemeinschaft zwischen dem Pharmaunternehmen Bristol-Meyers, Johnson Matthey Plc, ein Unternehmen, das u.a. Edelmetalle raffiniert und recycelt sowie dem *Institute of Cancer Research* (ICR) in London. Ihr Ziel war es, eine Alternative zu Cisplatin zu entwickeln, die entweder ein erweitertes therapeutisches Potential aufweist oder weniger Nebenwirkungen verursacht. Durch dieses Forschungsprojekt entstand die 2. Generation von platinbasierten Chemotherapeutika, wobei Carboplatin letztlich die Substanz war, die 1986 eine Zulassung bekam (Barnard, 2017).

Strukturell unterscheidet sich Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin, wie bereits besprochen, nur in seiner Abgangsgruppe, die aus einer 1,1-Cyclobutandicarboxylat-Gruppe besteht. Dieser Ligand ist letztlich überhaupt für die Zulassung der Substanz verantwortlich. Denn vom Wirkmechanismus unterscheiden sich die zwei Substanzen kaum bis gar nicht, da Carboplatin die gleichen DNA-Schäden in der Zelle verursacht wie Cisplatin, wodurch die gleiche Signaltransduktionskaskade eingeleitet wird, die zum Zelltod führt (Knox et al., 1986; Wheate et al., 2010). Aufgrund dessen findet Carboplatin Einsatz für die gleichen Tumorarten wie Cisplatin. Mittlerweile wird Carboplatin bevorzugt zu Cisplatin bei Ovarialkarzinomen eingesetzt, wohingegen in Hoden- und Blasen Tumoren sowie in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereich immer noch Cisplatin das Mittel der Wahl ist (Dilruba und Kalayda, 2016; Johnstone et al., 2016).

Der gleiche Wirkmechanismus der Substanz führt allerdings auch dazu, dass Carboplatin kreuzre-

sistent gegenüber Cisplatin ist, d.h. Tumoren, die resistent gegenüber Cisplatin sind, weisen auch eine Resistenz gegenüber Carboplatin auf (Go und Adjei, 1999).

Die beiden Substanzen unterscheiden sich demnach lediglich in der Kinetik, in der der Schaden entsteht. Der Aquatisierungsvorgang von Carboplatin läuft mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $10^{-8} \text{ s}^{-1}$  ab, wohingegen Cisplatin eine Geschwindigkeitskonstante von  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  aufweist (Wheate et al., 2010). Durch diese geringere Reaktivität von Carboplatin kann die Substanz zum einen in deutlich höheren Dosen als Cisplatin eingesetzt werden, zum anderen führt die Substanz zu weniger Nebenwirkungen bzw. weniger starken Nebenwirkungen (Dilruba und Kalayda, 2016; Kelland, 2007; Wheate et al., 2010). Im Vergleich zu Cisplatin ist Carboplatin weniger toxisch für den Gastrointestinaltrakt und zeigt eine geringere Neurotoxizität sowie Ototoxizität (Dilruba und Kalayda, 2016; Kelland, 2007). Dosislimitierende Nebenwirkung ist im Falle von Carboplatin Myelosuppression, d.h. die Blutbildung im Knochenmark wird durch die Substanz gestört. Dabei tritt vor allem die Thrombozytopenie, d.h. ein Mangel an Thrombozyten, auf (Kelland, 2007; Oun et al., 2018). Etwa jeder dritte Patient erleidet während einer Carboplatin Behandlung eine schwere Thrombozytopenie (Go und Adjei, 1999). Veränderungen in der Blutbildung schwächen das Immunsystem eines Patienten und machen ihn somit anfälliger für Infektionen, weshalb das Blutbild genauestens während einer Behandlung untersucht wird (Oun et al., 2018). Der zugrundeliegende Mechanismus der Carboplatin-induzierten Myelosuppression ist nicht bekannt.

## 2.4 Oxaliplatin - Generation 3 der platinbasierten Chemotherapeutika

Auch nach der Zulassung von Carboplatin wurde weiterhin nach neuen verbesserten platinbasierten Substanzen geforscht. Einzelne Substanzen, wie Nedaplatin (Japan) oder Lobaplatin (China), erhielten dabei nur Zulassungen für einzelne Länder. Das Schweizer Pharmaunternehmen Debiopharma Group<sup>TM</sup> trieb die Entwicklung von Oxaliplatin voran, das letztenendes 2002 eine weltweite Zulassung für die Behandlung von Kolorektalkarzinomen bekam (Barnard, 2017). Damit ist Oxaliplatin das bisher neueste zugelassene platinbasierte Chemotherapeutikum. Gleichzeitig war es auch das erste, das in der Lage war, eine Cisplatin-Resistenz zu überwinden. Der Erfolg der Substanz scheint dabei auf den DACH-Liganden der Substanz zurückzuführen zu sein.

Oxaliplatin bildet ebenfalls wie Cisplatin und Carboplatin verschiedene DNA-Schäden, die DNA-Intrastrang, DNA-Interstrang und DNA-Protein *Crosslinks*, aber auch DNA-Monoaddukte beinhalten (Chaney et al., 2005; Alcindor und Beauger, 2011). Untersuchungen über die Induktion von DNA-Schäden offenbarten, dass Cisplatin deutlich mehr DNA-Schäden als Oxaliplatin induzierte. Dennoch erwies sich Oxaliplatin als gleichermaßen potent wie Cisplatin (Woynarowski et al., 1998, 2000). Folglich scheinen Oxaliplatin-induzierte DNA-Schäden effektiver zu sein als Cisplatin-induzierte. Über den Grund gibt es bisher nur Hypothesen. Es wird postuliert, dass sowohl Cisplatin



als auch Oxaliplatin die DNA in Richtung der großen Furche verzerren (Mani et al., 2002). Durch den DACH-Liganden ist der Schaden aber sperriger, so dass in Kombination mit der verzerren DNA-Helix DNA-Reparaturproteine nur schlecht bis gar nicht binden können (Alcindor und Beauget, 2011; Perego und Robert, 2016; Wheate et al., 2010). So persistieren die Schäden und sind folglich letaler als Cisplatin-induzierte DNA-Schäden.

Hier soll auch der Grund für das Überwinden der Cisplatin-Resistenz in Kolonkarzinomen liegen. Eine Studie über das Spektrum von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin in Zelllinien des NCI 60 *panels*, das 60 charakterisierte Tumorzelllinien beinhaltet, offenbarte für Oxaliplatin eine deutlich unterschiedliche Aktivität im Vergleich zu Cisplatin und Carboplatin. Auffällig war dabei die Effektivität in den Kolonkarzinomzelllinien (Rixe et al., 1996). Kolonkarzinome sind oft defizient in der MMR, weshalb Cisplatin nicht wirksam ist, da die DNA-Schadenserkenung u.a. MMR-abhängig ist. Im Falle von Oxaliplatin scheint diese jedoch unabhängig von MMR-Proteinen zu sein, wodurch Oxaliplatin effektiv in MMR-defizienten Tumoren ist (Kweekel et al., 2005).

Ein weiterer Grund für die Effektivität von Oxaliplatin in Kolonkarzinomen findet sich im Aufnahmemechanismus der Substanz. Es zeigte sich, dass Oxaliplatin vermehrt über den OCT2, aber auch den OCT1 aufgenommen wird (Zhang et al., 2006). Diese werden in Kolonkarzinomen oft überexprimiert, wodurch Oxaliplatin vermehrt aufgenommen werden kann (Dilruba und Kalayda, 2016). Gleichzeitig scheint Oxaliplatin außerdem unabhängig von einer Aufnahme über den Ctr1 zu sein, wodurch es Cisplatin-Resistenzen, die mit einer verminderten Ctr1 Expression einhergehen, potentiell überwinden könnte (Dilruba und Kalayda, 2016; Holzer et al., 2006).

Eine offensichtlich unterschiedliche DNA-Schadenserkenung, unabhängig von der MMR, deutet auf einen unterschiedlichen Mechanismus von Oxaliplatin im Vergleich zu Cisplatin und Carboplatin hin. Bisher gibt es aber nur wenige detaillierten Studien über die Schadenserkenung und damit auch die nachfolgende Signaltransduktionskaskade, die Oxaliplatin in der Zelle auslöst. Eine neue Studie von Bruno und Kollegen untersuchte die DNA-Schadensantwort (DDR) nach Behandlung mit Oxaliplatin. In ihren Untersuchungen konnten sie keine Aktivierung der DDR feststellen. Sie postulieren deshalb, dass Oxaliplatin-induzierte DNA-Schäden nicht essentiell sind für die zytotoxische Wirkung. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass Oxaliplatin vermehrt zu ribosomalem Stress führt, weshalb sie argumentieren, dass dieser Mechanismus Teil der zytotoxischen Wirkung ist (Bruno et al., 2017). Hierzu sind weitere Untersuchungen dringend nötig, da Oxaliplatin eventuell ein unerwartetes Potential birgt, wodurch es nicht nur effektiv in Kolonkarzinomen sein könnte.

Neben der Überwindung der Kolonkarzinomresistenz spricht für Oxaliplatin weiterhin ein geringeres Nebenwirkungsprofil. Die Oxalatgruppe als Abgangsgruppe stellt gleichermaßen wie der Cyclobutanring von Carboplatin eine stabile Abgangsgruppe dar, wodurch der Schweregrad der Nebenwirkungen deutlich reduziert ist (Wheate et al., 2010). Aber auch Oxaliplatin weist eine dosislimitierende Nebenwirkung auf, nämlich die Neurotoxizität. Diese betrifft zwischen 60 - 95 % aller Patienten, die mit Oxaliplatin behandelt werden. Dabei unterscheidet sich jedoch der Schweregrad. Etwa 20 % der betroffenen Patienten leiden unter schweren Neurotoxizitäten (Oun et al., 2018). Die verursach-

ten Schäden am Nervensystem äußern sich vor allem in peripheren Neuropathien, d.h. Patienten leiden unter Schmerzen, Schwäche oder Taubheitsgefühlen der Extremitäten (Oun et al., 2018). Es wird dabei zwischen akuten, die bereits während der Infusion auftreten können, und chronischen Neuropathien, die durch eine kumulative Applikation entstehen können, unterschieden (Alcindor und Beauger, 2011; Cersosimo, 2005). Beide Formen der Neuropathien sind jedoch reversibel und führen, anders als Cisplatin-induzierte Nierenschäden, nicht zu bleibenden Schäden (Oun et al., 2018).

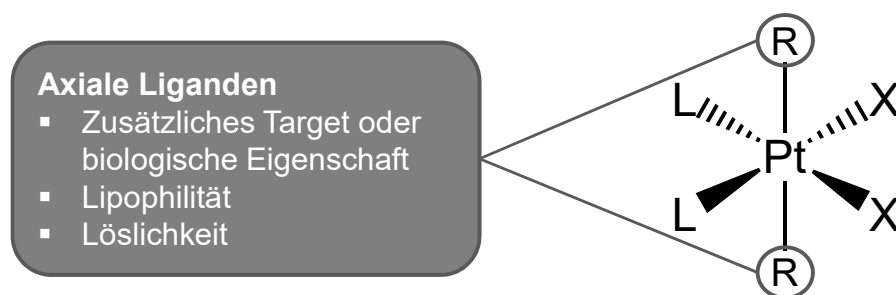
Ursache für die Neuropathien soll der Oxalatligand sein. Dieser chelatiert zum einen Calcium- und Magnesium-Ionen, wodurch indirekt auf den  $\text{Na}^+$ - sowie den  $\text{K}^+$ -Kanal Einfluss ausgeübt wird. Zum anderen kann Oxalat die Kanäle aber auch direkt beeinflussen (Kweekel et al., 2005; Oun et al., 2018; Weickhardt et al., 2011). Zur Prevention können deshalb Calcium- und Magnesiuminfusionen gegeben werden, wobei Studien über den Nutzen der Infusionen eine Diskrepanz aufweisen. Weitere Studien offenbarten, dass ROS ebenfalls eine Rolle in der Induktion der Neuropathien spielen (Di Cesare Mannelli et al., 2013a,b; McQuade et al., 2016).

## 2.5 Platin(IV)-Komplexe - die neue Generation platinbasierter Chemotherapeutika?

Der Erfolg bzw. die Effektivität von platinbasierten Chemotherapeutika spricht eindeutig für diese Substanzklasse. Allerdings wird auch deutlich, dass sie einige Nachteile mit sich bringen, weshalb sie stetig weiter entwickelt werden. Dabei in den Fokus geratene Verbindungen sind Platin(IV)-Komplexe.

Ihre Struktur unterscheidet sich dabei zu Platin(II)-Komplexen, indem sie zwei zusätzliche axiale Liganden aufweisen (Abbildung 2.8). Dadurch unterscheiden sie sich weiterhin deutlich in ihren physikochemischen Eigenschaften (Johnstone et al., 2016). Die zwei axialen Liganden führen zu einer oktaedrischen Struktur mit einem koordinativ gesättigten (Koordinationszahl (KZ) = 6) zentralem Pt(IV). Das macht sie im Vergleich zu den quadratisch planaren (KZ = 4) Pt(II)-Komplexen resistenter gegenüber Ligandensubstitutionen (Johnstone et al., 2016; Kenny et al., 2017). Diese Eigenschaft führt zu einer niedrigeren Reaktivität, die im Hinblick auf unerwünschte Nebenwirkungen von Vorteil sein kann (Hall et al., 2007).

Die axialen Liganden können verschiedene Gruppen aufweisen. Je nachdem, welche Liganden substituiert werden, lassen sich die Eigenschaften der Substanz verändern oder aber es lassen sich dadurch gezielt zelluläre Strukturen angreifen (Johnstone et al., 2016). Carboxylatgruppen erhöhen beispielsweise die Lipophilie der Substanz. Ethacraplatin besitzt zusätzliche Liganden, die ein zelluläres Target besitzen (Abbildung 2.9). Es weist zwei Ethacrynsäure Liganden auf, die an GSH binden können und so die Glutathion-S-Transferase (GST) inhibieren. Dadurch wird eine vermehrte Detoxifizierung durch GSH verhindert (Johnstone et al., 2016).



**Abbildung 2.8: Grundstruktur von Platin(IV)-Komplexen.** Platin(IV)-Komplexe besitzen zusätzlich, neben der Abgangsgruppen (X) und nicht-Abgangsgruppen (L) Liganden, zwei Liganden in axialer Position (R). Dadurch erhalten die Komplexe eine oktaedrische Struktur. In axialer Position lassen sich Liganden substituieren, die affin gegenüber einem zellulären Target sein können, oder die Eigenschaften der Substanz verändern können (modifiziert nach Johnstone et al., 2016).

Platin(IV)-Komplexe werden erst in der Zelle durch Reduktion zu einem Platin(II)-Komplex aktiv. Aus diesem Grund gelten sie als *prodrug* (Hall et al., 2007; Kenny et al., 2017). Aufgrund des lipophilen Charakters, den viele Platin(IV)-Komplexe aufweisen, wird außerdem eine orale Aufnahme ermöglicht. Eine orale Aufnahme bietet die Möglichkeit, dass der Patient die Applikation selbst durchführen kann und er somit nicht von einer langen intravenösen Gabe durch geschultes Personal abhängig ist.

Der Prozess der Reduktion von einem Platin(IV)- zu einem Platin(II)-Komplex ist von zwei Faktoren abhängig. Zum einen bestimmt der Ligand selbst den Prozess, zum anderen hat aber auch die biologische Umgebung einen Einfluss (Johnstone et al., 2016). Zu einem kleinen Teil könnten auch die äquatorialen Liganden einen Einfluss darauf haben, wobei dies als umstritten gilt (Hall und Hambley, 2002).

Choi und Kollegen zeigten, dass die Reduktionsrate eines Platin(IV)-Komplexes abhängig ist vom Redoxpotential seines axialen Ligandens. Dabei findet bei axialen Chlorid-Liganden die Reduktion am schnellsten statt, am langsamsten bei Hydroxyl-Liganden und dazwischenliegend Carboxyl-Liganden (Choi et al., 1998). Eine Reduktion kann letztlich aber nur unter bestimmten biologischen Umständen vonstattengehen. Diese sind erst in der Zelle gegeben. Es wird postuliert, dass vor allem Reduktionsmittel mit geringem Molekulargewicht wie Ascorbat oder GSH für die Reduktion der Platin(IV)-Komplexe verantwortlich sind (Wexselblatt und Gibson, 2012). So ist es auch nicht erstaunlich, dass Untersuchungen in verschiedenen Zelllinien eine unterschiedliche Redoxrate des gleichen Platin(IV)-Komplexes in den Zelllinien zeigte, denn jede Zelle weist eine unterschiedliche Komposition an zellulären Bestandteilen auf (Nemirovski et al., 2007).

Bisher haben es vier Platin(IV)-Komplexe in die klinische Phase geschafft (Abbildung 2.10). Als einer der ersten Platin(IV)-Komplexe durchlief Ormaplatin, auch bekannt als Tetraplatin, die klinische Phase. Doch bereits nach Phase I Untersuchungen zeigten sich sehr schwere Neurotoxizitäten.

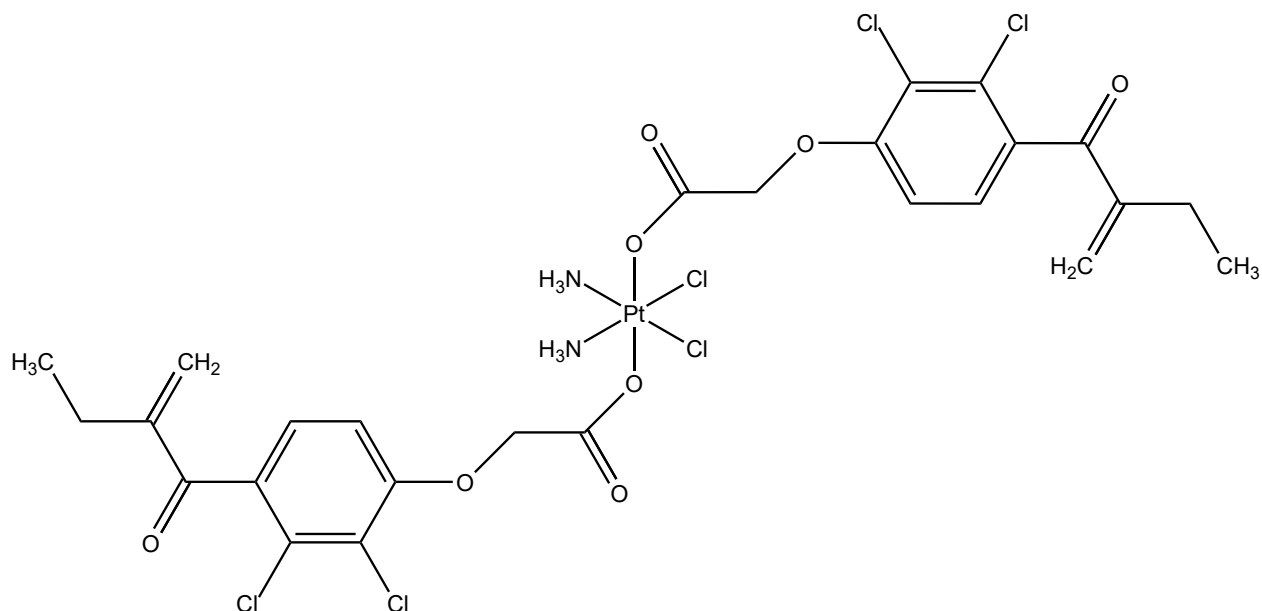


Abbildung 2.9: Struktur des Platin-(IV)-Komplexes Etracaptin.

Diese lassen sich vermutlich auf die schnelle Reduktion der axialen Chlorid-Liganden zurückführen (Johnstone et al., 2016). Iproplatin wurde zwar in verschiedenen Phase I - III Studien untersucht, bisher zeigte sich aber kein Vorteil der Substanz gegenüber Cisplatin oder Carboplatin. Gleiches gilt für die oral verabreichbare Substanz Satraplatin (Kenny et al., 2017). LA-12 hat die klinische Phase zwar bereits erreicht, allerdings gibt es hierzu noch keine publizierten Daten (Apps et al., 2015).

Obwohl es bisher noch keine Substanz zu einer klinischen Anwendung geschafft hat, bieten Platin(IV)-Komplexe dennoch ein großes Potential, weshalb auf diesem Gebiet noch weiterhin sehr viel Forschung betrieben wird.

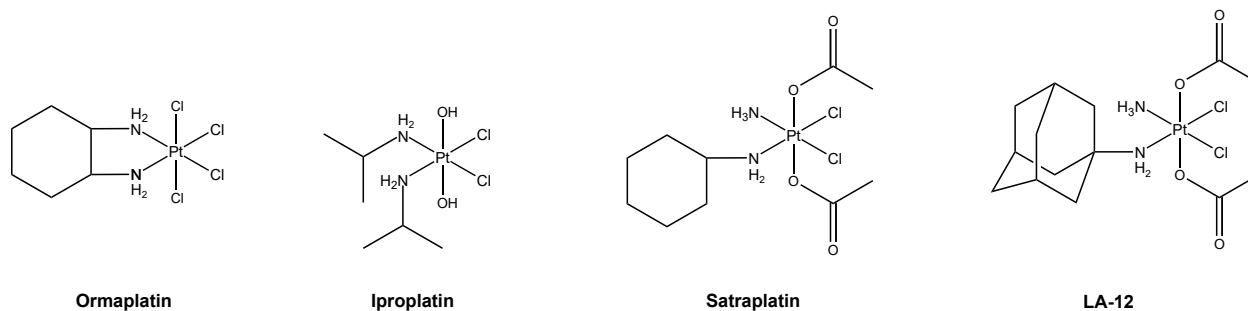
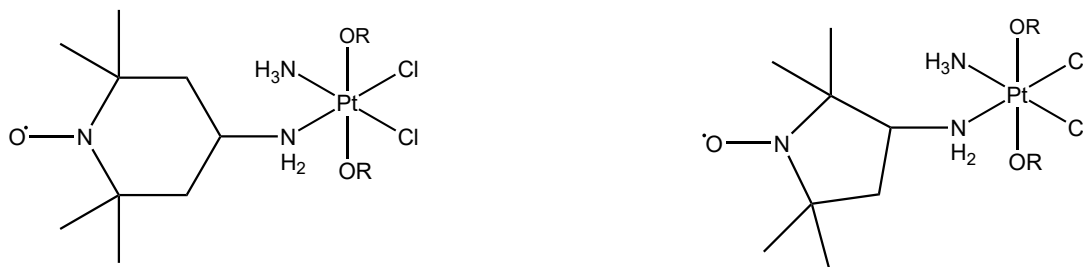


Abbildung 2.10: Strukturformeln der Platin(IV)-Komplexe, die die klinische Phase erreicht haben.

### 2.5.1 Platin(IV)-nitroxyl-Komplexe (PNCs)

Zu den Platin(IV)-Komplexen, an denen weiterhin geforscht wird, zählt auch die Substanzklasse der Platin(IV)-nitroxyl-Komplexe (PNCs). Das zusätzliche Nitroxyl-Radikal, das diese Substanzen aufweisen, birgt ein antioxidatives Potential (Cetraz et al., 2017; Sen' et al., 2012). Es lassen sich dabei grundsätzlich 2 Strukturen unterscheiden (Abbildung 2.11). Dabei können PNCs entweder einen 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-Rest (TEMPO) oder einen 2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-Rest aufweisen (Sen' et al., 2012; Cetraz et al., 2017).



#### 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-Derivate

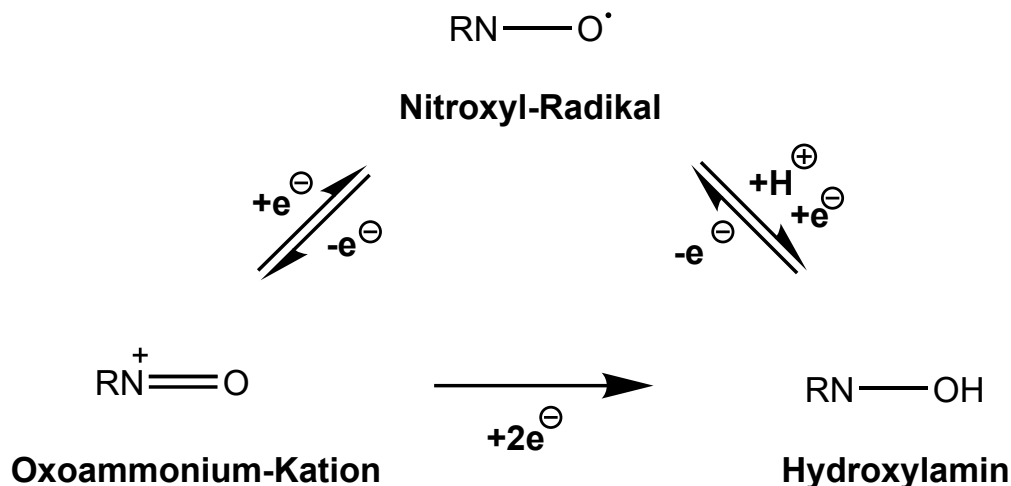
#### 2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidine-1-oxyl-Derivate

**Abbildung 2.11: Grundstrukturformeln von Platin(IV)-nitroxyl-Komplexen (PNCs).** Es lassen sich grundsätzlich zwei verschiedene Strukturen unterscheiden. PNCs können entweder einen 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-Rest oder einen 2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-Rest aufweisen. Substituiert sind sie in axialer Position mit Carboxylatgruppen mit verschiedenen Längen (OR).

Neben platinbasierten Chemotherapeutika gibt es weitere verschiedene Hybridsubstanzen, die ein Nitroxyl-Radikal aufweisen. Neben anderen wurden z.B. 5-Fluorouracil (5-FU) oder Daunorubicin mit einem Nitroxyl-Radikal gekoppelt und untersucht. In Untersuchungen der Substanzen zeigte sich, dass diese im Vergleich zur Stammverbindung zu weniger Nebenwirkungen führten und gleichzeitig effektiver waren. Das Daunorubicin-Derivat Ruboxyl war sogar sehr erfolgreich in Phase II Studien, wurde aber aus finanziellen Gründen nicht weiter untersucht (Sen' et al., 2012).

Nitroxyl-Radikale, wie TEMPO oder TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy), sind stabile freie Radikale, die aufgrund ihrer Struktur mit anderen freien Radikalen interagieren können. Dadurch erhalten sie ihre antioxidativen Eigenschaften und können ROS detoxifizieren. Ihre Stabilität erhalten die Substanzen durch die Methylgruppen in  $\alpha$ -Stellung (Soule et al., 2007). Untersuchungen zeigten, dass der ROS-detoxifizierende Mechanismus von Nitroxyl-Radikalen dem der Superoxiddismutase ähnelt (Goldstein et al., 2003; Krishna et al., 1992; Mitchell et al., 1990; Rachmilewitz et al., 1994). Zellulär liegen Nitroxyl-Radikale in einem Equilibrium mit ihrer reduzierten Form, einem Hydroxylamin, vor. Das Equilibrium wird dabei durch den Sauerstoffgehalt und den Redoxstatus des umgebenden Milieus beeinflusst (Soule et al., 2007). Als Intermediat liegt außerdem noch eine weitere Spezies vor, ein sogenanntes Oxoammonium-Kation (Abbildung 2.12). Das Redoxpaar aus Nitroxyl-Radikal und Oxoammonium soll für die SOD-ähnliche Aktivität der Substanzen verantwortlich sein (Goldstein et al., 2003; Krishna et al., 1992; Soule et al., 2007). Durch die protonierte Superoxidform  $\text{HO}_2^\bullet$  entsteht zunächst aus dem Nitroxyl-Radikal das Oxoammoni-

um. Dieses kann dann durch das Superoxidanionenradikal  $O_2^{\bullet-}$  wieder zum Nitroxyl-Radikal und Sauerstoff abgebaut werden (Krishna et al., 1992; Soule et al., 2007). Bei dieser Reaktion entsteht weiterhin  $H_2O_2$ . Auch gegen  $H_2O_2$  sollen Nitroxyl-Radikale eine protektive Wirkung haben. Diese stellt sich im Falle von  $H_2O_2$  aber eher als indirekt heraus, denn Nitroxyl-Radikale können die Fenton-Reaktion unterbinden.  $Fe^{2+}$ , das an die DNA chelatiert ist, reduziert das Nitroxyl-Radikal zur Hydroxylamin-Spezies und wird selbst dabei zu  $Fe^{3+}$  oxidiert. Dadurch wird die Bildung der ultimativen reaktiven Sauerstoffspezies  $OH^\bullet$  verhindert (Mitchell et al., 1990).



**Abbildung 2.12: Gleichgewichtsreaktion von Nitroxyl-Radikalen und deren Hydroxylamin-Spezies bzw. Oxoamminium-Kation *in vivo*.** Durch Einelektronenübertragungen können aus einem Nitroxyl-Radikal ein Hydroxylamin bzw. ein Oxoammonium-Kation entstehen. Das Verhältnis der Substanzen wird durch zelluläre Redoxaktivitäten bestimmt.

Da Nebenwirkungen von Chemotherapeutika oftmals mit der Bildung von ROS im Zusammenhang stehen, führte dies zur vermehrten Synthese von Nitroxyl-Derivaten verschiedener Chemotherapeutika. Weitere Untersuchungen zeigten außerdem, dass Nitroxyl-Radikale paradoxerweise auch eine zytotoxische Wirkung aufweisen. Interessanterweise scheint diese sich auch nur auf Tumorzellen zu beschränken (Gariboldi, 1998; Suy et al., 2005). Der zugrundeliegende Mechanismus ist bis heute allerdings unbekannt. Weitere Studien zeigten außerdem eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung von Nitroxyl-Radikalen (Flores-Santana et al., 2012). Diese könnte jedoch auch auf die antioxidative Wirkung zurückzuführen sein, da Inflamationsprozesse durch ROS ausgelöst werden können.

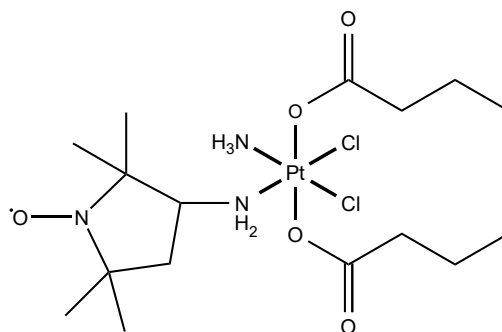
Aufgrund dieser Eigenschaften bergen PNCs ein großes Potential als neues platinbasiertes Chemotherapeutikum, da sie die Effektivität von platinbasierten Chemotherapeutika mit der antioxidativen Eigenschaften von Nitroxyl-Radikalen paaren. In ihrer axialen Position weisen PNCs Carboxylatgruppen auf. Diese können von unterschiedlicher Länge sein. Carboxylatgruppen stellen zum einen Liganden mit mittlerem Abgangspotential dar, zum anderen erhöhen sie die Lipophilität der Substanz. Folglich sind sie durchschnittlich reaktiv und sie können durch passive Diffusion in die Zelle aufgenommen werden.

Eine mittlere Reaktivität gepaart mit der antioxidativen Wirkung des Nitroxyl-Radikals könnte zu weniger Nebenwirkungen führen. Bisher gibt es hierzu jedoch noch keine Studien.

Die Effektivität von PNCs konnte in verschiedenen Studien jedoch schon gezeigt werden. In einer *in vivo* Studie an Mäusen zeigten der Piperidin-1-oxyl und Pyrrolidin-1-oxyl-Komplex gepaart mit einer Acetoxygruppe als axiale Liganden eine ähnliche Wirkung wie Cisplatin. Als noch effektiver zeigte sich eine gleichzeitige Gabe der jeweiligen Substanz mit Cisplatin (Sen' et al., 2006). In einer Studie an HeLa Zellen sowie einer weiteren in RT112 Zellen, einer Blasen-tumorzelllinie, zeigte sich, dass die zytotoxische Wirkung der Substanzen mit ihrer Lipophilie zusammenhängt. Je länger die Kohlenstoffkette der axialen Carboxylatgruppe, um so höher war die Aufnahme der Substanz in die Zelle und um so zytotoxischer war die Substanz letztlich, da die Aufnahme gleichermaßen mit der DNA-Platinierung korrelierte (Cetraz et al., 2017; Komleva et al., 2015).

Weiteren Untersuchungen wurde die Substanz PN149 unterzogen (Abbildung 2.13). In einem zellfreien Assay mit bakterieller *supercoiled* DNA zeigten sich für PN149 im Vergleich zu Cisplatin keine oxidativen DNA-Schäden. Dies könnte auf die antioxidative Wirkung des Nitroxyl-Radikals zurückzuführen sein. Eine Manipulation des Ctr1 zeigte außerdem keinen Einfluss auf die Aufnahme der Substanz in RT112 Zellen (Cetraz et al., 2017). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass PNCs hauptsächlich über passive Diffusion in die Zelle aufgenommen werden könnten und damit unabhängig von Transportsystemen sind. Dies könnte ein Vorteil bei resistenten Tumoren sein, bei denen die Resistenz auf eine veränderte Expression von Transportern zurückzuführen ist. Eine Untersuchung in Cisplatin-resistenten RT112-CP Zellen offenbarte, dass PNCs dieselbe zytotoxische Wirkung in der resistenten Sublinie wie in der parental Zelle zeigten. Dabei ließ sich die Cisplatin-Resistenz auf eine verminderte Expression des Ctr1 zurückführen (Cetraz et al., 2017). Folglich bestätigten diese Ergebnisse die oben genannte Hypothese.

Bisherige Untersuchungen verdeutlichen noch einmal das Potential, das PNCs besitzen, weshalb es wichtig ist, die Substanzen weiter zu untersuchen.



PN149

Abbildung 2.13: Strukturformel des Platin(IV)-nitroxyl-Komplexes PN149.

## 2.6 Platinbasierte Chemotherapeutika und deren Wirkungen in Nierenzellen

Aufgrund ihrer Funktion als Ausscheidungsorgan ist die Niere besonders dem Einfluss von Xenobiotika ausgesetzt. Viele Pharmazeutika scheitern in der klinischen Phase aufgrund einer induzierten Nephrotoxizität. Dies ist auch der Fall bei Cisplatin. Carboplatin und Oxaliplatin führen indessen kaum bis nicht zu Nierenschäden. Die Datenlage hierzu, warum nur Cisplatin zu Nierenschäden führt, ist bislang eher schlecht. Dennoch sollen mögliche Unterschiede im Folgenden herausgearbeitet werden, wobei zunächst auf die zugrundeliegenden Mechanismen der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität eingegangen werden soll.

### 2.6.1 Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität

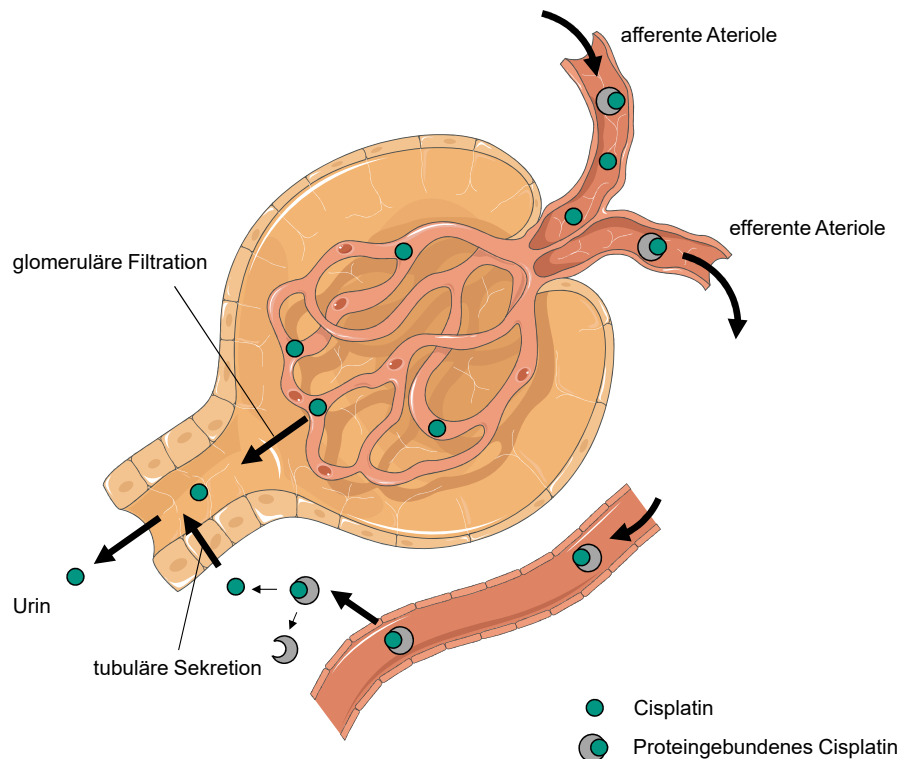
Obwohl die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität bereits in den Anfängen der klinischen Studien der Substanz festgestellt wurde, ist der zugrundeliegende Mechanismus bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt (Miller et al., 2010). Untersuchungen deuten jedoch daraufhin, dass, sobald Cisplatin in den Tubuluszellen ist, sich die Wirkung kaum von der antineoplastischen Wirkung unterscheidet. Dazu zählen DNA-Schäden, eine Induktion von p53 und der Apoptose sowie oxidativer Stress und Inflamationsprozesse. Daneben soll außerdem die Bildung eines Nephrotoxins über die Bindung von Cisplatin an GSH entstehen (Manohar und Leung, 2018; Yao et al., 2007). Bevor diese intrazellulären Auswirkungen überhaupt stattfinden können, muss Cisplatin erst einmal in die Zelle aufgenommen werden. Hier liegt vermutlich das große Problem der Substanz.

In proximalen Tubuluszellen konnte eine ca. 5x höhere Akkumulation von Cisplatin als im Blutplasma festgestellt werden. Dabei finden sich die höchsten Konzentrationen im S3 Segment (Yao et al., 2007). Dies erklärt, warum vor allem dieses Segment von renalen Schäden betroffen ist. Die Exkretion von Cisplatin erfolgt innerhalb der Niere über glomeruläre Filtration sowie über tubuläre Sekretion (Abbildung 2.14). Auf der basolateralen Seite der proximalen Tubuluszellen wird Cisplatin über verschiedene Transporter aufgenommen und luminal über weitere Transporter in den Urin ausgeschieden (Abbildung 2.15). Neben dem Ctr1 spielt insbesondere der OCT2 eine kritische Rolle in der Aufnahme von Cisplatin in proximale Tubuluszellen (Yao et al., 2007).

Während der Ctr1 in allen Zellen vorhanden ist, beschränkt sich die Lokalisation des OCT2 vor allem auf die Niere. Er konnte aber auch in Zellen der Cochlea nachgewiesen werden (Ciarimboli, 2014). Etliche Studien konnten einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme über den OCT2 und der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität feststellen (Ciarimboli et al., 2005, 2010; Filipski et al., 2008; Ludwig et al., 2004; Pabla et al., 2009; Sprowl et al., 2014; Tanihara et al., 2009; Yokoo et al., 2007; Yonezawa et al., 2005; Yonezawa und Inui, 2011). Luminal kann Cisplatin dann wieder über den MATE1/2-K (*multidrug and toxin extrusion 1/2K*) bzw. den ATP7A/7B (*ATPase copper transporting alpha/beta*) in den Urin abgegeben werden. Auch im Falle der MATE-Transporter spielt deren Lokalisation eine Rolle. Sie werden vermehrt in der Bürstensaummembran, d.h. der lumina-

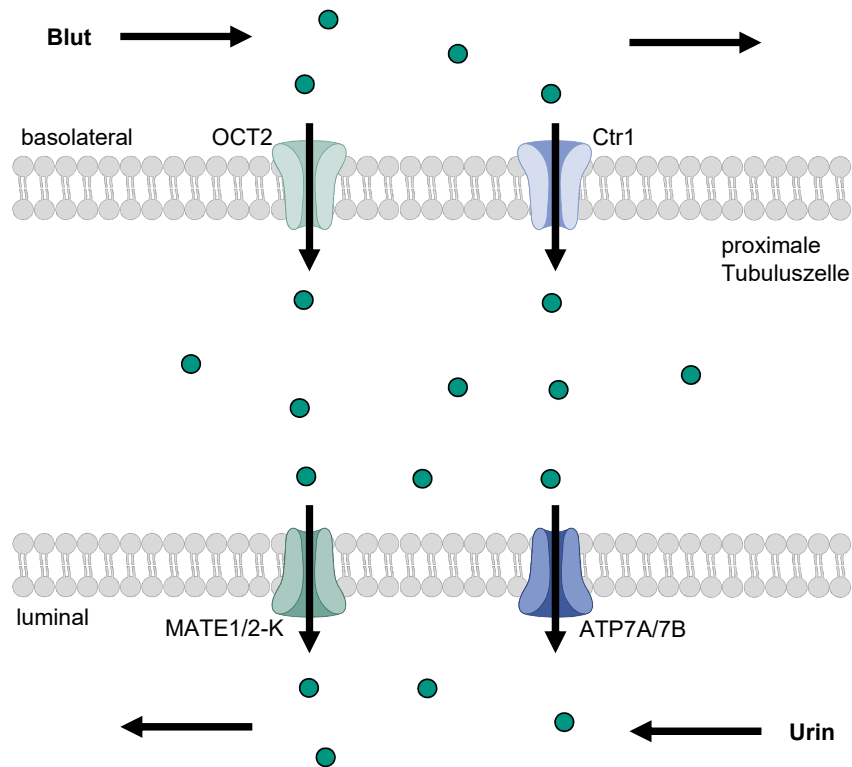


len Seite, in der Niere exprimiert (Burger et al., 2011). Es zeigte sich, dass ein *knockout* des MATE1 zu einer verstärkten nephrotoxischen Wirkung führte (Nakamura et al., 2010). Folglich spielen der Influx sowie der Efflux eine entscheidende Rolle in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität.



**Abbildung 2.14: Ausscheidungsmechanismen von Cisplatin innerhalb des Nephrons.** Cisplatin kann sowohl über glomeruläre Filtration über den Glomerulus als auch über tubuläre Sekretion der proximalen Tubuluszellen über den Urin ausgeschieden werden.

Nach der Aufnahme von Cisplatin in die Zelle, können die bereits erwähnten Mechanismen ablaufen. Ein viel diskutierter Vorgang ist die Biotransformation von Cisplatin zu einem toxischeren Metaboliten. Darin involviert soll die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (GGT) sein (Hanigan und Devarajan, 2003). In Studien zum Einfluss der GGT auf Cisplatin zeigten sich gegensätzliche Ergebnisse im Bezug auf den Einfluss in Tumor- und Nierenzellen. Wohingegen eine vermehrte Expression von GGT in Tumorzellen zu einer vermehrten Resistenz gegen Cisplatin führte, offenbarte ein *knock-out* des Enzyms eine verminderte nephrotoxische Wirkung (Hanigan et al., 1999, 2001). Gelangt Cisplatin in die Zelle, kann es u.a. an GSH binden, was den ersten Schritt in der Metabolisierung zum Nephrotoxin darstellt. Diese Cisplatin-GSH-Konjugate werden wieder aus der Zelle heraus transportiert. Durch die GGT, die in der nach außen gerichteten Membran lokalisiert ist, entsteht ein Cisplatin-Cysteinylglycin-Konjugat, das weiter durch die Aminopeptidase N zu einem Cisplatin-Cystein-Konjugat gespalten wird. Dieses Konjugat wird wieder von der Zelle aufgenommen. Hier

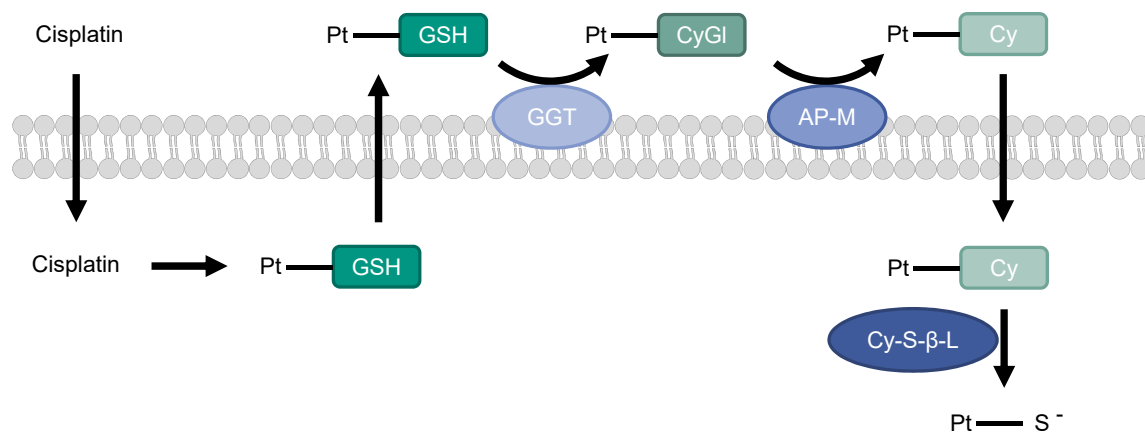


**Abbildung 2.15: Beteiligte Transporter am transzellulären Transport von Cisplatin in proximalen Tubuluszellen.** Cisplatin wird in die proximalen Tubuluszellen vor allem über den organischen Kationen Transporter 2 (OCT2) und den Kupfertransporter 1 (Ctr1) aufgenommen. Beide Transporter befinden sich dabei in der basolateralen Membran. Luminal wird Cisplatin über den MATE1/2-K (*multidrug and toxin extrusion 1/2-K*) und den ATP7A/7B (*ATPase copper transporting alpha/beta*) an den Urin abgegeben.

wird es durch die Cystein-S-Konjugat- $\beta$ -Lyase in ein reaktives Thiol gespalten, dass dann mit essentiellen Proteinen reagieren kann (Abbildung 2.16) (Zhang und Hanigan, 2003).

Um diesen Vorgang zu verhindern, können Thiolverbindungen während der Behandlung mit Cisplatin verabreicht werden. Sie sollen die Bildung des Cisplatin-GSH-Komplexes verhindern, indem sie selbst an Cisplatin binden. Amifostin ist dabei bisher allerdings die einzige Substanz, die durch die FDA genehmigt wurde, wobei ihr Nutzen fragwürdig ist (Manohar und Leung, 2018).

Neben einer vermehrten Aufnahme sowie der Bildung eines Nephrotoxins spielen in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität auch Vorgänge eine Rolle, die für die antineoplastische Wirkung essentiell sind, wie DNA-Schäden, eine Induktion von p53 und die Apoptose. Alle drei Vorgänge hängen dabei zusammen. Cisplatin induziert verschiedene DNA-Schäden, durch Signaltransduktion u.a. über p53 kann es dann zu einem Zellzyklusarrest kommen, wobei gleichzeitig DNA-Reparatursysteme versuchen die DNA zu reparieren. Ist es der Zelle nicht möglich den Schaden zu reparieren, so wird sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Apoptoseweg induziert (Jiang et al., 2004, 2006;



**Abbildung 2.16: Metabolismus von Cisplatin in proximalen Tubuluszellen zu einem toxischen Nephrotoxin.** Cisplatin bindet intrazellulär an Glutathion (GSH). Dieser Komplex wird wieder aus der Zelle ausgeschleust. Extrazellulär spaltet die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (GGT) den Komplex in ein Cisplatin-Cysteinylglycin-Konjugat (Pt-CyGl), das wiederum durch die Aminopeptidase N (AP-M) zu Cisplatin-Cystein (Pt-Cy) gespalten wird. Dieses Konjugat wird wieder in die Zelle aufgenommen und dort durch die Cystein-S-Konjugat- $\beta$ -Lyase (Cy-S- $\beta$ -L) in ein reaktives Thiol gespalten.

Wei et al., 2007; Zhu et al., 2015). Während man früher annahm, dass die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität über nekrotische Vorgänge abläuft, liegt der Fokus heutzutage vermehrt auf der Induktion der Apoptose. Dennoch geht die Apoptose immer einher mit der Nekrose (Pabla et al., 2008).

Zwei weitere wichtige Mechanismen, die im Zuge der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität immer wieder diskutiert werden, sind die Induktion von oxidativem Stress sowie von Inflammationsprozessen. Vieles deutet daraufhin, dass vor allem durch eine Fehlregulation in den Mitochondrien der Tubuluszellen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen können (Santos et al., 2007; Yang et al., 2014; Zsengeller et al., 2012). Aber auch eine Depletion von antioxidativen Enzymen sowie GSH spielen eine Rolle (Hanigan und Devarajan, 2003; Huang, 2001; Husain et al., 1998; Sadzuka et al., 1992). Es zeigte sich, dass vor allem proximale Tubuluszellen für eine vermehrte Induktion von ROS anfällig sind (Tsutsumishita et al., 1998).

Fehlregulationen der Mitochondrien beinhalten eine verminderte Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase (COX) und gleichzeitig auch eine verminderte Expression von Komplex IV Proteinen der Atmungskette (Yang et al., 2014). Weiterhin zeigten Untersuchungen eine verminderte Expression des mitochondrialen antioxidativen Enzyms Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) (Tanabe et al., 2012). Veränderungen in der Atmungskette führen zu einer vermehrten Bildung an ROS. Gleichzeitig werden diese durch verminderte Enzymaktivität von antioxidativen Schutzenzymen weniger abgebaut.

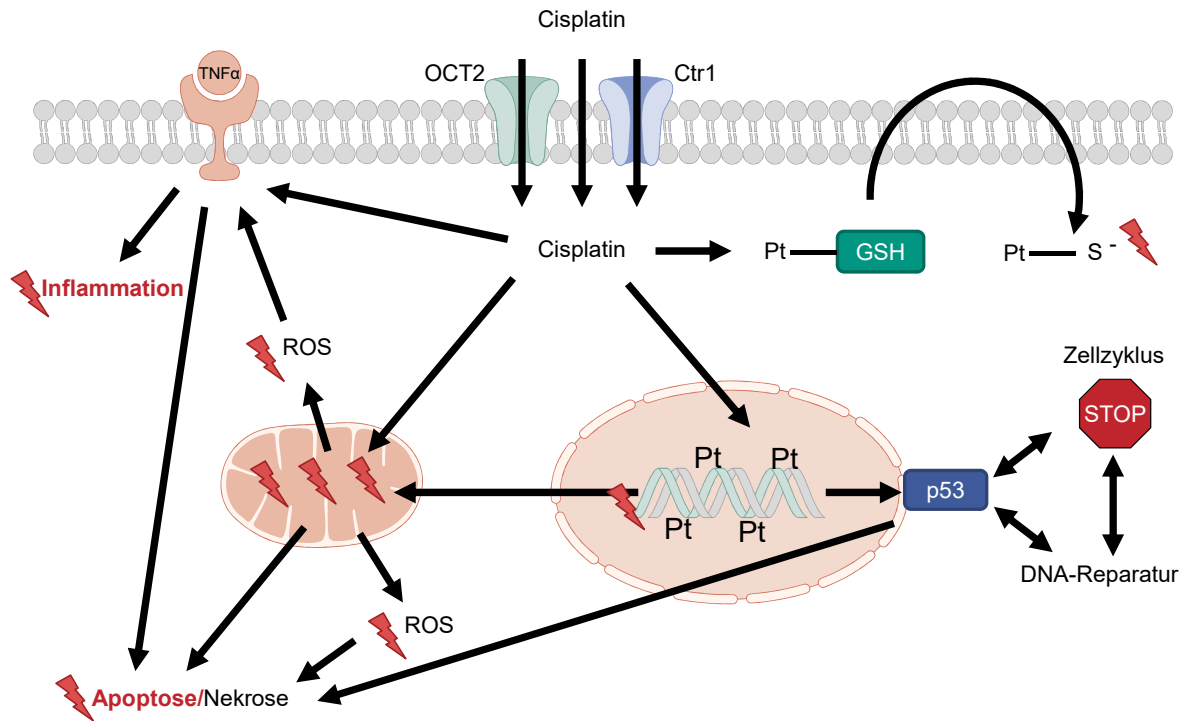
Mitochondriale Fehlregulationen entstehen durch Schäden an den Mitochondrien. Diese hängen im

Falle von Cisplatin mit den induzierten DNA-Schäden und der DNA-Schadensantwort zusammen. Denn diese führen, wie bereits erwähnt, zur Induktion der Apoptose u.a. über den intrinsischen Weg. Der intrinsische Apoptoseweg läuft über die Mitochondrien ab. P53 kann die Proteine BAX, PUMA oder NOXA induzieren, welche dann zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran führen und es infolgedessen zu einem Austritt von Cytochrom c (Cyt C) kommt (Elmore, 2007; Yang et al., 2014). Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass Cisplatin an die mitochondriale DNA (mDNA) binden kann und so zu mitochondrialen Fehlregulationen führen kann (Kohno et al., 2015; Marullo et al., 2013; Santos et al., 2007).

Letztliche Auswirkung von ROS sind oxidative Schäden an Makromolekülen in der Zelle. Sie können aber auch als Signalüberträger agieren und zur Induktion des Zelltodes führen. Hierbei soll es u.a. einen Zusammenhang zwischen ROS und p53 geben (Pabla et al., 2008). In einer Studie zeigte sich außerdem, dass unterschiedliche ROS zu unterschiedlichen Zelltodmechanismen beitragen können (Baek et al., 2003).

Eine vermehrte Bildung von ROS kann gleichzeitig mit einer Induktion von inflammatorischen Prozessen einhergehen. Entzündungsreaktionen werden auch im Zuge der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität beobachtet. Dabei kommt es zu einer vermehrten Expression von Zytokinen und Chemokinen (Pabla et al., 2008; Ramesh und Reeves, 2002). Eine zentrale Rolle spielt der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) (Ramesh und Reeves, 2002, 2003, 2005). TNF- $\alpha$  ist nicht nur an Inflammationsprozessen beteiligt, sondern auch am extrinsischen Apoptoseweg (Pabla et al., 2008; dos Santos et al., 2012). In seiner Funktion als Zytokin führt es zur Aktivierung weiterer Zytokine und Chemokine, die letztlich zu einer Rekrutierung von Zellen des Immunsystems führen (dos Santos et al., 2012). TNF- $\alpha$  wird vermehrt von Immunzellen gebildet, aber nicht-Immunzellen können das Zytokin ebenfalls bilden (Miller et al., 2010). Eine Studie zeigte, dass im Zuge von Cisplatin-induzierten Nierenschäden TNF- $\alpha$  nicht durch Immunzellen, sondern direkt von renalen Epithelzellen gebildet wird (Zhang et al., 2007). Induziert werden kann TNF- $\alpha$  u.a. durch ROS, aber auch durch NF- $\kappa$ B (*nuklear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) (dos Santos et al., 2012; Vyas et al., 2014). NF- $\kappa$ B gilt generell als wichtiger Regulator der Transkription verschiedener Inflammationsgene. Neben TNF- $\alpha$  beeinflusst es außerdem die Interleukine IL-1, IL-6 und IL-8 (Vyas et al., 2014). Durch die Induktion dieser Prozesse trägt die Inflammation ihren Teil zur Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität bei.

Die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität entpuppt sich zusammenfassend als ein komplexer Vorgang aus mehreren verschiedenen Prozessen, die in Abbildung 2.17 noch einmal dargestellt sind.



**Abbildung 2.17: Zelluläre Vorgänge der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität.** Verschiedene Faktoren tragen zu der durch Cisplatin induzierten Nephrotoxizität bei. An erster Stelle steht dabei die hohe Akkumulation der Substanz, die vermutlich vor allem über die Aufnahme über den organischen Kationentransporter 2 (OCT2) ermöglicht wird. In der Zelle kann Cisplatin dann zu einem Nephrotoxin über die Bindung zu Glutathion (GSH) umgewandelt werden. Weiterhin kann Cisplatin zu DNA-Schäden führen, die u.a. zu einer Aktivierung von p53 führen. Eine ausgelöste mitochondriale Fehlregulation führt zur vermehrten Induktion von ROS, die zu weiteren Schäden in der Zelle führen. Cisplatin kann außerdem über verschiedene Zytokine und Chemokine wie TNF- $\alpha$  Inflammationsprozesse auslösen. Letztlich wird durch alle Vorgänge die Apoptose über den extrinsischen als auch den intrinsischen Weg eingeleitet. Neben der Apoptose wird der Zelltod auch in geringem Ausmaß über die Nekrose eingeleitet.

### 2.6.2 Carboplatin und Oxaliplatin - warum sie im Vergleich zu Cisplatin nicht nephrotoxisch sind

Aufgrund der schwerwiegenden Nephrotoxizität, induziert durch Cisplatin, wird seit Jahren an Möglichkeiten geforscht, die Nephrotoxizität zu verhindern bzw. zu umgehen. Diese Möglichkeiten beinhalteten die Entwicklungen von Carboplatin und Oxaliplatin. Beide Substanzen führen in der Regel in der Klinik nicht zu Nierenschäden. Es stellt sich demnach die Frage nach dem Warum. Eine Antwort auf die Frage gibt es bisher nicht. Über den Einfluss der drei Substanzen auf die Niere bzw. Nierenzellen gibt es nur wenige Studien. Allgemein ist bekannt, dass je labiler der Abgangsgruppen Ligand ist, umso reaktiver und damit umso toxischer sind platinbasierte Sub-

stanzen (Oun et al., 2018). Demnach führt Cisplatin mit seinen eher labilen Abgangsgruppen im Vergleich zu Carboplatin und Oxaliplatin, die eher stabile Liganden aufweisen, generell zu mehr bzw. schwerwiegenderen Nebenwirkungen. Dennoch weisen auch Carboplatin und Oxaliplatin ihre Nebenwirkungen auf. Folglich kann die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität nicht nur auf die labilen Liganden zurückgeführt werden.

Im Kapitel zuvor wurde die wichtige Rolle der Akkumulation von Cisplatin in proximalen Tubuluszellen erläutert. Diese könnte der zentrale Faktor sein, warum Oxaliplatin und Carboplatin nicht nephrotoxisch sind. Eine *in vivo* Studie in Ratten zeigte eine deutlich niedrigere renale Akkumulation von Carboplatin und Oxaliplatin im Vergleich zu Cisplatin (Yokoo et al., 2007). Im Zuge der Akkumulation fallen weiter die Transporter OCT2 und MATE1/2-K in den Fokus (Yonezawa und Inui, 2011). Wie bereits erwähnt wurde, werden diese Transporter vor allem in der Niere exprimiert und tragen dort maßgeblich zum Transport von organischen Kationen bei. Der OCT2 ist dabei für den Transport in die Zelle verantwortlich. Es zeigte sich, dass Oxaliplatin gleichermaßen wie Cisplatin ein Substrat für den OCT2 darstellt und über diesen intrazellulär aufgenommen wird. Im Vergleich dazu erwies sich Carboplatin nicht als Substrat für den OCT2 (Yonezawa et al., 2006; Zhang et al., 2006). Bisher ist nicht klar, warum Cisplatin und Oxaliplatin, aber nicht Carboplatin ein Substrat für den OCT2 darstellen. Diskutiert wird hierbei, dass die Elektronegativität der Abgangsgruppen die Substratspezifität des Transporters definiert (Yonezawa und Inui, 2011).

Während für Carboplatin deshalb postuliert wird, dass eine fehlende Aufnahme über den OCT2 eine potentielle nephrotoxische Wirkung verhindert, muss es für Oxaliplatin einen anderen Grund geben. Dieser könnte in den Effluxtransportern MATE1 und MATE2-K liegen. Studien zeigten, dass Oxaliplatin ein Substrat sowohl für den MATE1 als auch den MATE-2K darstellt und dadurch vermehrt aus der Zelle ausgeschleust wird, weshalb Oxaliplatin nur zu einer geringen Akkumulation in der Niere führt. Weiterhin zeigte sich, dass Cisplatin nicht über den MATE2-K transportiert wird und nur in geringem Maße über den MATE1 (Yokoo et al., 2007; Yonezawa et al., 2006). Demnach wird postuliert, dass Oxaliplatin zwar in proximale Tubuluszellen aufgenommen wird, jedoch aber auch vermehrt wieder ausgeschleust wird. Gepaart mit der geringeren Reaktivität der Substanz könnte dies eine Erklärung für die fehlende Nephrotoxizität von Oxaliplatin sein. Carboplatin wird hingegen kaum von den Zellen aufgenommen und wird so hauptsächlich über glomeruläre Filtration mit dem Urin ausgeschieden.

---

### Fragestellung

---

Eine steigenden Tendenz an Krebsinzidenzfällen sowie -todesfällen erfordert eine intensive Forschung an Behandlungsmethoden. Auf dem Gebiet der Chemotherapeutika gibt es verschiedene Ansätze für Neuentwicklungen. Zum einen erfolgen Untersuchungen von bereits zugelassenen Chemotherapeutika in Tumorarten, für die die Substanz bisher nicht zugelassen ist, um das Wirkspektrum zu erweitern. Zum anderen wird der Wirkmechanismus dieser Substanzen im Detail weiter untersucht. Diese Untersuchungen geben Rückschlüsse auf die Struktureigenschaften, die für die Entwicklung neuer Substanzen hilfreich sind.

Als eine der am häufigsten angewandten Chemotherapieformen gilt die platinbasierte Chemotherapie. Intensive Forschung an Cisplatin führte zu der Entwicklung und Zulassung von Carboplatin und Oxaliplatin. Trotz des Erfolges der Substanzen bergen diese immer noch Nachteile, die es weiter zu untersuchen gilt. Weiterhin sind die Wirkmechanismen der Substanzen, besonders von Oxaliplatin, aufgrund ihrer Komplexität immer noch nicht vollständig erforscht. Ihr unterschiedliches Wirkspektrum sowie ihre spezifischen dosislimitierenden Nebenwirkungen deuten auf essentielle mechanistische Unterschiede hin.

Deshalb gilt es in dieser Arbeit, die Wirkmechanismen der drei platinbasierten Chemotherapeutika zunächst im Detail auf molekularer sowie funktioneller Ebene zu untersuchen und diese zu vergleichen. In der Nierenkarzinomzelllinie A498 soll zunächst das zytotoxische Potential der drei Substanzen ermittelt werden. Weiter gilt es, wichtige Parameter für platinbasierte Chemotherapeutika, wie die intrazelluläre Akkumulation sowie DNA-Platinierung, zu untersuchen. Die Erstellung von Genexpressionsprofilen mittels Hochdurchsatz RT-qPCR soll Aufschluss über wichtige Signaltransduktionswege geben. Untersucht werden dabei die DNA-Schadensantwort und -Reparatur, Zellzyklus und Proliferation, oxidative Stressantwort und Inflammation sowie Apoptose und wichtige

Transkriptionsfaktoren. Veränderungen, die sich auf Genexpressionsebene ergeben, sollen weiterhin auf funktioneller Ebene mit verschiedenen Methoden abgeklärt werden. Die generierten Ergebnisse tragen so weiter zur Aufklärung der charakteristischen Struktureigenschaften der Substanzen bei. Besonders für Oxaliplatin fehlen bisher detaillierte Untersuchungen.

Im weiteren Verlauf soll der Wirkmechanismus der neuen platinbasierten Substanz PN149 aufgeklärt werden. Diese zeigte in bisherigen Untersuchungen ein vielversprechendes Potential als neues Chemotherapeutikum (Cetraz et al., 2017). Da bisher nichts über den detaillierten Wirkmechanismus der Substanz bekannt ist, soll eine Einordnung der gewonnenen Ergebnisse zu den Wirkmechanismen der drei anderen Substanzen erfolgen.

Abschließend erfolgen Untersuchungen zum nephrotoxischen Potential der Substanzen in einer immortalisierten proximalen Tubuluszelllinie (ciPTEC) sowie Nierennormalzellen. Nephrotoxizität stellt die dosislimitierende Nebenwirkung von Cisplatin dar. In der Klinik werden weder für Carboplatin noch für Oxaliplatin Nierenschäden beobachtet. Diesen Unterschied gilt es herauszuarbeiten, denn bisher gibt es hierzu kaum vergleichende Untersuchungen. Außerdem wird für PN149 postuliert, dass seine Strukturmerkmale zu weniger Nebenwirkungen führen könnten. Hierzu gibt es bisher keine Untersuchungen, weshalb die Untersuchungen Aufschluss über die Hypothese geben können.



---

## Material und Methoden

---

Im Anhang befindet sich eine detaillierte Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen.

### 4.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden zum Schutz vor Kontaminationen unter einer *Laminar Flow* Sterilwerkbank der Schutzstufe 2 durchgeführt.

#### 4.1.1 Zelllinien und Kultivierungsbedingungen

Zur Behandlung der Fragestellung des Wirkmechanismus der Substanzen wurde die Zelllinie A498 eingesetzt. Diese stammten aus dem proximalen Tubulus eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms (ccRCC) und wurden einer 52 jährigen Patientin entnommen. Es handelt sich dabei um Epithelzellen, die adärent im *Monolayer* wachsen (Giard et al., 1973). Erworben wurde die Zelllinie von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Nierenzellkarzinome sind resistent gegenüber klassischen Chemotherapeutika. Die Ansprechrate liegt bei nur 5 - 6 % (Rini et al., 2009). Aufgrund dessen ist es essentiell, hier weiter Forschung zu betreiben und neue Kombinationen oder generell neue Chemotherapeutika auszutesten. Des Weiteren entstammen renale Zellkarzinome oft dem proximalen Tubulus, welches ebenfalls den Ursprungsort der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität darstellt.

Die Kultivierung von A498 Zellen erfolgte in RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) mit 10 % fetalem Kälber Serum (FKS) sowie 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin.

Die Zellen wurden weiterhin bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Da es sich bei A498 Zellen um eine permanente Zelllinie handelt, mussten die Zellen alle 2 - 3 Tage subkultiviert werden. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt, mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA-Lösung versetzt. Nach einer Einwirkzeit von ca. 1 min wurden der Zellrasen mit Hilfe einer Pipette abgelöst und ein entsprechender Anteil an Zellsuspension in ein neues Kultivierungsgefäß mit vorgelegtem Medium überführt. A498 Zellen wurden bis zu einer Passagenzahl von 8 - 38 verwendet.

Für die Einordnung des Wirkmechanismus von PN149 wurden zusätzlich alle Versuche von Cisplatin und PN149 in der Zelllinie RT112 durchgeführt. RT112 Zellen entstammen aus einem Blasen-tumor einer Patientin unbekanntes Alters (Masters et al., 1986). Cisplatin wird erfolgreich für die Behandlung von Blasen-tumoren eingesetzt, weshalb diese Zelllinie zum weiteren Vergleich eingesetzt wurde. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. John Masters bereitgestellt.

RT112 Zellen sind ebenfalls Epithelzellen, die adhären in *Monolayern* wachsen. Die Kultivierung erfolgte wiederum bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in RPMI-1640 Medium. Die Subkultivierung erfolgte im selben Ablauf wie für die A498 Zellen, wobei die Einwirkzeit von Trypsin ca. 5 min betrug. Zur besseren Übersicht werden die generierten Daten der RT112 Zellen im Anhang aufgelistet.

Um die Frage des nephrotoxischen Potentials zu bearbeiten, wurde die Zelllinie ciPTEC (*conditionally immortalized proximal tubule epithelial cells*) eingesetzt. CiPTEC Zellen entstammen aus dem proximalen Tubulus und wurden aus dem Urin eines gesunden Probanden gewonnen und durch Transfektion mittels SV40T (*SV40 large T antigen*) und hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) konditionell immortalisiert. Eine Transfektion mittels SV40T erlaubt es den Zellen wieder zu proliferieren. Zur Proliferation benötigen sie allerdings geringere Temperaturen, weshalb ciPTEC Zellen bei 33 °C kultiviert werden. Erhöht man die Temperatur auf 37 °C erfolgt wiederum die Inaktivierung des SV40T und die Zellen differenzieren wieder aus. Durch den hTERT Vektor wird die Länge der Telomere beibehalten, um eine replikative Seneszenz zu vermeiden. Sie wurden ausführlich charakterisiert, vor allem speziell im Hinblick auf Transporteigenschaften, und ihr Ursprung des proximalen Tubulus sichergestellt (Wilmer et al., 2010). Erworben wurden die Zellen von Dr. Martijn Wilmer.

CiPTEC Zellen wurden in DMEM-HAM's F12 phenolrotfreiem Medium kultiviert. Das Medium wurde mit 10 % FKS, 5 µg/mL Insulin, 5 µg/mL Transferrin, 5 ng/mL Selen, 36 ng/mL Hydrocortison, 10 ng/mL EGF (*epidermal growth factor*) sowie 40 pg/mL Triiodthyronin (T<sub>3</sub>) versetzt. Zur Kultivierung bei Proliferationstemperatur wurde zusätzlich zum Medium 5 % einer Lösung aus 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (P/S) zugegeben. Zur Subkultivierung wurden die Zellen, wie bereits erwähnt, bei 33°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dabei wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung versetzt und für 5 min bei 37 °C belassen.

Zum Ansetzen eines Experiments wurden die Zellen zunächst für 24 h bei 33 °C mit Medium mit

Zusatz von P/S kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen in 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit umgesetzt. Dabei wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit P/S-freiem Medium versetzt und für 7 Tage bei 37 °C kultiviert, wobei die Zellen in dieser Zeit ausdifferenzieren konnten. Dabei wurde alle 2 - 3 Tage das Medium erneuert. CiPTEC Zellen wurden von einer Passagenzahl von 30 - 60 eingesetzt.

Für alle Versuche wurden ciPTEC Zellen in einer Dichte von 55000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgestreut. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Zellen außerdem nur in Zellkulturflaschen kultiviert.

Als Vergleich zu den ciPTEC Zellen wurden zusätzlich Nierennormalgewebszellen (NT) eingesetzt. Diese wurden Patienten im Universitätsklinikum Mainz entnommen und wurden freundlicherweise von Dr. Walburgis Brenner zur Verfügung gestellt. NT's wurden in RPMI-1640 Medium mit 10 % FKS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin und 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte wie bei den A498 Zellen.

#### 4.1.2 Kryokonservierung und Inkulturnahme von Zellen

Um im Laufe der Arbeit erneut auf niedrige Passagenzahlen der Zelllinien zurückgreifen zu können, wurden diese nach Erhalt mittels Kryokonservierung tiefgefroren.

Zum Tieffrieren der A498 Zellen wurde eine ca. 95 % konfluente 10 cm Zellkulturschale verwendet. Die Zellen wurden wie zur Subkultivierung abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit Medium versetzt und anschließend für 3 min bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Medium wurde im Anschluss abgesaugt, sodass ein Zellpellet erhalten wurde. Das Zellpellet wurde mit 1 mL Tieffriermedium, bestehend aus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 90 % FKS, versetzt und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde folgend in ein zuvor auf Eis gelagertes Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde dann in einem mehrstufigen Tieffrierprozess eingefroren. Hierfür wurde ein Becherglas, welches mit Papierhandtüchern ausgekleidet wurde, verwendet. Das Kryoröhrchen wurde dabei zwischen die Papierhandtücher gestellt und über Nacht bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt, sodass die Zellen weiter auf -196 °C abkühlen konnten. So wurde eine Kühlgeschwindigkeit von -1 °C/min gewährleistet.

Zur Kryokonservierung der ciPTEC Zellen wurde eine zu 95 % konfluente T75 Flasche verwendet. Die Zellen wurden ebenfalls abgelöst und pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 2,5 mL Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf Eis gestellt. DMSO wurde ebenfalls auf Eis gestellt, sobald beides eiskalt war, wurden weitere 2,5 mL DMSO zur Zellsuspension gegeben, sodass eine DMSO Konzentration von 10 % erreicht wurde. Je 1 mL aus dieser Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurde zum weiteren Tieffrieren wie mit den A498 Zellen verfahren.

Zur Inkulturnahme von kryokonservierten Zellen wurde das Kryoröhrchen zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Sobald keine Eiskristalle mehr erkennbar waren, wurde die Zellsuspension in ein Zellkultivierungsgefäß mit vorgelegtem Medium überführt. Nach 4 h Stunden wurde das Medium

erneuert, um das vorhandene DMSO zu entfernen. Nach ca. einer Woche konnten die Zellen für Experimente verwendet werden.

## 4.2 Platinbasierte Chemotherapeutika

Die Behandlung der Zellen erfolgte mit den drei klinisch zugelassenen platinbasierten Chemotherapeutika Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin. Weiterhin wurde die noch nicht zugelassene Substanz PN149 eingesetzt. Cisplatin wurde vom Städtischen Klinikum Karlsruhe zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um eine zur Infusion anwendbare Lösung mit einer Konzentration von 1 g/L. Carboplatin und Oxaliplatin wurden als Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung kommerziell von der Firma Accord erworben. Die Konzentration von Carboplatin belief sich auf 10 mg/mL, die von Oxaliplatin auf 5 mg/mL. PN149 wurde von Vasily Sen' vom *Institute of Problem of Chemical Physics* der *Russian Academy of Sciences* synthetisiert und in Pulverform zur Verfügung gestellt. Daraus wurde eine Lösung in DMSO mit einer Konzentration von 5 mM hergestellt.

Um möglichst nahe an der klinischen Applikation zu sein, wurden verschiedene Konzentrationen und Inkubationszeiten der jeweiligen Substanz angepasst. Für Cisplatin liegt der klinisch relevante Bereich des Blutplasmalevels bei ca. 10 - 50  $\mu\text{M}$  (de Jongh et al., 2001, 2004; O'Dwyer et al., 2000; van Hennik et al., 1987). Carboplatin weist einen stabileren Liganden auf, weshalb es weniger reaktiv ist. Deshalb kann es in höheren Konzentrationen als Cisplatin eingesetzt werden (Kelland, 2007; Wheate et al., 2010). Der Konzentrationsbereich von Carboplatin lag daher bei 50 - 500  $\mu\text{M}$ . Oxaliplatin weist einen ähnlichen Konzentrationsbereich wie Cisplatin auf (O'Dwyer et al., 2000), weshalb hier Konzentrationen von 20 - 160  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurden.

Für die Inkubationszeiten wurde sich an der klinischen Gabe von Cisplatin orientiert. Cisplatin kann als Infusionslösung intravenös innerhalb 1 h verabreicht werden. Nach 24 h ist der Großteil von Cisplatin wieder ausgeschieden. Carboplatin und vor allem Oxaliplatin können unterschiedlich verabreicht werden. Dennoch wurde sich, zur besseren Vergleichbarkeit, an der Gabe von Cisplatin orientiert und deshalb eine Inkubationszeit für die A498 Zellen von 1 h gewählt. Abweichend hierzu wurde für die Versuche der intrazellulären Akkumulation sowie DNA-Platinierung eine Inkubationszeit von 2 h gewählt, da eine einstündige Inkubation nicht ausreichend für die Sensitivität der Graphitrohr-AAS ist.

Die Untersuchung des nephrotoxischen Potentials beinhaltet eine andere Fragestellung als die Untersuchung des Wirkmechanismen der Substanzen in Tumorzellen. Deshalb wurde sich hier an der Ausscheidezeit von Cisplatin orientiert, weshalb hierfür eine Inkubationszeit von 24 h gewählt wurde.

## 4.3 Zytotoxizitätsstudien

Die Bestimmung der Zytotoxizität der platinbasierten Substanzen erfolgte zum einen mittels relativer Zellzahl (RCC - *relative cell count*) sowie zum anderen anhand des Kolonieformationsassays (CFA). Dabei galt die Bestimmung der relativen Zellzahl zur Untersuchung der akuten Toxizität, wohingegen der CFA zur Untersuchung der Langzeittoxizität zum Einsatz kam.

### 4.3.1 Bestimmung der relativen Zellzahl

#### *A498 Zellen*

Zur Bestimmung der relativen Zellzahl wurden  $2,5 \times 10^5$  A498 Zellen in 6 cm Schalen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Dabei wurde jede Probe in Doppelbestimmung angesetzt. Neben einer unbehandelten Kontrollprobe wurden jeweils Behandlungen für Cisplatin mit 10, 20, 40 und 80  $\mu\text{M}$ , für Carboplatin mit 40, 80, 160, 320 und 500  $\mu\text{M}$ , für Oxaliplatin mit 20, 40, 80 und 160  $\mu\text{M}$  sowie für PN149 mit 10, 20, 40 und 80  $\mu\text{M}$  angesetzt. Die Proben wurden zur Behandlung für 1 h mit der jeweiligen Substanz und Konzentration inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und wiederum Medium auf die Zellen gegeben und die Zellen für weitere 72 h nachinkubiert.

Um die Zellzahl anschließend zu bestimmen, wurden die Zellen, wie oben beschrieben, abgelöst und in ein 15 mL Rörchen überführt. Aus dieser Zellsuspension wurde ein 50  $\mu\text{L}$  Aliquot entnommen, in 5 mL CASY®-Ton-Elektrolytlösung überführt und am CASY®-Zellzählgerät (CASY® TTC Cell Counter & Analyser System) die Zellzahl bestimmt. Die Messung erfolgte dabei jeweils in Doppelbestimmung.

Die Bestimmung der relativen Zellzahl von Cisplatin und PN149 in A498 Zellen erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Sabine Gajewski.

#### *ciPTEC Zellen*

Um das nephrotoxische Potential der Substanzen zu überprüfen, wurde ebenfalls die relative Zellzahl in ciPTEC Zellen bestimmt. Dafür wurden  $1,375 \times 10^6$  Zellen in T25 Flaschen ausgestreut und wie in Kapitel 4.1.1 kultiviert. Vergleichend zu den A498 Zellen wurden die Proben jeweils in Doppelbestimmung gemessen sowie eine unbehandelte Kontrollprobe mitgeführt. Inkubiert wurden die Zellen für 24 h mit jeweils Cisplatin (10, 20, 50  $\mu\text{M}$ ), Carboplatin (100, 200, 500  $\mu\text{M}$ ), Oxaliplatin (20, 50, 100, 150  $\mu\text{M}$ ) sowie PN149 (10, 20, 50  $\mu\text{M}$ ). Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen für 48 h weiterkultiviert und anschließend die Zellzahl bestimmt. Dabei erfolgte die Bestimmung der Zellzahl nach demselben Schema wie für die A498 Zellen.

Die Untersuchung der relativen Zellzahl wurde für alle Zelllinien in jeweils drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Um die relative Zellzahl zu ermitteln, wurden die Behandlungen prozentual auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

### 4.3.2 Kolonieformationsassay

Zur Bestimmung der chronischen Toxizität wurde die Kolonieformationsfähigkeit (CFA) untersucht. Hierfür wurden 600 A498 Zellen in 6 cm Schalen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Jede Probe wurde in Dreifachbestimmung ausgestreut, außerdem wurde eine unbehandelte Kontrollprobe mitgeführt. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit den jeweiligen platinbasierten Substanzen. Cisplatin, Oxaliplatin und PN149 wurden in den Konzentrationen 5, 10, 15 und 20  $\mu\text{M}$  angewandt, wohingegen Carboplatin in den Konzentrationen 50, 100, 150 und 200  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und erneut mit Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 12 Tage kultiviert, sodass sich Kolonien ausbilden konnten.

Zum Anfärben der Kolonien wurden diese zunächst mit eiskaltem 96 %igem Ethanol für 5 min fixiert. Der Ethanol wurde abgenommen und weitere Ethanolreste wurden im Abzug abgedampft. Anschließend wurden die Kolonien für 1 h mit einer 1:20 verdünnten Giemsa-Färbelösung angefärbt. Die Färbelösung wurde wieder abgenommen, restliche Färbelösung mit bidest  $\text{H}_2\text{O}$  abgewaschen und anschließend wurden die Schalen getrocknet, sodass die Kolonien abschließend mit Hilfe des Koloniezählgerätes (Colony Counter BZG-30) ausgezählt werden konnten.

Vergleichbar mit der relativen Zellzahlbestimmung wurde die Koloniebildungsfähigkeit in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Auch hier wurden die behandelten Proben auf die unbehandelte Kontrollprobe prozentual normiert.

## 4.4 Intrazelluläre Akkumulation

Die intrazelluläre Akkumulation von platinbasierten Chemotherapeutika lässt sich mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie (GF-AAS) ermitteln.

### 4.4.1 Zellkultur

#### *A498 Zellen*

Zur Bestimmung der intrazellulären Akkumulation in A498 Zellen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 cm Schalen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 2 h mit jeweils 50  $\mu\text{M}$  platinbasierter Substanz inkubiert. Für Carboplatin erfolgte eine zusätzliche Inkubation von 300  $\mu\text{M}$ . Abweichend zu anderen Experimenten wurde hier aufgrund der mangelnden Sensitivität der GF-AAS eine Inkubationszeit von 2 h gewählt. Zum Abbruch der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Röhrchen überführt und bei 4 °C und 1300 rpm für 3 min zentrifugiert. Vorher wurde noch die Gesamtzellzahl am CASY®-Zellzählgerät bestimmt. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

Dies wurde unter denselben Bedingungen erneut zentrifugiert und anschließend wiederum der Überstand abgenommen. Das Zellpellet konnte dann bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Die Bestimmung der intrazellulären Akkumulation von Cisplatin und PN149 in A498 Zellen erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Sabine Gajewski und erfolgte in drei voneinander unabhängigen Experimenten.

#### *CiPTEC Zellen*

Für die intrazelluläre Akkumulation in ciPTEC Zellen wurden  $4,125 \times 10^6$  Zellen in T75 Flaschen ausgestreut und wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben kultiviert. Es erfolgte dann, wie für die A498 Zellen, eine zweistündige Inkubation mit je  $50\text{ }\mu\text{M}$  Cisplatin, Oxaliplatin und PN149 bzw.  $300\text{ }\mu\text{M}$  Carboplatin. Die Zellen wurden nach zweistündiger Inkubation ebenfalls, vergleichend zu den A498 Zellen, pelletiert, wobei nicht mit PBS sondern mit HBSS Puffer gewaschen wurde. Der Versuch wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.

#### 4.4.2 Aufschluss der Zellpellets und Messung an der GF-AAS

Um den Platingehalt messen zu können, musste zunächst ein Aufschluss der Zellpellets erfolgen. Die Zellpellets wurden hierfür mit  $500\text{ }\mu\text{L}$  salpetersauerem  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $65\text{ }\%$   $\text{HNO}_3$  +  $30\text{ }\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) versetzt und auf einem Thermoschüttler vollständig eingedampft. Das Eindampfen erfolgte zunächst bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  für  $1\text{ h}$ , wobei die Temperatur dann im Einstudentakt um jeweils  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bis zu einer Höchsttemperatur von  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , erhöht wurde. Nach vollständigem Eindampfen wurde der Rückstand in  $500\text{ }\mu\text{L}$   $0,2\text{ }\%$   $\text{HNO}_3$  aufgenommen und zur Analyse an der AAS eingesetzt.

Die Bestimmung des Platingehalts der Proben wurde mit Hilfe einer Platinhohlkathodenlampe (Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von  $265,94\text{ nm}$  an der GF-AAS (PINAAcle 900 T, Perkin Elmer) gemessen. Zur Messung wurde zunächst eine Kalibrierung mit Hilfe einer Platin-Stammlösung von  $200\text{ }\mu\text{g/L}$  erstellt. Mittels Autosampler wurde in Dreifachbestimmung zwischen  $20$  und  $100\text{ }\mu\text{g/L}$  kalibriert. Alle Lösungen, Verdünnungen sowie Blindwerte wurden in  $0,2\text{ }\%$   $\text{HNO}_3$  hergestellt. Anhand des Temperaturprogramms in Tabelle 4.1 erfolgte die Atomisierung. Um einen linearen Zusammenhang der Kalibriergerade sicherzustellen, wurde ein Korrelationskoeffizient bis  $0,995$  als akzeptabel angesehen. Zur Überprüfung der Methode wurde außerdem ein externer Standard von  $50\text{ }\mu\text{g/L}$  aus einer Platin-Stammlösung erstellt. Es erfolgte weiterhin die Bestimmung der Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze nach DIN 32645.

## 4.5 DNA-Platinierung

Die DNA-Platinierung von platinbasierten Chemotherapeutika spiegelt wider, wie viele DNA-Läsionen die Substanzen induzieren. Durch vorherige DNA-Extraktion lässt sich der Platingehalt mittels Metallanalyse ermitteln. Aufgrund der geringen Sensitivität der GF-AAS wurde für die

**Tabelle 4.1:** Temperaturprogramm zur Messung des Platingehaltes an der GF-AAS.

	Temperatur [°C]	Ramp Time [sec]	Hold Time [sec]
Trocknung I	120	1	30
Trocknung II	140	15	45
Pyrolyse	1300	10	20
Atomisierung	2400	0	5
Ausheizen	2500	1	5

Bestimmung der DNA-Platinierung die ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) eingesetzt.

Hierfür wurden zunächst je  $3 \times 10^6$  Zellen in 20 cm Schalen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Jede Probe wurde zweifach angesetzt. Die später isolierte DNA wurde dann vor der Messung an der ICP-MS zusammengeführt, um im Sensitivitätsbereich des Messgerätes zu liegen. Folglich wurden so für eine Probe  $6 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden im Anschluss einer zweistündigen Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  der jeweiligen platinbasierten Substanz unterzogen. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte wie nach 4.4.1 die Erstellung eines Zellpellets. Dieses wurde wiederum bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die DNA-Platinierung wurde in drei voneinander unabhängigen Versuchen ermittelt.

#### 4.5.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus den Zellpellets erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurde die DNA isoliert bzw. gefällt, im Anschluss gewaschen und letztlich quantifiziert.

##### *DNA-Isolierung*

Um die DNA aus den Zellen zu isolieren, wurden die Zellpellets zunächst mit 100  $\mu\text{L}$  TE-Puffer ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ) versetzt und gut resuspendiert. Im Anschluss wurden 900  $\mu\text{L}$  Extraktionspuffer ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ) hinzugegeben und wiederum gut resuspendiert. Es erfolgte dann eine Inkubationszeit von 1 h 15 min, in der die Proben bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  geschüttelt wurden. Die Proben wurden anschließend mit 10  $\mu\text{L}$  Proteinase K (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) versetzt und für 3 h bei  $50\text{ }^\circ\text{C}$  im Thermoschüttler inkubiert. Bevor die DNA gefällt werden konnte, wurden die Proben vorher 20 min abgekühlt.

Die DNA-Fällung erfolgte zunächst durch Zugabe von 900  $\mu\text{L}$  Roti®-Phenol (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 1:1:1 (v:v:v)). Die Proben wurden dann für 2 min auf dem Vortex gut durchmischt und im Anschluss für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, ohne dabei die braune/weiße Proteinschicht zu berühren, und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Im nächsten Schritt erfolgte eine erneute Zugabe von 1 mL Roti®-Phenol zu den Proben. Die Proben wurden wiederum unter denselben Bedingungen, wie bereits erwähnt, durchmischt und zentrifugiert. Die obere Phase wurde wieder abgenommen und erneut in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses Mal erfolgte im Anschluss eine Zugabe von 1 mL einer Lösung aus Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v:v)). Die Probe wurde



abermals durchmischt, zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch letztliche Zugabe von 25  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4$ -Acetat (10 mM) und 1 mL Rotisol® (100% Ethanol) und leichtem Schütteln wurde die DNA gefällt. Zur vollständigen Fällung wurde die DNA über Nacht bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Am darauffolgenden Tag konnte dann das Waschen der DNA erfolgen.

#### *DNA Waschen*

Die Proben wurden zunächst bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und 9500 rpm für 10 min zentrifugiert, sodass im Anschluss der Überstand abgenommen werden konnte. In den folgenden Schritten wurde auf Eis gearbeitet, wobei die Waschlösung (70 % Ethanol) ebenfalls auf Eis gelagert wurde. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, erfolgte eine Zugabe von 1,5 mL 70 %igem Ethanol. Die Proben wurden anschließend vorsichtig invertiert und kurz zentrifugiert, sodass der Überstand wieder abgenommen werden konnte und ein erneuter Waschschrift durchgeführt wurde. Insgesamt erfolgten 4 Waschschrift. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand erneut abgenommen und die Proben, zum vollständigen Abdampfen des Ethanols, in den Abzug gestellt. Um die DNA im nächsten Schritt quantifizieren zu können, wurde sie in 500  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gelöst.

#### *Quantifizierung der DNA*

Mittels NanoQuant-Platte wurde die DNA am Tecan Infinite M200 Pro im UV-Bereich in Doppelbestimmung quantifiziert. Zur Prüfung der Reinheit der DNA-Proben wurden die Verhältnisse von DNA/Proteinen (260 nm/280 nm) und von DNA/Salzen (260 nm/230 nm) gemessen. Dabei sollte das Verhältnis von DNA/Proteinen zwischen 1,7 und 1,9 liegen sowie das von DNA/Salzen bei  $\pm 2,3$ .

Nach der DNA-Quantifizierung wurden die Proben eingedampft und wie in Kapitel 4.4.2 mit salpetersauerer  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufgeschlossen. Der Rückstand wurde dann zur Messung an der ICP-MS in 2 mL 0,2 %  $\text{HNO}_3$  aufgenommen.

### **4.5.2 Messung an der ICP-MS**

Die Messungen der Proben erfolgte an einer ICP-MS der X-Serie II mit CCT (*collision cell technology*) von Thermo Fisher Scientific mit einer Plasmaleistung von 1400 W. Die Kalibrierung erfolgte in Dreifachbestimmung in einem Bereich von 0,25 - 10  $\mu\text{g/L}$ , wobei aus einem Multielementstandard mit einer Konzentration von 1 mg Pt/L die jeweiligen Kalibrierlösungen erstellt wurden. Alle Lösungen, Verdünnungen und Blindwerte wurden, abweichend zur AAS, in 1%  $\text{HNO}_3$  hergestellt. Zu jeder Probe wurde zusätzlich ein interner Standard in einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{g/L}$  zur Signalkorrektur zugegeben. Als interner Standard wurden dabei  $^{169}\text{Tm}$  und  $^{209}\text{Bi}$  eingesetzt. Gemessen wurden die beiden am häufigsten vorkommenden Isotopen  $^{194}\text{Pt}$  und  $^{195}\text{Pt}$ , wobei aus den beiden Messungen der Mittelwert berechnet wurde. Abweichend zur GF-AAS wurde die Nachweisgrenze an jedem Messtag neu bestimmt.

## 4.6 Erstellung von Genexpressionsprofilen mittels Hochdurchsatz RT-qPCR

Zur Erstellung von Genexpressionsprofilen hinsichtlich verschiedener Transkriptionsfaktoren, DNA-Schadensantwort und -Reparatur, Zellzyklusregulation und Proliferation, (oxidativer) Stressantwort und Inflammation sowie Apoptose wurde eine Hochdurchsatz RT-qPCR angewandt. Sie erlaubt die simultane Bestimmung der Genexpression von 95 Genen in 96 Proben (Fischer et al., 2016). Für die Durchführung der Hochdurchsatz RT-qPCR wurde sich an die *MIQE Guidelines (Minimum of Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments)* gehalten (Bustin et al., 2009). Zur Erstellung von Genexpressionsprofilen mittels Hochdurchsatz RT-qPCR mussten verschiedene Schritte durchgeführt werden, die im Folgenden erläutert werden.

### 4.6.1 Zellkultur

#### *A498 Zellen*

In 10 cm Schalen wurden  $5 \times 10^5$  A498 Zellen ausgestreut und für 48 h kultiviert. In Doppelbestimmung erfolgte die einstündige Inkubation der Zellen mit jeweils Cisplatin (10, 20, 50  $\mu\text{M}$ ), Carboplatin, (50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{M}$ ), Oxaliplatin (20, 50, 100, 150  $\mu\text{M}$ ) oder PN149 (10, 20, 50  $\mu\text{M}$ ). Dabei wurde jeweils eine unbehandelte Kontrollprobe in Doppelbestimmung mitgeführt. Nach einstündiger Inkubation der jeweiligen platinbasierten Substanz wurde das Medium abgenommen, mit PBS gewaschen und mit neuem Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h kultiviert und im Anschluss ein Zellpellet nach 4.4.1 hergestellt. Die Zellpellets wurden dann bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die Erstellung der Genexpressionsprofile in A498 Zellen erfolgte in mindestens drei unabhängigen Versuchen.

#### *RT112 Zellen*

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus von PN149 wurden zusätzlich Genexpressionsprofile in RT112 Zellen erstellt. Hierzu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 6 cm Schalen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Alle Proben wurden dabei in Doppelbestimmung ausgestreut. Neben einer unbehandelten Kontrollprobe wurden die Zellen entweder mit Cisplatin oder PN149 mit den Konzentrationen 10, 20 und 50  $\mu\text{M}$  für 1 h inkubiert. Nach der einstündigen Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, erneut Medium dazu gegeben und für weitere 24 h kultiviert. Danach wurden, wie für die A498 Zellen, Zellpellets erstellt, die bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert wurden. Die Bestimmung der Genexpression in RT112 Zellen wurde in drei voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt.

#### *CiPTEC Zellen*

Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen in ciPTEC Zellen wurden  $1,375 \times 10^6$  Zellen in T25 Flaschen ausgestreut und wie in 4.1.1 kultiviert. Ebenfalls in Doppelbestimmung erfolgte eine

24 h Inkubation der Zellen mit jeweils Cisplatin (10, 20, 50  $\mu\text{M}$ ), Carboplatin (100, 200, 500  $\mu\text{M}$ ), Oxaliplatin (20, 50, 100, 150  $\mu\text{M}$ ) und PN149 (10, 20, 50  $\mu\text{M}$ ). Neben den Proben wurde außerdem in Doppelbestimmung eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Nach Ablauf der 24 h Inkubation wurden ebenfalls nach 4.4.1 Zellpellets hergestellt und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die Untersuchung der Genexpression in ciPTEC Zellen wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt.

#### *Normalgewebe*

Zusätzlich zu den ciPTEC Zellen wurden Genexpressionsprofile in Normalgewebszellen erstellt. Hierfür wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 10 cm Schalen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung angesetzt. Neben einer unbehandelten Kontrollprobe wurde eine Behandlung mit Cisplatin durchgeführt. Diese erfolgte für 24 h mit einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  Cisplatin. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein Zellpellet nach dem Schema der A498 Zellen erstellt. Die Zellpellets wurden ebenfalls bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die Genexpressionsbestimmung in Normalgewebe wurde in nur zwei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt, da nicht genug Gewebematerial vorhanden war, um ein weiteres Experiment durchzuführen. Die Gewebeproben wurden verschiedenen Patienten entnommen. Für Versuch I wurden NT3327 Zellen verwendet, für Versuch II wurden NT3318 sowie NT3322 Zellen verwendet.

### 4.6.2 RNA Isolation und Quantifizierung

Zunächst erfolgte die Isolation der RNA aus den Zellpellets. Diese wurde in einem separaten Raum unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Zur RNA Isolation wurde das MN NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plus Kit von Machery Nagel verwendet. Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers vorgegangen, wobei stets auf Eis gearbeitet wurde.

Die Proben wurden zunächst in 350  $\mu\text{L}$  Lysepuffer (LBP) gut resuspendiert und anschließend auf dem Vortex gut durchmischt. Das erhaltene Lysat wurde auf die NucleoSpin gDNA Removal Säule, die sich auf einem Sammelröhrchen befand, überführt. Die Säule dient dazu, DNA zu binden. Im darauffolgenden Schritt wurden die Säulen bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und 11000 rpm für 30 sec zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und das Zellysats mit 100  $\mu\text{L}$  einer *Binding Solution* (BS) versetzt und gut resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf eine RNA-bindende Säule gegeben, welche sich ebenfalls auf einem Sammelröhrchen befand. Die Säule wurde wiederum bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und 14000 rpm für 20 sec zentrifugiert. Die RNA wird dabei an der Säule gebunden und störende Makromoleküle sowie Salze verbleiben im Lysat. Um eine ausreichende Reinheit zu erhalten folgten hierauf verschiedene Waschschritte. Das Lysat wurde verworfen und die Säule mit 200  $\mu\text{L}$  Waschpuffer I (WB1) versetzt. Es erfolgte im Anschluss eine erneute Zentrifugation bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und 14000 rpm für 20 sec. Der Durchgang wurde erneut verworfen und die Säule mit 600  $\mu\text{L}$  Waschpuffer II (WB2) versetzt und unter denselben Bedingungen erneut zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde erneut mit 250  $\mu\text{L}$  WB2 wiederholt. Im Anschluss erfolgte dieses Mal eine Zentrifugation bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und 14000 rpm für 2 min. Nach dem Verwerfen des Durchgangs wurde die Säule auf ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß

**Tabelle 4.2:** Bedingungen der cDNA-Synthese.

Zeit [min]	Temperatur [°C]
5	25
30	42
5	85
∞	4

überführt. Die Elution der RNA erfolgte letztlich durch Zugabe von 30  $\mu\text{L}$  DNA/RNA-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  und anschließender Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 1 min. Das Eluat wurde nach der Zentrifugation erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert, um weitere RNA-Reste zu eluieren. Die RNA-Proben konnten für zwei Wochen bei -80 °C aufbewahrt werden.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte, wie die DNA-Quantifizierung, mittels NanoQuant-Platte am Tecan Infinite M200 Pro bei 260 nm in Doppelbestimmung. Um die Reinheit der Proben zu gewährleisten, musste das Verhältnis von RNA zu Proteinen (260 nm/280 nm) >2,00 sein. Für die nachfolgende cDNA-Synthese wurde 1  $\mu\text{g}$  RNA verwendet.

#### 4.6.3 cDNA-Synthese

Zur reversen Transkription der RNA in cDNA wurde das qScript<sup>TM</sup> cDNA Synthese Kit von Quanta verwendet. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden RNA- und DNA-Proben separat in zwei verschiedenen PCR-Kabinetten bearbeitet.

1  $\mu\text{g}$  RNA in 15  $\mu\text{L}$  PCR-zertifiziertem  $\text{H}_2\text{O}$  wurden mit 5  $\mu\text{L}$  Mastermix (4  $\mu\text{L}$  5x *Reaction Mix* + 1  $\mu\text{L}$  *iScript Reverse Transcriptase*) versetzt und anschließend mit dem Vortex gut durchmischt und in der Tischzentrifuge kurz zentrifugiert. Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend im *Thermocycler* unter den in Tabelle 4.2 aufgelisteten Bedingungen. Die cDNA konnte anschließend bei -20 °C über mehrere Wochen gelagert werden.

#### 4.6.4 Preamplifikation (*specific target amplification* (STA)) und Exonukleaseverdau

Vor der eigentlichen Hochdurchsatz RT-qPCR wurde eine Preamplifikation durchgeführt. So lässt sich sicherstellen, dass genügend Template der Gene vorhanden sind. Hierfür wurde zunächst ein Mix aus je 1  $\mu\text{L}$  jedes Primers (95x) und 105  $\mu\text{L}$  DNA-Suspensionspuffer hergestellt, sodass der Mix eine Endkonzentration von 500 nM je Primer aufwies. Details zu den Primern sind Fischer et al. (2016) zu entnehmen.

Zur Preamplifikation wurde ein Pre-Mix bestehend aus 2,5  $\mu\text{L}$  TaqMan PreAmp Master Mix, 0,5  $\mu\text{L}$  des zuvor hergestellten Primer Mixes und 0,75  $\mu\text{L}$  PCR-zertifiziertem  $\text{H}_2\text{O}$  hergestellt. Zu je 3,75  $\mu\text{L}$  des Pre-Mix wurden anschließend 1,25  $\mu\text{L}$  cDNA hinzugegeben. Weiterhin wurden zwei Kontrollen,

**Tabelle 4.3:** Temperaturprogramm der Preamplifikation.

	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Initiale Denaturierung	10	95
Denaturierung (12 Zyklen)	0,25	95
Annealing und Elongation (12 Zyklen)	4	60
Endtemperatur	$\infty$	4

**Tabelle 4.4:** Temperaturprogramm des Exonukleaseverdau.

	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Verdau	40	80
Inaktivierung	15	15
Endtemperatur	$\infty$	4

bestehend aus PCR-zertifiziertem H<sub>2</sub>O (NTC-STA) sowie einer nicht-reverstranskribierten RNA Kontrolle (NoRT), mitgeführt. Die Proben wurden anschließend mit einem Vortex gut durchmischt und kurz zentrifugiert. Die Preamplifikation erfolgte im *Thermocycler* nach dem Temperaturprogramm in Tabelle 4.3.

Um nicht eingebaute Primer und dNTPs zu entfernen, erfolgte im Anschluss an die Preamplifikation eine enzymatische Verdauung mittels Exonuklease I. Hierfür wurde die Stammlösung der Exonuklease I (20 U/ $\mu$ L) auf eine Einheit von 4 U/ $\mu$ L in einem Volumen von 2  $\mu$ L mit 0,2  $\mu$ L Exonuklease Reaktionspuffer (10x) und 1,4  $\mu$ L PCR-zertifiziertem H<sub>2</sub>O verdünnt. Die 2  $\mu$ L verdünnte Exonuklease I wurde jeweils zu den 5  $\mu$ L preamplifizierter Probelösung gegeben. Die Proben wurden wiederum mit dem Vortex gut durchmischt und kurz zentrifugiert. Anschließend erfolgte der Verdau im *Thermocycler* nach dem in Tabelle 4.4 aufgelisteten Temperaturprogramm. Die Proben wurden nach Ende des Temperaturprogramms 1:5 mit TE Puffer verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### 4.6.5 Primer und Probenvorbereitung

Bevor die Hochdurchsatz RT-qPCR gestartet werden konnte, mussten sowohl die Primer als auch die Proben zunächst vorbereitet werden. Die Stammlösung aller Primerpaare (100  $\mu$ M) musste zunächst auf eine Endkonzentrationen von 5  $\mu$ M verdünnt werden. Hierfür wurden 2,5  $\mu$ L jedes Primerpaares mit 25  $\mu$ L 2x Assay Loading Reagent und 22,5  $\mu$ L DNA-Suspensionspuffer versetzt. Es wurde außerdem eine weitere Negativkontrolle mitgeführt, die anstelle eines Primerpaares aus 2,5  $\mu$ L PCR-zertifiziertem H<sub>2</sub>O bestand (*no reaction control* - NRC). Die 2,25  $\mu$ L der STA und Exo I behandelten Proben wurden mit 2,5  $\mu$ L 2x SsoFast<sup>TM</sup> Eva-Green® Supermix mit Low ROX und 0,25  $\mu$ L 20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent vermischt.

**Tabelle 4.5:** Temperaturprogramm der qPCR.

	Zeit [sec]	Temperatur [°C]
Thermische Durchmischung	2400	70
	30	60
Hot Start	60	95
PCR (30 Zyklen)	5	96
	20	60
Schmelzkurve	3	60
	1 °C/3 sec	bis 95

#### 4.6.6 Dynamic Array IFC qPCR Analyse

Die eigentliche Hochdurchsatz RT-qPCR fand in einem 96.96 Dynamic Array IFC (*integrated fluidic circuit*) von Fluidigm statt. Bevor der 96.96 Dynamic Array IFC mit den Primern und Proben beladen werden konnte, musste dieser zuvor mit einem Kontrollfluid beladen werden. 150  $\mu\text{L}$  Kontrollfluid wurden jeweils in die zwei Akkumulatoren des Chips initalisiert. Mit Hilfe des IFC Controller HX (Fluidigm) wurde das Kontrollfluid in die Mikrokanäle gepumpt. Im Anschluss konnte der Chip mit den Proben und Primern beladen werden. Luftblasenfrei wurden jeweils 5  $\mu\text{L}$  jedes verdünnten Primerpaares sowie der Proben mit Hilfe einer 8-Kanalpipette in den Chip pipettiert. Erneut wurde mit Hilfe des IFC Controller HX der Chip mit den Lösungen beladen. Nach erfolgreicher Beladung des Chips wurde dieser in das BioMark<sup>TM</sup> HD System überführt und die qPCR sowie die Schmelzkurvenanalyse konnte stattfinden. Die Bedingungen hierfür sind in Tabelle 4.5 aufgelistet.

#### 4.6.7 Datenauswertung der Hochdurchsatz RT-qPCR

Zur Datenauswertung der Rohdaten wurde zunächst das Programm Fluidigm Real-Time PCR Analysis verwendet. Um eine gleichmäßige Beladung der Reaktionskammern zu überprüfen, konnte der Referenzfarbstoff ROX zunächst zur Bewertung herangezogen werden. Zur relativen Quantifizierung müssen zunächst die  $C_q$ -Werte (*quantification cycle*) der Zielamplifikate berechnet werden. Dies wurde durch den DNA-interkalierenden Farbstoff CellRox<sup>®</sup> ermöglicht. Durch eine Basislinien-Korrektur mit Hilfe der im Programm implementierten Schwellenwert-Methode (*auto detectors*), konnten die  $C_q$ -Werte zusätzlich präzisiert werden. Eine erste optische Qualitätskontrolle der RT-qPCR konnte anhand der Darstellung der  $C_q$ -Werte als Heatmap bzw. der dargestellten Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Zur Überprüfung der RT-qPCR wurden hierfür vor allem die Negativkontrollen betrachtet. Die  $C_q$ -Werte wurden im Anschluss exportiert und mit Hilfe des Programms GenEx weiter verarbeitet. Dabei wurden alle Proben, die einen  $C_q$ -Wert über 22 aufwiesen, gelöscht. Zur anschließenden Normalisierung auf die Referenzgene (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*) wurde zunächst mit Hilfe der integrierten Algorithmen *geNorm* und *Normfinder* die optimale Auswahl an Referenzgenen bestimmt. Die weitere Berechnung der relativen Genexpression

erfolgte dann mit der  $\Delta\Delta C_q$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001).

$$\Delta C_q = C_{qZielgen} - C_{qReferenzgen} \quad (4.1)$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_{qBehandlung} - \Delta C_{qKontrolle} \quad (4.2)$$

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (4.3)$$

Mit Hilfe der Formeln 4.1 - 4.3 lässt sich so die relative Genexpression der Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe berechnen. Die normierten Proben wurden in log<sub>2</sub>-Werte umgerechnet, sodass die unbehandelte Kontrollprobe einem Wert von 0 entspricht. Anhand der log<sub>2</sub>-Werte lässt sich deutlicher eine vermehrte sowie eine verminderte Genexpression im Vergleich zu linearen Werten feststellen. Eine relevante Genexpressionsveränderung wurde ab einem Faktor  $\pm 1$  angesehen. Dies entspricht im Falle einer vermehrten Expression der doppelten Transkriptmenge der Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe.

## 4.7 Untersuchung des p53 Proteinlevels mittels Immunoblot

Zur Bestimmung des p53 Proteinlevels wurde eine SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*) mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Die spezifische Detektion von p53 erfolgte mittels Immunodetektion. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte genauer erläutert. Das p53 Proteinlevel wurde dabei in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt.

### 4.7.1 Zellkultur

Um das Proteinlevel von p53 in A498 Zellen zu bestimmen, wurden zunächst  $1,0 \times 10^5$  Zellen in 10 cm Schalen ausgestreut. Neben den einzelnen Behandlungen wurde eine unbehandelte Kontrollprobe mitgeführt. Die Zellen wurden für 24 h kultiviert und im Anschluss für 1 h mit der jeweiligen platinbasierten Substanz inkubiert. Dabei wurden für Cisplatin und PN149 die Konzentrationen 10, 20 und 50  $\mu\text{M}$ , für Carboplatin 50, 100, 200, 300, 400 und 500  $\mu\text{M}$  und für Oxaliplatin 10, 20, 50, 100, 150  $\mu\text{M}$  angewandt. Für Carboplatin wurde zunächst ein Konzentrationsbereich von 50 - 400  $\mu\text{M}$  angewandt. Dabei zeigte sich nach dem ersten Experiment, dass 50  $\mu\text{M}$  kaum Veränderungen zeigten, weshalb für die weiteren zwei Wiederholungen anstelle von 50  $\mu\text{M}$  zusätzlich 500  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurde. Dasselbe wurde bei Oxaliplatin beobachtet, wobei hier zunächst 20 - 150  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurden. Nachdem 150  $\mu\text{M}$  sehr deutliche Veränderungen hervorriefen, wurde anstelle von 150  $\mu\text{M}$  eine geringere Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

Nach der einstündigen Inkubation mit der jeweiligen Substanz wurde das Medium abgesaugt, die

Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 24 h kultiviert. Im Anschluss wurde jeweils ein Zellpellet nach 4.4.1 hergestellt, welches zur nachfolgenden Proteinextraktion verwendet wurde.

### 4.7.2 Proteinextraktion

Bevor die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden konnten, wurde zunächst eine Proteinextraktion durchgeführt. Hierfür wurden die Proben zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend mit 120  $\mu\text{L}$  von einem Mix aus Lyse-Puffer sowie 1x Protease-Inhibitor versetzt. Die Proben wurden gut resuspendiert und im Anschluss für 30 min auf Eis im Schüttelinkubator inkubiert. Nach Ablauf der 30 min wurden die Proben für 20 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Bis zur weiteren Proteinbestimmung konnten die Proteinextrakte bei -20 °C gelagert werden.

### 4.7.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Damit eine gleichmäßige Auftragung der Proteinextrakte für die folgende SDS-PAGE realisiert werden konnte, wurden die Proteingehalte der Extrakte mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt (Bradford, 1976).

Aus einer Stammlösung aus BSA (*bovine serum albumin*) in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  wurde eine Kalibrierung im Bereich von 0,01 mg/mL bis 0,075 mg/mL erstellt. Die Messungen der Kalibrierung und der Proben erfolgten in einer 96-well-Platte am Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan Infinite M200 Pro). Hierfür wurden zunächst 20  $\mu\text{L}$  der Probenlösung in je ein well der Platte pipettiert und anschließend mit 180  $\mu\text{L}$  Bradford Reagenzmix, bestehend aus 140  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  + 40  $\mu\text{L}$  Bio Rad Bradfordreagenz, versetzt. Die Platte wurde im Mikrotiterplattenlesegerät kurz geschüttelt und nach 5 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Auftragung der Proteine wurde ein Gehalt von 50  $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$  mit Hilfe der erstellten Kalibriergerade ausgerechnet.

### 4.7.4 SDS-PAGE

Proteine lassen sich mit Hilfe der SDS-PAGE auftrennen. Durch den Einsatz des anionischen Detergens SDS lassen sich Proteine nur nach Größe und nicht nach Ladung auftrennen, da SDS die Eigenladung des Proteins abschirmt.

Die berechneten 50  $\mu\text{g}$  Protein in 20  $\mu\text{L}$  wurden jeweils mit 5  $\mu\text{L}$  Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Im Anschluss wurden die Proben kurz mit der Tischzentrifuge zentrifugiert und konnten dann für die Gelbeladung eingesetzt werden. Zur Trennung der Proteine wurde ein 10 %iges Trenngel und ein 4 %iges Sammelgel eingesetzt. Die Zusammensetzungen der Gele sind den Tabellen 4.6 und 4.7 zu entnehmen. Die Gele wurden mit den Proben sowie einem Molekulargewichtsstandard beladen. Im Anschluss erfolgte die Trennung in Tris-Glycin Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) zunächst für 5 min bei 50 V und anschließend bei 180 V für ca. 60 min.



**Tabelle 4.6:** Zusammensetzung des Trenngels (10 %).

Substanz	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
H <sub>2</sub> O bidest.	2245
Tris (1.5 M pH 8,8)	1250
SDS (10 %)	50
Glycerin	50
EDTA (0,1 M)	100
Acrylamid (40 %)	1250
APS (10 %)	50
TEMED	5

**Tabelle 4.7:** Zusammensetzung des Sammelgels (4 %).

Substanz	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
H <sub>2</sub> O bidest.	2930
Tris (1 M pH 6,8)	500
SDS (10 %)	40
EDTA (0,1 M)	80
Acrylamid (40 %)	400
APS (10 %)	40
TEMED	10

#### 4.7.5 Proteintransfer

Bevor die spezifische Immunodetektion von p53 erfolgen konnte, mussten die Proben zunächst nach dem Gellauf auf eine Membran übertragen werden. Dabei erfolgte der Proteintransfer mittels Western Blot. Im vorliegenden Fall wurde dieser mit Hilfe eines Tank-Blot-Systems durchgeführt (Abbildung 4.1). Hierzu erfolgte zunächst eine Äquilibration der Glasfaservliese und Whatmanpaper in Transferpuffer. Zur Übertragung wurde eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran eingesetzt. Diese musste zunächst für kurze Zeit, aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften, in Methanol aktiviert werden. Anschließend konnte die Membran gleichermaßen in Transferpuffer äquilibriert werden. Das Sammelgel wurde vom Trenngel getrennt und das Trenngel wurde ebenfalls in den Transferpuffer gegeben, damit es nicht austrocknete. Darauffolgend wurde das Tank-Blot-System wie in Abbildung 4.1 zusammengesetzt. Um Luftblasen zwischen Gel und Membran zu verhindern, wurden diese mit Hilfe eines Glasstabes weggerollt. Das zusammengesetzte System wurde in die Tank-Blot-Kammer eingespannt und die Kammer vollständig mit Transferpuffer befüllt. Der Transfer wurde letztlich unter Rühren bei 4 °C und 30 V über Nacht durchgeführt. Um eine vollständige Übertragung zu überprüfen, wurde die Membran nach dem Transfer unspezifisch mit Ponceau-S angefärbt. Die Färbung wurde vor der Immunodetektion mit H<sub>2</sub>O bidest. wieder abgewaschen.

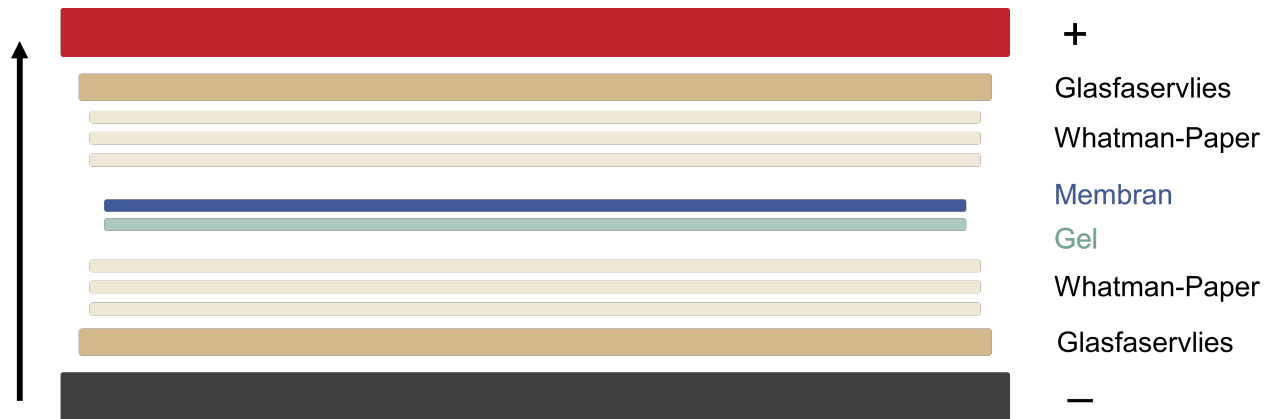


Abbildung 4.1: Zusammensetzung des Tank-Blot-Systems.

#### 4.7.6 Immunodetektion

Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran nach dem Proteintransfer zunächst in einer Lösung bestehend aus 5 % Milchpulver in PBST (PBS + Tween) für eine 1 h auf dem Taumler blockiert. Daraufaufend wurde die Membran in ein 50 mL Röhrchen überführt. In diesem Röhrchen befanden sich 5 mL Blockierlösung, in welcher der p53 Primärantikörper (DAKO, DO-7, *monoclonal mouse*) 1/2000 verdünnt vorlag. Die Membran wurde dann auf dem Rotator über Nacht bei 4 °C mit dem Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 10 min in PBST auf dem Taumler gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran in ein neues 50 mL Röhrchen überführt. In diesem Röhrchen befand sich dieses mal der Sekundärantikörper (Santa Cruz, *donkey anti-mouse*, HRP gekoppelt) 1/2000 verdünnt in 5 mL Blockierlösung. Die Membran wurde dann erneut bei 4 °C auf dem Rotator über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran wiederum für 3 x 10 min in PBST auf dem Taumler gewaschen.

Um die Chemilumineszenz des HRP gekoppelten Antikörpers messen zu können, wurde ein Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent Kit eingesetzt. Beide enthaltenen Reagenzien wurden 1:1 zusammengemischt, davon 1 mL auf der Membran verteilt und für 1 min einwirken gelassen. Im Anschluss wurde die Reagenzlösung abgekippt und die Membran am LAS-3000 Imaging System von Fuji gemessen. Zur Auswertung der Molekulargewichte wurde das Programm Aida Image Analyzer v.3.27 verwendet. Damit ausgeschlossen werden konnte, dass unterschiedlich intensive Banden auf eine ungleichmäßige Proteinauftragung zurückzuführen waren, erfolgte anschließend noch die Immunodetektion einer Ladekontrolle. Hierfür wurde die Membran mit einem ERK2 Primärantikörper (Santa Cruz, *polyclonal rabbit*) erneut inkubiert. Dieser wurde ebenfalls in einem 50 mL Röhrchen in 5 mL Blockierlösung 1/2000 verdünnt. Die Membran wurde unter oben genannten Bedingungen anschließend inkubiert und die Membran wiederum 3 x 10 min in PBST gewaschen. Der Sekundärantikörper (Santa Cruz, *donkey anti-rabbit*) wurde gleichermaßen 1/2000 in Blockierlösung verdünnt und die Membran unter oben genannte Bedingungen inkubiert. Nach erneutem waschen mit PBST (3 x 10 min) wurde die Membran, wie oben beschrieben, detektiert.

### 4.7.7 Semiquantitative Auswertung

Eine semiquantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Aida Image Analyzer v.3.27. Dabei werden zunächst die Peakflächen der p53 Banden (*Target Protein*, TP) auf die Peakflächen der Banden der ERK2 Ladekontrolle (*Loading Control*, LC) normiert (*normalized density to LC*, NDL). Dies erfolgte anhand der Formel 4.4. Um im Anschluss den Unterschied der Bandenintensitäten (*relative intensity*, RI) der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrollprobe zu berechnen, wurde das Verhältnis der NDL der Probe zur NDL der Kontrollprobe ( $NDL_{\text{Kontrolle}}$ ) gebildet (Formel 4.5).

$$NDL = \frac{TP * LC_{\text{Kontrolle}}}{LC} \quad (4.4)$$

$$RI = \frac{NDL}{NDL_{\text{Kontrolle}}} \quad (4.5)$$

## 4.8 Bestimmung der Apoptose und Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Apoptose und Zellzyklusverteilung erfolgte in einem Ansatz. Beide Untersuchungen erfolgten mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzfärbung. Beide Untersuchungen wurden in jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.

### 4.8.1 Zellkultur

Für die Bestimmung von Apoptose und Zellzyklus wurden  $2 \times 10^5$  A498 Zellen in 6 cm Schalen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Dabei wurden die Proben jeweils in Doppelbestimmung angesetzt. Außerdem wurde zusätzlich zu einer unbehandelten Kontrolle für die Bestimmung der Apoptose zwei Positivkontrollproben mitgeführt. Nach 24 h Kultivierung erfolgte eine 1 h Inkubation mit jeweils 50  $\mu\text{M}$  Cisplatin bzw. PN149, 20 und 50  $\mu\text{M}$  Oxaliplatin sowie 200 und 500  $\mu\text{M}$  Carboplatin. Die Positivkontrollen wurden mit jeweils 500 nM Staurosporin (Positivkontrolle Apoptose) für 24 h oder 5 mM Cadmiumchlorid (Positivkontrolle Nekrose + späte Apoptose) für 3 h inkubiert. Nach der 1 h Inkubation mit den platinbasierten Substanzen wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und die Zellen für weitere 24, 48, 72 oder 96 h kultiviert.

Im Anschluss wurde das Medium jeweils abgenommen und in ein 15 mL Röhrchen überführt, sodass neben den lebenden Zellen auch tote Zellen mit überführt wurden. Die noch anhaftenden Zellen wurden mit 2 mL PBS gewaschen und die 2 mL wurden ebenfalls in das 15 mL Röhrchen überführt. Darauffolgend wurden die Zellen trypsiniert. Die Trypsin-Zellsuspension wurde in das 15 mL Röhrchen überführt und die Schale noch einmal mit 2 mL Medium gewaschen, welches ebenfalls überführt wurde. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1300 rpm und 4 °C für 4 min. Der

Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 2 mL PBS resuspendiert. Je 1 mL dieser Zellsuspension wurde in ein Durchflusszytometerröhrchen überführt, sodass je ein Röhrchen für die Apoptose und die Zellzyklusverteilung erhalten wurde.

#### 4.8.2 Zellzyklusverteilung

Zur Untersuchung der Zellzyklusverteilung erfolgte zunächst eine Fixierung der Zellen. Dafür wurden tropfenweise 3 mL 96 %-iger Ethanol (-20 °C) zur Probe gegeben. Um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden, wurden die Proben während des Zutropfens mit Hilfe eines Vortex stetig durchmischt. Zur weiteren Fixierung wurden die Proben über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 4 °C und 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 1 mL PBS zugegeben. Daraufhin wurden die Proben erneut bei 4 °C und 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Es erfolgte ein erneutes Abnehmen des Überstandes. Die Proben wurden dann mit 300 µL einer 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Lösung versetzt und für 30 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert.

#### 4.8.3 Messung am Durchflusszytometer

Mit Hilfe des Durchflusszytometers BD LRSII Fortessa erfolgte im Anschluss die Analyse der Zellzyklusverteilung. Hierfür wurden 30000 Events, d.h. Zellen, mit einer maximalen Fließgeschwindigkeit von 700 Events/sec gemessen. Der Farbstoff DAPI interkaliert mit der DNA, wobei er dann ein Absorptionsmaximum von 358 und ein Emissionsmaximum bei 461 nm aufweist. Aufgrund dessen wurde das DAPI Signal mit Hilfe eines violetten Lasers mit einer Exzitation von 488 nm und einem Bandpassfilters von 450/50 nm ermittelt. Um eine Messung von Zellagglomeraten zu vermeiden, erfolgte eine Gatingstrategie nach Abbildung 4.2. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurde die Anzahl der Zellen (*counts*) in einem Histogramm über das DAPI-Signal aufgetragen. Für die Setzung der Gates für die einzelnen Zellzyklusphasen wurde sich an der G<sub>1</sub>-Phase orientiert (Abbildung 4.3). Da sich der doppelte DNA-Gehalt in der G<sub>2</sub>-Phase im Vergleich zur G<sub>1</sub>-Phase befindet, wurde das Gate für die G<sub>2</sub>-Phase auf das doppelte Signal der G<sub>1</sub>-Phase gesetzt.

#### 4.8.4 Apoptose

Die in Kapitel 4.8.1 erstellte Zellsuspension wurde erneut bei 4 °C und 1300 rpm für 4 min zentrifugiert und der Überstand im Anschluss abgenommen. Es wurde ein Mastermix für alle Proben aus 200 µL Ringerlösung + 0,25 µL Propidiumiodid (PI) (62,5 ng/mL) + 1 µL Annexin V-FITC (450 ng/mL) pro Probe hergestellt. Der Farbstoff PI wurde dabei zur Messung von nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen verwendet, da dieser nur die Membran von geschädigten Zellen durchdringen kann, nicht aber von lebenden Zellen. Bei apoptotischen Zellen verlagert sich das Membran

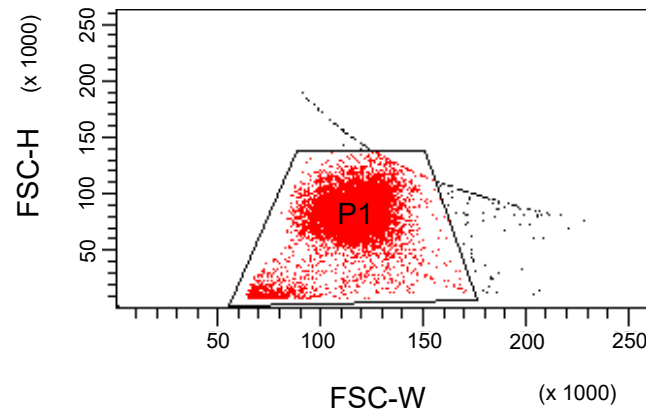


Abbildung 4.2: Gatingstrategie zur Vermeidung von Zellagglomeraten.

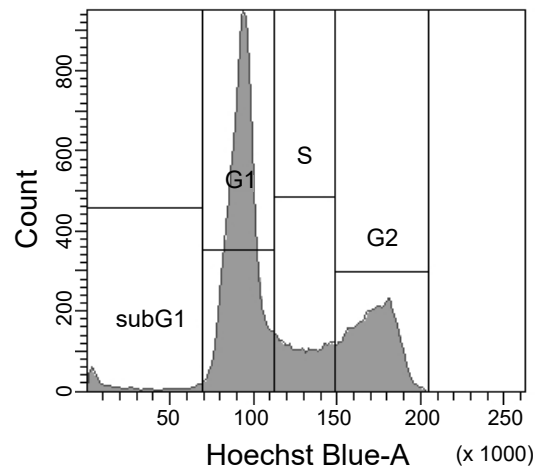


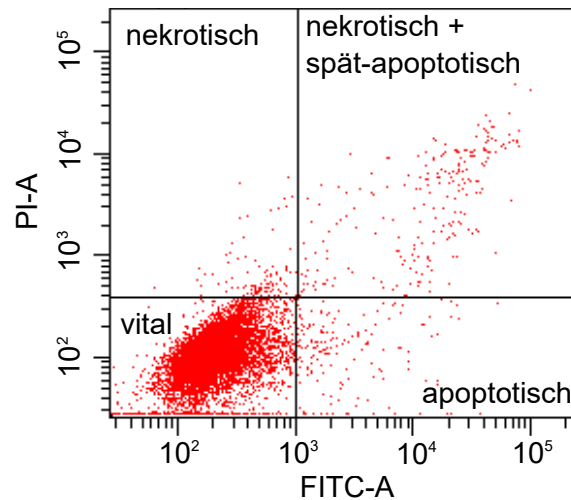
Abbildung 4.3: Gatingstrategie zur Messung der Zellzyklusverteilung.

Phospholipid Phosphatidylserin (PS) nach außen. Dadurch kann das Phospholipid-bindende Protein Annexin V an PS binden. Mit Hilfe des gekoppelten Fluorochrom FITC lässt sich so ein Signal für apoptotische Zellen erzeugen. Jede Probe wurde mit 200  $\mu\text{L}$  des Mastermixes versetzt und unter Lichtausschluss auf Eis für 30 min inkubiert.

#### 4.8.5 Messung am Durchflusszytometer

Für die Unterscheidung des Zelltodes in Apoptose und Nekrose bzw. spät-apoptotische Zellen wurden am Durchflusszytometer 10000 Events, ebenfalls mit einer maximalen Fließgeschwindigkeit von 700 Events/sec, gemessen. Da sich die Absorptionsspektren von FITC und PI überlagern, musste zunächst eine Kompensation durchgeführt werden. Das Signal von PI wurde mit Hilfe eines blauen Lasers mit einer Exzitation von 488 nm und einem Bandpassfilter von 695/40 nm verwendet. Für das FITC Signal wurde der gleiche Laser, aber ein Bandpassfilter von 530/30 nm verwendet. Gleicherma-

ßen wie für die Messung der Zellzyklusverteilung erfolgte ein Ausschluss von Zellagglomeraten. Zur Unterscheidung zwischen den Populationen vital, apoptotisch, nekrotisch und spät-apoptotisch und nekrotisch wurde das PI-Signal über das FITC-Signal aufgetragen und nach Abbildung 4.4 Gates gesetzt.



**Abbildung 4.4:** Gatingstrategie zur Unterscheidung der Populationen vital, apoptotisch, nekrotisch und spät-apoptotisch sowie nekrotisch.

## 4.9 Bestimmung der relativen Caspasenaktivität

Mittels Chemilumineszenzmessung wurde die relative Caspaseaktivität bestimmt. Dabei werden spezifische Moleküle verwendet, die bestimmte Aminosäuresequenzen aufweisen, die nur von der jeweiligen Caspase gespalten werden kann. Durch die Spaltung entsteht ein Molekül, das sich in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>, O<sub>2</sub>, ATP und dem Enzym Luciferase in ein angeregtes Molekül umwandeln lässt, dessen Chemilumineszenz sich letztlich messen lässt. Für die Bestimmung der relativen Caspaseaktivität wurde ein Kit der Firma Promega verwendet. Die Untersuchungen hierzu wurden im Zuge der Masterarbeit von Alessia Bachert in drei voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt.

### 4.9.1 Zellkultur

Zur Untersuchung wurden je 2 x 10<sup>5</sup> A498 Zellen in 6 cm Schalen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Die Proben wurden in Doppelbestimmung angesetzt. Nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen mit je 50 µM Cisplatin und PN149 für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 24, 48 und 72 h kultiviert. Zusätzlich wurde für jeden Zeitpunkt eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Nach Ablauf der jeweiligen Kultivierungsdauer

wurde das Medium abgesaugt, die Zellen abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Es erfolgte im Anschluss eine Aufkonzentrierung der Zellen, damit es im darauffolgenden Schritt möglich war, 50000 Zellen in ein *well* einer weißen 96-*well*-Platte zu pipettieren. Hierfür wurden die Proben bei Raumtemperatur für 4 min und 1000 *ref* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit der nötigen Menge an Medium wieder resuspendiert. Die entsprechenden Volumina wurden in die *wells* pipettiert und auf ein Volumen von 100  $\mu\text{L}$  mit Medium aufgefüllt.

#### 4.9.2 Messung der relativen Caspasenaktivität

Zusätzlich zu den Proben und Kontrollen wurde ein Blindwert von 100  $\mu\text{L}$  Medium mitgeführt. Die Proben wurden mit je 100  $\mu\text{L}$  Caspase-Glo 8 oder Caspase-Glo 9 Substrat gemischt mit Protease Inhibitor, versetzt und im Anschluss für 2 min geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 2,5 h bei 25 °C im Inkubator belassen. Die Messung des Chemilumineszenzsignals erfolgte im Anschluss am Tecan Infinite M200 Pro. Zur Auswertung wurde das Signal des Blindwertes von allen Proben abgezogen und das Signal der Proben auf die unbehandelten Kontrollen normiert.





---

### Ergebnisse und Diskussion

---

Seit der Entdeckung von Cisplatin und seiner klinischen Zulassung 1978 ist es bis heute eines der effektivsten Zytostatika auf dem Markt und gilt als Pionier der platinbasierten Chemotherapie. Aufgrund seiner schwerwiegenden Nebenwirkungen sowie Resistenzen gab es in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Bemühungen neue, verbesserte platinbasierte Substanzen zu entwickeln. Lediglich zwei dieser Substanzen, Carboplatin und Oxaliplatin, erhielten eine weltweite klinische Zulassung (Apps et al., 2015). Zusammengefasst als platinbasierte Chemotherapeutika zählen sie heutzutage zu den weltweit am meisten eingesetzten Zytostatika (Wheate et al., 2010). Trotz aller Bemühungen, neue Substanzen zu entwickeln, die weniger Nebenwirkungen aufweisen sollen, haben alle drei Substanzen immer noch schwerwiegende Nebenwirkungen und im Falle von Carboplatin weist dieses zudem Kreuzresistenzen zu Cisplatin auf. Um die platinbasierte Chemotherapie weiter zu verbessern, müssen die komplexen Wirkmechanismen der Substanzen besser aufgeklärt werden. Da sich alle drei Substanzen strukturell voneinander unterscheiden, lassen sich durch Untersuchungen der Wirkmechanismen die strukturellen Unterschiede bewerten und dienen letztlich zur Entwicklung neuer Substanzen.

Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit die Wirkmechanismen der klinisch angewandten Substanzen zunächst in der Nierenkarzinomzelllinie A498 detailliert untersucht. Im Anschluss erfolgte die Aufklärung der potentiellen neuen platinbasierten Substanz PN149. Der Platin(IV)-nitroxyl-Komplex zeigte in bisherigen Untersuchungen ein vielversprechendes Potential (Cetraz et al., 2017). Abschließend erfolgte eine Untersuchung des nephrotoxischen Potentials der Substanzen. Dabei sollte zum einen die Frage geklärt werden, warum Cisplatin, aber nicht Carboplatin und Oxaliplatin Nierenschäden verursachen und zum anderen, ob PN149 aufgrund seiner Struktur ebenfalls ein geringeres nephrotoxisches Potential aufweist.

## 5.1 Vergleich der Wirkmechanismen von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin in A498 Zellen

Die Untersuchung der Wirkungsmechanismen der drei zugelassenen Substanzen erfolgte anhand verschiedener Methoden sowohl auf molekularer sowie auf zellulärer Ebene in A498 Zellen.

### 5.1.1 Zytotoxizitätsstudien

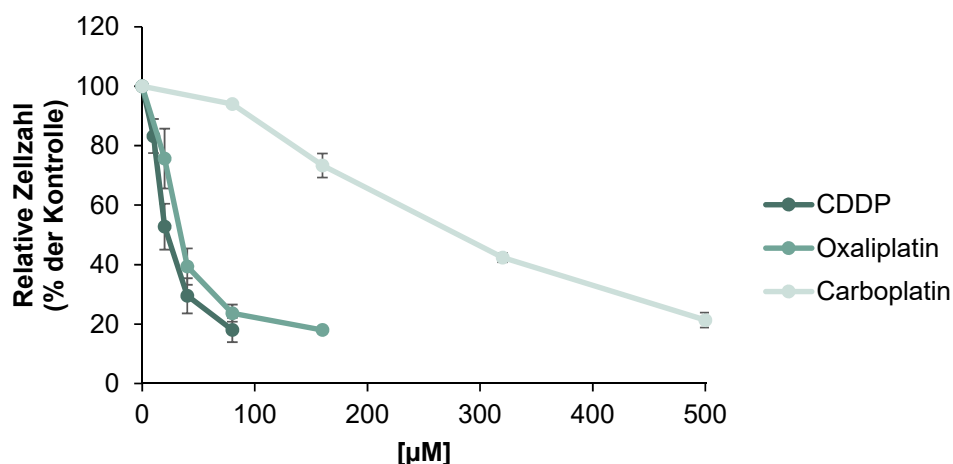
Die Wirkmechanismen verschiedener Chemotherapeutika können unterschiedlich sein, letztendliche Auswirkung bleibt jedoch für alle dieselbe, die Abtötung der Tumorzellen. Deshalb ist es essentiell, das zytotoxische Potential in Tumorzellen zu untersuchen. Mit Hilfe der Bestimmung der Zytotoxizität lässt sich folglich die Effektivität verschiedener Substanzen miteinander vergleichen. In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der Zytotoxizität der Verbindungen anhand zweier verschiedener Assays. Zum einen wurde die relative Zellzahl (RCC) bestimmt, wobei diese hierbei zur Bestimmung der akuten Toxizität galt. Zum anderen erfolgte eine Langzeittoxizitätsstudie mit Hilfe des Kolonieformationsassays (CFA). Um möglichst nahe an der klinischen Applikation zu sein, wurde als Inkubationszeit 1 h gewählt. Im Zuge der relativen Zellzahl wurde nach 72 h Nachinkubationszeit die Zellzahl bestimmt. Für die CFA Versuche erfolgte eine anschließende Kultivierungszeit von 12 Tagen.

Die Daten für die relative Zellzahl von Cisplatin in A498 Zellen wurden im Zuge der Masterarbeit von Sabine Gajewski erstellt.

A498 Zellen wurden für die Bestimmung der relativen Zellzahl in einem Konzentrationsbereich von 10 - 80  $\mu\text{M}$  Cisplatin inkubiert und deckt damit den klinisch relevanten Bereich für Cisplatin von ca. 10 - 50  $\mu\text{M}$  Blutplasmakonzentration ab (de Jongh et al., 2001, 2004; O'Dwyer et al., 2000; van Hennik et al., 1987). Inkubationen mit Carboplatin erfolgten in einem Bereich von 80 - 500  $\mu\text{M}$ . Aufgrund des stabileren Liganden zeigt Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin eine geringere Reaktivität. Dies führt zu einer langsameren DNA-Platinierung, dadurch kann Carboplatin (300 - 450  $\text{mg}/\text{m}^2$ ) in weitaus höheren Konzentrationen als Cisplatin (20 - 120  $\text{mg}/\text{m}^2$ ) eingesetzt werden (Kelland, 2007; Wheate et al., 2010). Oxaliplatin wurde in einem Bereich von 20 - 160  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Klinisch relevante Dosen liegen hier in einem ähnlichen Bereich wie Cisplatin (O'Dwyer et al., 2000).

Abbildung 5.1 zeigt den Einfluss der Substanzen auf die relative Zellzahl in A498 Zellen. Dabei ist vor allem zu erkennen, dass Cisplatin und Oxaliplatin zu einem ähnlichen Kurvenverlauf führten. Bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  lag die relative Zellzahl bei 30 % für Cisplatin bzw. 39 % für Oxaliplatin. Beide Substanzen wiesen einen eher stark abfallenden Kurvenverlauf auf, wohingegen Carboplatin einen eher flach abfallenden Verlauf zeigte. Erst mit einer Konzentration von 320  $\mu\text{M}$  erreichte Carboplatin eine ähnliche Toxizität wie Cisplatin und Oxaliplatin.

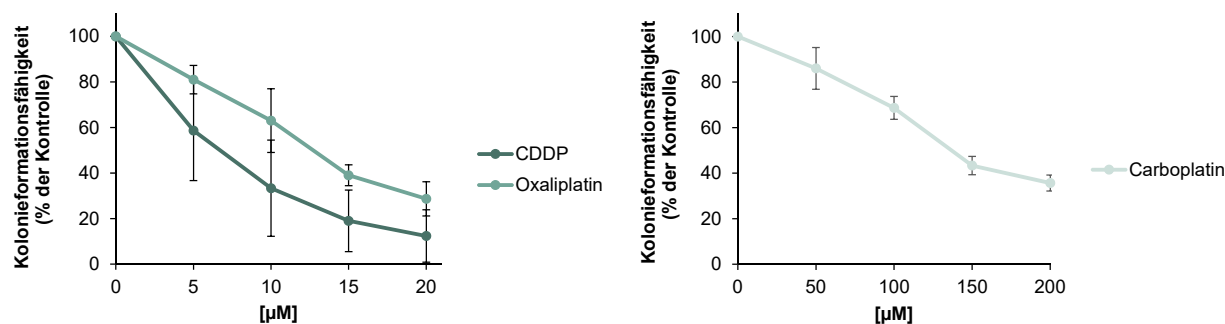
Für die Kolonieformationsversuche wurde ein geringerer Konzentrationsbereich für die Substanzen



**Abbildung 5.1: Bestimmung der relativen Zellzahl (RCC) in A498 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** A498 Zellen wurden für eine Stunde mit der jeweiligen Konzentration an Cisplatin (10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$ ), Carboplatin (80, 160, 320, 500  $\mu\text{M}$ ) und Oxaliplatin (20, 40, 80, 160  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Nach einer 72 h Nachinkubationszeit wurde die Zellzahl bestimmt. Um die relative Zellzahl zu erhalten, wurde auf die Kontrolle normiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden,  $\pm$  Standardabweichung.

gewählt. Da die relative Zellzahl für Cisplatin und Oxaliplatin einen ähnlichen Kurvenverlauf zeigte, wurde derselbe Konzentrationsbereich für beide Substanzen gewählt. Dieser lag zwischen 5 und 20  $\mu\text{M}$ . Carboplatin wurde in einem Bereich von 50 - 200  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Dies entspricht dem zehnfachen der Konzentration von Cisplatin. Im Kolonieformationsversuch zeigte sich dieses Mal ein unterschiedlicher Verlauf für Cisplatin und Oxaliplatin (Abbildung 5.2). Oxaliplatin erwies sich hierbei etwas weniger toxisch als Cisplatin. Bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  führte Cisplatin zu einer Abnahme der Kolonieformation auf 12 %. Oxaliplatin erreichte mit derselben Konzentration eine Abnahme auf 29 %. Zu beachten sind jedoch die hohen Standardabweichungen für Cisplatin, die sich teilweise mit den Standardabweichungen von Oxaliplatin überschneiden. Die Kolonieformation für Carboplatin zeigte eine Abnahme bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  auf 36 %. Carboplatin und Oxaliplatin wiesen folglich eine geringere Langzeittoxizität in A498 Zellen auf als Cisplatin. In Tabelle 5.1 sind die berechneten  $\text{IC}_{50}$  Werte der jeweiligen Substanzen im jeweiligen Assay dargestellt.

A498 Zellen stammen aus dem proximalen Tubulus eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms (ccRCC). Nierenzellkarzinome weisen eigentlich eine inherente Resistenz gegenüber Chemotherapeutika auf. Nur 5 - 6 % sprechen überhaupt auf eine Behandlung mit Chemotherapeutika an (Rini et al., 2009). Erstaunlicherweise zeigten A498 Zellen keine Resistenz gegenüber platinbasierter Chemothe-



**Abbildung 5.2: Kolonieformationsassays in A498 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** Zur Untersuchung der Kolonieformationsfähigkeit wurden A498 Zellen 1 h mit jeweils Cisplatin (5, 10, 15, 20 µM), Carboplatin (50, 100, 150, 200 µM) sowie Oxaliplatin (5, 10, 15, 20 µM) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Kultivierungsdauer von 12 Tagen, nach der die Anzahl der Kolonien ausgezählt wurde. Die Bestimmung erfolgte in drei unabhängigen Versuchen in jeweils Dreifachbestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Versuchen  $\pm$  Standardabweichung.

**Tabelle 5.1:** Berechnete  $IC_{50}$  Werte der CFAs sowie der relativen Zellzahl (RCC) von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin in A498 Zellen.

Platinbasierte Substanz	CFA [µM]	RCC [µM]
CDDP	6	27
Oxaliplatin	12	46
Carboplatin	153	273

rapeutika auf. Alle drei Substanzen wiesen sogar eine hohe Effektivität auf. Trivedi und Kollegen untersuchten ebenfalls die Viabilität nach Inkubation mit Cisplatin in A498 Zellen sowie einer weiteren ccRCC Zelllinie, den Caki-2 Zellen. Beide Zelllinien zeigten ebenfalls eine Sensitivität gegenüber Cisplatin (Trivedi et al., 2016). In einer Sensitivitätsstudie in resistenten Zellen des NCI-60 *panels* mit den drei Substanzen sowie Tetraplatin zeigten die drei Verbindungen eine eher geringe zytotoxische Wirkung gegenüber A498 Zellen. Vor allem die Sensitivität von Oxaliplatin war deutlich reduziert (Rixe et al., 1996). Die im Zuge dieser Arbeit generierten Ergebnisse deuten jedenfalls nicht daraufhin, dass die verwendeten A498 Zellen resistent gegenüber platinbasierten Chemotherapeutika sind.

Im folgenden Kapitel wird auf den Zusammenhang der hier dargestellten Ergebnisse und der intrazellulären Aufnahme sowie der DNA-Platinierung eingegangen.

### 5.1.2 Intrazelluläre Aufnahme und DNA-Platinierung

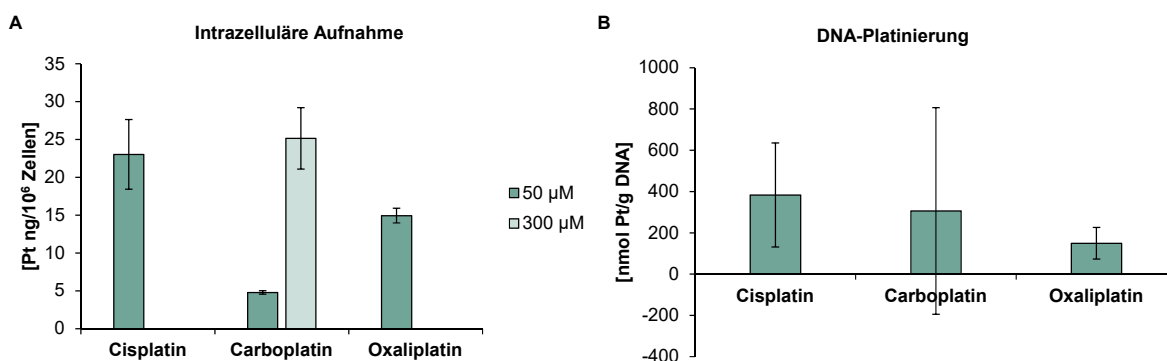
Einer der ersten und wichtigsten Schritte, den ein Chemotherapeutikum durchläuft, ist die Aufnahme in die Zelle. Der weitere Initialschritt für platinbasierte Chemotherapeutika ist anschließend die Induktion von DNA-Schäden. Dieser essentielle Schritt leitet eine Signalkaskade ein, die letztendlich zum Tod der Tumorzelle führt. Die intrazelluläre Aufnahme sowie die DNA-Platinierung lassen

sich mit Hilfe einer Metallanalyse nach einem Zellaufschluss bzw. einer DNA-Extraktion bestimmen. Zur Bestimmung der intrazellulären Aufnahme kam dabei die GF-AAS, sowie zur Analyse der DNA-Platinierung die ICP-MS zum Einsatz.

Abbildung 5.3 zeigt die intrazelluläre Aufnahme sowie die DNA-Platinierung der drei Substanzen in A498 Zellen. Die Zellen wurden für beide Untersuchungen mit jeweils 50  $\mu\text{M}$  der entsprechenden Substanz für 2 h inkubiert. In der Zytotoxizitätsbestimmung zeigte sich bereits, dass Carboplatin deutlich höhere Konzentrationen für dieselbe Effektivität wie Cisplatin bzw. Oxaliplatin benötigt, weshalb für die Aufnahme zusätzlich mit 300  $\mu\text{M}$  inkubiert wurde. Nach saurem Aufschluss erfolgte die Bestimmung des Platingehaltes für die intrazelluläre Aufnahme mit Hilfe der GF-AAS. Der Platingehalt der DNA-Platinierung wurde aufgrund der höheren Sensitivität mit Hilfe der ICP-MS gemessen. Angesichts der geringen Sensitivität der GF-AAS wurden die Versuche der intrazellulären Aufnahme für 2 h inkubiert. Damit sich die Ergebnisse der intrazellulären Aufnahme mit der DNA-Platinierung vergleichen ließen, wurde für die Bestimmung der DNA-Platinierung, trotz höherer Sensitivität der ICP-MS, ebenfalls für 2 h inkubiert.

Im Rahmen der Masterarbeit von Sabine Gajewski wurden die Daten für die intrazelluläre Aufnahme von Cisplatin in A498 Zellen erstellt.

Ein Vergleich der Aufnahme der Substanzen bei Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  lässt erkennen, dass Cisplatin die höchste Aufnahme von 23 ng Pt/ $10^6$  Zellen aufwies. Mit 15 ng Pt/ $10^6$  Zellen zeigte Oxaliplatin eine um ca 1/3 reduzierte Aufnahme im Vergleich zu Cisplatin. Carboplatin hingegen offenbarte mit ca. 5 ng Pt/ $10^6$  Zellen die geringste Aufnahme. Vergleichbare Aufnahmewerte zu Cisplatin wies Carboplatin jedoch bei der Inkubation mit 300  $\mu\text{M}$  auf.



**Abbildung 5.3: Intrazelluläre Akkumulation und DNA-Platinierung in A498 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** **A:** Zur Bestimmung der intrazellulären Akkumulation wurden A498 Zellen für 2 h mit jeweils 50  $\mu\text{M}$  Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin inkubiert. Für Carboplatin erfolgte eine zusätzliche Inkubation mit 300  $\mu\text{M}$ . Nach saurem Aufschluss wurde der Platingehalt mittels Graphitrohr-AAS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. **B:** Für die Bestimmung der DNA-Platinierung wurden A498 Zellen für 2 h mit jeweils 50  $\mu\text{M}$  Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin behandelt. Nach Abbruch der Behandlung erfolgte eine DNA-Extraktion sowie ein saurer Aufschluss. Der Platingehalt wurde abschließend mit Hilfe der ICP-MS gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung.

Ghezzi und Kollegen führten verschiedene Aufnahmestudien mit den drei Substanzen in der Brustkrebszelllinie MCF-7 durch. Sie setzten dabei nur geringe Konzentrationen (0,1  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von 24 h ein. Nach zusätzlichen 48 h ermittelten sie außerdem die jeweiligen  $\text{IC}_{50}$  Werte, wobei hier nicht hervor geht, welche Konzentrationen sie für die Bestimmung der Zellviabilität eingesetzt haben. In ihrer Studie zeigte sich die höchste Aufnahme für Oxaliplatin, gefolgt von Cisplatin und mit einer deutlich geringeren Aufnahme Carboplatin. Oxaliplatin wies dabei außerdem den niedrigsten  $\text{IC}_{50}$  von ungefähr 6  $\mu\text{M}$  auf. Cisplatin (28  $\mu\text{M}$ ) und Carboplatin (250  $\mu\text{M}$ ) zeigten, zu denen in dieser Arbeit ermittelten  $\text{IC}_{50}$  Werten, vergleichbare Werte (Ghezzi et al., 2004). In einer weiteren Studie verglichen Larson und Kollegen den Einfluss des Ctr1 auf die Aufnahme der drei Substanzen in parentalen embryonalen Mausfibroblasten. Ohne Manipulation des Ctr1 zeigten Carboplatin und Oxaliplatin vergleichbare Aufnahmen, wohingegen Cisplatin eine höhere Aufnahme aufwies. Da sie nur eine Kurzzeitinkubation von 5 min anwendeten, erklärten sie ihre Befunde mit der höheren Affinität von Cisplatin gegenüber Nukleophilen und somit auch dem Ctr1 (Larson et al., 2009). Holzer und Kollegen untersuchten ebenfalls den Einfluss des Ctr1 auf die intrazelluläre Akkumulation der drei Substanzen in murinen embryonalen Fibroblasten. Sie fanden heraus, dass der Ctr1 bei geringen Konzentrationen der drei Substanzen für die intrazelluläre Aufnahme mit verantwortlich ist. Interessanterweise hatte der Ctr1 bei hohen Konzentrationen von Oxaliplatin keinen Einfluss mehr auf die intrazelluläre Akkumulation (Holzer et al., 2006).

Ein weiterer involvierter Influxtransporter, neben dem bereits erwähnten Ctr1, ist der organische Kationen Transporter OCT2. Während der Ctr1 vor allem eine Rolle im Bezug auf Cisplatin-Resistenzen zu spielen scheint, trägt der OCT2 wohl zur Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität bei. Verschiedene Studien zeigten eine Kausalität zwischen dem OCT2 und der Aufnahme von Cisplatin in Nierenzellen, und der damit einhergehenden Nephrotoxizität, sowohl in *in vivo* als auch in *in vitro* Studien (Ciarimboli et al., 2010; Filipski et al., 2008; Ludwig et al., 2004; Yonezawa et al., 2005). Der OCT2 gehört der Familie der *Solute Carrier* an. Zu dieser Familie gehören neben dem OCT2 außerdem der OCT1 und OCT3. Interessanterweise wird der OCT2 vorwiegend in der Niere und dort vor allem im S3 Segment in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus exprimiert, folglich dem Ort, an dem die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität auftritt (Koepsell und Endou, 2004). Er scheint demnach besonders an der Aufnahme in Nierenzellen beteiligt zu sein.

Weitere Studien deuten außerdem daraufhin, dass Oxaliplatin, nicht aber Carboplatin, ebenfalls ein Substrat für den OCT2 darstellt (Burger et al., 2010; Yonezawa et al., 2006; Yonezawa und Inui, 2011). Dieser Befund könnte u.a. zur Erklärung beitragen, warum Carboplatin in der vorliegenden Arbeit nur gering im Vergleich zu den anderen zwei Substanzen in A498 Zellen aufgenommen wurde. Außerdem könnte sich dadurch weiter erklären, dass in den oben genannten Studien die Aufnahmen der Substanzen eine Zelllinienabhängigkeit aufweist.

In der Masterarbeit von Johanna Wall zeigte sich bei einem *knockdown* von 50 % des OCT2 in A498 Zellen jedoch kein Einfluss des Transporters auf die Aufnahme von Cisplatin (Daten nicht gezeigt). Hierzu müssten allerdings noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, da es sich

nur um einen *knockdown* und keinen *knockout* handelte.

Neben Transportsystemen für die Aufnahme spielen außerdem Effluxtransporter eine wichtige Rolle für die Akkumulation der Substanzen in der Zelle. Hier spielen die Pendanten zu den Influxtransportern eine Rolle. Der Kupfer Effluxtransporter ATP7A/7B und der zur *Solute Carrier* Familie gehörige MATE1 sollen einen Einfluss auf platinbasierte Substanzen haben (Burger et al., 2011; Hall et al., 2008; Harrach und Ciarimboli, 2015). MATE1 wird, wie auch der OCT2, unterschiedlich stark in verschiedenen Geweben exprimiert. Es wird diskutiert, dass die Niere eines der Organe ist, in dem der MATE1 besonders exprimiert wird (Meyer zu Schwabedissen et al., 2010). In einer Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität in MATE1 *knockout* Mäusen verstärkt war. Anhand ihrer Untersuchungen schlussfolgerten Nakamura und Kollegen, dass der MATE1 am Efflux von Cisplatin beteiligt ist und somit in die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität involviert ist (Nakamura et al., 2010). Yonezawa und Kollegen untersuchten in HEK239 Zellen u.a. den Einfluss von MATE1 auf Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin und Nedaplatin. Dabei stellten sie fest, dass Cisplatin und Oxaliplatin, aber nicht Carboplatin und Nedaplatin, ein Substrat für den MATE1 darstellen (Yonezawa et al., 2006). Weiterhin scheint Oxaliplatin eine höhere Affinität gegenüber dem MATE1 zu haben, wodurch Oxaliplatin vermehrt ausgeschleust werden soll. Dies könnte wiederum ein Grund für die nicht vorhandene Nephrotoxizität von Oxaliplatin sein (Yokoo et al., 2007). Eine vermehrte Ausschleusung von Oxaliplatin könnte ebenfalls in den A498 Zellen möglich sein. Im Rahmen der Masterarbeit von Sirin Yesil wurde mit Hilfe eines Immunoblots versucht, den MATE1 nachzuweisen. Ein Nachweis war jedoch aufgrund des Antikörpers nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend haben folglich verschiedene Transporter einen Einfluss auf die intrazelluläre Aufnahme von platinbasierten Substanzen. Der Influx und Efflux der jeweiligen Substanzen ist abhängig von unterschiedlichen Transportern, weshalb die drei Substanzen unterschiedliche Akkumulationen in der Zelle zeigen. Weiterhin werden Transporter in verschiedenen Organen unterschiedlich exprimiert, dadurch ist die Akkumulation der platinbasierten Substanzen außerdem zelltypabhängig.

Die Untersuchungen zur DNA-Platinierung offenbarten ebenfalls den höchsten Platinierungsgehalt für Cisplatin. Im Gegensatz zur Aufnahme zeigte Oxaliplatin die geringste Platinierung. Hierbei gilt es jedoch die außergewöhnlich hohe Standardabweichung für Carboplatin zu beachten. Eine Betrachtung der einzelnen Ergebnisse der drei unabhängigen Experimente offenbarte eine überaus deutliche Abweichung eines Versuches (siehe Anhang). Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die DNA-Platinierung von Carboplatin doch geringer ist als die von Oxaliplatin.

Verschiedene Studien offenbarten eine geringere Reaktivität von Oxaliplatin mit der DNA. Gleiche Konzentrationen an Oxaliplatin und Cisplatin führten zu weniger DNA-Schäden im Falle von Oxaliplatin (Saris et al., 1996; Woynarowski et al., 1998, 2000). Es zeigte sich jedoch auch, dass Oxaliplatin trotz weniger DNA-Schäden dieselbe Effektivität aufwies. Hector und Kollegen konnten in ihren Studien in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 ebenfalls feststellen, dass Oxaliplatin weniger

in der Zelle akkumuliert als Cisplatin, wobei sich dennoch derselbe zytotoxische Effekt für beide Substanzen, trotz geringerer DNA-Platinierung, zeigte (Hector et al., 2001). Diese Beobachtung lässt sich vermutlich auf die Art der DNA-Schäden bzw. deren Folgen zurückführen. Der genaue zugrundeliegende Mechanismus ist bis heute allerdings noch nicht offengelegt. Im späteren Verlauf der Arbeit wird noch einmal genauer auf die DNA-Schadensantwort eingegangen.

Knox und Kollegen zeigten in verschiedenen zellulären Kinetikstudien, dass Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin deutlich langsamer seinen Abgangsgruppen Liganden verliert und dieser mit Wassermolekülen ersetzt wird. Dadurch ist Carboplatin weniger reaktiv als Cisplatin. Die Folge davon ist, dass weitaus höhere Konzentrationen eingesetzt werden müssen, um dieselbe DNA-Platinierung zu erhalten. Knox und Kollegen zeigten weiterhin, dass dieselbe DNA-Platinierung letztendlich in Walker Zellen zu demselben zytotoxischen Effekt der beiden Substanzen führt, da beide Substanzen dieselben DNA-Schäden verursachen (Knox et al., 1986). Dieser Unterschied in der Reaktionskinetik der beiden Substanzen erklärt, warum Carboplatin eine geringere DNA-Platinierung in den A498 Zellen aufweist. Folglich führen eine geringere Aufnahme sowie DNA-Platinierung zu einer geringeren Toxizität. Dies erläutert weiterhin, warum für Carboplatin deutlich höhere Konzentrationen nötig sind, um dieselbe Effektivität wie Cisplatin zu erreichen. Interessant ist allerdings, dass Carboplatin bei selber Konzentration wie Cisplatin eine deutlich geringere Aufnahme zeigt. Dies lässt sich nicht durch die geringere Reaktivität erklären. Da der OCT2 vermehrt in Nierenzellen exprimiert wird und A498 Zellen der Niere entstammen, könnte dies eine Erklärung für die geringe Aufnahme von Carboplatin sein, da dieses kein Substrat für den Transporter darstellt.

Auf der Ebene der intrazellulären Aufnahme sowie DNA-Platinierung zeigten sich für alle drei platinbasierten Chemotherapeutika Unterschiede in A498 Zellen. Diese Unterschiede wurden im Folgenden weiter auf molekularer und zellulärer Ebene untersucht.

### 5.1.3 Einfluss von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin auf p53

Nachdem platinbasierte Chemotherapeutika DNA-Schäden verursacht haben, wird eine Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt, die letztendlich im Zelltod der Tumorzelle kulminiert. Diese Signalkaskade induziert oder reprimiert Gene bzw. Proteine mit unterschiedlichen Funktionen. Die Art des DNA-Schadens entscheidet dabei, welche Gene aktiviert werden. Für Cisplatin und Carboplatin ist bekannt, dass sie genau dieselben DNA-Schäden verursachen. Folglich sollte es hierbei zur Aktivierung derselben Signalkaskade kommen. Oxaliplatin hingegen verursacht, aufgrund seines DACH-Ligandens, andere DNA-Schäden. Dies führt zu einer unterschiedlichen Signaltransduktionskaskade, weshalb Oxaliplatin, im Gegensatz zu Cisplatin und Carboplatin, u.a. in Kolonkarzinomen effektiv ist. Es wird postuliert, dass der Grund hierfür bei der Schadenserkenkung durch Mismatch Reparatur Proteine liegt. MMR Proteine sind in der Schadenserkenkung von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden involviert. Im Gegensatz dazu werden Oxaliplatin-induzierte DNA-Schäden unabhängig von MMR-Proteinen erkannt. Kolonkarzinome können MMR defizient sein, wodurch sie auf



der einen Seite resistent gegenüber Cisplatin und Carboplatin sind, auf der anderen Seite Oxaliplatin aber sehr effektiv in Kolonkarzinomen wirken kann (Kweekel et al., 2005).

In Abbildung 5.4 ist die veränderte Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren in A498 Zellen nach Inkubation mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin dargestellt. Zur Untersuchung der Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR wurden A498 Zellen für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen der platinbasierten Substanzen inkubiert und anschließend für 24 h weiterkultiviert.



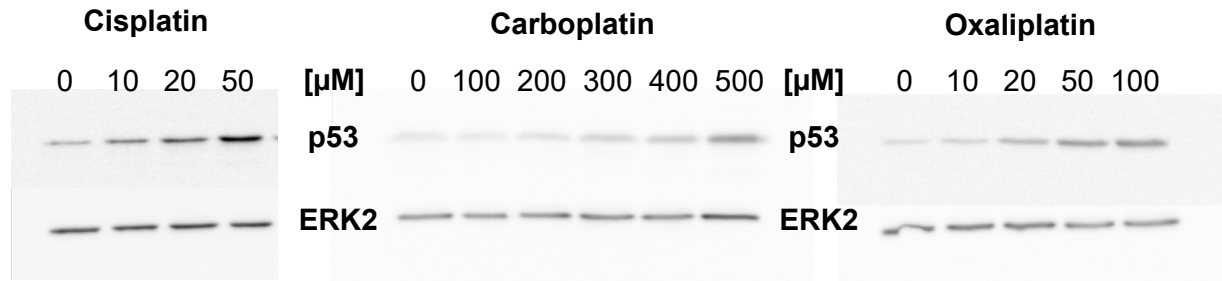
**Abbildung 5.4: Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren in A498 Zellen nach Inkubation mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** Es erfolgte zunächst eine 1 h Inkubation der A498 Zellen mit jeweils verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin (10, 20, 50 µM), Carboplatin (50, 100, 200, 300, 400, 500 µM) sowie Oxaliplatin (20, 50, 100, 150). Im Anschluss folgte eine 24 h Nachinkubation. Schließlich wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR ermittelt. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen normiert auf die Kontrolle. Dabei entspricht die Kontrolle 0.

Einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren im Bezug auf zellulären Stress stellt p53 dar. Erfährt eine Zelle Stress und kommt es zu DNA-Schäden, führt eine Aktivierung von p53 entweder zu einem Zellzyklusarrest, sodass die Zelle Zeit bekommt Reparaturprozesse einzusetzen, oder aber die Zelle leitet die Apoptose ein (Vousden und Lu, 2002). Aufgrund dessen wird p53 auch als Wächter des Genoms bezeichnet. Negativregulator von p53 ist MDM2. MDM2 sorgt dafür, dass p53 unter normalen Bedingungen auf einem niedrigen Level gehalten wird, in dem es an p53 bindet und es

so in seiner Funktion inhibiert. MDM2 kann aber auch die Ubiquitinierung und damit den Abbau von p53 auslösen. Es zeigte sich weiterhin, dass p53 und MDM2 eine negative Feedbackschleife aufweisen, d.h. p53 induziert MDM2, das wiederum den Abbau von p53 auslöst (Levine und Oren, 2009). In Abbildung 5.4 ist eine deutliche Zunahme der Genexpression von *MDM2* für alle drei Substanzen zu erkennen. Diese wird mit steigender Konzentration stärker und zeigte die stärkste Expression für Oxaliplatin. Diese Veränderungen deuten folglich auf eine Aktivierung von p53 hin. Neben *MDM2* zeigte die Genexpressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren nach Behandlung von A498 Zellen mit Cisplatin sowie Oxaliplatin eine vermehrte Expression von *NFKBIA* sowie *VEGFA*. *NFKBIA* codiert für das Protein  $I\kappa B\alpha$ , das NF- $\kappa$ B reguliert (Vallabhapurapu und Karin, 2009). Im Vergleich zu Oxaliplatin zeigte Cisplatin keine vermehrte Expression der für NF- $\kappa$ B codierenden Gene *NFKB1* und *NFKB2*. Dennoch spricht eine vermehrte Expression von *NFKBIA* für eine Induktion von NF- $\kappa$ B. Diese Induktion von NF- $\kappa$ B steht im Zusammenhang mit Inflamationsprozessen (Vallabhapurapu und Karin, 2009). Ebenso involviert in Inflamationsprozesse soll *VEGFA* sein (Martin et al., 2009). In Abschnitt 5.1.6 wird daher näher auf die vermehrte Expression der beiden Gene eingegangen.

Zusätzlich dazu zeigte Oxaliplatin außerdem eine vermehrte Expression von *JUN*. Für Cisplatin lässt sich hier eine leichte konzentrationsabhängige vermehrte Expression erkennen, diese lag jedoch nicht im relevanten Bereich. *JUN* codiert für das Protoonkogen c-Jun und ist Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 (Bohmann et al., 1987). Reguliert wird *JUN* durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992; Shaulian, 2010). Bekannt ist *JUN* weiterhin vor allem dafür, an der Proliferation beteiligt zu sein. Folglich gilt es als Tumorpromotor (Shaulian, 2010). In Experimenten an embryonalen Mausfibroblasten, die mit UV-Strahlung behandelt wurden, untersuchten Shaulian und Kollegen, welchen Einfluss dabei die Induktion von *JUN* auf weitere Proteine in der Zelle hat. Dabei fanden sie heraus, dass *JUN* den Einfluss von p53 auf p21 unterbindet und somit den induzierten Zellzyklusarrest aufhebt. Gleichzeitig führte dies dazu, dass die Zellen in die Apoptose gingen. *JUN* defiziente Zellen hingegen verblieben im Zellzyklusarrest und leiteten nicht die Apoptose ein (Shaulian et al., 2000). Weiterhin scheint außerdem der Inflamationsmarker TNF- $\alpha$  zur Aktivierung von *JUN* zu führen (Westwick et al., 1994).

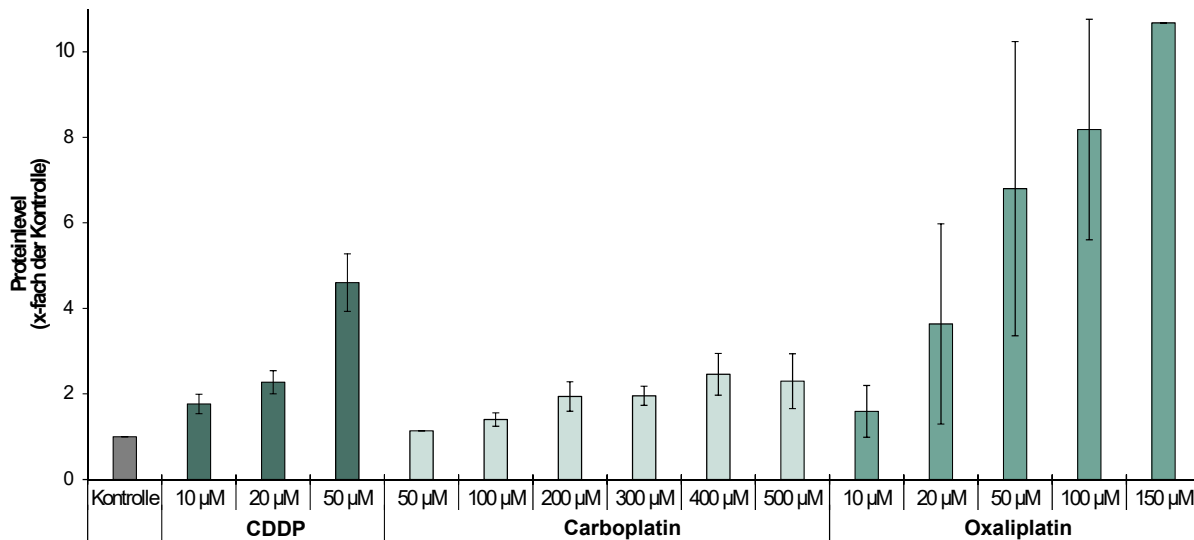
Neben diesen Funktionen scheint *JUN* außerdem DNA-Reparaturgene zu beeinflussen (Shaulian, 2010). *JUN* wird u.a. durch die *c-Jun N-terminale kinase (JNK)* aktiviert. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Cisplatin über *JNK* *JUN* aktiviert (Hayakawa et al., 2003; Potapova et al., 1997, 2001). Diese Aktivierung führt zu einer erhöhten DNA-Reparatur und spielt außerdem eine Rolle in Cisplatin-resistenten Tumoren (Hayakawa et al., 2004). In A498 Zellen konnte allerdings keine vermehrte Expression von *JUN* im relevanten Bereich für Cisplatin ermittelt werden. Für Oxaliplatin konnte keine Studie, die den Einfluss auf *JUN* untersucht, ausfindig gemacht werden. Lediglich in einer Studie wurde die Aktivierung von *JNK* nach Inkubation mit Oxaliplatin bzw. Cisplatin untersucht. Dabei konnten Nehmé und Kollegen eine Aktivierung für Cisplatin, nicht aber für Oxaliplatin feststellen (Nehmé et al., 1999). Im Zuge der Zellzyklusuntersuchung von Oxaliplatin wird noch einmal auf *JUN* eingegangen.



**Abbildung 5.5: Proteinlevel von p53 nach Inkubation mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin in A498 Zellen.** A498 Zellen wurden für 1 h mit Cisplatin (10, 20, 50 µM), Carboplatin (100, 200, 300, 400, 500 µM) sowie Oxaliplatin (10, 20, 50, 100 µM) inkubiert. Es folgte anschließend eine 24 h Nachinkubation. Mittels Immunoblot wurde das Proteinlevel von p53 bestimmt. Als Ladekontrolle diente ERK2. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei jeweils ein Versuch exemplarisch dargestellt ist.

Die verstärkte Genexpression von *MDM2* weist auf eine Aktivierung von p53 hin, weshalb im Weiteren das Proteinlevel von p53 nach Inkubation der Substanzen mittels Immunoblot untersucht wurde. Die Behandlung der Zellen erfolgte dabei nach dem gleichen Schema wie für die Genexpression. Beispielhafte Immunoblots der drei Substanzen sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Alle Substanzen zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg des p53 Proteinlevels nach Inkubation mit der jeweiligen Substanz. Eine semiquantitative Auswertung der Immunoblots, mit Einbezug der Ladekontrolle ERK2, offenbarte vor allem für Oxaliplatin einen deutlichen Anstieg des p53 Proteinlevels (Abbildung 5.6). Carboplatin zeigte den geringsten Anstieg des p53 Proteinlevels. Selbst bei der höchsten Konzentration von 500 µM lag das Proteinlevel deutlich unter dem von Cisplatin, bei einer Konzentration mit einem vergleichbaren zytotoxischen Effekt (50 µM). Dies ist insofern interessant, da Carboplatin und Cisplatin genau die gleichen DNA-Schäden verursachen. P53 wird vor allem als Antwort auf DNA-Schäden vermehrt induziert. Folglich könnten im Falle von Cisplatin weitere Ursachen zu einer vermehrten Induktion von p53 führen. Neben anderen steht die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Verdacht p53 zu aktivieren (Bae et al., 2006; Bragado et al., 2007; Jiang et al., 2007).

In 50 % aller Tumoren ist p53 mutiert und damit oft inaktiv. Dies kann ein Problem in der Tumorbehandlung darstellen, da der Tumor dadurch resistent gegenüber dem Chemotherapeutikum sein kann (Bourdon, 2007). Wie bereits weiter oben erklärt, kann p53 neben einem Zellzyklusarrest gleichermaßen die Apoptose einleiten. Die Einleitung der Apoptose ist ein essentieller Vorgang für den Wirkmechanismus vieler Chemotherapeutika. Durch ein mutiertes p53 kann dieser Schritt ausbleiben und die Tumorzelle überlebt. Das erhöhte p53-Proteinlevel nach Inkubation mit der jeweiligen platinbasierten Substanz deutet auch hier auf einen p53-abhängigen Wirkmechanismus hin. Vor allem Oxaliplatin führte in A498 Zellen zu einem starken Anstieg des p53 Proteinlevels. Bragado und Kollegen konnten in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 mit Wildtyp p53 ebenfalls nach Behandlung mit Cisplatin einen Anstieg im p53 Proteinlevel feststellen. Weiterhin postulieren



**Abbildung 5.6: Semiquantitative Auswertung der p53 Immunoblots in A498 Zellen nach Inkubation mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** Die semiquantitative Auswertung erfolgte anhand der Immunoblots von p53 mit Einbezug der Ladekontrolle ERK2. A498 Zellen wurden hierfür 1 h mit der jeweiligen Substanz inkubiert. Anschließend erfolgte eine Nachinkubation von 24 h. Da sich bei einer Konzentration von 50 µM Carboplatin das p53 Level kaum änderte, wurde diese Konzentration nur einmal gemessen. Dafür wurde in den weiteren zwei Experimenten eine höhere Konzentration von 500 µM eingesetzt. Ähnliches gilt für die höchste Konzentration von Oxaliplatin mit 150 µM, wobei sich hier eine sehr starke Zunahme des Proteinlevels zeigte, weshalb in den weiteren zwei Experimenten eine zusätzliche niedrige Konzentration von 10 µM eingesetzt wurde. Alle weiteren Konzentrationen wurden in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die behandelten Proben wurden jeweils auf die unbehandelte Kontrollprobe normiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Versuche  $\pm$  Standardabweichung.

sie einen Zusammenhang zwischen dem p53 Status und der Induktion von ROS nach Behandlung mit Cisplatin (Bragado et al., 2007). Bae und Kollegen untersuchten ebenfalls den postulierten Zusammenhang in p53 inaktiven Zelllinien und fanden dabei heraus, dass dieser Zusammenhang Zelltyp abhängig ist (Bae et al., 2006). In eigenen Untersuchungen in RT112 Zellen zeigte sich nach Behandlung mit Cisplatin kein erhöhtes p53 Proteinlevel, obwohl auf Genexpressionsebene, wie für die A498 Zellen, p53-abhängige Gene vermehrt expremiert wurden (Schoch et al., 2018, siehe Anhang). Nichtsdestotrotz induzierte Cisplatin effektiv den Zelltod. Die Induktion von p53 durch Cisplatin scheint folglich nicht zwingend notwendig für die Einleitung des Zelltods zu sein. Weiterhin soll p53 außerdem eine Rolle in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität spielen (Cummings, 2002; Jiang et al., 2004, 2006; Pabla et al., 2008; Zhu et al., 2015).

Kiyonari und Kollegen untersuchten u.a. das p53 Proteinlevel in HCT116 Zellen nach Behandlung mit 10 µM Cisplatin und 1 µM Oxaliplatin über einen Zeitraum von 48 h. Dabei fanden sie ebenfalls sowohl für Cisplatin als auch Oxaliplatin ein erhöhtes p53 Proteinlevel, wobei Oxaliplatin zu einer deutlicheren Zunahme führte (Kiyonari et al., 2015). Hierbei muss jedoch auch erwähnt werden, dass HCT116 Zellen aufgrund einer MMR-Defizienz resistent gegenüber Cisplatin sind, wohingegen Oxaliplatin in diesen Zellen sehr effektiv ist.

In einer Studie in verschiedenen Zervixkarzinomzelllinien, in denen der p53 Status durch das HPV E6 Onkogen beeinflusst ist, untersuchten Koivusalo und Kollegen, inwiefern der veränderte p53 Status Einfluss auf die Behandlung von Cisplatin, Carboplatin oder Oxaliplatin hat. Es zeigte sich, dass der Status auf die zytotoxische Wirkung aller drei Substanzen einen Einfluss hatte. Sie betonten aber weiter, dass auch Zellen mit inaktivem p53 zum Zelltod führten. Folglich weisen vermutlich alle drei Substanzen einen p53-abhängigen, aber auch einen -unabhängigen Mechanismus auf (Koivusalo et al., 2002).

P53 scheint am Wirkmechanismus von platinbasierten Chemotherapeutika in A498 Zellen jedenfalls beteiligt zu sein. Die folgende Untersuchung weiterer p53-abhängiger *downstream* Gene sollen weiteren Aufschluss über den Einfluss von p53 auf den Wirkmechanismus geben.

#### 5.1.4 DNA-Schadensantwort und -Reparatur

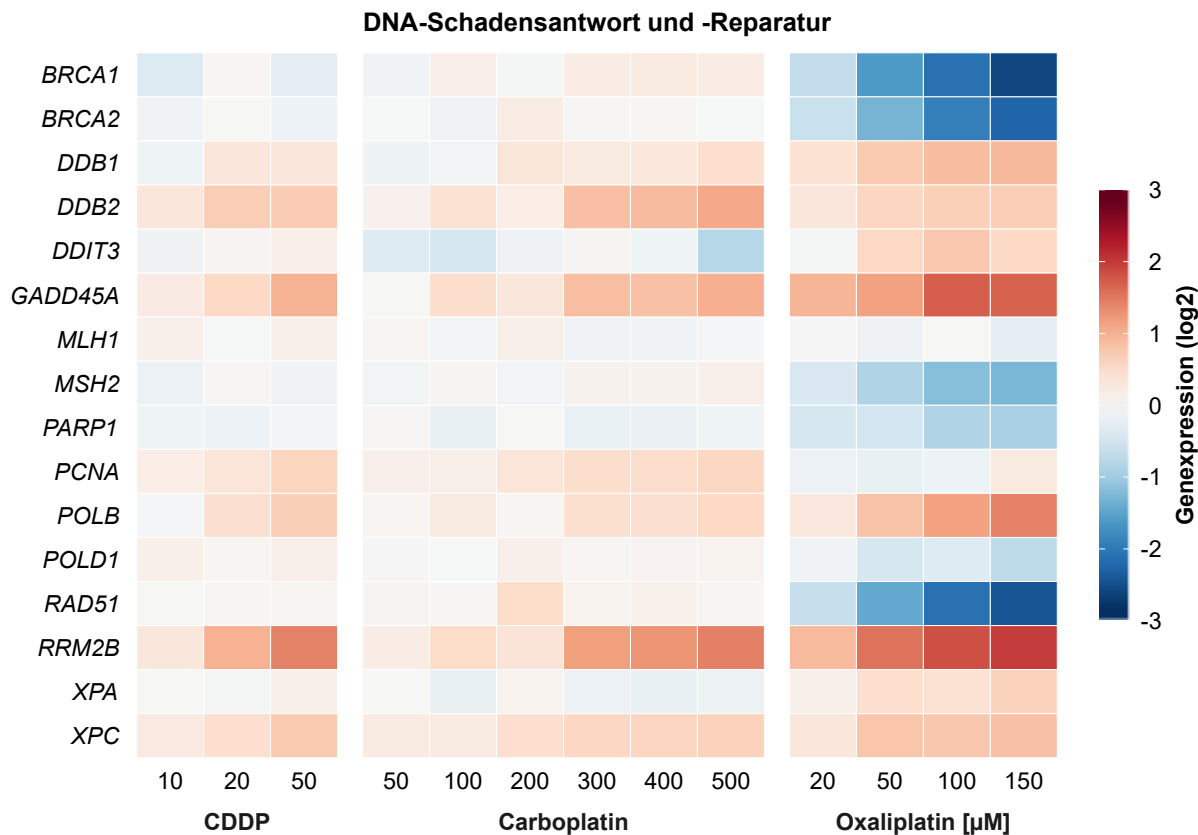
DNA-Schäden führen in der Zelle zu einer sogenannten DNA-Schadensantwort (DNA *damage response* - DDR). DNA-Läsionen beeinflussen u.a. die Transkription oder Replikation, weshalb es essentiell für die Zelle ist, Prozesse zu besitzen, die es ermöglichen solche Schäden zu beheben. Ohne diese Prozesse können letztendlich Mutationen entstehen (Giglia-Mari et al., 2011). Der wichtigste Prozess ist primär die DNA-Schadenserkennung und letztendlich die DNA-Reparatur. Je nach Art der DNA-Läsion werden unterschiedliche DNA-Reparaturwege induziert. Die DNA-Schadensantwort kann neben der Reparatur auch zu einem Zellzyklusarrest führen. Dieser verschafft der Zelle mehr Zeit für die Reparatur. Sollte eine Reparatur nicht mehr möglich sein, werden Signalwege induziert, die zum programmierten Zelltod führen. So verhindert die Zelle eine Weitergabe der eventuell entstehenden Mutation (Ciccia und Elledge, 2010; Giglia-Mari et al., 2011).

Die Induktion von Intrastrang- und Interstrang-*Crosslinks* durch Cisplatin führt in der Zelle zu einer schnellen DNA-Schadensantwort. Dabei scheinen die Proteine ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein*) eine entscheidende erste Rolle zu spielen und Initiatoren der weiteren Signalkaskade zu sein (Roos und Kaina, 2013; Zhu et al., 2015). Zur weiteren Signalkaskade gehören u.a. Chk1 und Chk2 sowie letztlich p53 (Zhu et al., 2015). Weitere *downstream* p53-*target* Gene sollen *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*), *GADD45A* (*growth arrest and DNA damage 45*), *XPC* (*XPC complex subunit, DNA damage recognition and repair factor*) sowie *DDB2* (*damage-specific DNA binding protein 2*) sein (Wang und Lippard, 2005; Zhu et al., 2015).

An der Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden sind verschiedene Reparaturprozesse beteiligt. Cisplatin-induzierte Intrastrang-*Crosslinks* können durch die Nukleotidexzisionsreparatur repariert werden (Köberle et al., 2010; Usanova et al., 2010). Die Reparatur von Interstrang-*Crosslinks* erfolgt über die ICL Reparatur, ein Reparaturmechanismus, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Muniandy et al., 2010; Köberle et al., 2010). Es scheint aber ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen Reparaturmechanismen zu sein. Neben der homologen Rekombination (HR) sollen die Nukleotidexzisionsreparatur, Mismatch Reparatur, das Fanconia Anemia-Proteinnetzwerk

sowie Translesions-DNA-Polymerasen beteiligt sein (Hinz, 2010). Weiterhin wird diskutiert, ob Proteine der Basenexzisionsreparatur (BER) ebenfalls an der ICL Reparatur beteiligt sind (Kotchandapani und Patrick, 2013). Aus den induzierten *Crosslinks* können, über den Arrest von DNA Replikationsgabeln, DNA-Doppelstrangbrüche entstehen (Kennedy et al., 2004).

Carboplatin induziert exakt die gleichen DNA-Schäden wie Cisplatin, weshalb es hier keinen Unterschied in der DDR sowie der DNA-Reparatur geben sollte. Oxaliplatin hingegen induziert zwar auch Intrastrang- und Interstrang-*Crosslinks*, aufgrund seines DACH-Liganden unterscheidet sich aber die DDR und Reparatur im Vergleich zu Cisplatin und Carboplatin. Der DACH-Ligand führt u.a. zu einer größeren Verzerrung der DNA-Helix. Dies führt zu einer unterschiedlichen Schadenserken- nung und folglich weiteren Unterschieden in den nachfolgenden Prozessen wie der DNA-Reparatur (Lewis et al., 2009; Chaney et al., 2004; Vaisman und Chaney, 2000).



**Abbildung 5.7: Genexpression von DNA-Schadensantwort- und -Reparaturgenen in A498 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** A498 Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz inkubiert und anschließend für weitere 24 h kultiviert. Danach erfolgte die Bestimmung der Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelte Kontrollprobe normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 5.7 zeigt die Genexpression von Genen involviert in die DNA-Schadensantwort sowie -Reparatur in A498 Zellen nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanz. Darge-

stellt sind nur Gene, die eine relevante Veränderung in der Genexpression aufwiesen. Auf den ersten Blick lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Cisplatin und Carboplatin im Vergleich zu Oxaliplatin erkennen. Für alle drei Substanzen lässt sich jedoch auch eine erhöhte Expression von p53-abhängigen Genen erkennen. Eine relevante Erhöhung wiesen dabei die Gene *DDB2*, *GADD45A* und *RRM2B* (*ribonucleotide reductase regulatory TP53 inducible subunit M2B*) auf. Eine konzentrationsabhängige Tendenz war außerdem für *PCNA* (außer bei Oxaliplatin) sowie *XPC* zu erkennen. Alle Gene spielen dabei eine Rolle in der NER. *PCNA* interagiert weiterhin mit *GADD45A* und *p21*, wodurch es so Einfluss auf den Zellzyklus nimmt.

Ein weiteres Gen, das konzentrationsabhängige Tendenzen für Cisplatin und Carboplatin zeigte, war *POLB* (*DNA polymerase beta*). Für Oxaliplatin war die erhöhte Genexpression von *POLB* im relevanten Bereich. Das codierende Proteine ist Teil der BER (Lange et al., 2011). Yang und Kollegen konnten in *POLB*-defizienten Zellen einen Zusammenhang zwischen *POLB* und von Oxaliplatin-induzierten DNA-Schäden nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigte sich für Cisplatin kein Unterschied in der Reparatur in den profizienten und defizienten Zellen (Yang et al., 2010). Konträr zu dieser Studie zeigte sich jedoch in einer Studie in der humanen Kolonkrebszelllinie CaR-1, dass Patienten mit einer geringen Expression von *POLB* eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin aufweisen, aber nicht gegenüber Oxaliplatin (Iwatsuki et al., 2009). Weitere Proteine der BER blieben in der Genexpressionsanalyse unverändert (Daten nicht gezeigt). Deshalb bleibt es fraglich, inwiefern die BER an der Reparatur der DNA-Schäden der drei Substanzen beteiligt ist.

Wie bereits erwähnt, sollen die Proteine ATM und ATR eine entscheidende Rolle in der DDR von Cisplatin spielen. Für keine der drei Substanzen zeigte sich jedoch eine Veränderung in der Genexpression (Daten nicht gezeigt). Da beide Proteine am Anfang der Signalkaskade stehen, könnte es sein, dass zum gewählten Zeitpunkt nach 24 h kein Einfluss mehr zu erkennen ist. Weitere NER beteiligte Gene wie *ERCC1* (*ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit*), *ERCC2* (*ERCC excision repair 2, TFIIH core complex helicase subunit, XPD*), *ERCC4* (*ERCC excision repair 4, endonuclease catalytic subunit, XPF*), *ERCC5* (*ERCC excision repair 5, endonuclease, XPG*) und *XPA* (*XPA, DNA damage recognition and repair factor*) zeigten ebenfalls keine Veränderung in ihrer Expression (Daten nicht gezeigt).

Ein deutlicher Unterschied von Oxaliplatin zu Cisplatin und Carboplatin im Genexpressionsprofil von Genen der DNA-Schadensantwort und -Reparatur zeigte sich bei Genen, die an der Doppelstrangbruchreparatur, genauer an der Homologen Rekombination, beteiligt sind. *BRCA1* (*breast cancer 1, DNA repair associated*), *BRCA2* (*breast cancer 2, DNA repair associated*) und *RAD51* (*RAD51 recombinase*) wurden durch die Behandlung mit Oxaliplatin konzentrationsabhängig stark vermindert exprimiert. Des Weiteren sind das an der Mismatch Reparatur beteiligte Gen *MSH2* (*MutS homolog 2, DNA mismatch repair protein Msh2*) sowie *PARP1* (*poly(ADP-ribose) polymerase 1*), das an der Einzelstrangbruchreparatur beteiligt ist, ebenfalls herunterreguliert. Folglich sind mehrere Gene verschiedener DNA-Reparaturwege nach Behandlung mit Oxaliplatin herunterreguliert. Lediglich Gene der NER werden hochreguliert. Studien konnten zeigen, dass die NER keinen

Unterschied in der Reparatur von Cisplatin- und Oxaliplatin-induzierten DNA-Schäden macht. Dahingegen zeigte sich, dass Unterschiede in der MMR, bei DDR Proteinen sowie Transläsions-DNA-Polymerasen vorhanden sind (Chaney et al., 2005). Bisher wurde eine Niederregulation beteiligter DNA-Reparaturgene jedoch noch nicht beobachtet. Da auf zellulärer Ebene keine weiteren Versuche zur DNA-Schadensantwort und -Reparatur durchgeführt wurden, lassen sich keine konkreten Aussagen treffen.

In der in Kapitel 5.1.3 bereits erwähnten Studie von Kiyonari und Kollegen, konnte nach Behandlung der Zellen mit Oxaliplatin keine Veränderung in der Phosphorylierung von Chk1 und Chk2 festgestellt werden (Kiyonari et al., 2015). Chk1 und Chk2 kontrollieren als Effektorinasen Zellzyklus Checkpoints. Dabei werden sie nach einem DNA-Schaden respektive durch ATR und ATM durch Phosphorylierung aktiviert (Reinhardt und Yaffe, 2009). Beide Kinasen phosphorylieren dann außerdem *downstream* p53 (Roos und Kaina, 2013). Folglich sind beide Kinasen Marker für DNA-Schäden und eine DNA-Schadensantwort, die u.a. p53-abhängig ist.

Dieser Mechanismus soll, wie bereits erwähnt, in der DDR für Cisplatin eine Rolle spielen. Bruno und Kollegen untersuchten diesen Mechanismus sowohl für Cisplatin als auch für Oxaliplatin. Dabei zeigte sich, dass nur die DNA-Schadensantwort von Cisplatin Chk2-abhängig war, nicht aber die von Oxaliplatin (Bruno et al., 2017). Sie untersuchten weiter die DNA-Schadenswort mit Hilfe des DNA-Schadensmarker  $\gamma$ -H2AX. Dabei stellten sie fest, dass Oxaliplatin, im Vergleich zu Cisplatin, nicht zur Ausbildung von  $\gamma$ -H2AX Foci führte. Diese Untersuchungen bestätigten sie weiterhin mit einem Comet Assay zur Untersuchung von DNA-Schäden. Sie postulieren deshalb, dass Oxaliplatin nicht über eine DDR den Zelltod einleitet sondern, wie sie in weiteren Untersuchungen herausfanden, über ribosomalen Stress (Bruno et al., 2017). Ribosomaler Stress kann über einen p53-abhängigen Mechanismus, gänzlich unabhängig von DNA-Schäden, den Zelltod einleiten (Golumb et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden keine Untersuchungen hierzu durchgeführt, dennoch könnte es eine Erklärung für die Unterschiede in der DDR von Cisplatin und Oxaliplatin sein. Weitere Untersuchungen müssten hierzu durchgeführt werden.

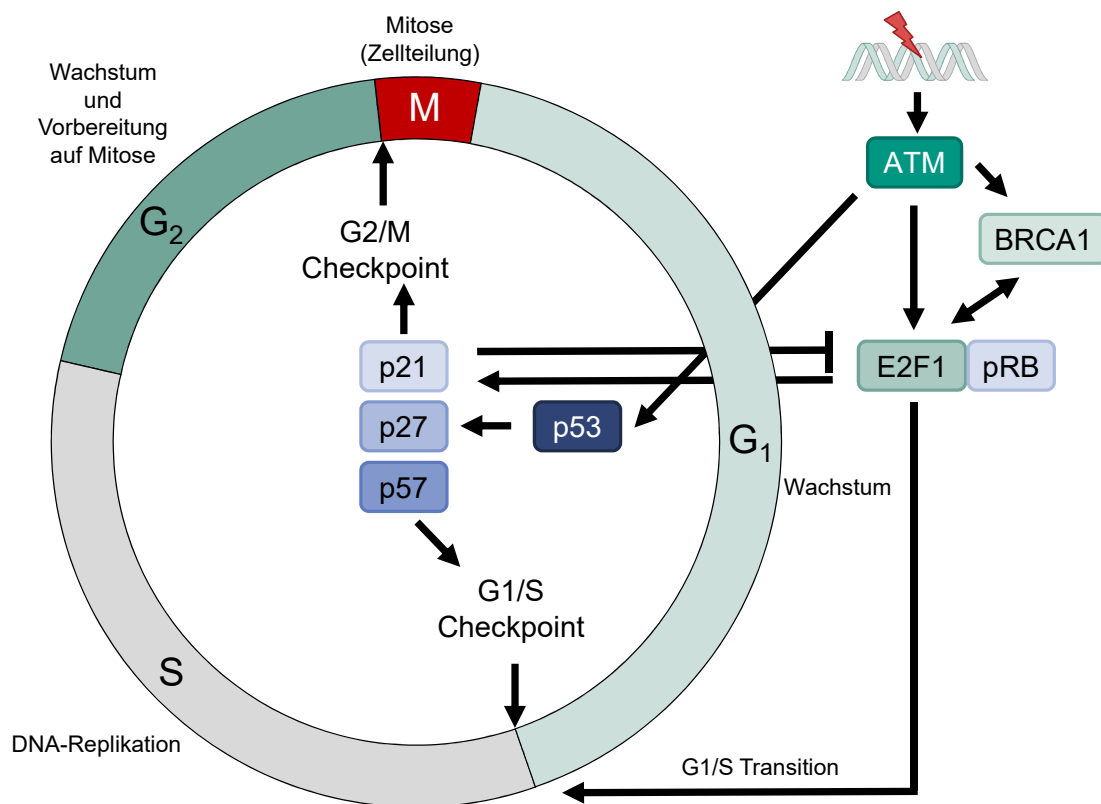
### 5.1.5 Zellzyklus und Proliferation

Ein weiterer wichtiger und komplexer Vorgang in der Zelle stellt der Zellzyklus dar. Durch eine spezifische Abfolge entstehen am Ende des Zyklus zwei Tochterzellen (Schafer, 1998). Die spezifische Abfolge besteht aus vier Phasen (Abbildung 5.8). In der  $G_1$ -Phase befindet sich die Zelle im Wachstum und bereitet sich auf die DNA-Synthese vor. In der darauffolgenden S-Phase erfolgt die DNA-Replikation, d.h. der DNA Gehalt wird verdoppelt. In der  $G_2$ -Phase bereitet sich die Zelle auf die Teilungsphase, die Mitose, vor. Letztendlich teilt sich die Zelle in der M-Phase in zwei Tochterzellen (Maddika et al., 2007; Schafer, 1998). Diese Abfolgesequenz wird durch spezifische Proteine, die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), reguliert (Vermeulen et al., 2003).

Entsteht ein DNA-Schaden, können verschiedene Checkpoints aktiviert werden, um der Zelle Zeit zu geben den Schaden zu reparieren. Checkpoints befinden sich vor der S-Phase ( $G_1/S$  Checkpoint)



sowie nach der Replikation (G<sub>2</sub>/M Checkpoint). Dabei werden sogenannte Cyclin-abhängige Kinasen (CDKI), wie z.B. p21 oder p27, aktiviert (Vermeulen et al., 2003).

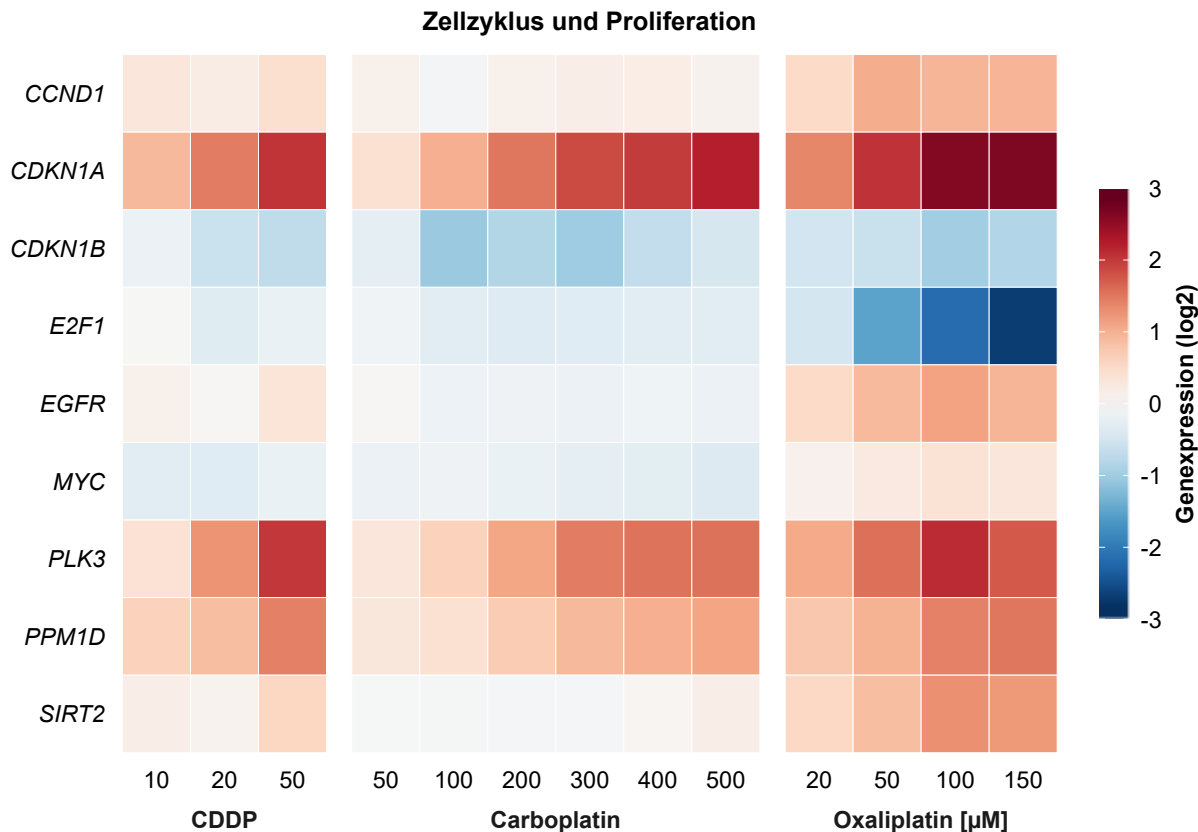


**Abbildung 5.8: Zellzyklusabfolge und der Einfluss von DNA-Schäden.** Die Abfolge des Zellzyklus wird in vier Phasen eingeteilt. In der G<sub>1</sub>-Phase bereitet sich die Zelle auf die DNA-Synthese vor. In der darauffolgenden S-Phase findet die DNA-Replikation statt, wobei die Zelle einen doppelten DNA-Gehalt aufweist. Im Anschluss befindet sich die Zelle in der G<sub>2</sub>-Phase, in der sie sich auf die Mitose (M) vorbereitet. Schließlich teilt sich die Zelle in der M-Phase in zwei Tochterzellen. Erleidet die Zelle DNA-Schäden, können verschiedene Checkpoints durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKI) wie p21, p27 oder p57 aktiviert werden. Dadurch erfährt die Zelle einen Zellzyklusarrest und bekommt so mehr Zeit zur Reparatur der Schäden. Eine Aktivierung der CDKI kann u.a. p53-abhängig sein, das wiederum durch ATM aktiviert werden kann. Ein weiterer wichtiger Regulator des Zellzyklus ist E2F1. Im Normalzustand wird es durch Bindung von pRb reguliert und verhindert so die Proliferation der Zelle. Außerdem scheint es einen Zusammenhang zwischen p21 sowie BRCA1 und E2F1 zugeben.

In Abbildung 5.9 ist die Genexpression in A498 Zellen von zellzyklus- sowie proliferationsbeteiligten Genen dargestellt. Es wird ersichtlich, dass die Genexpression von den p53-abhängigen Genen *CDKN1A*, *PLK3* und *PPM1D* konzentrationsabhängig durch alle drei platinbasierten Substanzen erhöht wurde. *CDKN1A* codiert dabei für p21, das als CDKI einen Zellzyklusarrest einleiten kann. Dabei kann es sowohl einen G<sub>1</sub>/S- als auch einen G<sub>2</sub>/M-Arrest einleiten (Abbas und Dutta, 2009; Deng et al., 1995; Gartel und Radhakrishnan, 2005). *PLK3* codiert für das Protein *polo-like kinase 3*, dessen Hauptaufgabe die Regulation des Zellzyklus ist (Iida et al., 2009; Helmke et al., 2016).

*PPM1D*, dessen codierendes Protein eine Serin/Threonin Phosphatase ist, dephosphoryliert u.a. p53 und hebt somit den durch p53-induzierten Zellzyklusarrest auf (Lu et al., 2005).

Eine leicht verminderte Expression zeigte sich für das Gen *CDKN1B*, das für den CDK Inhibitor p27 codiert. Allerdings lag diese verminderte Expression nicht im relevanten Bereich. Durch Cisplatin und Carboplatin wurden keine weiteren Gene des Zellzyklus oder der Proliferation beeinflusst. Folglich deutet die Genexpression der beiden Substanzen auf einen p53-abhängigen Zellzyklusarrest hin.



**Abbildung 5.9: Zellzyklus- und proliferationsbeteiligte Gene und deren veränderte Genexpression in A498 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** Für eine Stunde wurden A498 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Nachinkubation von weiteren 24 h. Die Genexpression wurde letztlich mittels Hochdurchsatz RT-qPCR ermittelt. Die behandelten Proben wurden auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Bestimmungen.

Das Genexpressionsprofil zeigte für Oxaliplatin, wie bereits bei der DNA-Schadensantwort und -Reparatur, deutliche Unterschiede zu Cisplatin und Carboplatin. Neben den bereits erwähnten Genen wurden außerdem *CCND1*, *EGFR* sowie *SIRT2* vermehrt exprimiert. Das Protein Cyclin D1, welches durch *CCND1* codiert wird, gehört zur Familie der Cycline, deren Aufgabe die Regulation von CDKs ist. Cyclin D1 bildet zusammen mit CDK4 und CDK6 einen Komplex, der für den Eintritt in die S-Phase nötig ist (Vermeulen et al., 2003). Studien zeigten eine Korrelation zwischen

einer Überexpression von Cyclin D1 und einer verkürzten G<sub>1</sub>-Phase und somit einer beschleunigten Zellproliferation. Lin und Kollegen konnten einen Zusammenhang zwischen EGFR (*epidermal growth factor receptor*), einem Protein, das an der Zellproliferation beteiligt ist, und Cyclin D1 feststellen. Dabei zeigte sich, dass eine vermehrte Akkumulation von EGFR im Zellkern zu einer vermehrten Expression von Cyclin D1 führt (Lin et al., 2001; Lo und Hung, 2006). Die vermehrte Expression von *CCND1* und *EGFR* deutet demnach auf eine vermehrte Zellproliferation hin.

Dryden und Kollegen untersuchten die Rolle des Proteins SIRT2 (Sirtuin 2) innerhalb des Zellzyklus. SIRT2 wurde vermehrt in der G<sub>2</sub>/M-Phase vorgefunden. Weiter stellten sie fest, dass es offenbar eine wichtige Rolle in der Mitose spielt (Dryden et al., 2003). Dabei soll es Teil des Mitose Checkpoints zwischen Prophase und Prometaphase sein und so die Integrität der DNA sicherstellen (Inoue et al., 2007). Demnach könnte es nach Behandlung mit Oxaliplatin zu einem Arrest in der Mitosephase kommen.

Der deutlichste Unterschied in der Expression bezüglich zellzyklusabhängiger Gene von Oxaliplatin zu Cisplatin lag bei der verminderten Expression von *E2F1*. Dieses codiert für einen Transkriptionsfaktor, der an der Regulation des Zellzyklus, aber auch an der Apoptose beteiligt ist. Reguliert wird er durch das Tumorsuppressorprotein pRb (Abbildung 5.8). Im hypophosphorierten Zustand bindet es an E2F1 und verhindert so die Proliferation der Zelle (Ertosun et al., 2016). Durch Phosphorylierung von pRb dissoziiert es von E2F1 ab, wodurch E2F1 seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben kann. Es gilt dabei als eines der wichtigsten Proteine für den Eintritt in die S-Phase. In der späten G<sub>1</sub>/S-Phase wird es vermehrt gebildet und induziert so die Transkription verschiedener Gene für die DNA-Synthese und Zellzyklusprogression. Dabei wird u.a. die Transkription von Cyclin D1 induziert (Chen et al., 2009; Ertosun et al., 2016). Neben der Regulation durch pRb zeigten Studien außerdem eine Korrelation zwischen dem p21-Status und E2F1 (Delavaine und La Thangue, 1999; Devgan et al., 2005). Demnach kann p21 an E2F1 binden und es somit in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor inhibieren (Delavaine und La Thangue, 1999).

Wang und Kollegen fanden außerdem einen Zusammenhang von *BRCA1* und *E2F1*. Sie zeigten, dass *BRCA1* abhängig von *E2F1* reguliert werden kann (Wang et al., 2000). So könnte die verminderte Expression von *E2F1* durch Oxaliplatin in A498 Zellen auch im Zusammenhang mit der verminderten Expression von *BRCA1* stehen und eventuell Einfluss auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur haben. Ren und Kollegen fanden weiterhin in ihrer Microarrayanalyse heraus, dass *E2F1* mehrere DNA-Reparaturgene beeinflusst. Hierzu zählten u.a. die MMR Gene *MSH2* und *MLH1* (Ren et al., 2002). Dies könnte weiterhin den Umstand erklären, dass *MSH2* durch Behandlung mit Oxaliplatin vermindert exprimiert wurde, obwohl die Schadenserkennung von Oxaliplatin MMR-unabhängig ist.

In Kapitel 5.1.3 wurde der Einfluss von *JUN* auf p53 und p21 diskutiert. Eine Induktion von *JUN* kann dazu führen, dass der durch p21 induzierte Zellzyklusarrest durch *JUN* wieder aufgehoben wird und die Zelle stattdessen in die Apoptose geht. Folglich könnten sowohl *E2F1* als auch *JUN* Einfluss auf das Fortlaufen des Zellzyklus haben.

Die Genexpressionsdaten für Oxaliplatin sind nicht eindeutig deutbar. Es wurden sowohl zellzyklusinhibierende Gene als auch Gene für die Proliferation vermehrt exprimiert, sodass sich keine definitive Aussage treffen lässt. Da die Genexpressionsebene nicht unbedingt der Proteinebene entsprechen muss, ist es wichtig, beide Ebenen zu betrachten. Deshalb wurde im Anschluss an die Genexpression die Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie untersucht.

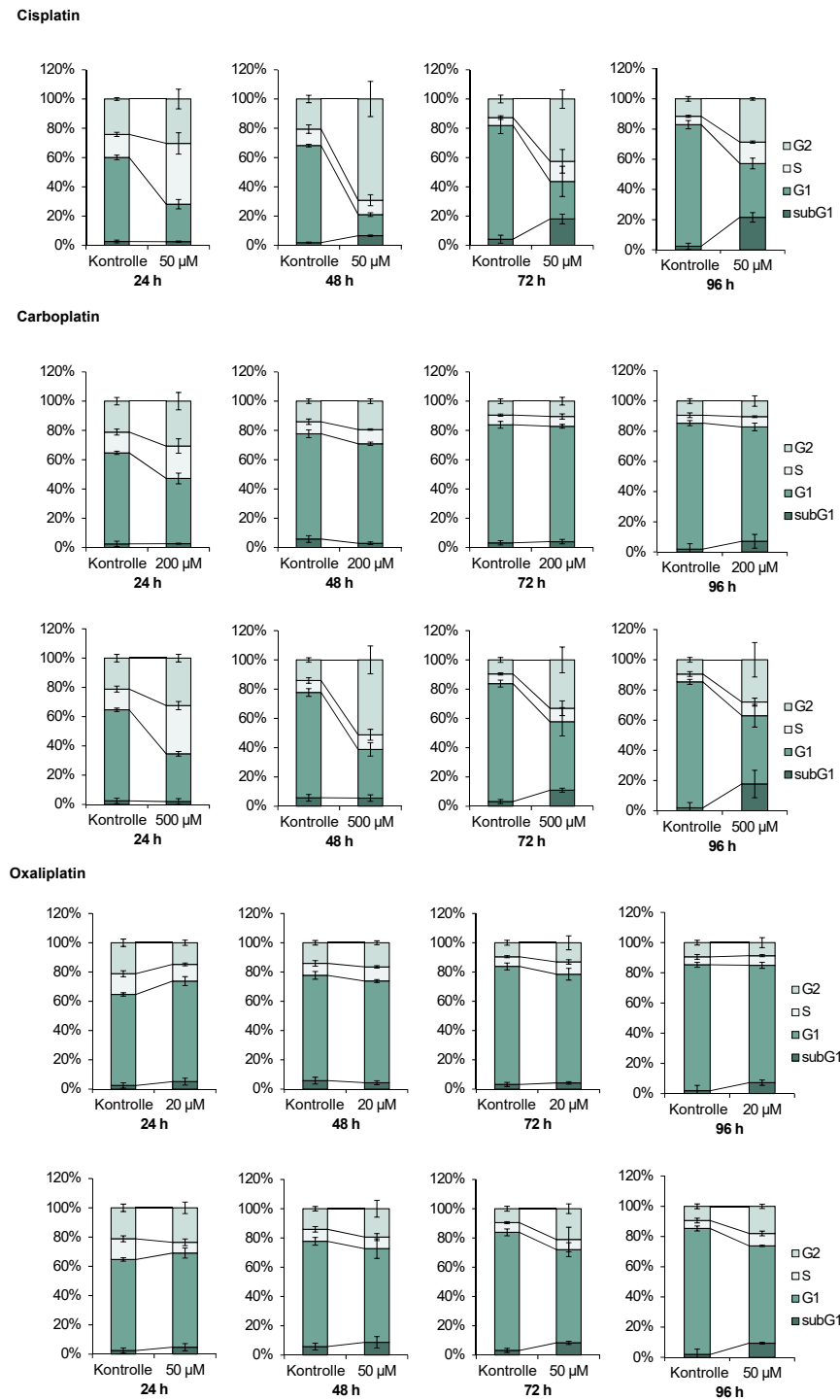
Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 5.10 dargestellt. Nach einstündiger Inkubation von A498 Zellen mit der jeweiligen Substanz wurde die Zellzyklusverteilung nach 24, 48, 72 sowie 96 h untersucht. Für Cisplatin erfolgte die Inkubation lediglich mit 50  $\mu\text{M}$ , da in der Literatur die Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit Cisplatin schon mehrfach beschrieben wurde (Ormerod et al., 1994; Sorenson et al., 1990; Volland et al., 2006). Die Behandlungen mit Oxaliplatin und Carboplatin erfolgten mit 20 und 50  $\mu\text{M}$  sowie 200 und 500  $\mu\text{M}$ , respektive.

Mit Hilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffes DAPI (4',6'-Diamidin-2-phenylindol) lässt sich der DNA-Gehalt der Zellen messen. Aufgrund des unterschiedlichen DNA-Gehaltes in den Zellzyklusphasen lässt sich so zwischen den einzelnen Phasen unterscheiden. Zusätzlich zur  $G_0/G_1$ -, S-, sowie  $G_2/M$ -Phase lässt sich außerdem noch die sub $G_1$ -Phase ermitteln. Die sub $G_1$ -Phase beinhaltet dabei apoptotische bzw. tote Zellen, die nur noch DNA-Fragmente aufweisen.

A498 Zellen zeigten nach Inkubation mit Cisplatin nach 24 h einen deutlichen S-Phasenarrest. Auf diesen folgte nach 48 h ein  $G_2/M$ -Arrest. Bis 96 h nahm der prozentuale Anteil aller drei Phasen ab, wobei gleichzeitig der Anteil an Zellen in der sub $G_1$ -Phase zunahm. Eine ähnliche Zellzyklusverteilung ließ sich für Carboplatin mit einer vergleichbaren Inkubation von 500  $\mu\text{M}$  erkennen. Nach 24 h zeigte sich ein S-Phasenarrest, gefolgt von einem  $G_2/M$ -Arrest nach 48 h und anschließendem Anstieg der sub $G_1$ -Phase.

Eine niedrigere Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  Carboplatin führte zeitlich gesehen zu einem anderen Ergebnis. Nach 24 h konnte ebenfalls ein S-Phasenarrest festgestellt werden. Dieser war jedoch prozentual gesehen, schwächer ausgeprägt als bei der Inkubation mit 500  $\mu\text{M}$ . Daneben war ein leichter Anstieg der  $G_2/M$ -Phase zu erkennen, wobei dieser sowohl bei Cisplatin als auch 500  $\mu\text{M}$  Carboplatin ebenfalls auftrat. Nach 48 h befand sich ein Großteil der Zellen wieder in der  $G_0/G_1$ -Phase. Bei einer Nachinkubationszeit von 72 h konnte kein Unterschied mehr in der Verteilung der Zellzyklusphasen im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden. Schließlich stieg nach 96 h der Anteil der sub $G_1$ -Phase leicht an, jedoch deutlich geringer als bei 500  $\mu\text{M}$  Carboplatin. Die Zellzyklusverteilung von 200  $\mu\text{M}$  Carboplatin deutet daraufhin, dass die Zelle verursachte DNA-Schäden vermutlich repariert und nicht in die Apoptose geht.

Bei erneutem Betrachten der relativen Zellzahl von Carboplatin (Abbildung 5.1) bei 200  $\mu\text{M}$  lässt sich eine Reduktion der Zellzahl auf nur ca. 70 % erkennen. Dies stellt eine geringe zytotoxische Wirkung dar, im Vergleich zur Wirkung bei 500  $\mu\text{M}$  von ca. 20 %. Generell verläuft die Kurve der relativen Zellzahl von Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin deutlich flacher. Dies spricht, wie in Kapitel 5.1.2 bereits diskutiert, zusammen mit den Aufnahme- sowie Platinierungsdaten, für eine langsamere Reaktionskinetik für Carboplatin.



**Abbildung 5.10: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung in A498 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** A498 Zellen wurden zunächst für 1 h mit jeweils 50 µM Cisplatin, 20 und 50 µM Oxaliplatin oder 200 und 500 µM Carboplatin inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 24, 48, 72 und 96 h weiter kultiviert. Zur Messung der Zellzyklusverteilung am Durchflusszytometer wurden die Zellen mit dem DNA interkalierenden Farbstoff DAPI (4',6'-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen  $\pm$  Standardabweichung.

In der Genexpression der Gene der DNA-Schadensantwort und -Reparatur war eine deutliche Erhöhung der Genexpression von NER-Genen erst ab 300  $\mu\text{M}$  Carboplatin zu erkennen, so dass vermutlich erst bei höheren Konzentrationen ausreichend exzessive DNA-Schäden entstehen. Dies könnte die unterschiedliche Zellzyklusverteilung von 200 und 500  $\mu\text{M}$  Carboplatin erklären. Demnach könnte die Zelle bei 200  $\mu\text{M}$  Carboplatin, die DNA-Schäden noch ausreichend reparieren, weshalb der Zellzyklusarrest nach 72 h wieder aufgehoben ist. Ab einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  scheint die DNA-Reparaturkapazität folglich überschritten zu sein, weshalb der Zellzyklusarrest weiter anhält. Prinzipiell verursacht Carboplatin jedoch dieselbe zelluläre Antwort wie Cisplatin, da es dieselben DNA-Schäden induziert. Lediglich die Kinetik, d.h. wie schnell der Schaden entsteht und somit auch wie schnell eine zelluläre Antwort hervorgerufen wird, unterscheidet sich, weshalb Carboplatin erst ab einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  zu einer vergleichbaren Antwort wie Cisplatin führt.

Die beschriebene Zellzyklusverteilung von Cisplatin wurde in verschiedenen Studien ebenfalls gezeigt (Cepeda et al., 2007; Siddik, 2003). Sorenson und Eastman fanden in murinen Leukämiezellen L1210 ebenfalls einen S-Phasenblock, gefolgt von einem  $G_2$ -Arrest (Sorenson und Eastman, 1988). Knudsen und Kollegen konnten, wie auch Sorenson und Eastman, einen S-Phasenarrest nach Behandlung von murinen embryonalen Fibroblasten mit Cisplatin feststellen (Knudsen et al., 2000). Es zeigte sich außerdem, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Zellzyklus und der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität gibt (Price et al., 2009). Da sich Nierenzellen *in vivo* normalerweise in der  $G_0$ -Phase, d.h. in einem Ruhezustand, befinden, wird der Zellzyklus nur durch äußere Einflüsse aktiviert. Eine Behandlung mit Cisplatin scheint zu einer Aktivierung des Zellzyklus zu führen (Price et al., 2009). Megyesi und Kollegen zeigten in einer *in vivo* Studie in Mäusen mit Wildtyp p21 und Mäusen mit p21 Deletion (p21(-/-)), dass eine Induktion von p21 einen protektiven Effekt auf Nierenzellen hat (Megyesi et al., 1998). So kommt es vermutlich zu einem Zellzyklusarrest und einer erhöhten DNA-Reparatur. Miyaji und Kollegen zeigten in einer Studie an Ratten, dass zwischen zwei Zyklen an Cisplatin-Expositionen p21 und PCNA überexprimiert werden. Es wird diskutiert, dass dies dazu beitragen könnte, dass Nierenzellen resistent gegenüber einer weiteren Cisplatin-induzierten Nierenschädigung werden (Miyaji et al., 2001). Inguaggiato und Kollegen fanden außerdem einen Zusammenhang zwischen einer Überexpression von HMOX1 und einer vermehrten Expression von p21 in Nierenzellen aus dem Schwein (LLC-PK1). Dies führte ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin-induzierten Nierenschäden (Inguaggiato et al., 2001).

Oxaliplatin zeigte eine gänzlich andere Verteilung des Zellzyklus. Sowohl für 20 als auch 50  $\mu\text{M}$  konnte kaum eine Veränderung der Verteilung der Phasen ermittelt werden. Bei einer 1 h Behandlung von A498 Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  Oxaliplatin zeigte sich nach 24 h eine minimale Erhöhung der  $G_0/G_1$ -Phase auf Kosten der  $G_2/M$ -Phase. Mit Einbezug der Standardabweichungen ist im weiteren Verlauf kein Unterschied zur Kontrolle mehr erkennbar. Nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Oxaliplatin zeigte sich nach 24 h eine minimale Abnahme der Anzahl der Zellen in der S-Phase, wobei gleichzeitig der Anteil der Zellen in allen anderen Phasen minimal erhöht war. Darauf folgt eine minimale Zunahme der Zellen in der  $G_2/M$ -Phase nach 48 h. Diese minimale Zunahme hält sich bis

96 h, wobei sich außerdem auch der Anteil der subG<sub>1</sub>-Phase leicht erhöht. Deutliche Änderungen in der Verteilung der Zellzyklusphasen zeigten sich im Vergleich zu Cisplatin und Carboplatin aber nicht. Obwohl auf Genexpressionsebene ein Großteil der Gene eine veränderte Expression aufwiesen, zeigte sich keine Auswirkung darauf auf funktioneller Ebene.

Voland und Kollegen untersuchten den Einfluss von Oxaliplatin und Cisplatin auf den Zellzyklus in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HCT116. In ihrer Studie wurden die Zellen für 24 h mit 1 und 5 µM der jeweiligen Substanz behandelt. Die Behandlung der Zellen mit 5 µM Cisplatin führte ebenfalls zu einem S-Phasen- sowie G<sub>2</sub>/M-Arrest. Im Hinblick auf die Behandlung mit Oxaliplatin interpretieren sie ihre Ergebnisse als starken G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Arrest, wobei sie bei einer Konzentration von 1 µM Oxaliplatin lediglich eine Erhöhung des Anteils der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase von 6 und in der G<sub>1</sub>-Phase von 10 Prozentpunkte ermitteln konnten. Der Anteil der S-Phase nahm im Zuge dessen um 16 Prozentpunkte ab (Voland et al., 2006). Im Vergleich zu Cisplatin sahen sie folglich auch keinen großen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der Zellen.

Mit Hilfe einer *Microarray* Analyse untersuchten sie weiter den Einfluss der beiden Substanzen auf die Genexpression der Zellen. Durch eine Clusteranalyse konnten sie drei verschiedene Gencluster ermitteln. Es zeigte sich, dass Cisplatin und Oxaliplatin in zwei der drei Cluster ähnliche Genexpressionsmuster aufwiesen, wohingegen sie sich im dritten Cluster gänzlich voneinander unterschieden. In diesem Cluster befanden sich u.a. Gene für die Zellzyklusregulation und Zellproliferation sowie der DNA-Replikation. Sie kommen letztlich zu dem Schluss, dass Cisplatin und Oxaliplatin zwei verschiedene Wirkmechanismen aufweisen (Voland et al., 2006).

William-Faltaos und Kollegen führten ebenfalls Untersuchungen der Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit Oxaliplatin durch. Dabei verwendeten sie vier verschiedene humane Tumorzelllinien. Sie untersuchten die Kolonkarzinomzelllinie HT29, die Brustkrebszelllinie MCF-7, die Lungenkarzinomzelllinie A549 sowie die Zervixkarzinomzelllinie HeLa. Für alle vier Zelllinien zeigten sich jeweils unterschiedliche Zellzyklusverteilungen. Die HT29 sowie HeLa Zellen zeigten nach 24 h Nachinkubation einen S-Phasenarrest, wohingegen die MCF-7 Zellen einen G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Arrest aufwiesen. Nach 72 h zeigten diese drei Zelllinien einen G<sub>2</sub>/M-Arrest. Die A549 Zellen zeigten einen leichten G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Arrest nach 24 h der bis zu 72 h anhielt (William-Faltaos et al., 2006). Der Einfluss von Oxaliplatin auf die Zellzyklusverteilung scheint demnach zelltypabhängig zu sein.

Die Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchung der DNA-Schadensantwort und -Reparatur sowie der Zellzyklusregulation und Zellproliferation deuten ebenfalls wie in den Untersuchungen von Voland und Kollegen (Voland et al., 2006) auf einen anderen Wirkmechanismus für Oxaliplatin, im Vergleich zu Cisplatin und Carboplatin, hin. Die Cisplatin- und Oxaliplatin-induzierten DNA-Schäden scheinen in der Zelle zu einer unterschiedlichen Antwort zu führen.

### 5.1.6 Oxidative Stress- und Inflammationsantwort

Oxidativer Stress entsteht durch eine Imbalance zugunsten von reaktiven Sauerstoffspezies auf Kosten antioxidativer Schutzsysteme (Gorrini et al., 2013). Im normalen Zustand einer Zelle sind ROS wichtige Signalüberträger. Kommt es aber zu einem Überschuss an ROS, entstehen vermehrt oxidative Schäden an zellulären Makromolekülen. Oxidativer Stress kann so zur Beeinträchtigung der normalen Funktion einer Zelle führen oder gar den Zelltod auslösen. Viele der heute eingesetzten Chemotherapeutika führen zur Bildung von ROS und somit zu oxidativem Stress. Das Problem dabei ist, wenn die ROS-Bildung nicht zum eigentlichen Wirkmechanismus der Substanz gehört, um Tumorzellen abzutöten, sondern zu Nebenwirkungen im Normalgewebe führt (Chen et al., 2007). Zu diesen Substanzen gehört auch Cisplatin.

Verschiedene Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der Bildung von ROS und einer Behandlung mit Cisplatin (Berndtsson et al., 2007; Bragado et al., 2007; Marullo et al., 2013; Tsutsumishita et al., 1998). Oxidativer Stress soll dabei zur Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität beitragen (dos Santos et al., 2012; Pabla et al., 2008). Verschiedene Mechanismen sollen dabei zur Induktion von oxidativem Stress führen. Unter anderem soll eine verminderte Aktivität von antioxidativen Enzymen dazu beitragen (Huang, 2001; Husain et al., 1998; Hanigan und Devarajan, 2003; Sadzuka et al., 1992). Weiterhin wird postuliert, dass Cisplatin vermehrt an die mitochondriale DNA (mDNA) bindet und so zu einer mitochondrialen Dysfunktion führt (Kohno et al., 2015; Marullo et al., 2013; Santos et al., 2007).

Carboplatin führt zwar nicht wie Cisplatin zu Nephrotoxizität, weist aber dennoch verschiedene Nebenwirkungen auf. Ototoxizität stellt dabei eine dieser Nebenwirkungen dar. Ein zugrundeliegender Mechanismus könnte die Entstehung von oxidativem Stress durch eine verminderte Aktivität von antioxidativen Enzymen darstellen (Husain et al., 2001).

Die dosislimitierende Nebenwirkung von Oxaliplatin ist die Neurotoxizität. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher kaum erforscht. Di Cesar Mannelli und Kollegen untersuchten in zwei Studien den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und durch Oxaliplatin induzierten Neuropathien. Mit Hilfe von Antioxidantien stellten sie, sowohl in einem Tierversuch als auch in *in vitro* Versuchen in verschiedenen neuronalen Zellen, einen Zusammenhang zwischen der Toxizität von Oxaliplatin und oxidativem Stress fest (Di Cesare Mannelli et al., 2012, 2013a). McQuade und Kollegen fanden ebenfalls in einer Tierstudie ein erhöhtes Level an Superoxidradikalen in Darmzellen nach Behandlung mit Oxaliplatin (McQuade et al., 2016).

Mit Hilfe der Genexpressionanalyse wurden Gene für die oxidative sowie generelle Stressantwort untersucht. Nach einstündiger Inkubation von A498 Zellen mit den drei platinbasierten Substanzen erfolgte nach 24 h die Genexpressionsanalyse (Abbildung 5.11). Generell konnten kaum Veränderungen in der Genexpression ausgemacht werden. Cisplatin zeigte lediglich für das Gen *GPX2*, das für die Glutathionperoxidase codiert und für die Detoxifizierung von  $H_2O_2$  verantwortlich ist, eine konzentrationsabhängige vermehrte Expression. Daneben wurden außerdem die Gene *HMOX1* und *SEPP1* konzentrationsabhängig vermindert exprimiert. *HMOX1* codiert für die Hämoxigenase 1,



ein Enzym, das essentiell für die Oxidation von Häm zu Biliverdin ist (Agarwal et al., 1995). Eine vermehrte Expression von *HMOX1* soll eine protektive Wirkung gegen Oxidantien haben. Shiraishi und Kollegen untersuchten die Rolle von *HMOX1* in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität. Dabei konnten sie zeigen, dass eine vermehrte Expression in renalen Epithelzellen eine protektive Wirkung gegenüber Cisplatin aufwies. Ein *knockout* von *HMOX1* in Mäusen führte hingegen zu einer stärkeren nephrotoxischen Wirkung von Cisplatin (Shiraishi et al., 2000).

Selenoprotein P, für das *SEPP1* codiert, fungiert neben dem Transport von Selen als Antioxidant sowie als Schwermetallchelator (Gresner et al., 2009). Eine verminderte Expression der beiden Gene könnte folglich negative Folgen für die Zelle haben, da ihre antioxidative Schutzfunktion nicht mehr gegeben ist.

Für Carboplatin zeigten sich keine relevanten Veränderungen, lediglich bei 500  $\mu\text{M}$  wurde *FTH1* vermindert exprimiert. *FTH1* codiert für eine der zwei Untereinheiten von Ferritin. Ferritin ist essentiell für die Eisenhomöostase. Indem es  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert, verhindert es außerdem die Fenton Reaktion, bei der ROS entstehen (Lee et al., 2009). Eine Herunterregulierung des Enzyms hat folglich negative Auswirkungen, indem vermehrt ROS entstehen können.

Die Behandlung mit Oxaliplatin führte, wie auch bei Cisplatin, zu einer konzentrationsabhängigen verminderten Expression von *HMOX1* und *SEPP1*. Weiterhin kam es zu einer vermehrten Expression von *GPX1* und *SOD2*. *GPX1* stellt dabei eine weitere Isoform der Glutathionperoxidase dar. *SOD2* codiert für das Superoxidradikal-detoxifizierende Enzym Superoxiddismutase 2. Die Isoform des Enzyms kommt dabei vor allem im Mitochondrium vor (Zelko et al., 2002). Folglich werden antioxidative Schutzsysteme sowohl vermehrt, aber auch gleichzeitig vermindert exprimiert.

Bisher zeigten sich für Cisplatin und Carboplatin in den Genexpressionsanalyse kaum Unterschiede. Dies erscheint logisch, da sie genau die gleichen DNA-Schäden verursachen und somit dieselbe DNA-Schadensantwort hervorrufen. In der oxidativen Stressantwort zeigte sich nun aber ein Unterschied in der Genexpression. Eine Behandlung mit Cisplatin führte zwar auch nur zu einer veränderten Genexpression von drei Genen, jedoch zeigte Carboplatin keine Veränderungen. Selbst bei sehr hohen Konzentrationen von 500  $\mu\text{M}$  zeigte sich lediglich für *FTH1* eine minimale Veränderung. Dies könnte auf die bereits erwähnte geringere Reaktivität von Carboplatin zurückzuführen sein. Somit würde sich schlussfolgern lassen, dass die Entstehung von oxidativem Stress unabhängig von induzierten DNA-Schäden der Substanzen ist. A498 Zellen entstammen der Niere, weshalb sich weiter schlussfolgern lassen könnte, dass die fehlende Induktion von oxidativem Stress durch Carboplatin mit ein Grund sein könnte, warum Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin nicht zu Nephrotoxizität führt.

Generell lässt sich jedoch anhand der Genexpressionsdaten nur schwer eine Aussage über die Induktion von oxidativem Stress treffen. Die Genexpressionsmuster von Cisplatin und Oxaliplatin weisen jedenfalls daraufhin, dass die Substanzen eventuell oxidativen Stress verursachen könnten. Da sich die Genexpressionsmuster untereinander leicht unterscheiden, könnte für jede der Substanzen ein unterschiedlicher Mechanismus zugrundeliegen. Die Analyse des Zellzyklus zeigte jedoch, dass die



**Abbildung 5.11: Genexpression verschiedener (oxidativer) Stressantwortgene nach Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin in A498 Zellen.** Zur Untersuchung der Genexpression wurden A498 Zellen für 1 h mit Cisplatin (10, 20, 50  $\mu\text{M}$ ), Carboplatin (50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{M}$ ) sowie Oxaliplatin (20, 50, 100, 150  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend für 24 h nachinkubiert. Mittels Hochdurchsatz RT-qPCR erfolgte dann die Bestimmung der Genexpression. Dargestellt sind die  $\log_2$  Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

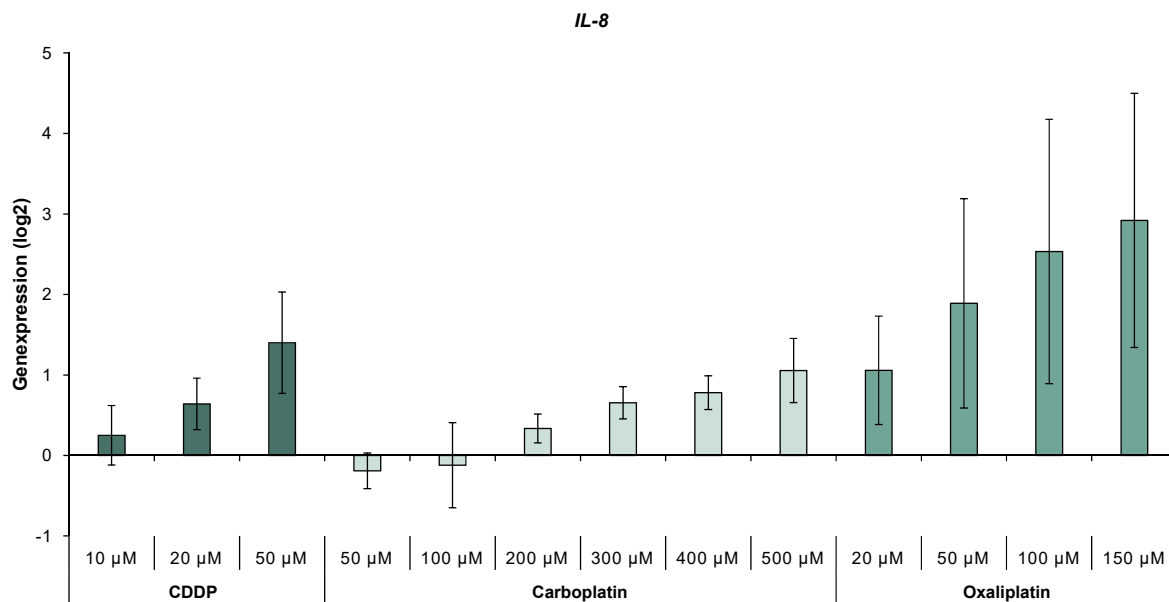
Genexpressionsebene nicht immer mit der funktionellen Ebene übereinstimmen muss. Bisherige Versuche, die Induktion von ROS nachzuweisen, u.a. mit dem Farbstoff CellRox® Green, führten jedoch zu keinen verlässlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt), weshalb hier noch weitere Methoden in Betracht gezogen werden müssten. Anhand der bisherigen Datenlage lässt sich deshalb keine eindeutige Aussage über die Induktion von oxidativem Stress treffen.

Neben der Induktion von oxidativem Stress stehen außerdem Entzündungsreaktionen im Verdacht zur Nephrotoxizität von Cisplatin beizutragen (dos Santos et al., 2012). Es zeigte sich nach Behandlung mit Cisplatin eine vermehrte Expression von Zytokinen und Chemokinen (Pabla et al., 2008; Ramesh und Reeves, 2002). Vor allem TNF- $\alpha$  scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Miller et al., 2010). Ramesh und Reeves konnten in verschiedenen Studien zeigen, dass durch Cisplatin induzierte Entzündungsprozesse in der Niere vor allem auf eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  zurückzuführen sind (Ramesh und Reeves, 2002, 2003, 2005). Ein Chemokin, das neben dem Zytokin TNF- $\alpha$  eine Rolle in Cisplatin-induzierten Entzündungsprozessen spielen soll, ist Interleukin 8

(IL-8) (Vyas et al., 2014). Im Normalzustand einer Zelle wird die Transkription von *IL-8* durch verschiedene Faktoren unterdrückt. Erfährt die Zelle Stress, wird die Transkription von *IL-8* u.a. durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert (Jundi und Greene, 2015). Aber auch TNF- $\alpha$  oder ROS können zur Aktivierung von *IL-8* führen (Campbell et al., 2013).

Eine inflammatorische Antwort in Oxaliplatin-induzierten Neuropathien ist bisher fraglich (Di Cesare Mannelli et al., 2013a, 2014). Ning und Kollegen fanden jedoch einen Zusammenhang zwischen der Toxizität von Oxaliplatin und der Expression von *IL-8* in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien. Eine Überexpression von *IL-8* führte zu einer verminderten Toxizität von Oxaliplatin (Ning et al., 2011). Dabkeviciene und Kollegen konnten diese Befunde ebenfalls bestätigen (Dabkeviciene et al., 2015). *IL-8* scheint demnach eine Rolle im Wirkmechanismus von Oxaliplatin zu spielen.

Abbildung 5.12 zeigt die Genexpression des Inflammationsmarkers *IL-8* nach Behandlung von A498 Zellen mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin. Es wird ersichtlich, dass alle drei Substanzen zu einer konzentrationsabhängigen, vermehrten Expression von *IL-8* führten. Cisplatin und Carboplatin zeigten jedoch erst ab der jeweils höchsten Konzentration eine relevante veränderte Expression, wohingegen Oxaliplatin bereits bei der niedrigsten Konzentration im relevanten Bereich lag. Generell zeigte Oxaliplatin die stärksten Veränderungen in der Expression von *IL-8*. Dies könnte dafür sprechen, dass *IL-8*, wie bereits erwähnt, Teil des Wirkmechanismus von Oxaliplatin ist.



**Abbildung 5.12: Genexpression des Inflammationsmarkers *IL-8* nach Behandlung von A498 Zellen mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** A498 Zellen wurden jeweils für 1 h mit Cisplatin (10, 20, 50 µM), Carboplatin (50, 100, 200, 300, 400, 500 µM) oder Oxaliplatin (20, 50, 100, 150 µM) inkubiert. Nach der einstündigen Behandlung erfolgte eine Nachinkubationszeit von 24 h. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR bestimmt. Dargestellt sind die log2 Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung.

Neben *IL-8* soll außerdem *VEGFA* eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen einnehmen. *VEGFA* gehört zur Familie der *vascular endothelial growth factors* (VEGF), welche u.a. eine Rolle in der Proliferation und Migration von Endothelzellen spielt (Martin et al., 2009). Martin und Kollegen fanden heraus, dass es einen Zusammenhang zwischen der Expression von *NFκB*, *VEGFA* und *IL-8* während Entzündungsprozessen gibt (Martin et al., 2009). In Kapitel 5.1.3 zeigte sich eine konzentrationsabhängige vermehrte Expression der NF-κB Gene *NFKB1* und *NFKB2*, des NF-κB Inhibitors *NFKBIA* sowie *VEGFA* nach Behandlung mit Oxaliplatin. Für Cisplatin zeigte sich ebenfalls eine vermehrte Expression des NF-κB Inhibitors *NFKBIA* nach einer Behandlung mit 20 und 50 μM. Bei einer Konzentration von 10 μM Cisplatin zeigte sich eine verminderte Expression des Gens. Interessanterweise zeigte die Expression von *VEGFA* dieselben Einflüsse. Dies könnte folglich dafür sprechen, dass sowohl Cisplatin als auch Oxaliplatin eine inflammatorische Antwort in A498 Zellen auslösen, wobei Oxaliplatin vermutlich eine deutlichere Antwort hervorruft. Carboplatin hingegen zeigte keine Veränderungen in der Expression der erwähnten Gene, wodurch sich hier keine inflammatorische Antwort vermuten lässt.

Um eine genauere Aussage treffen zu können, müssten allerdings noch weitere inflammatorische Marker untersucht werden.

### 5.1.7 Induktion des Zelltods

Die erwünschte Wirkung eines Chemotherapeutikums ist der Zelltod der Tumorzelle. Eine Zelle kann über verschiedene Wege den Tod einleiten. Die zwei wichtigsten Wege sind die Apoptose und die Nekrose. Als sogenannter programmierter Zelltod gilt dabei die Apoptose, im Vergleich dazu gilt die Nekrose als eher unkontrollierter Mechanismus (Edinger und Thompson, 2004). Der apoptotische Zelltod lässt sich auf zwei Wegen in der Zelle einleiten. Der extrinsische Weg wird über sogenannte Todesrezeptoren eingeleitet. Die dadurch eingeleitete Signalkaskade führt zur Aktivierung der Caspase 8. Die Einleitung der Apoptose über den intrinsischen Weg erfolgt über die Mitochondrien und ist p53-abhängig (Elmore, 2007; Nikolettou et al., 2013). Durch eine erhöhte Permeabilisierung der Mitochondrienmembran tritt vermehrt Cytochrom c in das Cytosol aus. Die weitere Signaltransduktion beinhaltet schließlich die Aktivierung der Caspase 9. Sowohl Caspase 8 als auch Caspase 9 aktivieren letztlich die Caspase 3, die Caspase, die schlussendlich die Apoptose einleitet (Elmore, 2007). Morphologisch charakterisiert sich die Apoptose durch ein Abrunden der Zellen (Pyknose), Chromatinkondensation, Zellkernfragmentierung sowie der Bildung von sogenannten apoptotischen Körpern (Nikolettou et al., 2013). Anhand der Morphologie lässt sich die nekrotische Zelle von der apoptotischen Zelle unterscheiden. Nekrose führt zu einem Anschwellen von Zellorganellen sowie dem Verlust der Membranintegrität (Zong und Thompson, 2006). Dadurch kommt es bei der Nekrose vermehrt zu Entzündungen (Nikolettou et al., 2013). Deshalb ist es im Hinblick auf Chemotherapeutika erstrebenswert, dass diese den Zelltod hauptsächlich über die Apoptose induzieren. Allerdings geht die Zelle nicht nur über einen der Wege in den Zelltod, sondern Apoptose und Nekrose laufen meistens zusammen ab, wobei einer der Wege

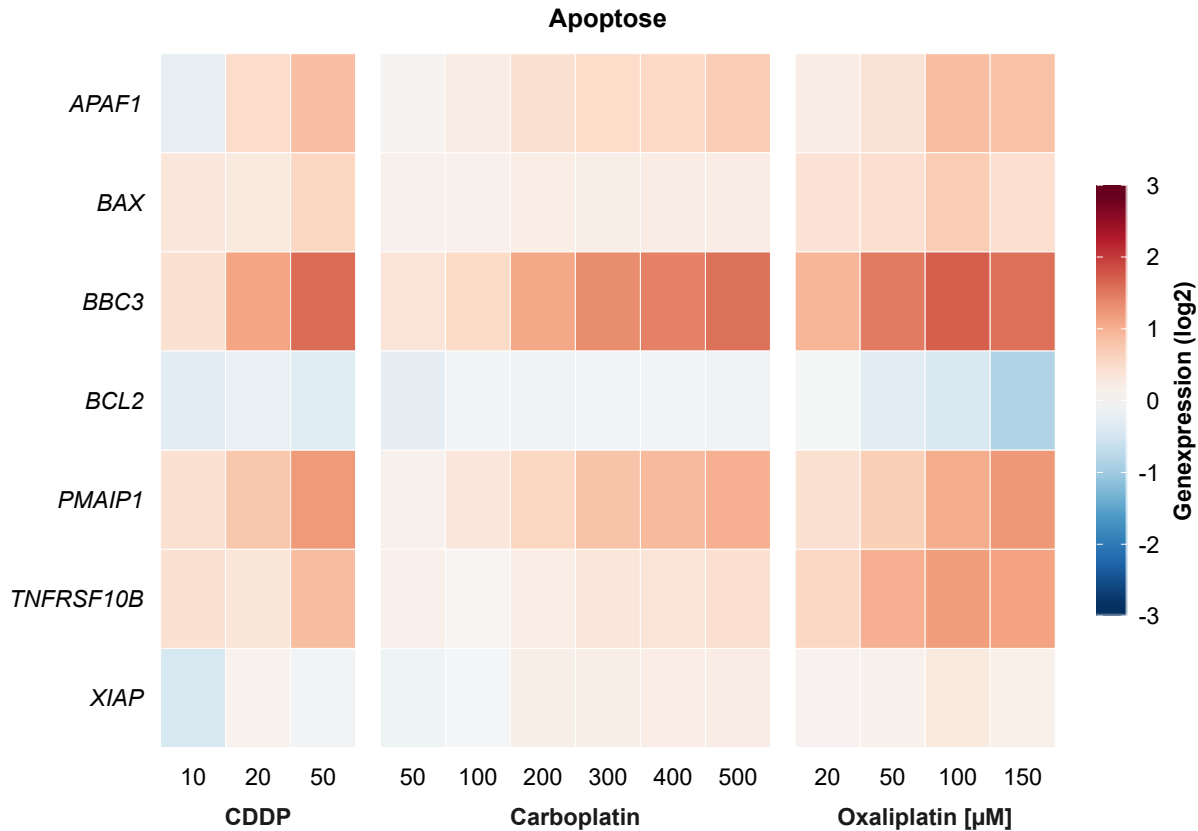
bevorzugt abläuft (Zong und Thompson, 2006).

Cisplatin induziert den Zelltod in Tumorzellen hauptsächlich über die Apoptose (Gonzalez et al., 2001; Siddik, 2003). Es zeigte sich, dass Cisplatin die Apoptose sowohl über den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg einleitet. Ob ein Weg bevorzugt eingeleitet wird, scheint außerdem zelltypabhängig zu sein (Micheau et al., 1997; Kuwahara, 2000; Pabla et al., 2008; Wang et al., 2000). Im Hinblick auf Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität stellte sich heraus, dass Cisplatin in hohen Konzentrationen Nekrose verursacht, wohingegen niedrige Konzentrationen bevorzugt zur Einleitung der Apoptose führten (Lau, 1999; Lieberthal et al., 1996). Cummings und Schellmann zeigten außerdem einen Zusammenhang zwischen p53 und der Apoptose in Nierenzellen. Sie stellten zudem fest, dass nur 50 % der Cisplatin-induzierten Apoptose Caspasen-abhängig waren (Cummings, 2002). Lock und Kollegen konnten dies in der Nierenkarzinomzelllinie Caki-1 sowie in A498 Zellen bestätigen (Lock et al., 2007).

Oxaliplatin induziert ebenfalls in Tumorzellen Apoptose. Faivre und Kollegen konnten in A2780 Zellen, einer Ovarialkarzinomzelllinie, und CEM Zellen, Leukämiezellen, zeigen, dass Oxaliplatin ebenso potent die Apoptose einleitet wie Cisplatin. In normalen Prostatazellen hingegen zeigte sich keine Induktion der Apoptose durch Oxaliplatin (Faivre et al., 2003). Hayward und Kollegen untersuchten in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 den Zusammenhang zwischen p53 und der durch Oxaliplatin-induzierten Apoptose. In verschiedenen Subzelllinien mit *knockouts* von p53, Bax und p21 offenbarte sich, dass Oxaliplatin über p53 und Bax den intrinsischen Apoptoseweg induziert (Hayward et al., 2004). Gourdiere und Kollegen konnten dies in ihren Studien in HCT116 Zellen ebenfalls belegen (Gourdiere et al., 2004). In einer Studie mit der Kolonkarzinomzelllinie HCT15, die einen heterozygoten p53 Status aufweist (wt/mutant), stellten Marchetti und Kollegen fest, dass Oxaliplatin sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptoseweg einleitet (Marchetti et al., 2004).

In Abbildung 5.13 sind die Genexpressionsprofile apoptotischer Gene nach Behandlung von A498 Zellen mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin dargestellt. Für alle drei Substanzen zeigte sich eine konzentrationsabhängige vermehrte Expression von *APAF1*, *BBC3* und *PMAIP1*. Alle drei Gene sind proapoptotisch und am intrinsischen Apoptoseweg beteiligt (Abbildung 5.14). *BBC3* (*BCL2 binding component 3*), das für das Protein PUMA codiert, sowie das für NOXA codierende Gen *PMAIP1* (*phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) gehören der sogenannten BCL-2 Familie an (Oda, 2000; Yu et al., 2001). Durch einen DNA-Schaden können sie über p53 transkriptionell aktiviert werden und so den intrinsischen Apoptoseweg einleiten (Fulda und Debatin, 2006). Durch die Aktivierung proapoptotischer Proteine, kommt es zu einer erhöhten Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran. Infolgedessen treten Proteine, die sich normalerweise in der Membran befinden, in das Cytosol über. Eines dieser Proteine ist Cytochrom C. Dieses bildet dann im Cytosol ein sogenanntes Apoptosom, d.h. einen Komplex mit APAF1 und Caspase 9. Dieser Komplex aktiviert weiter die Caspase 3, wodurch die Apoptose eingeleitet wird (Fulda und Debatin, 2006). P53 kann zusätzlich über eine transkriptionsunabhängige Aktivierung von BAX

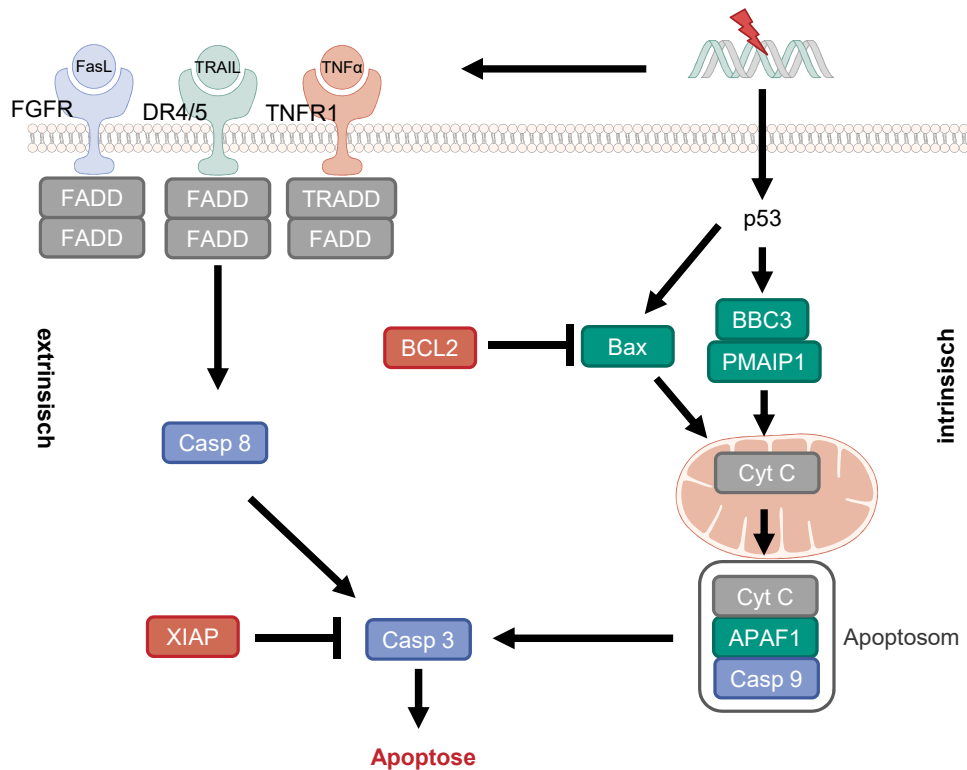
ebenfalls zur Permeabilisierung der Membran führen. Weiter kann es außerdem an die antiapoptotischen Proteine BCL2 und BCL-xL binden, wodurch die Membran ebenfalls destabilisiert wird, da die antiapoptotische Wirkung der Proteine inhibiert wird (Moll et al., 2005).



**Abbildung 5.13: Genexpression von pro- und antiapoptotischen Genen in A498 Zellen nach Inkubation mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** A498 Zellen wurden jeweils für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin, Carboplatin oder Oxaliplatin inkubiert. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Zellen für weitere 24 h kultiviert und anschließend die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR ermittelt. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelte Kontrollprobe normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Nach Behandlung von A498 Zellen mit Oxaliplatin zeigte sich eine konzentrationsabhängige vermehrte Expression von *BAX* (*BCL2 associated X, apoptosis regulator*), wobei diese noch unterhalb des relevanten Bereichs lag. Für Cisplatin konnte ebenfalls eine vermehrte Expression von *BAX* ermittelt werden, jedoch auch unterhalb des relevanten Bereichs. Dennoch lässt sich im Vergleich zu Carboplatin eine Tendenz zu einer vermehrten Expression erkennen. Carboplatin zeigte im Vergleich zu Cisplatin und Oxaliplatin keine Veränderung in der Expression. Dies könnte mit der Expression von p53 zusammenhängen, da *BAX* durch p53 aktiviert werden kann. Verglichen mit Cisplatin und Oxaliplatin wies Carboplatin das geringste p53 Proteinlevel auf. Für Oxaliplatin lässt sich außerdem eine konzentrationsabhängige reduzierte Expression von *BCL2* erkennen. Eine reduzierte Expression könnte dafür sprechen, dass p53 an *BCL2* bindet und so dessen antiapoptotische

Wirkung inhibiert.



**Abbildung 5.14: Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg.** Entschieden die Zelle nach DNA-Schäden die Apoptose einzuleiten, kann dies über den intrinsischen und/oder den extrinsischen Apoptoseweg ablaufen. Der intrinsische Weg läuft über p53 ab. Eine Aktivierung durch p53 von BBC3 und PMAIP1 sowie BAX führt zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membran. Dadurch kommt es zu einem Austritt von Cytochrom C (Cyt C) in das Zytosol, wo es zusammen mit APAF1 und der Caspase 9 (Casp 9) ein sogenanntes Apoptosom bildet, das wiederum die Caspase 3 aktiviert. Die Effektorcaspase leitet dann letztlich die Apoptose ein. Der extrinsische Weg läuft über Rezeptoren der TNF-Rezeptor Superfamilie ab. Durch Ligandenbindung des entsprechenden Liganden an den Rezeptor wird ein sogenannter DISC (*death-inducing signaling related apoptosis-inducing ligand*) aus FADD oder TRADD und der Caspase 8 gebildet. Dadurch wird letztlich die Caspase 3 aktiviert und somit die Apoptose eingeleitet.

Teil des extrinsischen Apoptosewegs sind Rezeptoren der TNF-Rezeptor Superfamilie (TNFRSF). *TNFRSF10B* codiert für den *death receptor 5* (DR5). Durch Ligandenbindung von TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) bildet der DR5 einen sogenannten DISC (*death-inducing signaling complex*) bestehend aus FADD (*Fas-associated protein with death domain*) und Caspase 8 (Nair et al., 2014). Caspase 8 aktiviert dann die Caspase 3, die dann wiederum die Apoptose einleitet (Abbildung 5.14). Cisplatin und Oxaliplatin zeigten beide nach Behandlung von A498 Zellen eine vermehrte Expression von *TNFRSF10B*. Dagegen zeigte Carboplatin nur eine minimal vermehrte Expression bei den höchsten Konzentrationen (300 - 500  $\mu\text{M}$ ). Daraus lässt sich schließen, dass Cisplatin und Oxaliplatin vermutlich sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsi-

schen Weg die Apoptose einleiten. Das Genexpressionsprofil von Carboplatin deutet nur auf eine Induktion der Apoptose über den intrinsischen Weg hin. Allerdings wurde auch nur ein Gen des extrinsischen Wegs untersucht, weshalb eine Induktion der Apoptose über den extrinsischen Weg nicht ausgeschlossen werden kann. Detaillierte Untersuchungen auf funktioneller Ebene würden hierüber weiter Aufschluss geben.

Die Genexpressionsprofile der drei platinbasierten Substanzen deuten auf eine Induktion des Zelltodes über die Apoptose hin. Deshalb wurde nachfolgend auf funktioneller Ebene die Induktion der Apoptose untersucht. Mit Hilfe des Proteins Annexin V, gekoppelt mit dem Fluorochrom FITC, lassen sich apoptotische Zellen am Durchflusszytometer analysieren. Um zusätzlich zwischen apoptotischen Zellen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden, wird der Farbstoff Propidiumiodid (PI) eingesetzt. Jedoch lässt sich dabei nicht zwischen nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen unterscheiden. In Abbildung 5.15 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung in A498 Zellen nach einstündiger Behandlung und jeweiliger Nachinkubationszeit (24, 48, 72, 96 h) dargestellt. Es handelt sich hierbei um dieselben Proben wie für die Zellzyklusbestimmung am Durchflusszytometer, weshalb dieselben Konzentrationen eingesetzt wurden.

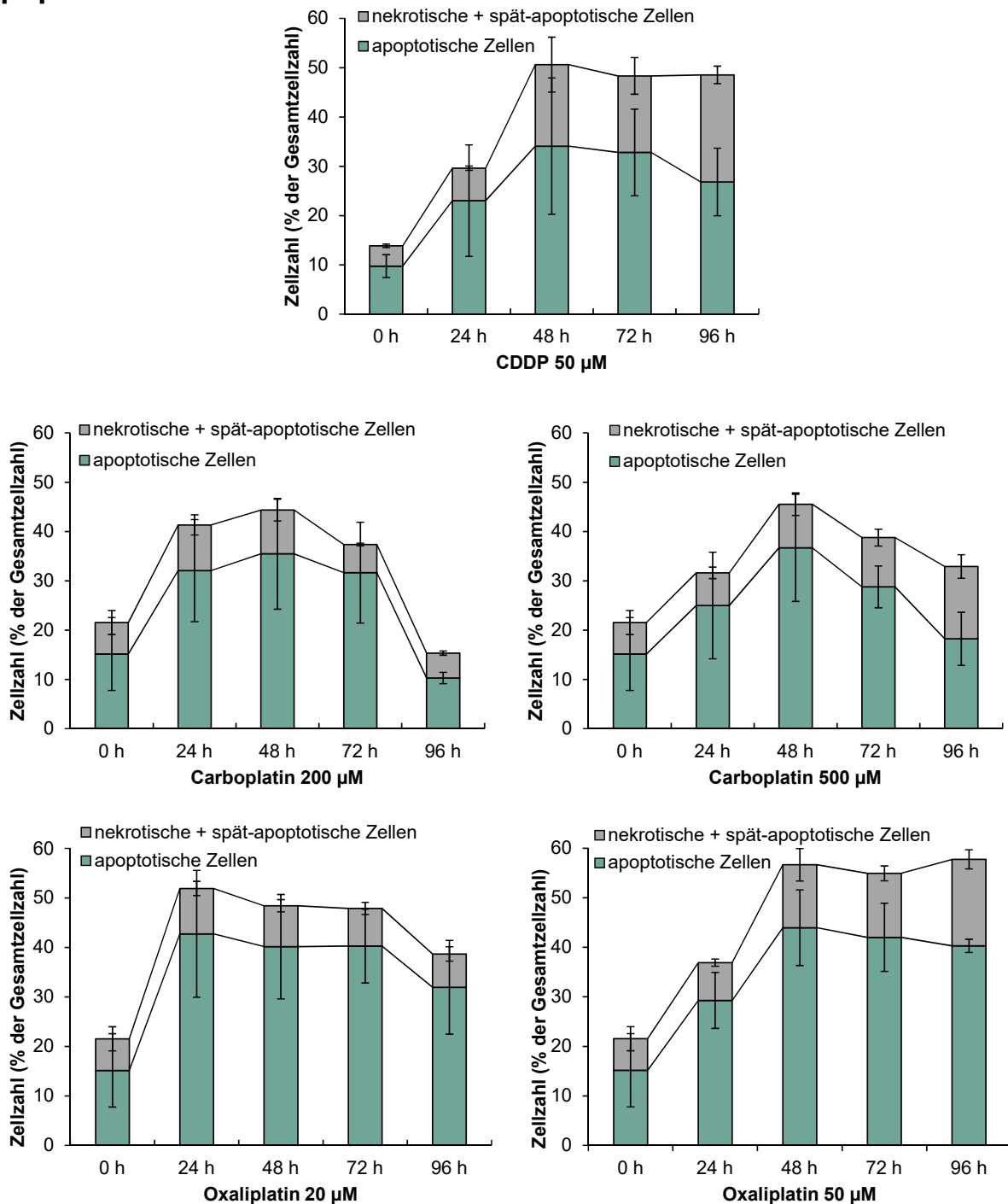
A498 Zellen zeigten einen Anstieg an apoptotischen Zellen bei einer Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Cisplatin nach 24 h Nachinkubation. Der Anteil an apoptotischen Zellen nahm nach 48 h weiterhin zu und blieb nach 72 h auf demselben Niveau. Nach 96 h nahm dann letztlich der Anteil an spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen zu. Die Durchflusszytometerdaten spiegeln demnach die Genexpressionsdaten wieder, die darauf hindeuteten, dass nach 24 h bereits die Apoptose eingeleitet wird.

Nach einer Inkubation von 200  $\mu\text{M}$  Carboplatin nahm der Anteil an apoptotischen Zellen ebenfalls zu und blieb bis 72 h Nachinkubationszeit erhalten. Interessanterweise nahm dann der Anteil an apoptotischen Zellen nach 96 h sehr stark ab. Dabei nahm der Anteil an lebenden Zellen wieder zu (siehe Anhang). Werden die Zellzyklusdaten mit einbezogen, so ist nach 72 h keine Veränderung mehr in der Zellzyklusverteilung im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich. Es scheint demnach, dass die Zellen sich ab diesem Zeitpunkt wieder vermehrt teilten. Ob die verursachten DNA-Schäden dabei repariert wurden, lässt sich jedoch nicht sagen. Bei einer Behandlung mit 500  $\mu\text{M}$  nahm der Anteil an apoptotischen Zellen bis 48 h zu und nahm bis 96 h wieder ab. Der Anteil an spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen nahm nach 96 h leicht zu, wobei generell der Anteil an lebenden Zellen ab 72 h bis 96 h wieder leicht zunahm. Selbst bei höheren Konzentrationen an Carboplatin schienen sich die A498 Zellen wieder vermehrt zu teilen, wobei der Anteil an lebenden Zellen in einem geringeren Ausmaß als bei 200  $\mu\text{M}$  wieder zunahm.

Nach einer Behandlung von A498 Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  Oxaliplatin nahm der Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach 24 h sehr stark zu. Über 40 % der Gesamtzellzahl waren dabei apoptotische Zellen. Im Vergleich dazu belief sich der Anteil an apoptotischen Zellen nach Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Cisplatin nach 24 h auf knapp über 20 %. Der Anteil an apoptotischen Zellen hielt sich bis 72 h, wobei er nach 96 h wieder leicht abnahm und die Anzahl an lebenden Zellen wieder leicht zunahm.



## Apoptose



**Abbildung 5.15: Untersuchung der Apoptose in A498 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** Zur Bestimmung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie wurden A498 Zellen zunächst für 1 h mit jeweils 50 µM Cisplatin, 200 und 500 µM Carboplatin oder 20 und 50 µM Oxaliplatin inkubiert. Die Zellen wurden danach für 24, 48, 72 und 96 h weiter kultiviert. Zur Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen + spät-apoptotischen Zellen wurden die Zellen zum einen mit Annexin V, zum anderen mit Propidiumiodid angefärbt und anschließend am Durchflusszytometer vermessen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an apoptotischen sowie nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen, wobei jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen gezeigt ist.

Eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Oxaliplatin führte zu einem zu Cisplatin vergleichbaren Anstieg der apoptotischen Zellen nach 24 h. Nach 48 h nahm der Anteil an apoptotischen Zellen auf ca. 40 % zu und hielt sich bis 96 h. Der Anteil an nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen nahm ebenfalls nach 48 h zu, blieb aber konstant bis 96 h. Im Vergleich zu Oxaliplatin und Carboplatin wies Cisplatin den höchsten Anteil an spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen auf.

Eine vermehrte Induktion der Nekrose könnte folglich zur Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität beitragen. Dennoch wird als Hauptmechanismus bei allen drei Substanzen die Apoptose eingeleitet.

## 5.2 Aufklärung und Einordnung des Wirkmechanismus von PN149

Obwohl die platinbasierte Chemotherapie seit Jahrzehnten eine der am häufigsten eingesetzten Chemotherapieformen ist, weist sie trotz hoher Effektivität immer noch negative Wirkungen auf. Alle drei klinisch zugelassenen Substanzen können zu einer, für jede Substanz unterschiedlichen, schweren und meist auch dosislimitierenden Nebenwirkung führen. Neben toxischen Nebenwirkungen stellen außerdem Resistenzen ein großes Problem dar. Diese können entweder dem Tumor bereits innewohnen oder sich während der mehrfachen Behandlung mit den Substanzen entwickeln. Trotz aller Bemühungen, die platinbasierte Chemotherapie zu verbessern, gibt es folglich immer noch gravierende negative Folgen. Deshalb ist es essentiell, die Therapieform weiter zu erforschen und zu entwickeln.

Eine Weiterentwicklung, die dabei in den Fokus geraten ist, sind Platin(IV)-Derivate. Sie haben den Vorteil, dass sie weniger reaktiv sind und im Vergleich zu ihren Platin(II)-Pendents können sie oral verabreicht werden. Weiterhin gelten sie als sogenannte *prodrugs*, d.h. sie werden erst innerhalb der Zelle in ihre aktive Platin(II)-Form umgewandelt (Kenny et al., 2017; Hall et al., 2007; Sen' et al., 2010).

Eines dieser Platin(IV)-Derivate stellt der Platin(IV)-nitroxyl-Komplex PN149 dar. Die Grundstruktur, auf die dieser Komplex aufbaut, ist die von Cisplatin. Zusätzlich weist er aber in axialer Position zwei lipophile Gruppen sowie anstelle einer Aminogruppe einen Aminonitroxylrest auf (Sen' et al., 2006). Die zusätzlichen lipophilen Gruppen ermöglichen eine Aufnahme der Substanz über passive Diffusion und somit unabhängig von Transportern. Der Aminonitroxylrest verleiht der Substanz antioxidative Eigenschaften, indem es die Superoxiddismutase nachahmt (Goldstein et al., 2003; Krishna et al., 1992). Da die Induktion von ROS eine Rolle in den toxischen Nebenwirkungen spielt, könnte dies zu verminderten toxischen Nebenwirkungen führen. Außerdem weisen Nitroxylradikale an sich eine Antitumoraktivität auf (Gariboldi, 1998; Suy et al., 2005).

Eine Studie, welche u.a. in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, untersuchte verschiedene PNCs und deren Antitumorwirkung im Vergleich zu Cisplatin in der Blasen-tumorzelllinie RT112 und deren Cisplatin-resistenten Sublinie RT112-CP. Dabei kristallisierte sich heraus, dass PNCs, im Gegensatz zu Cisplatin, keinen Unterschied in ihrer Effektivität in beiden Zelllinien aufwiesen und

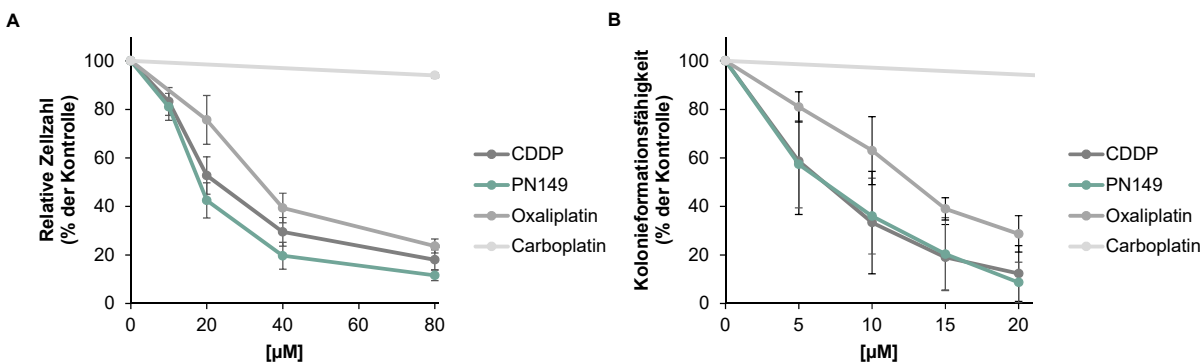
somit die Cisplatin-Resistenz überwinden konnten (Cetraz et al., 2017). Großes Potential zeigte dabei die Substanz PN149, weshalb der genaue Wirkmechanismus in dieser Arbeit weiter im Detail untersucht wurde und mit den Wirkmechanismen von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin verglichen wurde. Die Untersuchungen zum Wirkmechanismus wurden in A498 und teilweise in RT112 Zellen durchgeführt. Es handelt sich bei RT112 Zellen um Blasen-tumorzellen, die effektiv mit Cisplatin behandelt werden können. Aufgrund dessen wurde zusätzlich diese Zelllinie verwendet. Außerdem konnte so auf bisherige Ergebnisse aus Cetraz et al. (2017) aufgebaut werden. Die Ergebnisse wurden in Schoch et al. (2018) veröffentlicht und sind dem Anhang zu entnehmen.

### 5.2.1 Vergleich der Zytotoxizitätsstudien

Als potentiell platiniertes Chemotherapeutikum stellt sich zunächst die Frage der Effektivität von PN149 in Tumorzellen. In bisherigen Zytotoxizitätsstudien in RT112 Zellen zeigte PN149 dabei eine ähnliche Effektivität wie Cisplatin (Cetraz et al., 2017; Schoch et al., 2018). Sen' und Kollegen bestimmten ebenfalls die Zytotoxizität von PN149 in HeLa Zellen, einer Zervixkarzinomzelllinie, und H1299 Zellen, einer nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie, mittels MTT Test nach einer 24 h Inkubation. Dabei wies PN149 einen ähnlichen  $IC_{50}$  Wert in den HeLa Zellen wie Cisplatin auf. In den H1299 Zellen war Cisplatin sogar weniger effektiv als PN149 (Sen' et al., 2010). Bisherige Studien deuten also auf eine mit Cisplatin vergleichbare Zytotoxizität hin.

In Abbildung 5.16 ist die Zytotoxizität (RCC und CFA) von PN149, in grün hervorgehoben, im Vergleich zu den anderen drei platinbasierten Substanzen dargestellt. Dabei lässt sich erkennen, dass PN149 in A498 Zellen, sowohl in der Langzeittoxizität als auch der akuten Toxizität, eine ähnliche Effektivität wie Cisplatin aufwies. Dies spiegelte sich auch in den berechneten  $IC_{50}$  Werten wider (Tabelle 5.2). Mit einem  $IC_{50}$  Wert von 6  $\mu$ M im CFA zeigte PN149 die gleiche zytotoxische Effektivität wie Cisplatin. In der Bestimmung der relativen Zellzahl (RCC) wurde für PN149 ein  $IC_{50}$  Wert von 20  $\mu$ M berechnet, damit ist es sogar effektiver als Cisplatin mit 27  $\mu$ M.

Die oktaedrische Struktur des Komplexes sowie das gesättigte Platin(IV)-Zentralatom führen dazu, dass der Komplex resistenter gegenüber einer Ligandensubstitution ist. Folglich ist PN149 inerte als z.B. das planare Cisplatin (Johnstone et al., 2016; Kenny et al., 2017). In der Zelle muss der Platin(IV)-Komplex erst zu einem Platin(II)-Komplex reduziert werden, um überhaupt in Tumorzellen wirken zu können. Dieser entscheidende Schritt ist abhängig von den axialen Liganden sowie den Umgebungsbedingungen in der Tumorzelle (Kenny et al., 2017; Nemirovski et al., 2007). Als Reduktionsmittel spielen dabei z.B. Thiole und Ascorbinsäure eine Rolle. Carboxylat-Gruppen, wie sie PN149 besitzt, besitzen ein mittelmäßiges Reduktionspotential (Nemirovski et al., 2007). Aufgrund dieser Eigenschaften könnte angenommen werden, dass PN149 weniger toxisch ist als Cisplatin. Dies scheint jedoch nicht für PN149 der Fall zu sein. Zytotoxizitätsuntersuchungen von PN149 und Cisplatin zeigten auch in verschiedenen Zelllinien keinen Unterschied im zytotoxischen Potential der beiden Substanzen (Cetraz et al., 2017; Schoch et al., 2018; Sen' et al., 2010).



**Abbildung 5.16: Einordnung der zytotoxischen Wirkung von PN149 in A498 Zellen im Vergleich zu Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.** Zur Einordnung der Zytotoxizitätsdaten von PN149 wurden diese in den Diagrammen zusätzlich mit den Daten aus Abbildungen 5.1 und 5.2 dargestellt. **A:** Bestimmung der relativen Zellzahl (RCC) in A498 Zellen. A498 Zellen wurden für eine Stunde mit der jeweiligen Konzentration an platinbasierter Substanz inkubiert. Nach einer 72 h Nachinkubationszeit wurde die Zellzahl bestimmt. Um die relative Zellzahl zu erhalten wurde auf die Kontrolle normiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden,  $\pm$  Standardabweichung. **B:** Untersuchung der Kolonieformationsfähigkeit in A498 Zellen. Für eine Stunde wurden A498 Zellen zunächst inkubiert und anschließend für 12 Tage kultiviert. Im Anschluss wurde die Koloniezahl bestimmt und die behandelten Proben auf die unbehandelte Probe prozentual normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Untersuchungen, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden,  $\pm$  Standardabweichung.

**Tabelle 5.2:** Berechnete  $\text{IC}_{50}$  Werte der CFAs sowie der relativen Zellzahl (RCC) der platinbasierten Chemotherapeutika in A498 Zellen. Zum Vergleich wurden noch einmal die  $\text{IC}_{50}$  Werte aus Tabelle 5.1 mit aufgelistet.

Platinbasierte Substanz	CFA [ $\mu\text{M}$ ]	RCC [ $\mu\text{M}$ ]
PN149	6	20
CDDP	6	27
Oxaliplatin	12	46
Carboplatin	153	273

Um weiter Einblick in das zytotoxische Potential von PN149 zu bekommen wurden im Folgenden Genexpressionsprofile erstellt sowie verschiedene funktionelle Methoden durchgeführt.

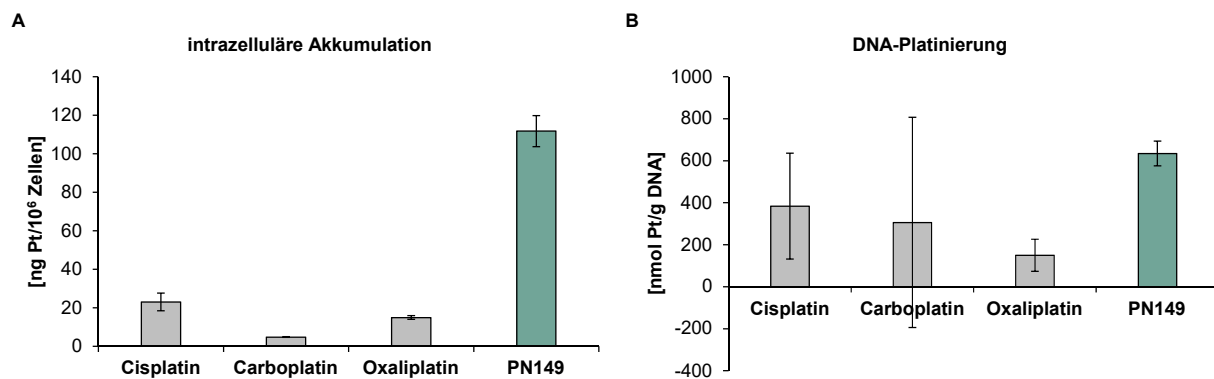
### 5.2.2 Intrazelluläre Aufnahme und DNA-Platinierung

Ein wichtiger Parameter im Bezug auf den Wirkmechanismus von platinbasierten Chemotherapeutika ist die Aufnahme in die Zelle und der dann entscheidende Schritt, die DNA-Platinierung. Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die intrazelluläre Akkumulation sowie DNA-Platinierung in A498 Zellen der drei klinisch eingesetzten platinbasierten Substanzen deutliche Unterschiede aufwiesen.

Vergleichbar zu den drei anderen Substanzen wurden A498 Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  PN149 für 2 h in-

kubiert. Die Untersuchung der intrazellulären Akkumulation von PN149 in A498 Zellen wurde im Rahmen der Masterarbeit von Sabine Gajewski durchgeführt. Die Zellen zeigten eine deutlich höhere intrazelluläre Akkumulation von PN149 im Vergleich zu allen anderen Substanzen (Abbildung 5.17a). Mit ca. 112 ng Pt/10<sup>6</sup> Zellen zeigte PN149 eine 5-fach höhere intrazelluläre Akkumulation als Cisplatin und eine 10-fach bzw. 20-fach höhere als Oxaliplatin bzw. Carboplatin. Diese deutlich höhere intrazelluläre Akkumulation lässt sich vermutlich auf den bereits erwähnten lipophilen Charakter der Substanz zurückführen.

In Kapitel 5.1.2 wurde die Aufnahme der drei klinisch angewandten Substanzen diskutiert. Dabei wurde erläutert, dass diese alle abhängig von verschiedenen aktiven Transportern sind. Diese Abhängigkeit kann ein Problem bei der Tumorbehandlung sein. Eine verminderte Akkumulation von Cisplatin stellt einen von mehreren möglichen Mechanismen in der Cisplatin-Resistenz dar. Hierbei können sowohl ein verminderter Influx als auch ein erhöhter Efflux durch Veränderungen in den Transportsystemen eine Rolle spielen (Köberle et al., 2010). Ishida und Kollegen fanden in ihren Untersuchungen in Hefen und Mauszellen einen Zusammenhang zwischen der Cisplatin Aufnahme durch den Ctr1 und der Cisplatin-induzierten Resistenz (Ishida et al., 2002, 2010). Song und Kollegen untersuchten weiterhin die Rolle von Ctr1 in Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten kleinzelligen Lungentumorzellen. In einer der Cisplatin-resistenten Zelllinien fanden sie eine im Vergleich zur sensitiven Zelllinie verminderte Expression von Ctr1. Diese Zelllinie zeigte weiterhin eine Kreuzresistenz gegenüber Carboplatin, aber nicht Oxaliplatin (Song et al., 2004).



**Abbildung 5.17: Vergleich der intrazellulären Akkumulation und DNA-Platinierung in A498 Zellen nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanz.** Zum Vergleich wurden die Daten von PN149 zusammen mit den Daten aus Abbildung 5.3 dargestellt. **A:** Zur Bestimmung der intrazellulären Akkumulation wurden A498 Zellen für 2 h mit jeweils 50  $\mu$ M platinbasierter Substanz inkubiert. Nach saurem Aufschluss wurde der Platingehalt mittels Graphitrohr-AAS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. **B:** Für die Bestimmung der DNA-Platinierung wurden A498 Zellen für 2 h mit jeweils 50  $\mu$ M der platinbasierten Substanz behandelt. Nach Abbruch der Behandlung erfolgte eine DNA-Extraktion sowie ein saurer Aufschluss. Der Platingehalt wurde abschließend mit Hilfe der ICP-MS gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung.

In Studien aus der Arbeitsgruppe konnte gleichermaßen eine verminderte Expression des Ctr1 in der Cisplatin-resistenten Sublinie RT112-CP im Vergleich zur parentalen RT112 Zelllinie ermittelt

werden. Die Untersuchung der intrazellulären Akkumulation von verschiedenen PNCs und Cisplatin ergab dabei für keine der PNCs einen Unterschied zwischen parentaler und resistenter Sublinie im Gegensatz zu Cisplatin (Cetraz et al., 2017). Um den Einfluss des Ctr1 auf die Aufnahme von Cisplatin und PN149 zu untersuchen, wurde die Expression des Ctr1 mit Hilfe eines Kupferchelators in der Sublinie manipuliert. Da die Expression des Ctr1 über den Kupfergehalt reguliert wird, resultiert eine Inkubation mit einem Kupferchelator in einer erhöhten Expression des Rezeptors. Nach Manipulation zeigte sich eine vermehrte Aufnahme für Cisplatin aber nicht für PN149 (Cetraz et al., 2017). Folglich ist die Aufnahme von PN149 vermutlich unabhängig vom Ctr1.

Neben dem Ctr1 spielt der OCT2 eine Rolle in der Aufnahme, wobei hier vielmehr ein Zusammenhang zwischen der von Cisplatin ausgelösten Nephrotoxizität besteht als mit einer Cisplatin-Resistenz. Um den Einfluss von OCT2 auf die Aufnahme von Cisplatin und PN149 in A498 Zellen zu untersuchen, wurde im Zuge der Masterarbeit von Johanna Wall ein *knockdown* mittels siRNA des Transporters in A498 Zellen durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 5.1.2 erwähnt, zeigte sich hier kein Einfluss auf die Aufnahme von Cisplatin. Für die Aufnahme von PN149 zeigte sich ebenso wenig ein Einfluss (Daten nicht gezeigt). Mit einem *knockout* des Transporters würden sich weitere definitivere Aussagen treffen lassen, da nur ein *knockdown* von 50 % erreicht werden konnte, ob der OCT2 wirklich keinen Einfluss auf die Aufnahme von PN149 hat.

Die deutlich höhere Aufnahme von PN149 spricht jedoch für den lipophilen Charakter der Substanz, der vermutlich zu einer Aufnahme hauptsächlich über passive Diffusion führt. Somit wäre die Substanz im Vorteil bei Behandlungen von resistenten Tumoren, die eine veränderte Expression von Transportern aufweisen.

In Abbildung 5.17b ist weiterhin die DNA-Platinierung in A498 Zellen nach Behandlung mit PN149 im Vergleich zu den anderen drei platinbasierten Substanzen dargestellt. Zur Untersuchung der DNA-Platinierung wurden die Zellen im Einklang mit der intrazellulären Akkumulation für 2 h mit 50  $\mu\text{M}$  platinbasierter Substanz inkubiert. PN149 zeigte auch hier eine deutlich höhere DNA-Platinierung als die anderen drei platinbasierten Substanzen. Im Vergleich zu Cisplatin und Carboplatin führte die Behandlung mit PN149 zu einer doppelt so hohen DNA-Platinierung in A498 Zellen. PN149 zeigte verglichen mit Oxaliplatin sogar eine 4-fach erhöhte DNA-Platinierung. Die hohe intrazelluläre Akkumulation scheint folglich im Einklang mit einer hohen DNA-Platinierung zu stehen. In Cetraz et al. (2017) konnte eine Korrelation zwischen der intrazellulären Akkumulation und der DNA-Platinierung der PNCs sowohl in der sensitiven RT112 als auch der resistenten RT112-CP Zelllinie ermittelt werden. Bei einer intrazellulären Akkumulation von PN149 mit 167 ng Pt/ $10^6$  Zellen wurden eine DNA-Platinierung von 658 nmol Pt/g DNA in RT112 Zellen ermittelt. Dies entspricht in etwa den Werten, die in den A498 Zellen ermittelt wurden.

In Kapitel 5.2.1 wurde bereits diskutiert, dass PN149 erst in der Zelle zu einem Platin(II)-Derivat umgewandelt werden muss, damit es mit der DNA reagieren kann. Dieser Vorgang ist u.a. von den axialen Liganden und der zellulären Umgebung abhängig. Weiterhin wurde in Kapitel 5.1.2 die Reaktionskinetik von Carboplatin besprochen. Carboplatin weist einen stabilen Liganden als Ab-

gangsgruppe auf, weshalb der Aquatisierungsvorgang für Carboplatin sehr viel länger dauert als für Cisplatin, und Carboplatin somit weniger reaktiv als Cisplatin ist. Es wäre also anzunehmen gewesen, dass PN149 aufgrund seiner Struktur ebenfalls eine vergleichsweise langsamere Reaktionskinetik als Cisplatin aufweist. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da die hohe DNA-Platinierung für einen schnellen Abbau zum Platin(II)-Derivat spricht.

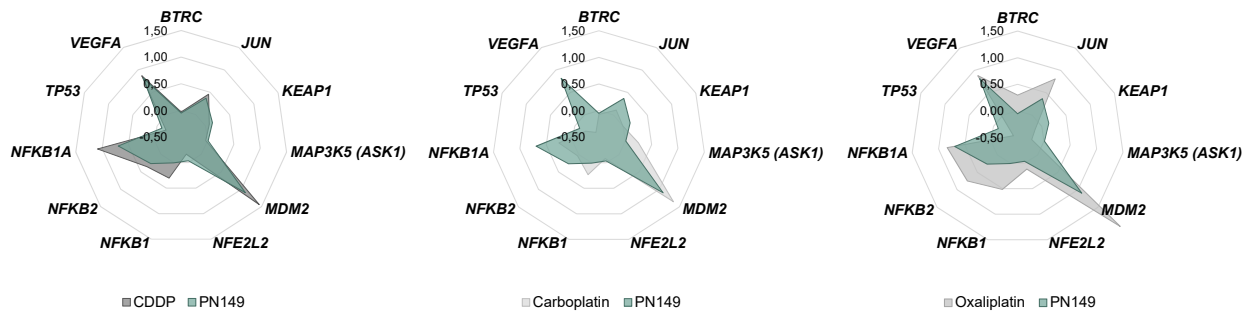
In einer Studie von Reithofer und Kollegen wurde die DNA-Platinierung sowie das zytotoxische Potential von verschiedenen Platin(IV)-Derivaten mit Carboxylat-Liganden in vier verschiedenen Zelllinien untersucht. Alle Substanzen zeigten ebenfalls eine deutlich höhere DNA-Platinierung als Cisplatin in allen vier Zelllinien. Es zeigte sich jedoch auch, dass Cisplatin mit weniger DNA-Schäden zum gleichen zytotoxischen Potential führte wie die Platin(IV)-Substanzen (Reithofer et al., 2007). Dies ist auch in der vorliegenden Arbeit der Fall gewesen. Eine deutlich geringere DNA-Platinierung durch Cisplatin war ausreichend, um dasselbe zytotoxische Potential wie PN149 in A498 Zellen hervorzurufen. Aufgrund seines Aminonitroxylrestes könnte PN149, wie auch Oxaliplatin, zu anderen DNA-Schäden führen als Cisplatin bzw. die Schadensantwort könnte eine andere sein. Im Folgenden wurde dies weiter untersucht.

### 5.2.3 Einfluss von p53

Die bisherigen Untersuchungen deuteten daraufhin, dass PN149 zwar ein ähnliches zytotoxisches Potential wie Cisplatin aufweist, sich jedoch vermutlich in der DNA-Schadensantwort und der weiteren Signaltransduktion unterscheiden muss, da es eine deutlich höhere DNA-Platinierung zeigte. Wie schon für Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin erfolgte für PN149 eine Genexpressionsanalyse verschiedener Signaltransduktionswege. Um den Wirkmechanismus zu den klinisch zugelassenen platinbasierten Chemotherapeutika einordnen zu können, wurden die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse jeweils in Netzdiagrammen dargestellt. Dabei wurde das Profil der höchsten Konzentration von PN149 (50  $\mu\text{M}$ ) jeweils über die einzelnen Profile mit der höchsten Konzentrationen der anderen Substanzen (Cisplatin 50  $\mu\text{M}$ , Carboplatin 500  $\mu\text{M}$ , Oxaliplatin 150  $\mu\text{M}$ ) gelegt. Die genauen Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

Abbildung 5.18 zeigt die Genexpressionsprofile von verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Beim Betrachten der Netzdiagramme lässt sich erkennen, dass die Profile von Cisplatin und PN149 sich sehr ähneln. Beide Stoffe zeigen einen Ausschlag Richtung *NFKBIA*, *VEGFA* und *MDM2* sowie einen leichten Ausschlag Richtung *JUN*. Dabei ist die Genexpression dieser Gene für beide Stoffe ähnlich stark verändert. Im Vergleich zu Carboplatin zeigte das Profil von PN149 mehr Veränderungen in Genen. Verglichen mit Oxaliplatin ist die Genexpression von PN149 weniger verändert.

Wie in Kapitel 5.1.3 erklärt, ist *MDM2* der Gegenspieler von p53, d.h. auch für PN149 deutet sich ein p53-abhängiger Mechanismus an. Deshalb wurde für PN149 gleichermaßen, wie für die anderen Substanzen, das Proteinlevel von p53 mittels Immunoblot untersucht. Ein beispielhafter Immunoblot ist in Abbildung 5.19 im Vergleich zu Cisplatin dargestellt. Abbildung 5.20 zeigt die se-



**Abbildung 5.18:** Netzdiagramm zum Vergleich der Genexpressionsprofile verschiedener Transkriptionsfaktoren in A498 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin (CDDP), Carboplatin, Oxaliplatin und PN149. A498 Zellen wurden für eine Stunde mit der jeweiligen Substanz in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach einer 24 h Nachinkubation erfolgte die Bestimmung der Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR. Im Diagramm dargestellt sind jeweils nur die log<sub>2</sub> Mittelwerte der höchsten Konzentration der jeweiligen Substanz, d.h. 50  $\mu$ M für Cisplatin und PN149, 500  $\mu$ M Carboplatin und 150  $\mu$ M Oxaliplatin.

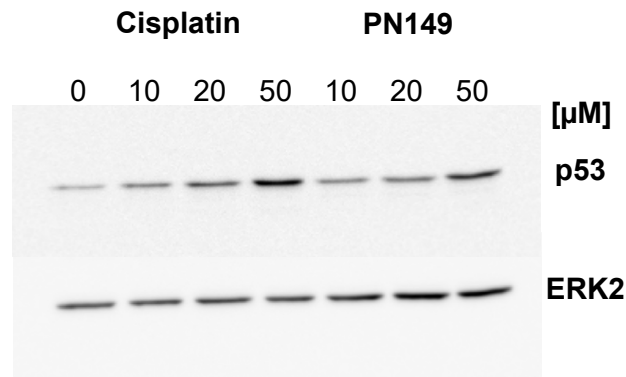
miquantitative Auswertung aller Immunoblots der vier Substanzen. Zur Berechnung wurde hierfür die Ladekontrolle ERK2 miteinbezogen. Dabei wurden die A498 Zellen, wie für die Genexpression, für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an PN149 (10, 20, 50  $\mu$ M) inkubiert und weitere 24 h kultiviert.

Der Verdacht, der sich durch die Genexpressionsanalyse ergab, dass PN149, wie auch die anderen drei platinbasierten Substanzen, p53 beeinflusst, bestätigte sich durch die Immunoblotanalyse. Bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M PN149 zeigte sich eine Zunahme des p53 Proteinlevels. Dies ließ sich auch in der semiquantitativen Auswertung erkennen. Dabei ließ sich weiterhin erkennen, dass PN149 überhaupt erst ab einer Konzentration von 50  $\mu$ M zu einer Veränderung im p53 Proteinlevel führte. Bei Konzentrationen von 10 und 20  $\mu$ M veränderte sich das Proteinlevel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur marginal. Ordnet man PN149 nun zu den anderen drei Substanzen ein, würde die Intensität des p53 Proteinlevels eher der von Carboplatin entsprechen. Cisplatin und vor allem Oxaliplatin weisen deutlich höhere Proteinlevel auf.

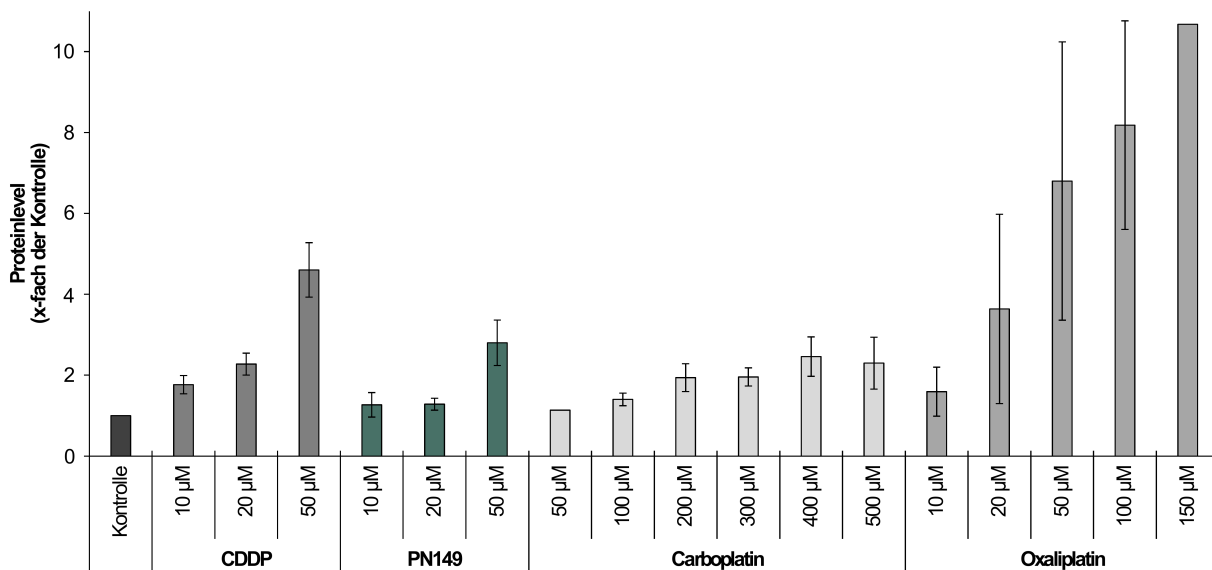
Führt man wiederum einen Strukturvergleich der Substanzen untereinander durch, hätte angenommen werden können, dass PN149 aufgrund seines eher sperrigen Aminonitroxyligandes in die Richtung von Oxaliplatin gehen könnte. Dies scheint jedoch im Falle des p53 Proteinlevels nicht der Fall zu sein. Erstaunlicherweise entspricht es vielmehr Carboplatin, dass aufgrund seiner stabilen Abgangsgruppe eine langsamere Reaktionskinetik aufweist und deshalb deutlich länger braucht, um die gleiche Anzahl an DNA-Schäden zu setzen wie Cisplatin. Die DNA-Platinierung von PN149 zeigte jedoch einen sehr hohen Platinierungsgehalt. DNA-Schäden induziert durch PN149 scheinen, wie schon angedeutet, nicht so effektiv zu sein wie die von Cisplatin oder Oxaliplatin.

In RT112 Zellen wurde ebenfalls das p53 Proteinlevel sowie die Genexpression der Transkriptionsfaktoren nach Behandlung mit Cisplatin und Oxaliplatin untersucht (siehe Anhang). Die Genexpression von *MDM2* deutete auch hier auf eine Veränderung im p53 Proteinlevel hin. Auf Proteinebene konnte hier jedoch für keine der beiden Substanzen eine Veränderung festgestellt werden.





**Abbildung 5.19: P53 Proteinlevel in A498 Zellen nach Inkubation mit Cisplatin und PN149.** A498 Zellen wurden für 1 h mit jeweils 10, 20 und 50 µM Cislatin bzw. PN149 inkubiert und anschließend für 24 h weiter kultiviert. Danach erfolgte die Bestimmung des p53 Proteinlevels mittels Immunoblot. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung diente ERK2. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei einer exemplarisch dargestellt ist.



**Abbildung 5.20: Semi quantitative Auswertung der Immunoblots von p53 in A498 Zellen nach Inkubation mit der jeweiligen platinbasierten Substanz.** Zum Vergleich wurden die Daten von PN149 im Diagramm zusammen mit den Daten aus Abbildung 5.6 dargestellt. Es erfolgte eine 1 h Inkubation von A498 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen platinbasierten Substanz. Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Zur semi quantitativen Auswertung wurden die Bandenintensitäten der Ladekontrolle ERK2 miteinberechnet und auf die Kontrolle normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung.

Dies lässt sich vermutlich auf die Mutation im p53 Gen in den RT112 Zellen zurückführen (Bohnke et al., 2004; Warenius et al., 2000). A498 Zellen weisen hingegen einen p53 Wildtyp auf. Die zugrundeliegende Mutation in RT112 Zellen kann zu einem inaktiven Protein führen und somit in einer fehlerhaften Signaltransduktion enden (Chresta et al., 1996). Beide Substanzen zeigten dennoch ein hohes zytotoxisches Potential in den RT112 Zellen. Folglich können beide Substanzen auch unabhängig von p53 den Zelltod einleiten (Schoch et al., 2018).

Sen' und Kollegen führten mit einem anderen PNC ebenfalls Studien zum p53 Proteinlevel in der Brustkrebszelllinie MCF7 durch. Nach einer 6 h Behandlung mit dem Komplex zeigte sich jedoch keine Veränderung im p53 Proteinlevel. Dies mag zum einen an der unterschiedlichen Struktur liegen, zum anderen aber auch an der Inkubationszeit von 6 h, die eventuell als zu kurz gewählt wurde. MCF7 Zellen induzieren außerdem erst relativ spät nach einem DNA-Schaden die Apoptose (Fan et al., 1995).

PN149 scheint folglich auf Genebene zu ähnlichen Veränderungen von Transkriptionsfaktoren wie Cisplatin zu führen, auf Proteinebene zeigte sich jedoch nur eine mäßige Erhöhung des p53 Proteinlevels und scheint daher eher vergleichbar mit Carboplatin zu sein. Gleichermaßen wie für die klinisch angewandten platinbasierten Substanzen, dienen deshalb die weiteren Untersuchungen auf Genebene und auf funktioneller Ebene zur weiteren Aufklärung der Mechanismen.

#### 5.2.4 DNA-Schadensantwort und -Reparatur

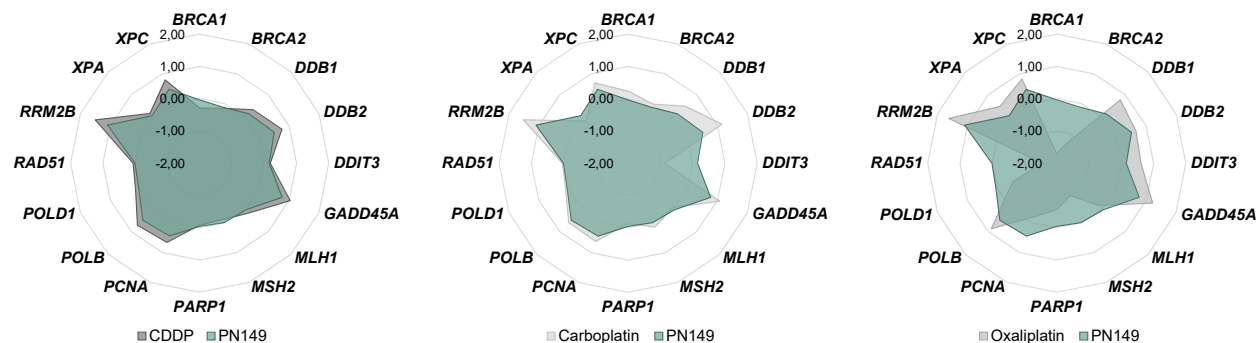
Durch platinbasierte Chemotherapeutika induzierte DNA-Läsionen sind der Hauptgrund für ihre Wirksamkeit in Tumorzellen. Eine nachfolgende DDR kann so letztlich weitere Mechanismen in Gang setzen, die letztendlich zum Zelltod führen. Nach einem DNA-Schaden versucht die Zelle zunächst diesen zu reparieren. Im Falle von Cisplatin und Carboplatin geschieht dies durch die NER und die ICL. Die Genexpressionsanalyse offenbarte allerdings kaum Veränderungen in NER beteiligten Genen. Lediglich die p53-abhängigen Gene *DDB2*, *GADD45A* und *RRM2B* zeigten eine Veränderung im relevanten Bereich. Die DNA-Schadenserkennung sowie -Reparatur von Oxaliplatin ist aufgrund seines DACH-Ligandens eine andere. Dies spiegelte sich auch in der Genexpressionsanalyse wieder. Hier war vor allem auffällig, dass es zu einer verminderten Expression von DNA-Doppelstrangbruchreparaturgenen wie *BRCA1* und *BRCA2* sowie *RAD51* kam. Daneben wurden auch das in die MMR involvierte Gen *MSH2* sowie das vor allem an der Einzelstrangbruchreparatur beteiligte Gen *PARP1* vermindert exprimiert. Die DNA-Schadensantwort von Cisplatin und Carboplatin im Vergleich zu Oxaliplatin scheint sich demnach deutlich voneinander zu unterscheiden. Bruno und Kollegen postulierten anhand ihrer Untersuchungen, dass Oxaliplatin seine Wirkung nicht über eine DDR sondern über ribosomalen Stress entfaltet (Bruno et al., 2017).

Über die DDR sowie DNA-Reparatur von PNCs ist bisher noch nichts bekannt. Im Zuge dieser Arbeit sowie der Untersuchungen von Cetriz et al. (2017) konnte bisher festgestellt werden, dass PNCs auf jeden Fall die DNA platinieren und somit zu DNA-Schäden führen. Mit Hilfe der Genexpressionsanalyse wurden in A498 Zellen die DDR sowie DNA-Reparatur nach Behandlung mit

PN149 untersucht. Hierfür wurden A498 Zellen für 1 h mit der jeweiligen platinbasierten Substanz inkubiert und anschließend für weitere 24 h kultiviert. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden zum Vergleich als Netzdiagramme dargestellt (Abbildung 5.21). Es wurden jeweils die höchsten Konzentrationen miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich wieder eine deutliche Überlappung der Profile von PN149 und Cisplatin. PN149 induzierte wie alle anderen Substanzen die p53-abhängigen Gene *DDB2*, *GADD45A* und *RRM2B*.

*DDB2* und *GADD45A* sind beide an der NER beteiligt. Demnach könnten PN149-induzierte DNA-Schäden über die NER repariert werden. *RRM2B* unterstützt die DNA-Reparatur durch die Bildung von Desoxyribose Nukleosidtriphosphaten (dNTPs) (Haupt und Haupt, 2017). Es gilt neben *CDKN1A* als das ultimative p53-Targetgen. Beide Gene werden im Falle eines Mechanismus über p53 immer vermehrt exprimiert (Fischer, 2017). Dies scheint sowohl für die klinisch angewandten Substanzen als auch für PN149 der Fall zu sein. Obwohl PN149 zu einer deutlich geringeren Erhöhung des p53 Proteinlevels als Cisplatin führt, scheint die zelluläre Antwort auf Genexpressionsebene von DDR- und DNA-Reparaturgenen eine ähnlich ausgeprägte zu sein.

Die Genexpressionsanalyse wurde gleichermaßen in RT112 Zellen durchgeführt. Obwohl diese eine Mutation im p53-Gen aufweisen, zeigten sie ein ähnliches Genexpressionsprofil für DDR- und DNA-Reparaturgene sowohl für Cisplatin als auch für PN149 (siehe Anhang). Es scheint demnach, dass die Zelle unabhängig von einem funktionsfähigen p53 p53-Targetgene vermehrt exprimieren kann. P53-Targetgene können nicht nur von p53, sondern auch von einem weiteren Familienmitglied, dem p73, aktiviert werden (Levrero et al., 2000). Folglich könnte in den RT112 Zellen p73 die Funktion von p53 übernehmen.



**Abbildung 5.21: Vergleich der Genexpressionsprofile mit Hilfe eines Netzdiagramms von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin mit PN149.** A498 Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen platinbasierten Substanz inkubiert. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Zellen für weitere 24 h kultiviert und anschließend die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR bestimmt. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Dargestellt sind lediglich die Inkubationen der höchsten Konzentrationen der jeweiligen Substanz (50  $\mu$ M Cisplatin/PN149, 500  $\mu$ M Carboplatin, 150  $\mu$ M Oxaliplatin) als log<sub>2</sub> Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Betrachtet man die Struktur von PN149, scheint es eher ungewöhnlich, dass die DDR und DNA-Reparatur dieselbe ist wie von Cisplatin. Aufgrund des sperrigen Aminonitroxylrestes liegt die

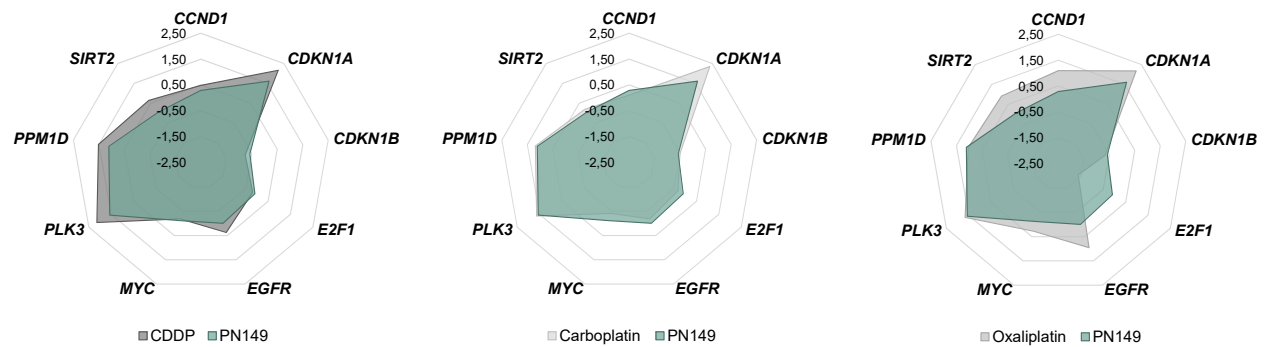
Annahme nahe, dass PN149 eher Oxaliplatin ähneln würde. Der DACH-Ligand von Oxaliplatin führt, wie bereits mehrfach erwähnt, zu einer gänzlich anderen DDR im Vergleich zu Cisplatin. Im Falle von PN149 scheint dies wohl nicht der Fall zu sein.

Ein weiteres Platin(IV)-Derivat stellt Satraplatin dar. Es weist ebenfalls zwei zusätzliche Carboxylgruppen sowie einen sperrigen Cyclohexanaminrest auf. Die Struktur von Satraplatin ist demnach ähnlich der Struktur von PN149. Kalimutho und Kollegen untersuchten u.a. die Genexpression von p53-abhängigen Genen in HCT116 p53-profizienten Zellen nach Behandlung mit Oxaliplatin und Satraplatin. Dabei zeigte sich ein ähnliches Genexpressionsprofil beider Substanzen, lediglich *BRCA1* wurde nach Behandlung mit Oxaliplatin in geringeren Mengen exprimiert, wohingegen eine Behandlung mit Satraplatin zu einer vermehrten Expression des Gens führte. Satraplatin führte neben der Induktion der NER Gene *ERCC1* und *GADD45A* außerdem zur Induktion von *MLH1*, das an der MMR beteiligt ist, wobei *MSH2* reprimiert wurde (Kalimutho et al., 2011). Aus ihren Untersuchungen geht jedoch nicht hervor unter welchen Bedingungen ihre Behandlungen durchgeführt wurden. Sie konnten jedoch einen vergleichbaren Mechanismus zu Oxaliplatin feststellen. Für PN149 in A498 Zellen konnte dies nicht festgestellt werden. Der Vergleich der bisherigen Genexpressionsanalysen der Substanzen mit PN149 offenbarte folglich, dass PN149 Cisplatin in seiner zellulären Antwort ähnelt.

### 5.2.5 Zellzyklus und Proliferation

Ein Wirkmechanismus der über p53 abläuft, beinhaltet meistens zunächst einen Zellzyklusarrest, um der Zelle Zeit für die Reparatur der DNA-Schäden zu geben. Dabei wird der Zellzyklusarrest durch die Induktion von p21 durch p53 ausgelöst. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte sich für alle drei klinisch angewandten Substanzen in A498 Zellen eine vermehrte Expression von *CDKN1A*, das für p21 codiert. Außerdem wurden weitere p53-abhängige Gene, wie *PLK3* und *PPM1D* vermehrt exprimiert. Auf funktioneller Ebene zeigte sich dann jedoch, dass nur Cisplatin und Carboplatin zu einem ausgeprägten Zellzyklusarrest führten. Oxaliplatin hingegen wies nur minimale Veränderungen in der Zellzyklusverteilung auf. Dies könnte auf die zusätzliche Veränderungen in der Genexpression von proliferationsbeteiligten Genen zurückzuführen sein, so dass die Zelle die DNA gar nicht mehr reparieren kann, sondern direkt in die Apoptose geschickt wird.

Für PNCs ist bezüglich der Zellzyklusverteilung bisher nichts bekannt. Die bisherigen Ergebnisse deuten aber vermutlich auf einen Zellzyklusarrest hin, der mit Cisplatin vergleichbar ist. In Abbildung 5.22 sind die Genexpressionsprofile von zellzyklus- und proliferationsbeteiligten Genen dargestellt. Im Netzdiagramm ist deutlich zu erkennen, dass PN149 die gleichen Gene beeinflusst wie Cisplatin und Carboplatin. Der Grad der Veränderung entspricht dieses Mal eher dem von Carboplatin. Carboplatin und PN149 führten, im Vergleich zu Cisplatin und Oxaliplatin, zu einer eher geringen Erhöhung des p53 Proteinlevels. Dennoch verändern beide die Genexpression von p53-abhängigen Genen zu einem ähnlichen Niveau wie Cisplatin.



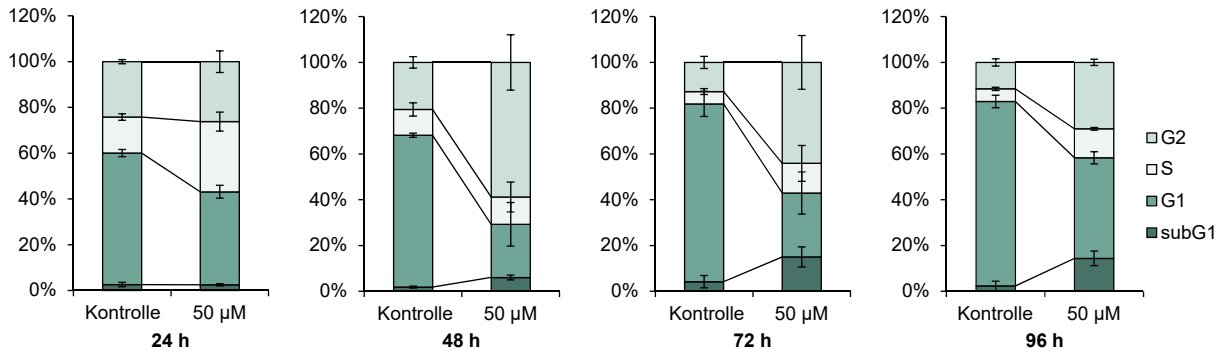
**Abbildung 5.22: Vergleich der Genexpressionsprofile von zellzyklus- und proliferationsbeteiligten Genen in A498 Zellen nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanz.** A498 Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen platinbasierten Substanz inkubiert und anschließend für 24 h weiter kultiviert. Zur Untersuchung der Genexpression wurde eine Hochdurchsatz RT-qPCR durchgeführt. Die behandelten Proben wurden zur Auswertung auf die unbehandelten Kontrollproben normiert und als log<sub>2</sub> Werte berechnet. Im Netzdiagramm dargestellt sind die Mittelwerte der jeweils höchsten Konzentration der Substanzen (50 µM Cisplatin/PN149, 500 µM Carboplatin, 150 µM Oxaliplatin) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Eines der besonders wichtigen p53-Targetgene ist *CDKN1A*. PN149 führte ebenfalls zu einer erhöhten Expression des Gens. Ebenso wurde die Genexpression von *PLK3* und *PPM1D*, beides p53-abhängige Gene, verändert. Das Genexpressionsprofil von zellzyklus- und proliferationsbeteiligten Genen nach Behandlung von A498 Zellen mit PN149 deutet auf einen Zellzyklusarrest hin. Dieser könnte vergleichbar mit Cisplatin bzw. Carboplatin sein. Nachfolgend wurde deshalb die Zellzyklusverteilung mittels DAPI-Fluoreszenzfärbung am Durchflusszytometer bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 5.23 dargestellt.

Nach einer einstündigen Inkubation von 50 µM PN149 in A498 Zellen zeigte sich nach einer 24 h Nachinkubationszeit, wie bereits für Cisplatin und Carboplatin, ein S-Phasenblock, wobei dieser im Verhältnis zu Cisplatin und auch Carboplatin weniger ausgeprägt war. Ab einer Nachinkubationszeit von 48 h war ein deutlicher G<sub>2</sub>/M-Arrest erkennbar. Dieser nahm bis 96 h Nachinkubationszeit wieder etwas ab, wobei der Anteil an Zellen, der sich in der subG<sub>1</sub>-Phase befand, zunahm. Die Zellzyklusverteilung in A498 Zellen nach Behandlung mit PN149 ist folglich vergleichbar mit der von Cisplatin und Carboplatin. Alle drei Substanzen führen nach 24 h Nachinkubation zu einem S-Phasenblock, der nach 48 h in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest übergeht. Dieser Arrest wird vermutlich über eine Aktivierung von p21 durch p53 hervorgerufen.

Kalimutho und Kollegen stellten weitere Untersuchungen zur Wirkung von Oxaliplatin und Satraplatin in HCT116 Zellen an. Sie untersuchten die Zellzyklusverteilung nach einer Inkubation mit jeweils 10 µM der Substanzen für 48 und 72 h. Oxaliplatin zeigte, vergleichbar mit den in dieser Arbeit generierten Daten in den A498 Zellen, kaum Veränderungen in der Zellzyklusverteilung, wohingegen Satraplatin einen G<sub>2</sub>/M-Arrest nach 48 h induzierte, der bis 72 h anhielt (Kalimutho et al., 2011). Als Platin(IV)-Derivat, das eine ähnliche Struktur wie PN149 aufweist, zeigt Satraplatin folglich ebenfalls einen ähnlichen Mechanismus im Bezug auf den Zellzyklus wie Cisplatin

## PN149



**Abbildung 5.23: Zellzyklusverteilung von A498 Zellen nach Behandlung mit PN149.** A498 Zellen wurden für 1 h mit 50 µM PN149 behandelt und im Anschluss für 24, 48, 72 und 96 h weiter kultiviert. Zur Messung der Zellzyklusverteilung wurden die Proben mit DAPI (4',6'-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung.

und Carboplatin. Die Struktur von Oxaliplatin scheint hingegen dazu zu führen, dass sich der Mechanismus von Oxaliplatin deutlich von dem anderer platinbasierter Substanzen unterscheidet.

Nach Behandlung von RT112 Zellen mit Cisplatin bzw. PN149 zeigte sich auf Genexpressionsebene eine erhöhte Expression für *CDKN1A*, *PLK3* sowie *PPM1D* (siehe Anhang). Folglich wurden die gleichen Gene, wie nach Behandlung von A498 Zellen mit den beiden Substanzen vermehrt exprimiert. Jedoch war die Veränderung nicht so deutlich wie in A498 Zellen. Nichtsdestotrotz resultierten daraus ähnliche Veränderungen in der Zellzyklusverteilung wie für die A498 Zellen. Beide Substanzen induzierten nach 24 h einen S-Phasenarrest, der nach 48 h in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest überging (siehe Anhang). Wie zuvor schon diskutiert, können beide Substanzen offensichtlich auch ohne funktionsfähiges p53 ihren Wirkmechanismus ausführen.

### 5.2.6 Oxidative Stress- und Inflammationsantwort

In Kapitel 5.1.6 wurde bereits diskutiert, dass Chemotherapeutika zur Bildung von ROS führen können. Im Falle von platinbasierten Chemotherapeutika scheinen diese zu den einzelnen Nebenwirkungen der jeweiligen Substanz beizutragen. Um diesen Mechanismus u.a. zu verhindern, wurde die Struktur von PN149 mit einem Aminonitroxylrest ausgestattet. Als Aminonitroxylrest enthält PN149 einen 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-Rest. Aminonitroxylreste bzw. zyklische Nitroxylreste im Allgemeinen sollen eine antioxidative Eigenschaft aufweisen, indem sie die Superoxiddismutase nachahmen (Goldstein et al., 2003; Krishna et al., 1992).

Die Superoxiddismutase ist in der Zelle für den Abbau von Superoxid-Anionen-Radikalen ( $O_2^{\bullet-}$ ) verantwortlich. Durch eine Redoxreaktion können Nitroxyl-Radikale ( $RNO^{\bullet}$ ) ein Hydroxylamin bzw. ein Oxoammonium-Kation ( $RNO^+$ ) bilden. Dieses Redoxpaar aus  $RNO^{\bullet}/RNO^+$  kann zum

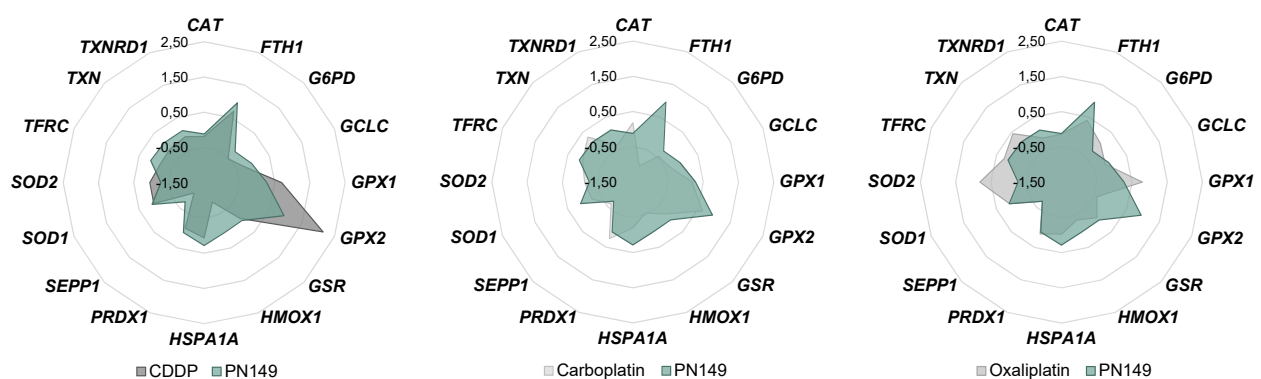
Abbau von Superoxid-Anionen-Radikal führen. Weiterhin wurde gezeigt, dass Nitroxyl-Radikale in der Lage sind,  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  zu oxidieren. Durch diesen Vorgang kann die Fenton-Reaktion unterbunden werden und folglich wird verhindert, dass toxisches Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) entsteht (Mitchell et al., 1990; Soule et al., 2007).

In einem zellfreien Assay aus bakterieller *supercoiled* DNA und der Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) wurde die Bildung von oxidativen Schäden, induziert durch Cisplatin bzw. PN149, in der Arbeitsgruppe untersucht. Fpg ist ein DNA-Reparaturprotein, das u.a. oxidative Basenschäden erkennt und sie herauschneidet, wodurch Strangbrüche entstehen (Boiteux et al., 1989). Es zeigte sich, dass Cisplatin in diesem Assay konzentrationsabhängig vermehrt zu Fpg-Stellen führte, PN149 jedoch nicht (Cetraz et al., 2017). Demnach scheint PN149 nicht zu oxidativen Schäden zu führen.

Mit Hilfe der Genexpressionsanalyse wurde die Expression verschiedener Gene untersucht, die in die oxidative Stressantwort involviert sind. A498 Zellen wurden eine Stunde mit der jeweiligen Substanz inkubiert und nach 24 h eine Genexpressionsanalyse mit Hilfe der Hochdurchsatz RT-qPCR durchgeführt. Das Genexpressionsprofil von PN149 ähnelt dabei dem von Cisplatin (Abbildung 5.24). Relevante Veränderungen zeigten sich für die Gene *FTH1* und *GPX2*.

Im Gegensatz zu A498 Zellen zeigten sich in RT112 Zellen für Cisplatin keine Veränderungen der Expression oxidativer Stressgene. PN149 führte in RT112 Zellen bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zu einer vermehrten Expression verschiedener Gene (siehe Anhang).

In Kapitel 5.1.6 konnte anhand der Genexpression keine konkrete Schlussfolgerung im Bezug auf oxidativen Stress, induziert durch platinbasierte Substanzen, gezogen werden. Gleiches gilt ebenfalls für PN149.

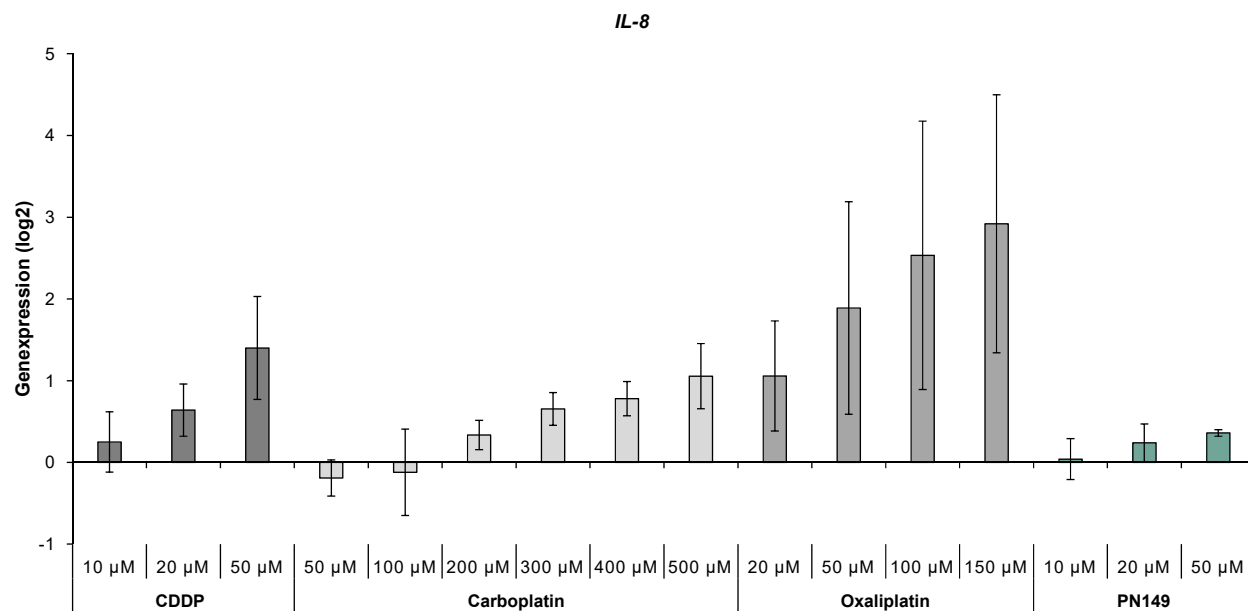


**Abbildung 5.24: Vergleich der Genexpressionsprofile (oxidativer) Stressantwortgene in A498 nach Behandlung von Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin bzw. PN149.** Zur Bestimmung der Genexpression wurden A498 Zellen für 1 h mit der jeweiligen Substanz mit jeweils verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Darauffolgend wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR bestimmt. Dargestellt sind jeweils die höchsten Konzentrationen der platinbasierten Substanzen (50  $\mu\text{M}$  Cisplatin/PN149, 500  $\mu\text{M}$  Carboplatin, 150  $\mu\text{M}$  Oxaliplatin). Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unebelndeten Kontrollproben normiert und die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten berechnet.

Um das antioxidative Potential von PN149 feststellen zu können, würde sich vermutlich ein funktioneller Assay, der die direkte Bildung von ROS misst, besser eignen. Mit Hilfe des Farbstoffes CellROX® Green wurde dies auch versucht, wobei hier weder für Cisplatin noch für PN149 ein positives Signal festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Weitere Farbstoffe zur Messung von ROS stellen DCF (Dichlorofluorescein) und DHE (Dihydroethidium) dar. In Untersuchungen in diesem Labor wurde jedoch festgestellt, dass beide Farbstoffe durch zu viele Umweltfaktoren beeinflusst werden können, weshalb eine Messung mit diesen Farbstoffen abgelehnt wurde.

Auf dem gleichen Prinzip wie die Messung der DNA-Strangbrüche in *supercoiled* Bakterien-DNA beruht die Messung von Strangbrüchen mittels *alkaline unwinding* mit Fpg. Auch hiermit lassen sich oxidative Basenschäden untersuchen. Aufgrund von technischen Problemen ergab diese Bestimmung jedoch auch kein Ergebnis. Die Messung von oxidativem Stress bzw. der Bildung von ROS stellt sich als große Herausforderung dar.

Bisher gibt es keine zu 100 % verlässliche Methode, weshalb hier weiterer Forschungsbedarf besteht, um konkretere Aussagen über die Induktion von oxidativem Stress von platinbasierten Substanzen treffen zu können. Dementsprechend lässt sich anhand der bisherigen Daten keine Aussage darüber treffen, ob PN149 im Vergleich zu Cisplatin nicht zur Induktion von oxidativem Stress führt.



**Abbildung 5.25: Genexpression von *IL-8* in A498 Zellen nach Behandlung der jeweiligen platinbasierten Substanz.** Zum Vergleich wurden die Daten von PN149 im Diagramm mit den Daten aus Abbildung 5.12 dargestellt. A498 Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen platinbasierten Substanz inkubiert und für weitere 24 h kultiviert. Darauf folgend wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR ermittelt. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert und als log<sub>2</sub> Werte berechnet. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung.

In Kapitel 5.1.6 wurde erwähnt, dass neben oxidativem Stress außerdem Inflammationsprozesse eine Rolle in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität spielen. Bezüglich Inflammation und PN149 gibt



es bisher noch keine Daten. Studien zeigten jedoch, dass Nitroxyl-Radikale zu einer Linderung in inflammatorischen Krankheiten führen können (Soule et al., 2007). Flores-Santana und Kollegen untersuchten die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Nitroxyl-Derivaten von *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAID) in A549 Zellen. Dabei stellten sie fest, dass die anti-inflammatorische Wirkung von NSAID durch den zusätzlichen Nitroxyl-Rest erhöht wurde (Flores-Santana et al., 2012). Die potentielle anti-inflammatorische Wirkung könnte sich natürlich aber auch auf die antioxidative Eigenschaften zurückführen lassen, da ROS inflammatorische Prozesse auslösen können (Soule et al., 2007).

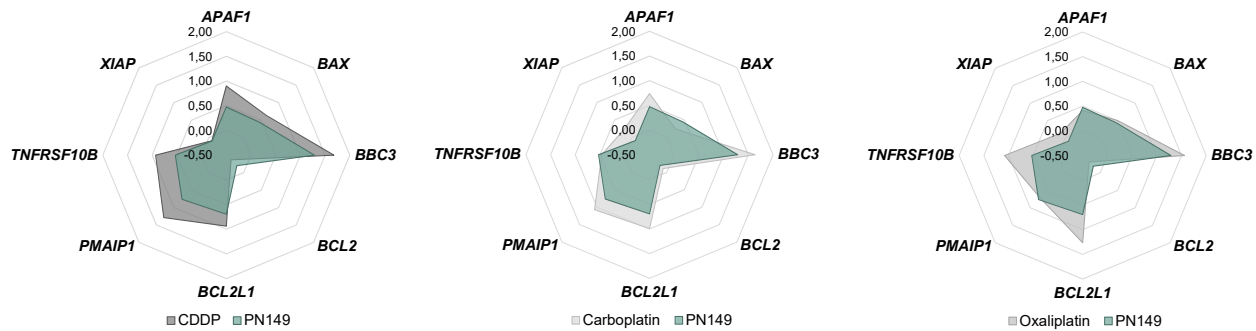
Mittels Genexpressionsanalyse wurde die veränderte Genexpression des Inflammationsmarkers *IL-8* gemessen. Nach einstündiger Inkubation mit der jeweiligen Substanz und weiteren 24 h Kultivierung wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR bestimmt. In Abbildung 5.25 ist die Genexpression von PN149 im Vergleich zu den klinisch angewandten Substanzen dargestellt. Es lässt sich deutlich erkennen, dass PN149 zu kaum einer Veränderung in der Genexpression von *IL-8* führt. Selbst die höchste Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  liegt noch deutlich unter dem relevanten Bereich. Demnach wäre es möglich, dass PN149 nicht zu Entzündungsprozessen führt. Allerdings spielen neben *IL-8* noch weitere Gene eine Rolle in der Inflammationsantwort, weshalb hier noch weitere Untersuchungen weiterer Inflammationsmarker von Nöten sind.

### 5.2.7 Induktion des Zelltods

Ultimatives Ziel eines Chemotherapeutikum ist der Zelltod. In Kapitel 5.1.7 wurde erläutert, dass eine Induktion des Zelltods durch ein Chemotherapeutikum über die Apoptose von Vorteil ist. Untersuchungen hierzu mit den klinisch angewandten platinbasierten Substanzen zeigten, dass alle drei Substanzen den Zelltod in A498 Zellen über die Apoptose einleiten. Auch hierzu ist für PN149 bisher nichts bekannt.

Abbildung 5.26 zeigt die Genexpressionsprofile von pro- und antiapoptotischen Genen in A498 Zellen nach Behandlung mit der jeweiligen Substanz für 1 h und weiteren 24 h Nachinkubationszeit. Alle vier Substanzen zeigten hier relativ ähnliche Profile, wobei die Veränderungen der Gene unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Auch PN149 führte zu einer vermehrten Expression von p53-abhängigen Genen wie *BBC3* und *PMAIP1*. Die Genexpression von PN149 deutet folglich ebenfalls auf die Induktion der Apoptose hin. Deshalb wurde auch hier auf funktioneller Ebene die Induktion der Apoptose untersucht.

Durch Anfärben der Zellen mit Annexin V-FITC und PI wurde durchflusszytometrisch zwischen apoptotischen sowie nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen unterschieden. Nach einstündiger Inkubation von 50  $\mu\text{M}$  PN149 wurde der Anteil an apoptotischen bzw. nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen nach 24, 48, 72 und 96 h untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.27 dargestellt. Ein erster deutlicher Anstieg des Anteils an apoptotischen Zellen wurde nach 48 h erfasst. Dabei nahm außerdem der Anteil an nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen zu. Der



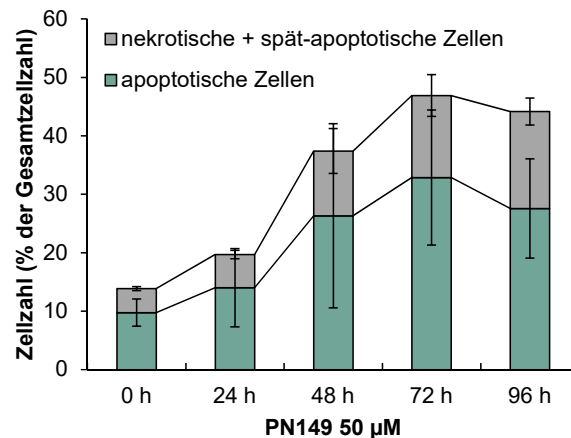
**Abbildung 5.26: Vergleich der Genexpressionsprofile von Apoptosegenen in A498 Zellen nach jeweiliger Behandlung mit der platinbasierten Substanz.** Zur Bestimmung der Genexpression von pro- und antiapoptotischen Genen wurden A498 Zellen für 1 h mit der jeweiligen platinbasierten Substanz in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und für weitere 24 h kultiviert. Im Anschluss wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR ermittelt. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert und die log<sub>2</sub> Mittelwerte berechnet. Im Netzdiagramm sind jeweils nur die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen der höchsten Konzentrationen der jeweiligen Substanz (50  $\mu$ M Cisplatin/PN149, 500  $\mu$ M Carboplatin, 150  $\mu$ M Oxaliplatin) dargestellt.

Anteil an apoptotischen Zellen nahm weiter bis 72 h zu. Nach 96 h nahm dieser wieder leicht ab, wobei der Anteil an nekrotischen und spät-apoptischen sowie der lebenden Zellen leicht zunahm. Die Untersuchungen sind demnach vergleichbar mit denen von Cisplatin, wobei der nekrotische und spät-apoptische Anteil nach 96 h für PN149 weniger hoch ist.

In RT112 Zellen wurde ebenfalls die Genexpression pro- und antiapoptotischer Gene nach Inkubation mit Cisplatin und PN149 ermittelt, sowie die Apoptose durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Anhang). Auf Genexpressionsebene zeigte sich ein ähnliches Bild für beide Substanzen wie in den A498 Zellen. Die Veränderungen der Gene waren jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in A498 Zellen. Bezüglich der durchflusszytometrischen Bestimmung zeigte sich ein Unterschied beider Substanzen im Vergleich zu A498 Zellen nach 96 h. Hier lag der Anteil an nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen deutlicher höher als in den A498 Zellen. Mechanistisch zeigte sich dennoch kein Unterschied zwischen Cisplatin und PN149.

Die Apoptose lässt sich in zwei Wege einteilen, den intrinsischen und den extrinsischen. Wie bereits in Kapitel 5.1.7 erläutert, können platinbasierte Substanzen beide Wege induzieren. Ob ein Weg bevorzugt abläuft, scheint zelltypabhängig zu sein. Da bisher nichts über die PN149 induzierte Apoptose bekannt ist, wurde ein Caspase-Assay zur Differenzierung zwischen intrinsischem und extrinsischem Apoptoseweg durchgeführt. Die Untersuchungen hierzu wurden im Rahmen der Masterarbeit von Alessia Bachert durchgeführt.

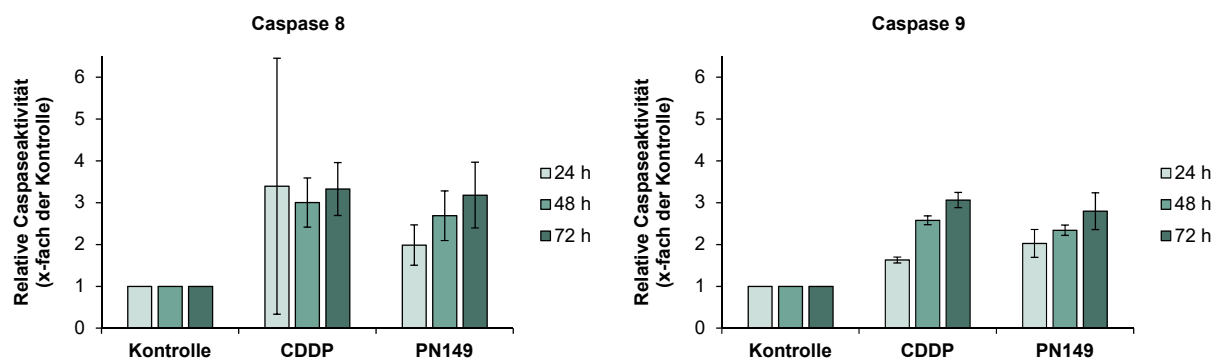
Mit Hilfe eines Kits von Promega wurde die relative Caspaseaktivität mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Hierbei wird sich die spezifische Enzymaktivität der Caspasen zu Nutzen gemacht. Zum Einsatz kommen Moleküle, die bestimmte Aminosäuresequenzen aufweisen, die nur von der jeweiligen Caspase gespalten werden kann. Das entstandene Molekül lässt sich in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ ,  $O_2$ , ATP und dem Enzym Luciferase zu einem angeregten Molekül umwandeln, dessen



**Abbildung 5.27: Durchflusszytometrische Untersuchung der Induktion der Apoptose in A498 Zellen nach Behandlung mit PN149.** A498 Zellen wurden für 1 h mit 50 µM PN149 behandelt und für 24, 48, 72 und 96 h weiter kultiviert. Im Anschluss wurden die Proben zur Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen + spät-apoptotischen Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) respektive angefärbt. Die angefärbten Proben wurde am Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung.

Chemilumineszenz sich messen lässt. Zur Bestimmung der relativen Caspaseaktivität wurden A498 Zellen für 1 h mit 50 µM Cisplatin bzw. PN149 behandelt und für 24, 48 und 72 h weiter kultiviert. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.28 dargestellt. Caspase 8 steht dabei für den extrinsischen und Caspase 9 für den intrinsischen Apoptoseweg.

Beide Substanzen zeigten eine vergleichbare konzentrationsabhängige Zunahme der Aktivität von sowohl Caspase 8 als auch Caspase 9. Die Aktivität beider Caspasen erhöhte sich dabei um ein ähnliches Niveau. Folglich führen sowohl Cisplatin als auch PN149 in A498 Zellen zur Induktion der Apoptose über den intrinsischen und den extrinsischen Weg.



**Abbildung 5.28: Untersuchung der Caspase 8- und Caspase 9-Aktivität in A498 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin und PN149.** Zur Bestimmung der Caspaseaktivität wurden A498 Zellen für 1 h mit 50 µM Cisplatin bzw. PN149 inkubiert. Nach weiterer Kultivierung von 24, 48 und 72 h wurde die relative Caspaseaktivität durch Chemilumineszenzmessung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Untersuchungen  $\pm$  Standardabweichung.

Die Untersuchungen von PN149 offenbarten zusammenfassend, dass die Substanz einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Cisplatin und Carboplatin aufweist. Obwohl die Substanz zu einer deutlich höheren Aufnahme sowie Platinierung in der Zelle führte, war die zelluläre Antwort auf einem ähnlichen Niveau wie Cisplatin bzw. Carboplatin. Erstaunlicherweise verhält sich der Amminonitroxylrest unterschiedlich zum DACH-Liganden von Oxaliplatin. Obwohl beide Strukturen eher sperrig sind, unterschieden sie sich in der zellulären Antwort.

### 5.3 Einfluss von platinbasierten Chemotherapeutika auf Nieren-normalzellen

Cisplatin, als Pionier der platinbasierten Chemotherapie, ist auch heute noch 40 Jahre nach seiner Zulassung eines der am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika weltweit. So effektiv es auch in der Tumorbehandlung ist, ist die Behandlung mit Cisplatin mit starken Nebenwirkungen behaftet. Neben den üblichen Nebenwirkungen von Chemotherapeutika, wie Übelkeit und Erbrechen, stellt vor allem die Nephrotoxizität ein großes Problem dar. Sie ist der dosislimitierende Faktor in der Cisplatin-Tumortherapie. Etwa 1/3 aller Patienten leiden wenige Tage nach der Behandlung mit Cisplatin unter Nephrotoxizität (Pabla et al., 2008). Renale Schäden treten dabei vor allem im S3-Segment des proximalen Tubulus auf (Sahni et al., 2009).

Die Niere stellt das Hauptausscheidungsorgan von Cisplatin dar. Resultat hiervon ist eine in etwa 5x höhere Akkumulation von Cisplatin in Zellen des proximalen Tubulus als im Blutplasma. Innerhalb der Niere befindet sich dann der Hauptanteil von Cisplatin im S3-Segment (Yao et al., 2007). Das klinische Bild von Cisplatin-induzierten akuten Nierenschäden (AKI), auch bekannt als akutes Nierenversagen, geht einher mit einer erniedrigten glomerulären Filtrationsrate (GFR), einem erhöhten Serum Kreatininspiegel sowie erniedrigten Serum Magnesium- und Natriumspiegeln (Pabla et al., 2008). Viele Patienten, die während der Tumorbehandlung mit Cisplatin Nierenschäden erleiden, leiden auch noch nach der Behandlung unter Folgeschäden, z.B. einer erniedrigten GFR, welche nie vollständig zurückgehen (Barabas et al., 2008; Pabla et al., 2008).

Der zugrundeliegende Wirkmechanismus ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Mechanismen, die auch in der antineoplastischen Wirkung eine Rolle spielen, sind für die nephrotoxische Wirkung von Bedeutung. Zum einen spielt natürlich die hohe Akkumulation eine Rolle, daneben außerdem oxidativer Stress, Inflamationsprozesse, DNA-Schäden, die Induktion von p53 und der Apoptose sowie die Bildung eines Nephrotoxins durch die Bindung von Cisplatin an Glutathion (GSH) (Manohar und Leung, 2018). Aufgrund dieser schwerwiegenden Folgen wurde und wird bis heute nach Strategien geforscht, um die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität zu verhindern. Heute wird Cisplatin in Kombination mit einer exzessiven Hydratation gegeben (Launay-Vacher et al., 2008). Auch die Entwicklung von Carboplatin und Oxaliplatin sollte zur Verbesserung führen. Beide Substanzen weisen in ihren Nebenwirkungen auch tatsächlich keine Nephrotoxizität auf, dafür aber andere toxische Nebenwirkungen. Um den genauen Mechanismus weiter aufzuklären,

wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin sowie PN149 in ciPTEC Zellen untersucht und verglichen. Carboplatin und Oxaliplatin sollten sich dabei von Cisplatin unterscheiden. Für PN149 wird ebenfalls postuliert, dass es weniger nephrotoxisch sein soll.

### 5.3.1 Auswahl des *in vitro* Modells zur Untersuchung von Nephrotoxizität

Obwohl die nephrotoxische Wirkung von Cisplatin schon seit Jahrzehnten bekannt ist, wurde der Wirkmechanismus bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Ein Problem stellen hierbei u.a. die zur Verfügung stehenden *in vivo* und *in vitro* Modelle dar. *In vivo* Studien sind oft aufgrund von deutlichen interspeziesvariationen bezüglich der Niere unzuverlässig. Für *in vitro* Versuche stellt sich die Frage nach dem richtigen Zellkulturmodell. Aufgrund dieser Unzuverlässigkeit scheitern viele Medikamente erst in der klinischen Phase, da die Nephrotoxizität sich in besagten Modellen nicht bemerkbar machte (Jang et al., 2013).

Um die Unzuverlässigkeit von *in vivo* Studien zu umgehen, ist die Auswahl des richtigen *in vitro* Modells essentiell. Von Studien mit aus Tieren gewonnenen Nierenzellen sollte zur Vorhersage des nephrotoxischen Potentials abgeraten werden. Eine speziesabhängige unterschiedliche Expressierung verschiedener Transporter spielt hier eine wichtige Rolle, da Transportvorgänge in der Niere entscheidend sein können (Tiong et al., 2014). Renale Primärzellen, aus dem menschlichen Nierengewebe isoliert, spiegeln den natürlichen Status *in vivo* am besten wieder. Ein großes Manko stellt aber die begrenzte Verfügbarkeit der Zellen dar. Primärzellen teilen sich normalerweise nicht mehr und es wird ein Spender benötigt, weshalb nur sehr wenig Probenmaterial zur Verfügung steht (Sánchez-Romero et al., 2016). Durch Zelllinien lässt sich dieses Problem umgehen. Eine relativ häufig verwendete Zelllinie zur Untersuchung von Nephrotoxizität sind *human embryonic kidney 293* (HEK293) Zellen. Über die Jahre hat sich allerdings heraus gestellt, dass HEK293 wahrscheinlich nicht renale Epithelzellen sind, weshalb von einem Gebrauch abgeraten wird (Tiong et al., 2014).

Wilmer und Kollegen immortalisierten aus dem Urin gewonnene proximale Tubuluszellen eines gesunden humanen Probanden. Mittels SV40T und hTERT Transfektion entwickelten sie die Zelllinie ciPTEC (*conditionally immortalized proximal epithelial tubule cells*). Damit erreichten sie eine konditionelle Proliferation der Zellen bei 33 °C und eine anschließende Differenzierung zu proximalen Tubuluszellen bei 37 °C (Wilmer et al., 2010). Eine Charakterisierung der Zelllinie bezüglich wichtiger Transporter offenbarte, dass die Zellen weiterhin wichtige Transporter exprimieren (Jansen et al., 2014; Wilmer et al., 2010). CiPTEC Zellen werden für Untersuchungen stets als dichter Monolayer ausgestreut. Innerhalb weniger Tage differenzieren sie wieder zu charakteristischen proximalen Tubuluszellen aus. So werden realistischere Bedingungen zur Untersuchung geschaffen. Somit umgeht diese Zelllinie die bereits erwähnten Probleme und eignet sich zur Untersuchung der Nephrotoxizität von platinbasierten Substanzen.

### 5.3.2 Zytotoxizität von platinbasierten Chemotherapeutika in ciPTEC Zellen

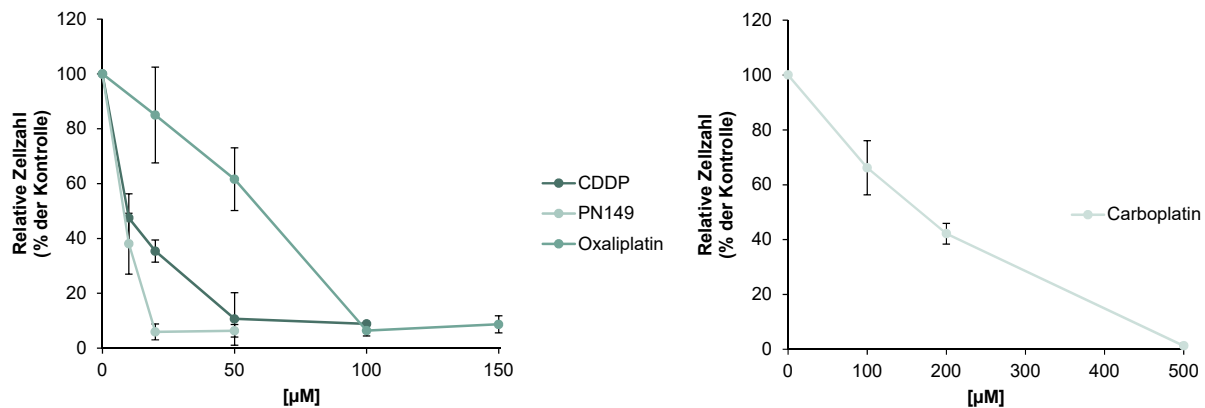
Über Jahre hinweg gab es und gibt es immer noch zahlreiche Erstrebungen, den dosislimitierenden Faktor der Cisplatin-Tumorthherapie zu beheben. Zwei Erstrebungen endeten mit der Zulassung von Carboplatin und Oxaliplatin. In der Regel führen beide Stoffe im Patienten nur zu wenigen bis keinen Nierenschäden (Sahni et al., 2009). Die Begründung hierfür liegt vermutlich, ähnlich wie bei ihrer antineoplastischen Wirkung, bei ihrer unterschiedlichen Struktur. Detaillierte, vergleichende Studien zum nephrotoxischen Potential der Substanzen in humanen Nierenzellen gibt es kaum. Oftmals finden Versuche *in vivo* in Ratten oder Mäusen statt oder in oben genannten Zelllinien. Dadurch sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten. Um so essentieller ist ein Vergleich der Substanzen auf molekularer und funktioneller Ebene durchzuführen. Mit Hilfe der ciPTEC Zelllinie wurde dies in der vorliegenden Arbeit ermöglicht.

Um das nephrotoxische Potential der Substanzen in ciPTEC Zellen zu untersuchen, wurden zunächst Zytotoxizitätsstudien durchgeführt. Diese erfolgten anhand der Bestimmung der relativen Zellzahl. Die Inkubationszeiten der platinbasierten Substanzen für die Studien in ciPTEC Zellen wurden auf 24 h angepasst. Cisplatin weist eine 3-Phasenkinetik in seiner Exkretion auf (Schierl et al., 1995). Die erste Halbwertszeit ( $t_{1/2\alpha}$ ) beträgt 14 - 49 min. Darauf folgt eine zweite Halbwertszeit ( $t_{1/2\beta}$ ) von 0,7 - 4,6 h. Die letzte Halbwertszeit ( $t_{1/2\gamma}$ ) beträgt 24 - 127 h (O'Dwyer et al., 2000). Um in einem angemessenen Rahmen zu agieren, wurden deshalb 24 h gewählt.

Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen für die Bestimmung der relativen Zellzahl noch für weitere 48 h kultiviert und im Anschluss die Zellzahl bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.29 dargestellt. In Tabelle 5.3 sind außerdem die berechneten  $IC_{50}$  Werte der jeweiligen Substanz aufgelistet. Die Bestimmung der relativen Zellzahl offenbarte, dass alle vier platinbasierten Substanzen zytotoxisch in ciPTEC Zellen wirken. Die zytotoxische Stärke unterschied sich jedoch untereinander. Mit einem  $IC_{50}$  von 6  $\mu$ M zeigte PN149 den stärksten Effekt. Cisplatin, dessen nephrotoxisches Potential bekannt ist, wies einen  $IC_{50}$  Wert von 13  $\mu$ M auf. Oxaliplatin und Carboplatin, die im Patienten kein nephrotoxisches Potential aufweisen, wiesen einen  $IC_{50}$  von 34  $\mu$ M bzw. 122  $\mu$ M respektive auf. Folglich weisen alle vier Substanzen, im Vergleich zur RCC Bestimmung in A498 Zellen, einen niedrigeren  $IC_{50}$  Wert auf. Dies könnte jedoch auch auf die deutlich längere Inkubationszeit zurückzuführen sein. Dennoch zeigen alle Substanzen ein deutliches nephrotoxisches Potential in ciPTEC Zellen. Vor allem das Potential von PN149 ist erstaunlich stark.

Aufgrund seiner Struktur wurde postuliert, dass es das Potential besitzt, ROS zu detoxifizieren. Da die Induktion von ROS in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität eine Rolle spielen soll, könnte dieser Mechanismus durch PN149 verhindert werden. Da PN149 aber deutlich zytotoxisch in ciPTEC Zellen ist, scheint diese Struktureigenschaft obsolet zu sein. Welcher Mechanismus für die zytotoxische Wirkung verantwortlich ist, wird im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht.

Nieskens und Kollegen untersuchten die Zytotoxizität von Cisplatin in ciPTEC Zellen mittels MTT Test. Sie inkubierten die Zellen mit 8,7 - 222  $\mu$ M Cisplatin für 24, 48 und 72 h. Bereits nach 24 h konnten sie einen  $TC_{50}$  Wert, welcher äquivalent dem  $IC_{50}$  ist, von 41  $\mu$ M berechnen (Nieskens et al.,



**Abbildung 5.29: Relative Zellzahlbestimmung in ciPTEC Zellen nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanz.** CiPTEC Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 48 h kultiviert und letztlich die Zellzahl bestimmt. Die behandelten Proben wurden prozentual auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung.

2018). Bisher gibt es keine Untersuchungen zur Zytotoxizität von Carboplatin und Oxaliplatin in ciPTEC Zellen. Im Zuge der Studien von Zhang und Kollegen über den Einfluss von OCTs auf platinbasierte Substanzen wurden Zytotoxizitätsstudien in MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) und HEK293 Zellen durchgeführt. Neben den transfizierten Zellen führten sie auch eine MOCK transfizierte Kontrolle mit. Diese wurde für 7 h mit Cisplatin, Carboplatin oder Oxaliplatin inkubiert und nach 72 h wurde die Viabilität mittels MTT Test bestimmt. Dabei ergab sich in den MDCK Zellen für Cisplatin ein  $IC_{50}$  Wert von 20  $\mu$ M, für Carboplatin von 260  $\mu$ M und Oxaliplatin 33  $\mu$ M. Die HEK293 Zellen waren im Vergleich dazu noch sensibler mit einem  $IC_{50}$  Wert von 2,9  $\mu$ M für Cisplatin, 110  $\mu$ M für Carboplatin und 3  $\mu$ M für Oxaliplatin (Zhang et al., 2006). Demnach zeigen sich in diesen Zellen ähnliche Verhältnisse zwischen den einzelnen Verbindungen wie bei den hier generierten  $IC_{50}$  Werten in ciPTEC Zellen. Platinbasierte Chemotherapeutika scheinen folglich auch in anderen Nierenzelllinien ein nephrotoxisches Potential zu haben. Dieser Umstand wurde dennoch nicht von Zhang und Kollegen diskutiert.

Eine vergleichende *in vivo* Studie in Ratten, welche mit den drei Substanzen behandelt wurden, zeigte jedoch genau den Umstand, der in der Klinik beobachtet wird. Cisplatin induzierte Nierenschäden, Carboplatin und Oxaliplatin nicht (Yokoo et al., 2007). Diese Diskrepanz zwischen *in vivo* und *in vitro* unterstreicht noch einmal, wie schwierig es ist, das nephrotoxische Potential einer neuen Substanz präklinisch zu bestimmen. Der niedrige  $IC_{50}$  Wert von PN149 muss demnach nicht zu 100 % die Situation in einem Patienten widerspiegeln. Auch Carboplatin und Oxaliplatin zeigten ein relativ hohes nephrotoxisches Potential in ciPTEC Zellen, obwohl klinische Untersuchungen zeigen, dass sie keine Nephrotoxizität auslösen.

**Tabelle 5.3:** Berechnete IC<sub>50</sub> Werte aus der Bestimmung der relativen Zellzahl von platinbasierten Chemotherapeutika in ciPTEC.

Platinbasierte Substanz	IC <sub>50</sub> [μM]
CDDP	13
PN149	6
Oxaliplatin	34
Carboplatin	122

### 5.3.3 Intrazelluläre Aufnahme platinbasierter Chemotherapeutika in ciPTEC Zellen

Ein viel diskutierter Punkt in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität ist die vermehrte Akkumulation von Cisplatin in der Niere. In Kapitel 5.3 wurde bereits erwähnt, dass die Akkumulation in proximalen Tubuluszellen 5x höher ist als im Blutplasma. Dies liegt zum einen daran, dass Cisplatin hauptsächlich über die Niere ausgeschieden wird, zum anderen generell an Transportsystemen in der Niere (dos Santos et al., 2012). Transportsysteme, die vor allem in der Niere vorhanden sind, sind Transporter der *solute carrier family* (SLC). Hierzu gehören der OCT2 und der MATE1 (*multidrug and toxin extrusion*). Beide Transporter werden bevorzugt in der Niere exprimiert (Filipski et al., 2008; Meyer zu Schwabedissen et al., 2010; Pabla et al., 2008). Der OCT2 wird in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen exprimiert, wohingegen der MATE1 auf der apikalen Seite, d.h. der Bürstensaummembran, vorzufinden ist (Meyer zu Schwabedissen et al., 2010; Nakamura et al., 2010). Folglich ist der OCT2 für die Aufnahme von organischen Kationen in die Zelle und der MATE1 für den Transport aus der Zelle verantwortlich.

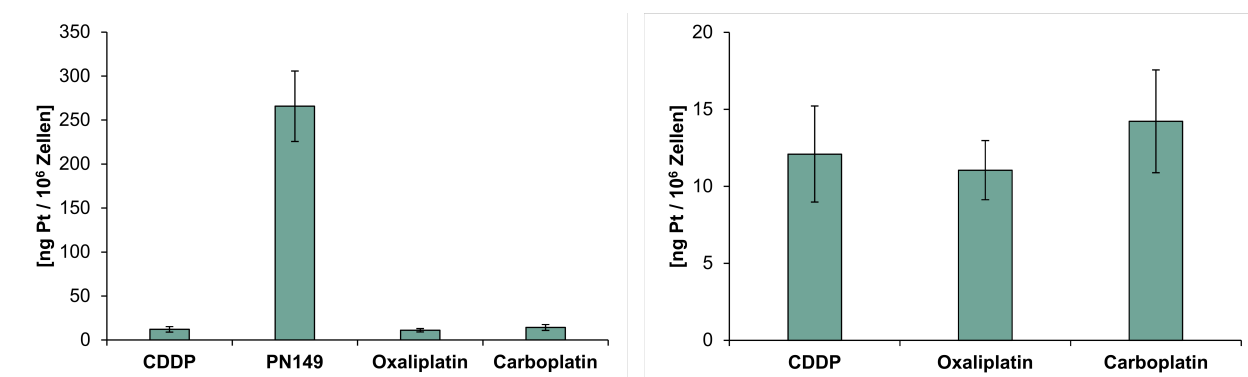
Beide Transporter sollen eine entscheidende Rolle in der Akkumulation platinbasierter Chemotherapeutika in der Niere spielen. Cisplatin und Oxaliplatin sollen dabei beide über den OCT2 aufgenommen werden, nicht aber Carboplatin (Yokoo et al., 2007; Yonezawa und Inui, 2011). Für den Efflux zeigte sich, dass Oxaliplatin und Cisplatin beide über den MATE1 aus der Zelle transportiert werden. Carboplatin stellt auch hier kein Substrat für den MATE1 dar. Oxaliplatin soll außerdem zusätzlich über den MATE2-K ausgeschleust werden (Nakamura et al., 2010; Yokoo et al., 2007; Yonezawa et al., 2006). Diese zusätzliche Ausschleusung über den MATE2-K könnte der Grund für eine geringere Akkumulation und damit auch einer fehlenden Nephrotoxizität von Oxaliplatin im Vergleich zu Cisplatin sein.

Um den Einfluss der Akkumulation von platinbasierten Substanzen auf die Nephrotoxizität zu untersuchen, wurde die intrazelluläre Akkumulation in ciPTEC Zellen gemessen. Ausdifferenzierte ciPTEC Zellen wurden für 2 h mit je 50 μM Cisplatin, PN149 oder Oxaliplatin oder 300 μM Carboplatin inkubiert und anschließend der Platingehalt an der GF-AAS gemessen. In Abbildung 5.30 sind die Ergebnisse der Messung dargestellt. Da PN149 eine deutlich höhere intrazelluläre Akkumulation aufwies, wurden die Ergebnisse von Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin noch einmal in einem weiteren Diagramm zur besseren Übersicht dargestellt. Interessanterweise unterscheidet



sich die Aufnahme der drei Substanzen nur marginal voneinander. Dagegen zeigte PN149 eine ca. 20-fach höhere Akkumulation. Der lipophile Charakter der Substanz führt demnach auch in normalem Gewebe zu einer erhöhten Aufnahme. Im Zuge der Masterarbeit von Sabine Gajewski wurde weiterhin die intrazelluläre Akkumulation von Cisplatin in der renalen Normalgewebprobe NT3318 bestimmt (Daten nicht gezeigt). Auch hier zeigte sich für PN149 eine deutliche Akkumulation von 153 ng Pt/10<sup>6</sup> Zellen. Die Akkumulation von Cisplatin war in den NT3318 Zellen doppelt so hoch wie in den ciPTEC Zellen.

Zu Beginn der Arbeiten mit den ciPTEC Zellen wurden außerdem Aufnahmestudien in Penicillin/Streptomycin (P/S) haltigem Medium durchgeführt. Martijn Wilmer empfahl, die Zellen ohne P/S zu kultivieren, da P/S ein Substrat für Transporter sein kann. Es zeigte sich, dass der Einsatz von P/S keinen Einfluss auf die Aufnahme von Oxaliplatin und PN149 hatte, jedoch konnten Unterschiede in der Akkumulation von Cisplatin und Carboplatin festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Immunoblotanalyse ergab, dass die Kultivierung von ciPTEC Zellen in P/S haltigem Medium einen Einfluss auf den Ctr1 hat. Dieser wurde dabei in P/S haltigem Medium vermehrt exprimiert (Daten nicht gezeigt). Der Versuch wurde jedoch nur einmal durchgeführt und müsste, um konkreter Aussagen zu treffen, noch wiederholt werden. Dennoch könnte diese Untersuchung einen Hinweis über die Aufnahme der Substanzen über den Ctr1 geben. Demnach würden Oxaliplatin und PN149 nicht über den Ctr1 aufgenommen werden, Cisplatin und Carboplatin aber schon. Dies würde auch die Untersuchungen von Holzer et al. (2006) unterstützen, die keinen Einfluss des Ctr1 auf die Aufnahme von Oxaliplatin bei hohen Konzentrationen feststellen konnten.



**Abbildung 5.30: Intrazelluläre Akkumulation der platinbasierten Chemotherapeutika in ciPTEC Zellen.** Ausdifferenzierte ciPTEC Zellen wurden für 2 h mit jeweils 50  $\mu$ M Cisplatin, PN149 oder Oxaliplatin bzw. 300  $\mu$ M Carboplatin inkubiert. Nach saurem Aufschluss wurde der Platingehalt mittels GF-AAS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung.

Yonezawa und Kollegen untersuchten u.a. in ihren Aufnahmestudien die intrazelluläre Akkumulation von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin in HEK293 Zellen. Sie inkubierten die Zellen für eine Stunde mit jeweils 500  $\mu$ M der jeweiligen Substanz. Cisplatin und Oxaliplatin wiesen dabei eine vergleichbare intrazelluläre Akkumulation auf. Carboplatin hingegen zeigte nur einen Bruchteil der Akkumulationen von Cisplatin und Oxaliplatin (Yonezawa et al., 2006). Bei gleicher Konzentration der Substanzen konnte dies jedoch auch in A498 Zellen festgestellt werden. Erst bei einer

deutlich höheren Konzentrationen war die Akkumulation von Carboplatin mit der von Cisplatin vergleichbar. Im einfachen Zellkulturmodell scheint also kein Unterschied in der Akkumulation der Substanzen feststellbar zu sein. Yokoo und Kollegen untersuchten die Akkumulation von platinbasierten Substanzen in der Niere von Ratten. Sie konnten eine deutlich vermehrte Akkumulation von Cisplatin im Vergleich zu Carboplatin und Oxaliplatin feststellen (Yokoo et al., 2007).

Auch hier offenbart sich wieder das Problem des Modells zur Untersuchung von Nephrotoxizität. Ein einfaches Zellkulturmodell spiegelt die Situation in der Niere nicht adequat wieder. Welchen Einfluss das Zellkulturmodell auf die Aufnahme von platinbasierten Substanzen hat, konnten Ludwig und Kollegen anhand eines Transwellsystems veranschaulichen. Sie kultivierten den C7 Klon der MDCK Zelllinie auf einer Membran in einem Transwellsystem (Ludwig et al., 2004). Dieses System erlaubt die Trennung in eine basolaterale und eine apikale Seite. Diese Kultivierungsform erlaubt den Zellen dann, einen polarisierten dichten Monolayer auszubilden. Hierdurch werden realistischere Bedingungen erhalten, die den eigentlichen Verhältnissen im Körper sehr viel näher kommen (Sánchez-Romero et al., 2016). Ludwig und Kollegen untersuchten in ihrem System den Einfluss der Applikation von platinbasierten Substanzen (Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin) auf der basolateralen bzw. apikalen Seite. Dabei zeigte sich, dass eine Applikation auf der basolateralen Seite zu einer stärkeren Toxizität der platinbasierten Substanzen führte als auf der apikalen (Ludwig et al., 2004).

In der Masterarbeit von Sirin Yesil wurde die intrazelluläre Akkumulation von Cisplatin in A498 und ciPTEC Zellen untersucht. Beide Zelllinien wurden jeweils im einfachen Zellkulturmodell sowie in einem Transwellsystem kultiviert. In beiden System wurde dann die Akkumulation von Cisplatin gemessen. Dabei zeigte sich eine sehr viel geringere Akkumulation im Transwellsystem (siehe Anhang).

Diese Ergebnisse unterstreichen noch einmal, welchen Einfluss das Modellsystem bei Transportstudien in Nierenzellen und generellen Untersuchungen zur Nephrotoxizität hat.

Da neben der Akkumulation von Cisplatin in der Niere weitere Faktoren eine Rolle in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität spielen können, wurden im weiteren Genexpressionsanalysen zu verschiedenen Signalwegen durchgeführt.

#### **5.3.4 Einfluss von platinbasierten Chemotherapeutika auf Transkriptionsfaktoren in ciPTEC Zellen**

Nur alleine durch eine vermehrte Akkumulation führt Cisplatin nicht zu Nephrotoxizität. Innerhalb der Zelle müssen verschiedene Vorgänge stattfinden, damit Nierenschäden überhaupt entstehen können. Es scheint, dass dieser Vorgang der antineoplastischen Wirkung von Cisplatin sehr ähnlich ist. Letztlich induziert Cisplatin verschiedene Signaltransduktionswege, die zum Zelltod führen (Pabla et al., 2008). Signalwege, die dabei von Bedeutung sein sollen, sind u.a. die MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) sowie die p53-Signalkaskade (Sahni et al., 2009). Um einen genaueren Einblick über die involvierten Signalwege zu erhalten, wurden, gleichermaßen zur antineoplasti-

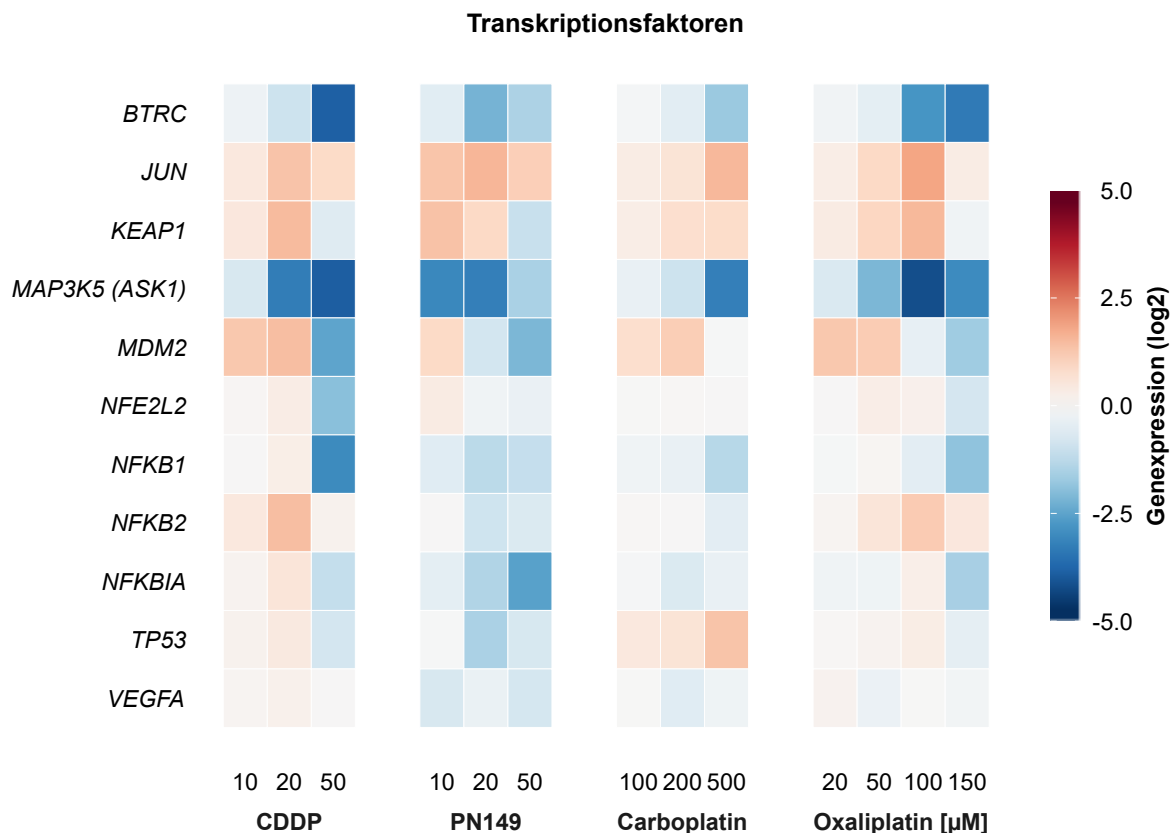
sehen Wirkung, Genexpressionsprofile verschiedener Signalwege in ciPTEC Zellen erstellt. Eine umfassende Studie über die Wirkung von platinbasierten Substanzen in Nierenzellen gibt es bisher nur in renalen Tubuluszellen der Ratte (Krüger et al., 2015), nicht aber in humanen Zellen. Über die Wirkung von PN149 ist des Weiteren bisher noch nichts bekannt.

In Abbildung 5.31 ist die Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren nach einer 24 h Inkubation mit den platinbasierten Substanzen in ciPTEC Zellen dargestellt. Für Cisplatin lässt sich erkennen, dass ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  die Genexpression mehrerer Gene herunterreguliert wurde. Dies war ebenfalls in den weiteren Genexpressionsprofilen zu erkennen. Folglich deutet dies auf das Absterben der Zellen ab dieser Konzentration hin. Eine visuelle Betrachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop konnte dies bestätigen. Dieses Phänomen war gleichermaßen bei PN149 ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  und bei Oxaliplatin ab einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  zu erkennen. Für Carboplatin war eine allgemeine verminderte Expression verschiedener Gene bei keiner Konzentration zu erkennen. Eine lichtmikroskopische Betrachtung der Zellen offenbarte nach der 24 h Inkubation mit Carboplatin auch keine deutlichen Veränderungen der Zellen.

Bei Betrachtung der Genexpressionsprofile lässt sich vor allem erkennen, dass die Gene *BTRC* und *MAP3K5 (ASK1)* eine verminderte Expression bei allen vier Substanzen aufwiesen. *BTRC (beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase)* codiert für eine E3 Ubiquitin Ligase, die u.a. für den Abbau von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  und  $\beta$ -Catenin, welches eine wichtige Rolle im Wnt-Signalweg spielt, verantwortlich ist (Wolter et al., 2003). Weiterhin soll das Protein außerdem an der Zellzykluskontrolle beteiligt sein (Nakayama und Nakayama, 2006). Eine verminderte Expression sollte folglich einen Einfluss auf den NF- $\kappa$ B Signalweg haben. Für PN149 ging die verminderte Expression von *BTRC* einher mit einer verminderten Expression von *NFKBIA*. Bei Cisplatin und Oxaliplatin war hingegen eine vermehrte Expression von *NFKB2* zu detektieren.

*MAP3K5* oder auch *ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase)* gehört zu den sogenannte MAP Kinasen, welche an verschiedenen Stressantwortwegen, wie der Induktion des Zelltods, beteiligt sind (Matsukawa et al., 2004). *MAP3K5 (ASK1)* aktiviert *downstream* dann den JNK und p38 Signalweg (Matsukawa et al., 2004; Tobiume et al., 2001). Diese Aktivierung führt weiter zur Phosphorylierung und damit zur Inaktivierung des antiapoptotischen Proteins BCL2. Dadurch trägt *MAP3K5 (ASK1)* zur Induktion des intrinsischen Apoptosewegs bei (Yamamoto et al., 1999). *JUN*, das ebenfalls am JNK Signalweg beteiligt ist, zeigte in der Genexpression für alle Substanzen eine erhöhte Expression. Beide Gene stehen sich demnach im Widerspruch gegenüber. Die genauen Auswirkungen der verminderten Expression von *BTRC* und *MAP3K5 (ASK1)* lassen sich demnach anhand der Genexpressionsdaten nicht ausmachen.

Ein weiteres Gen, das eine vermehrte Expression aufwies, war *KEAP1*. *KEAP1 (kelch like ECH associated protein 1)* codiert für das gleichnamige Protein, welches am KEAP1-Nrf2-ARE Signalweg beteiligt ist. Dieser stellt einen wichtigen Signalweg zum Schutz der Zelle vor (oxidativem) Stress dar (Kensler et al., 2007). Unter normalen Bedingungen bindet KEAP1 an Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) und führt so zu seinem stetigen Abbau. Durch zellulären Stress



**Abbildung 5.31: Genexpressionsprofile verschiedener Transkriptionsfaktoren in ciPTEC Zellen nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanz.** Ausdifferenzierte ciPTEC Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen platinbasierten Substanz behandelt. Nach 24 h wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR bestimmt. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die  $\log_2$  Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

kommt es zu Modifikationen von KEAP1. Infolgedessen wird Nrf2 in den Zellkern translokalisiert und bindet dort an das *antioxidative response element* (ARE). Dies führt wiederum zu einer Aktivierung der Genexpression antioxidativer Gene (Kaspar et al., 2009). Eine vermehrte Expression von KEAP1 spricht folglich für eine Induktion von oxidativem Stress. Wilmes und Kollegen führten ebenfalls Studien zu Signalwegen in Cisplatin behandelten humanen proximalen Tubuluszellen durch. Mittels *transcriptomics* konnten sie u.a. einen Einfluss des KEAP1-Nrf2-ARE Signalweges in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität ermitteln (Wilmes et al., 2015). In Kapitel 5.3.7 wird noch genauer auf die Induktion von oxidativem Stress eingegangen.

Alle vier Substanzen führten außerdem zu einer vermehrten Expression von MDM2. Wie bereits mehrfach diskutiert, ist MDM2 der Gegenspieler von p53. Demnach könnte es auch in ciPTEC Zellen zu einer Aktivierung von p53 kommen. In ciPTEC Zellen wurde jedoch nicht das p53 Proteinlevel bestimmt, weshalb hier keine definitiven Aussagen getroffen werden können. Jiang und Kollegen konnten in ihren Studien an proximalen Tubulus Zellen der Ratte p53 eine wichtige Rolle

in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität zuordnen (Jiang et al., 2004, 2006). Cummings und Kollegen stellten in ihren Studien an proximalen Tubuluszellen des Kaninchens eine Beteiligung von p53 an der Induktion von p53 an der Apoptose fest (Cummings, 2002). In der Rattentubuluszelllinie NRK-52E konnten Krüger und Kollegen sowohl für Cisplatin als auch Carboplatin und Oxaliplatin eine Aktivierung feststellen (Krüger et al., 2015). Demnach scheint auch p53 eine wichtige Rolle in der Nephrotoxizität von Cisplatin zuzukommen.

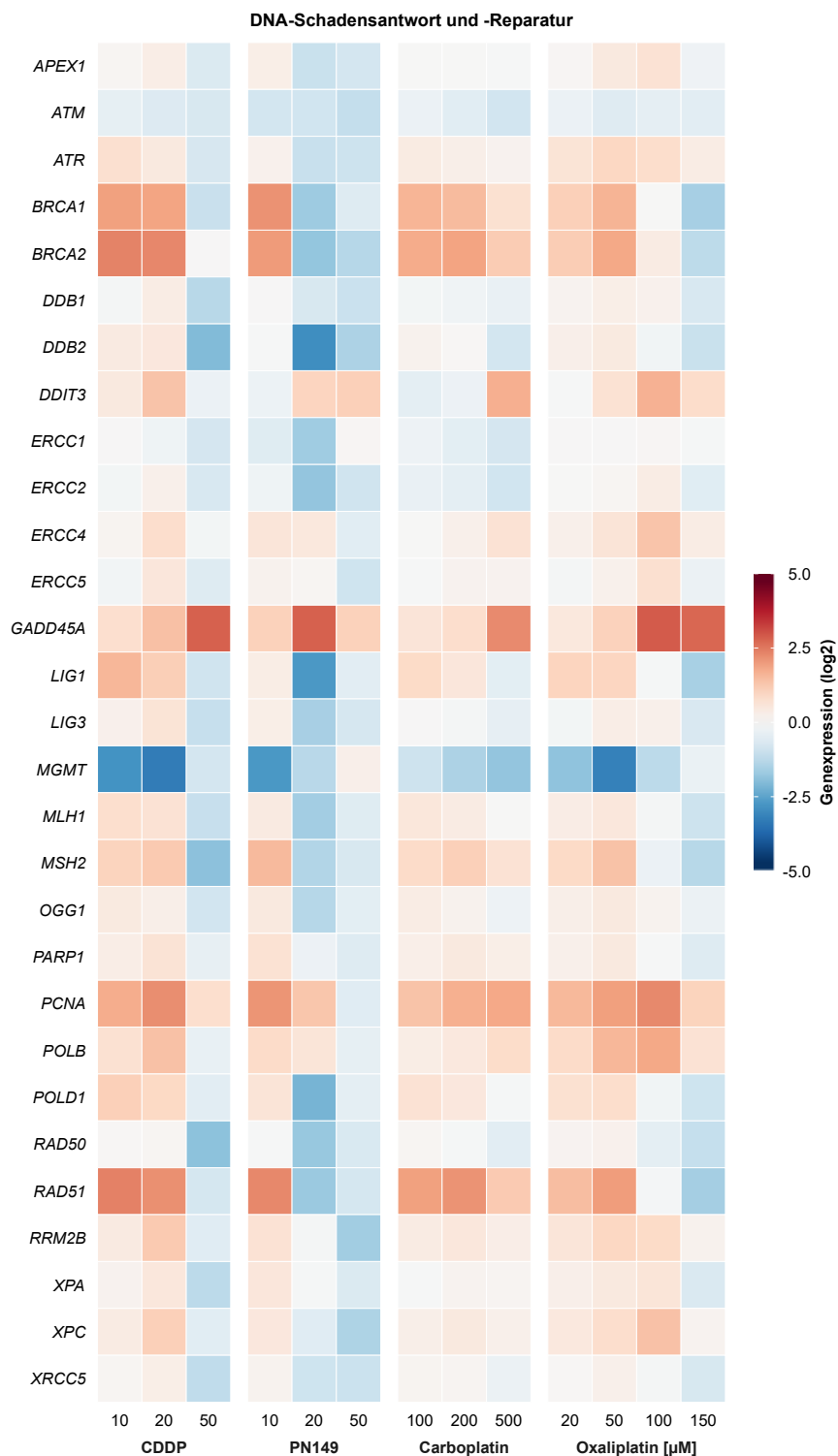
Interessant bei den hier generierten Daten ist, dass alle vier Substanzen zu ähnlichen Veränderungen in der Genexpression von Transkriptionsfaktoren führten. Selbst Oxaliplatin ähnelt den anderen Substanzen, obwohl es in seinem Wirkmechanismus in den A498 Zellen von den anderen drei Substanzen abwich. Es bleiben jedoch die restlichen Ergebnisse der Genexpression abzuwarten, um konkretere Aussagen hierüber treffen zu können.

### 5.3.5 DNA-Schadensantwort und -Reparatur in ciPTEC Zellen

Gleichermaßen wie ihre antineoplastische Wirkung können platinbasierte Chemotherapeutika, einmal in der Zelle angelangt, zu DNA-Schäden führen. Untersuchungen zeigten, dass DNA Schäden und die damit verbundene DDR ebenfalls an der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität beteiligt sein können (Krüger et al., 2015; Zhu et al., 2015). In ciPTEC Zellen wurde deshalb ebenfalls die Genexpression von DNA-Schadensantwort- und -Reparaturgenen untersucht.

In Abbildung 5.32 sind die Genexpressionsprofile der jeweiligen platinbasierten Substanz in ciPTEC Zellen dargestellt. Ausdifferenzierte ciPTEC Zellen wurden hierfür jeweils für 24 h mit der jeweiligen Substanz inkubiert. Auch hier zeigte sich, wie bereits bei den Transkriptionsfaktoren, eine verminderte Expression vieler Gene ab bestimmten Konzentrationen. Auf den ersten Blick fällt auch hier auf, dass alle vier Substanzen zu einer ähnlichen Veränderung in den gleichen Genen führen. Ähnlich zur antineoplastischen Wirkung der Substanzen wurden auch in den ciPTEC Zellen p53-abhängige Gene vermehrt exprimiert. Hierzu zählen *GADD45A*, *PCNA* und *RRM2B*, wobei die veränderte Expression von *RRM2B* nur für Cisplatin und Oxaliplatin im relevanten Bereich lag. Beide Substanzen führten in den A498 Zellen auch zur stärksten Erhöhung des p53-Proteinlevels und damit zur ausgeprägtesten Veränderung von p53-abhängigen Genen. Dies könnte auch in ciPTEC Zellen der Fall sein.

Neben der vermehrten Expression von p53-abhängigen Genen war weiterhin auffällig, dass Gene der DNA-Doppelstrangbruchreparatur vermehrt exprimiert wurden. Dabei wurden vor allem die an der HR beteiligten Gene *BRCA1*, *BRCA2* und *RAD51* vermehrt exprimiert. Dies war für alle Substanzen der Fall. Demnach könnten alle Substanzen in ciPTEC Zellen zu Doppelstrangbrüchen führen. Dies ist insofern erstaunlich, da Oxaliplatin in A498 Zellen genau zum gegenteiligen Effekt führte. Alle drei Gene wurden in A498 Zellen deutlich vermindert exprimiert. Bruno und Kollegen konnten in ihren Untersuchungen in primären Mauslymphomazellen mit Hilfe des Comet Assays und dem  $\gamma$ -H2AX Assay zeigen, dass Oxaliplatin keine Strangbrüche verursacht (Bruno et al., 2017). Erstaunlicherweise scheint Oxaliplatin sich demnach in Normalzellen anders zu verhalten.



**Abbildung 5.32: Genexpressionsprofile von DNA-Schadensantwort- und -Reparaturgenen in ciPTEC Zellen nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanz.** Ausdifferenzierte ciPTEC Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen platinbasierten Substanz inkubiert. Im Anschluss wurde mit Hilfe der Hochdurchsatz RT-qPCR die Genexpression bestimmt. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Werte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Ein weiteres Gen, das auffällig verändert wurde, ist *MGMT* (*O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase). Alle vier Substanzen führten dazu, dass es vermindert exprimiert wurde, wobei der Effekt für Carboplatin am geringsten war und für Cisplatin am stärksten. *MGMT* codiert für ein DNA-Reparaturprotein, das auch als *O*<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT) bekannt ist (Esteller et al., 2000; Gerson, 2004). Dieses Enzym repariert Alkylierungen an der *O*<sup>6</sup> Position von Guanin und kann somit *Crosslinks* wieder rückgängig machen (Esteller et al., 2000).

Die hauptsächlich gebildeten *Crosslinks* von platinbasierten Substanzen entstehen am *N*<sup>7</sup> von Guanin, dennoch können auch *Crosslinks* an *O*<sup>6</sup> gebildet werden. Diese gebildeten Cisplatin-*O*<sup>6</sup> *Crosslinks* führten in einem Experiment in HeLa Zellen zu einer Inaktivierung des Enzyms. Wang und Kollegen zeigten in ihrer Studie aber auch, dass dieser Schaden nicht ausschlaggebend für die zytotoxische Wirkung ist (Wang und Setlow, 1989). Eine Inaktivierung des Enzyms kann aber insofern fatal sein, da ein unreparierter Schaden zu einer Mutation führen kann (Gerson, 2004).

Die verminderte Expression von *MGMT* deutet ebenfalls auf eine Inaktivierung des Enzyms hin. Eine Inaktivierung in Nierennormalzellen könnte folglich zu Mutationen führen, deren weitere Folgen die Bildung von Tumoren beinhalten kann.

Neben Genen der HR und p53-abhängigen Genen wurde außerdem das MMR Gen *MSH2* durch alle Substanzen vermehrt exprimiert. *MSH2* ist ebenfalls ein Gen, welches in A498 Zellen nach Inkubation mit Oxaliplatin vermindert exprimiert wurde. In ciPTEC Zellen wurde es jedoch vermehrt exprimiert. Die codierenden Proteine von *MSH2* und *MLH1* bilden zusammen mit weiteren MMR beteiligten Proteinen einen Komplex, der Cisplatin-induzierte DNA-Schäden erkennt und gelten somit als DNA-Schadenserkennungsproteine (Siddik, 2003).

MMR Proteine binden während dem sogenannten *replicative bypass* an Cisplatin-induzierte DNA-Schäden. Dadurch wird ein fultes *cydling* der DNA-Schäden aktiviert, sodass die Schäden persistieren oder Strangbrüche entstehen können, die letztlich zum Zelltod führen (Kweekel et al., 2005). Dies ist der Grund, warum Cisplatin resistent in Kolonkarzinomen ist, da diese oft MMR defizient sind. Gleichzeitig ist dies aber auch der Grund, warum Oxaliplatin effektiv in Kolonkarzinomen ist, da Oxaliplatin-induzierte DNA-Schäden unabhängig von der MMR sind (Kweekel et al., 2005).

Umso erstaunlicher ist auch hier wieder das Ergebnis von Oxaliplatin in ciPTEC Zellen. Scheinbar führt Oxaliplatin dennoch zu einer vermehrten Expression von MMR Genen.

Weitere Gene, die durch die Behandlung von ciPTEC Zellen mit platinbasierten Substanzen vermehrt exprimiert wurden, waren *DDIT3*, *POLB* und *POLD1*. *DDIT3* ist am Zellwachstum sowie der Zelldifferenzierung beteiligt. Eine Überexprimierung kann zu einer vermehrten Induktion der Apoptose führen (Wang et al., 2010). *POLB* ist an der BER und *POLD1* an der NER beteiligt. Alle vier platinbasierten Substanzen führten folglich zu DNA-Schäden, die eine ähnliche DDR hervorriefen. Dies steht im Kontrast zu den Daten aus den A498 Zellen, in denen sich Oxaliplatin deutlich von den anderen drei Substanzen unterschied.

### 5.3.6 Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferation in ciPTEC Zellen

Eine vermehrte Expression von DNA-Reparaturgenen deutet auf einen Zellzyklusarrest hin, da die Zelle sich so mehr Zeit gibt und versucht, den Schaden zu reparieren. In A498 Zellen konnte ein deutlicher Zellzyklusarrest für Cisplatin und Carboplatin festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte Oxaliplatin nur einen geringen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung. A498 Zellen stellen im Vergleich zu ciPTEC Zellen allerdings Tumorzellen dar. Diese teilen sich fortwährend weiter, wohingegen Normalzellen sich im Normalfall nicht mehr teilen und sich in der sogenannten G<sub>0</sub>-Phase befinden (Maddika et al., 2007). Nur 1 % aller renalen Tubuluszellen befindet sich in der Proliferationsphase. Kommt es jedoch zu einem Schaden, können Zellen aus der G<sub>0</sub>-Phase in die G<sub>1</sub>-Phase übergehen (Price et al., 2009). Bei einer AKI kommt es dabei u.a. zur Induktion von *PCNA* und *JUN*, folglich Gene, die als Marker für Proliferation angesehen werden. (Witzgall et al., 1994; Price et al., 2009). Dieser Unterschied von normalen Zellen zu Tumorzellen bzw. generell sich teilenden Zellen sollte bei *in vitro* Untersuchungen niemals vergessen werden. CiPTEC Zellen verhalten sich wie Normalzellen, sobald sie bei 37 °C ausdifferenziert wurden. Damit spiegeln sie die Realität deutlich besser wider als andere Zelllinien.

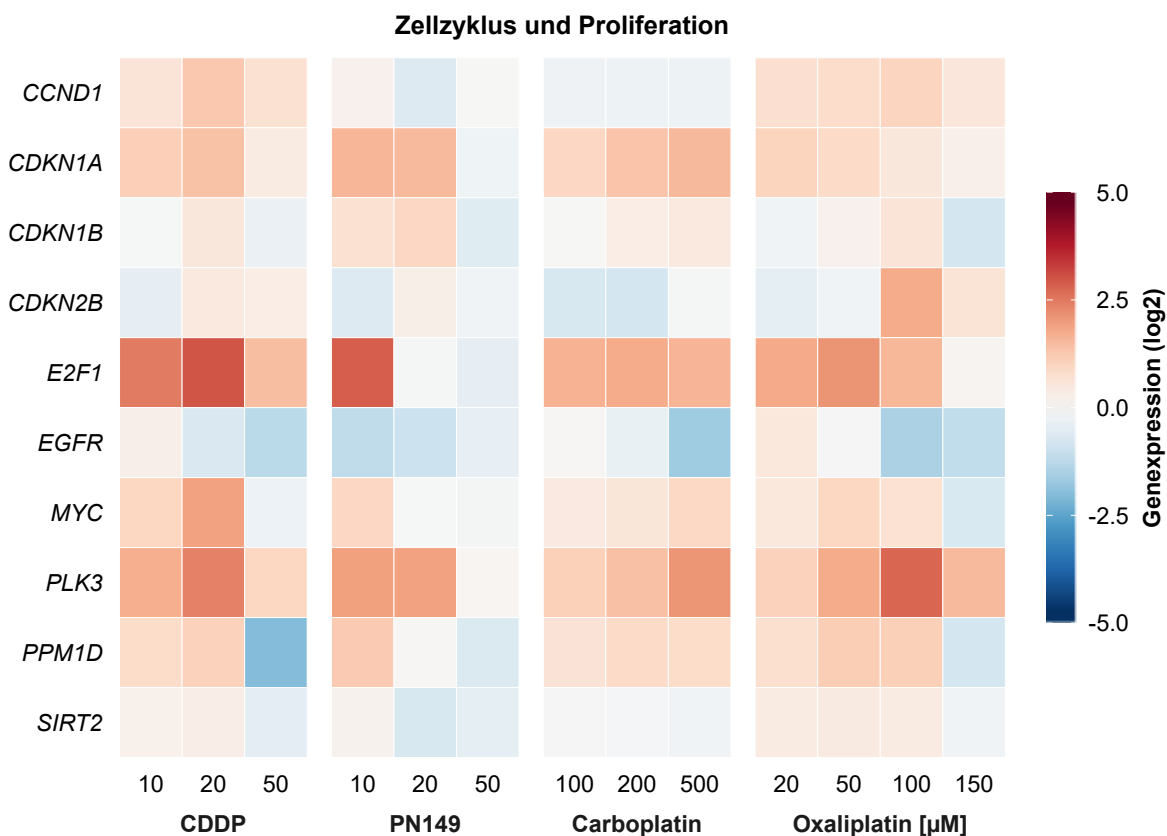
Um die Rolle des Zellzykluses in der Wirkung von platinbasierten Chemotherapeutika zu untersuchen, wurde die Genexpression verschiedener zellzyklus- und proliferationsbeteiligter Gene in ciPTEC Zellen untersucht. ciPTEC Zellen wurden hierfür für 24 h mit der jeweiligen Substanz inkubiert und im Anschluss die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR bestimmt. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 5.33 dargestellt. Dabei ist erkennbar, dass die Substanzen zu unterschiedlich starken zellulären Antworten führten, wobei das Gen *E2F1* den deutlichsten Unterschied zeigte. Eine Behandlung der Zellen führte zu einer vermehrten Expression des Gens, wobei diese am ausgeprägtesten für Cisplatin und PN149 war. In Kapitel 5.1.5 wurde erläutert, dass das codierende Protein E2F1 eines der wichtigsten Proteine für den Eintritt in die S-Phase ist und somit an der Zellzyklusprogression beteiligt ist. *PCNA* und *JUN* sind weitere Gene, die an der Proliferation beteiligt sind und es bekanntermaßen bei AKI zu einer vermehrten Expression der Gene kommt (Price et al., 2009). Auch diese Gene wurden von allen vier Substanzen vermehrt exprimiert (Abbildung 5.32 und 5.31). Es scheint folglich, dass platinbasierte Chemotherapeutika dazu führen, dass ciPTEC Zellen von einem Ruhezustand in den proliferierenden Zustand übergehen. Hierfür spricht außerdem die vermehrte Expression von *CCND1*, wobei diese nur nach Behandlung von ciPTEC Zellen mit Cisplatin und Oxaliplatin zu erkennen war.

Weiterhin wurden durch die Behandlung von ciPTEC Zellen mit platinbasierten Chemotherapeutika p53-abhängige Gene vermehrt exprimiert. Wie bereits in den A498 Zellen wurden *CDKN1A*, *PLK3* und *PPMID* durch alle Substanzen vermehrt exprimiert. Dies spricht u.a. für einen Zellzyklusarrest durch p21. Ein weiteres Gen, das durch platinbasierte Chemotherapeutika beeinflusst wurde, war *MYC*. Das codierende Protein MYC ist sowohl am Zellwachstum, der Proliferation aber auch an der Induktion der Apoptose nach einem DNA-Schaden beteiligt (Levens, 2002). Weiterhin reguliert *MYC* die Expression von *E2F1*, wodurch eine vermehrte Expression von *MYC* einhergeht



mit einer vermehrten Expression von *E2F1* (O'Donnell et al., 2005).

Zusammenfassend deuten die Genexpressionsdaten darauf hin, dass ciPTEC Zellen nach Behandlung mit platinbasierten Chemotherapeutika in einen Proliferationsstatus übergehen und den Zellzyklus durchlaufen. Eine vermehrte Expression von *CDKN1A* deutet außerdem auf einen Zellzyklusarrest hin. Diese Abfolge an Proliferation und Zellzyklusarrest könnte darauf hinweisen, dass die Zellen nicht einfach direkt den Zelltod einleiten, sondern vorher versuchen, den DNA-Schaden zu beheben und sich so regenerieren (Hanigan und Devarajan, 2003). Um weitere definitive Aussagen über den Zellzyklus treffen zu können, müsste allerdings die Zellzyklusverteilung untersucht werden.



**Abbildung 5.33: Genexpressionsprofile zellzyklus- und proliferationsbeteiligter Gene in ciPTEC Zellen nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanz.** Zur Untersuchung der Genexpression wurden ausdifferenzierte ciPTEC Zellen für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen platinbasierten Substanz inkubiert. Darauf folgend wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR bestimmt. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Huang und Kollegen konnten in ihren Genexpressionsstudien sowohl in Ratten als auch in NRK-52E Zellen ebenfalls eine vermehrte Expression von Proliferationsgenen nach Behandlung mit Cisplatin ermitteln (Huang, 2001). In weiteren *in vitro* und *in vivo* Versuchen konnte sowohl eine vermehrte Expression von p21 auf Gen- als auch auf Proteinebene nach Behandlung mit Cisplatin festgestellt

werden (Megyesi et al., 1998; Miyaji et al., 2001; Wilmes et al., 2015). Miyaji und Kollegen zeigten außerdem, dass die vermehrte Expression von p21 p53-abhängig, aber auch -unabhängig ist (Miyaji et al., 2001). Krüger und Kollegen untersuchten die Zellzyklusverteilung nach Behandlung von NRK-52E Zellen mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin. Nach 24 h Inkubation der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  Cisplatin zeigte sich bereits eine deutliche Zunahme der subG<sub>1</sub>-Phase, die nach 48 h weiter deutlich zunahm. Für Carboplatin (100  $\mu\text{M}$ ) und Oxaliplatin (5  $\mu\text{M}$ ) zeigte sich diese Zunahme der subG<sub>1</sub>-Phase erst nach 48 h. Deutliche Änderungen in den anderen Zellzyklusphasen konnten sie keine ermitteln (Krüger et al., 2015).

Der Zellzyklus scheint demnach eine wichtige Rolle in der Wirkung von platinbasierten Substanzen in renalen Epithelzellen zu spielen.

### 5.3.7 Oxidative Stressantwort und Inflammationsmarker in ciPTEC Zellen

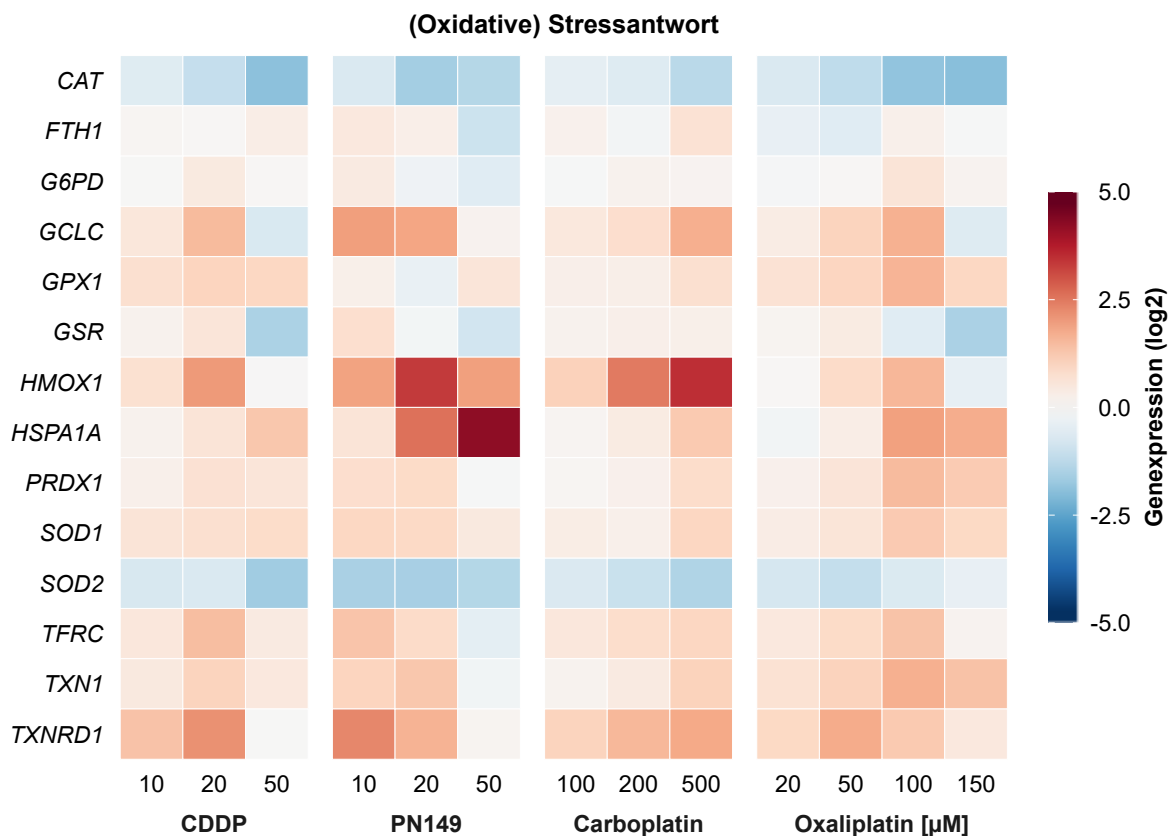
Oxidativer Stress und Inflammationsprozesse werden häufig im Zuge der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität genannt. Dabei wird oxidativer Stress sowohl als Auslöser des Zelltods aber auch als Nebenprodukt des Zelltods angesehen (dos Santos et al., 2012). Cisplatin-induzierte reaktive Sauerstoffspezies können u.a. durch eine verminderte Expression von antioxidativen Enzymen sowie einer GSH Depletion entstehen (Hanigan und Devarajan, 2003). ROS können aber auch das Ergebnis von mitochondrialen Schäden bzw. eine Fehlregulation in den Mitochondrien sein (Yang et al., 2014). In der Zelle können ROS dann u.a. Schäden an Makromolekülen, wie Lipiden oder der DNA, verursachen. Sie können aber auch als Signalüberträger agieren und wichtige Signaltransduktionswege aktivieren, wie z.B. p53 (Pabla et al., 2008). Baek und Kollegen konnten sogar zeigen, dass unterschiedliche ROS an verschiedenen Zelltodmechanismen involviert sein können. Sie postulierten anhand ihrer Ergebnisse, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an der Cisplatin-induzierten Nekrose, wohingegen OH<sup>•</sup> an der Cisplatin-induzierten Apoptose beteiligt sein soll (Baek et al., 2003). Tsutsumishita und Kollegen konnten zudem zeigen, dass Cisplatin in proximalen Tubuluszellen des S<sub>3</sub>-Segments zur Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte, nicht aber in Zellen des äußeren medullären Sammelrohrs (Tsutsumishita et al., 1998). Demnach könnten Zellen des proximalen Tubulus besonders anfällig für die Bildung von ROS sein.

Aufgrund dieser Evidenzlage, dass ROS Teil der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität sind, wurde für die Struktur von PN149 ein Amminonitroxyl-Rest gewählt. Dieser weist, wie bereits in Kapitel 5.2.6 erwähnt, ein antioxidatives Potential auf. Darüber, ob Carboplatin und Oxaliplatin zu oxidativem Stress in der Niere führen, ist nichts bekannt. Jedoch konnte ein Zusammenhang zwischen ihren dosislimitierenden Nebenwirkungen und ROS ermittelt werden. Ein Vergleich der oxidativen Stressantwort in proximalen Tubuluszellen bringt demnach weiterhin Aufschluss darüber, welche spezifische Rolle oxidativer Stress in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität spielt.

In ciPTEC Zellen wurde deshalb nach einer 24 h Inkubation mit der jeweiligen platinbasierten Substanz die Expression von Genen, involviert in die oxidative Stressantwort, mittels Hochdurchsatz RT-qPCR ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.34 dargestellt. Alle vier Substanzen führ-

ten nach Behandlung von ciPTEC Zellen zu einer verminderten Expression von *CAT* und *SOD2*. Dies geht einher mit der zuvor beschriebenen Depletion an antioxidativen Enzymen. Tanabe und Kollegen konnten in einer *in vivo* Studie feststellen, dass eine Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität zu mitochondrialen Dysfunktionen führt, die einhergeht mit einer verminderten Expression der MnSOD, dem codierenden Protein von *SOD2* (Tanabe et al., 2012).

Diese Depletion soll außerdem mit einem verminderten Glutathionspiegel einhergehen (Yang et al., 2014). Als Marker für Veränderungen im GSH Spiegel dienten in der Genexpressionsanalyse die Gene *GSR* (*glutathion-disulfide reductase*), dessen Aufgabe die Reduktion von oxidiertem Glutathiondisulfid (GSSG) zu GSH ist, und *GCLC*, das an der GSH Synthese beteiligt ist. Das Gen *GSR* wurde erst bei der höchsten Konzentration der jeweiligen Substanz vermindert exprimiert bzw. im Falle von Carboplatin gar nicht beeinflusst, wohingegen *GCLC* durch alle vier Substanzen vermehrt exprimiert wird. Demnach scheint ein Einfluss auf das GSH Level möglicherweise vorhanden zu sein.



**Abbildung 5.34: Genexpressionsprofile von (oxidativen) Stressantwortgenen nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanz in ciPTEC Zellen.** Ausdifferenzierte ciPTEC Zellen wurden mit der jeweiligen platinbasierten Substanz für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR bestimmt. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

*CAT* codiert für das  $\text{H}_2\text{O}_2$  detoxifizierende Enzym Katalase. Verschiedene Studien deuten daraufhin, dass dieses Molekül eine Rolle in der Induktion des Zelltods in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität spielt (Baek et al., 2003; Tsutsumishita et al., 1998). Eine verminderte Expression des Enzyms könnte also zu einem verminderten Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$  führen. Interessanterweise war die Expression des Gens *GPX1*, dessen codierendes Enzym ebenfalls  $\text{H}_2\text{O}_2$  abbaut, nach Behandlung mit Cisplatin und Oxaliplatin erhöht. Folglich kommt es nicht zu einer Depletion aller antioxidativer Enzyme.

Im Kontrast zur verminderten Expression von *SOD2* wurde *SOD1* durch alle vier Substanzen vermehrt exprimiert. Die Isoformen der SOD unterscheiden sich in ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle. *SOD2* wird dabei in den Mitochondrien exprimiert, wohingegen *SOD1* im Zytoplasma lokalisiert ist (Zelko et al., 2002). Es könnte demnach gemutmaßt werden, dass nur mitochondrial lokalisierte Enzyme depletiert werden, aber *CAT* ist ebenfalls im Zytoplasma bzw. den Peroxisomen lokalisiert (Bai und Cederbaum, 2001). Die Frage, wieso *CAT* vermindert exprimiert wird, *SOD1* aber vermehrt, lässt sich folglich anhand der hier generierten Daten nicht beantworten.

Konträr zu den hier generierten Daten konnten Wilmes und Kollegen eine vermehrte Expression von *CAT* in Cisplatin-behandelten RPTEC/TERT1 Zellen feststellen. Übereinstimmend mit den Daten in ciPTEC Zellen zeigten RPTEC/TERT1 Zellen ebenfalls eine verminderte Expression von *SOD2* (Wilmes et al., 2015).

Alle vier Substanzen führten weiterhin zu einer vermehrten Expression von *TXN* und *TXNRD1*. *TXN* codiert für Thioredoxin, eine Reduktase, die andere Proteine in ihrem reduzierten Zustand hält. Die oxidierte Form von Thioredoxin wird dann in einem Redoxcycling durch die Thioredoxin Reduktase, das Produkt von *TXNRD1*, und NADPH wieder in seine reduzierte Form überführt (Arnér und Holmgren, 2000). Eine vermehrte Expression dieser Gene spricht demnach für vermehrte Oxidationsvorgänge in der Zelle.

Zwei weitere Gene, die vermehrt exprimiert wurden, sind *TFRC* und *HMOX1*. Beides sind Gene, die am Eisenhaushalt beteiligt sind. *TFRC* codiert für den Transferrinrezeptor, der für die intrazelluläre Aufnahme von Eisen verantwortlich ist (Meneghini, 1997). Eine vermehrte Expression von *TFRC* spricht demnach für eine erhöhte Eisenaufnahme. Veränderungen im Eisenmetabolismus könnten wiederum die Fentonreaktion beeinflussen. Die Funktion von *HMOX1* wurde bereits in Kapitel 5.1.6 diskutiert. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität einhergeht mit einer vermehrten Expression von *HMOX1*. Diese vermehrte Expression soll dabei einen protektiven Effekt haben und die Zelle vor Oxidantien schützen (Schaaf et al., 2009; Shiraishi et al., 2000; Agarwal und Nick, 2000).

Auffällig ist weiterhin, dass PN149 und Carboplatin zu einer deutlich höheren Expression von *HMOX1* in ciPTEC Zellen führten. Dies ist insofern erstaunlich, da Carboplatin in den A498 Zellen zu keiner oxidativen Stressantwort führte und PN149 eigentlich ein antioxidatives Potential besitzt. Die Regulation von *HMOX1* scheint äußerst komplex zu sein. Verschiedene Ursachen können zu einer Induktion von *HMOX1* führen, wobei der Großteil dieser Ursachen mit dem Redoxstatus der Zelle zusammenhängen soll (Agarwal und Nick, 2000). Demnach könnten PN149 und Carboplatin

zu einer stärkeren Induktion von oxidativem Stress führen als Cisplatin oder Oxaliplatin.

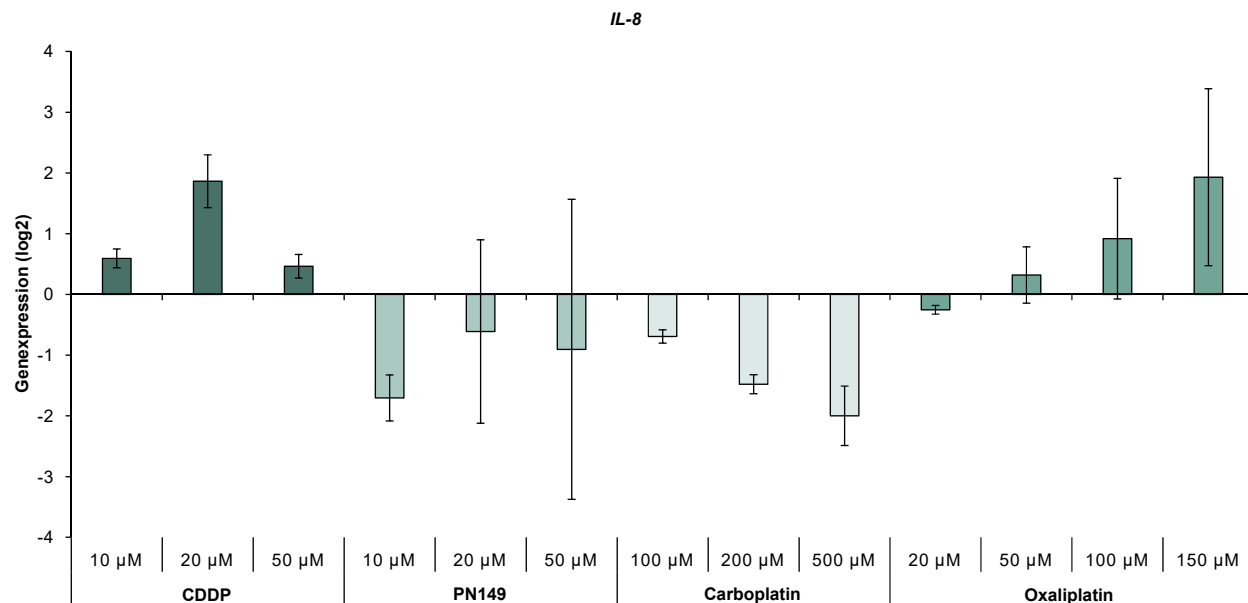
Ein weiterer deutlicher Unterschied zeigte sich in der Expression von *HSPA1A*. Dieses Gen wurde durch Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin leicht vermehrt exprimiert. Eine Behandlung mit PN149 zeigte im Vergleich dazu eine deutlich vermehrte Expression. *HSPA1A* codiert für das Protein HSP70 (*heat shock protein*) und gehört zu der Familie der Chaperone. Die Aufgabe dieser Proteine ist u.a. die Faltung von neusynthetisierten, aber auch von falsch gefalteten oder aggregierten Proteinen (Mayer und Bukau, 2005). *HSPA1A* gilt deshalb als allgemeiner Stressmarker (Bukau und Horwich, 1998). Demnach würde PN149 zu einer deutlichen Stressantwort in ciPTEC Zellen führen. Allerdings muss erwähnt werden, dass erst ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  eine deutlich vermehrte Expression in den Zellen auftrat. Diese Konzentration liegt deutlich über dem  $\text{IC}_{50}$  der Substanz. Außerdem zeigten die bisherigen Ergebnisse der Genexpression, dass die Zellen ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  die Genexpression des Großteils der Gene bereits herunterreguliert, d.h. die Zellen sterben vermehrt ab.

Die im Zuge dieser Arbeit generierten Daten deuten folglich darauf hin, dass scheinbar alle vier Substanzen zu oxidativem Stress in ciPTEC Zellen führen.

In Kapitel 5.1.6 wurde bereits über Cisplatin-induzierte Inflammationsprozesse in der Niere diskutiert. Vor allem  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen.  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  fungiert dabei als wichtiger Regulator über die Transkription verschiedener Inflammationsgene, wie *IL-1*, *IL-6*, *IL-8* aber auch  $\text{TNF-}\alpha$  (Vyas et al., 2014).  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  kann u.a. durch ROS aktiviert werden (dos Santos et al., 2012). Dadurch kann eine Induktion von oxidativem Stress auch gleichzeitig einhergehen mit einer Induktion von inflammatorischen Prozessen. Demzufolge könnten alle vier Substanzen zu Entzündungsprozessen führen, da alle vermutlich zu oxidativem Stress in ciPTEC Zellen führten.

Zur Untersuchung von Inflammationsprozessen wurde die Genexpression des Inflammationsmarkers *IL-8* gemessen. Nach einer 24 h Inkubation von ausdifferenzierten ciPTEC Zellen wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.35 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass Cisplatin und Oxaliplatin zu einer vermehrten Expression von *IL-8* führten, wohingegen PN149 und Carboplatin zu einer verminderten Expression des Gens führten. Interessanterweise zeigten letztere bereits in A498 Zellen keine relevante inflammatorische Response. Weiterhin zeigte sich in Kapitel 5.3.4 eine vermehrte Expression von *NFKB2*, einer Untereinheit des  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  Komplexes, für Cisplatin und Oxaliplatin, nicht aber für PN149 und Carboplatin. Als Regulator von Inflammationsgenen könnte diese vermehrte Expression ein weiterer Hinweis auf Inflammationsprozesse ausgelöst durch Cisplatin und Oxaliplatin sein. Anhand nur eines Inflammationsmarkers lässt sich jedoch keine konkrete Aussage treffen. Da vor allem  $\text{TNF-}\alpha$  eine wichtige Rolle in Cisplatin-induzierten Inflammationsprozessen spielen soll, wäre es sinnvoll, diesen Marker zusätzlich zu untersuchen.

Die Frage, warum PN149 und Carboplatin trotz oxidativer Stressantwort nicht zu Inflammationsprozessen führten, lässt sich anhand der hier generierten Daten nicht beantworten. Hierzu müssten vor allem auf funktioneller Ebene weitere Untersuchungen durchgeführt werden.



**Abbildung 5.35: Genexpression des Inflammationsmarkers *IL-8* nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanz in ciPTEC Zellen.** Zur Untersuchung der Genexpression von *IL-8* wurden ausdifferenzierte ciPTEC Zellen für 24 h mit der jeweiligen platinbasierten Substanz in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR bestimmt. Zur Auswertung der Daten wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung.

### 5.3.8 Untersuchung apoptotischer Gene in ciPTEC Zellen

In Kapitel 5.1.7 wurde bereits über die Art des Zelltodes in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität diskutiert. In *in vitro* Studien konnte dabei gezeigt werden, dass Cisplatin in hohen Dosen eher Nekrose verursacht, wohingegen bei geringen Dosen eher die Apoptose eingeleitet wird (Lau, 1999; Lieberthal et al., 1996). Aber auch hier zeichnet sich eine Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen ab. Denn in *in vivo* Studien an Tieren zeigte sich, dass Cisplatin sowohl die Apoptose als auch die Nekrose im Zuge der induzierten Nephrotoxizität einleitet (Liu und Baliga, 2003; Pabla et al., 2008; Ramesh und Reeves, 2003). Nichtsdestotrotz scheint die Apoptose ein wichtiger Faktor in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität zu sein. Dabei soll auch, wie schon in der antineoplastischen Wirkung, die Apoptose p53-abhängig, aber auch -unabhängig induziert werden (Cummings, 2002). Die Apoptose kann dabei sowohl über den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg eingeleitet werden (Pabla et al., 2008). Weiterhin wurde festgestellt, dass Cisplatin die Apoptose über das endoplasmatische Retikulum (ER) induzieren kann. Dabei kommt es im ER über die Interaktion von Cisplatin mit Cytochrom P450 zur Bildung von ROS, welche die Caspase 12 einleiten (Liu und Baliga, 2005).

Als Hauptweg kristallisierte sich dennoch der intrinsische Weg über die Mitochondrien heraus, wodurch u.a. die verursachten mitochondrialen Dysfunktionen erklärt werden können. Dabei soll es zu einer Akkumulation von BAX in den Mitochondrien kommen, deren Folge der vermehrte Aus-

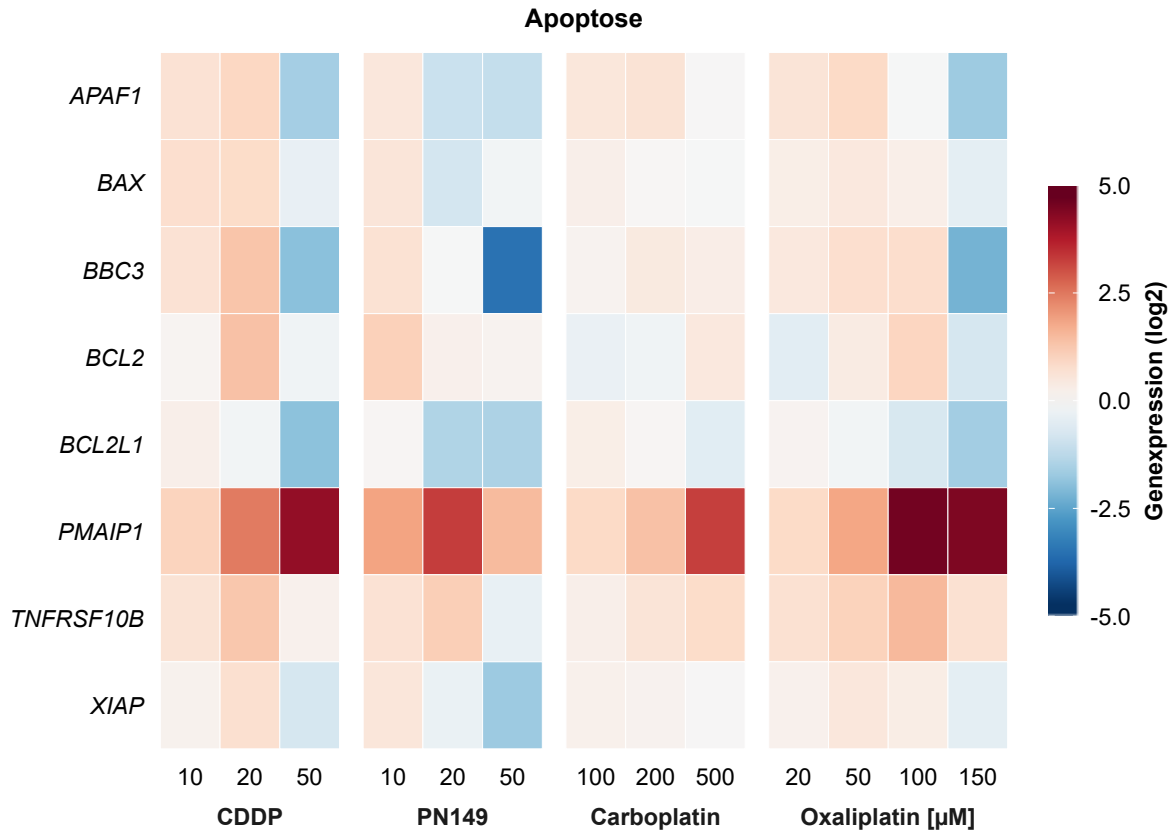
tritt von Cytochrom C ist (Park et al., 2002). Jiang und Kollegen fanden weiterhin eine starke Expression von PUMA nach Behandlung von RPTC Zellen mit Cisplatin. Diese starke Expression von PUMA ging einher mit einer Aktivierung an BAX und war zudem p53-abhängig (Jiang et al., 2006). Die induzierte Apoptose scheint folglich mit hauptverantwortlich für den renalen Zelltod in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität zu sein und deshalb ein wichtiger Faktor, den es zu untersuchen gilt.

Per Genexpressionsanalyse wurde deshalb die Genexpression apoptosebeteiligter Gene in ciPTEC Zellen nach einer 24 h Behandlung mit platinbasierten Chemotherapeutika untersucht. Das Ergebnis der Analysen ist in Abbildung 5.36 dargestellt. Auffällig ist dabei die deutlich vermehrte Expression von *PMAIP1* nach Behandlung aller platinbasierten Substanzen, das für das Protein NOXA codiert. Zusammen mit PUMA (*BBC3*) sind beide am intrinsischen Apoptoseweg beteiligt. Während *BBC3* in A498 Zellen noch deutlich vermehrt exprimiert wurde, führte nur eine Behandlung mit Cisplatin in ciPTEC Zellen zu einer vermehrten Expression im relevanten Bereich. Cisplatin führte außerdem zu einer vermehrten Expression von *APAF1*, *BAX*, *BCL2* und *TNFRSF10B*. Während *APAF1* und *BAX* am intrinsischen Weg beteiligt sind, ist *TNFRSF10B* Teil des extrinsischen Weges. *BCL2* hingegen ist ein antiapoptotisches Gen. Eine vermehrte Expression dieses Gens kann die Apoptose verhindern, in dem es den Austritt von Cytochrom C verhindert (Yang, 1997).

Für PN149 und Oxaliplatin zeigte sich ebenfalls eine vermehrte Expression von *BCL2* und *TNFRSF10B* im relevanten Bereich. Bei allen anderen Genen lag die veränderte Genexpression unter dem relevanten Bereich. Eine Behandlung von ciPTEC Zellen mit Carboplatin führte, neben *PMAIP1*, nur zu einer vermehrten Expression von *TNFRSF10B*.

Demnach zeigte Cisplatin die stärkste Veränderung in apoptosebeteiligten Genen. Sowohl Gene des intrinsischen als auch des extrinsischen Apoptosewegs wurden vermehrt exprimiert. Aber auch das antiapoptotische Gen *BCL2* wurde vermehrt exprimiert. Für alle anderen Substanzen zeigte sich vor allem eine deutlich vermehrte Expression von *PMAIP1*, aber auch von *TNFRSF10B*. Demnach könnten auch PN149, Carboplatin und Oxaliplatin die Apoptose über beide Wege induzieren. Krüger und Kollegen konnten in ihrer Genexpressionsanalyse in NRK-52E Zellen vor allem eine vermehrte Expression von *BAX* nach Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin oder Oxaliplatin feststellen. Dabei zeigte Cisplatin die deutlichste Veränderung (Krüger et al., 2015). Sie untersuchten außerdem die Effektorcaspasen Caspase 3 und 7, wobei sie feststellen konnten, dass Cisplatin und Oxaliplatin bereits nach 24 h zu einer Induktion der Caspase führten und Carboplatin nach 72 h ebenfalls zu einer Induktion führte (Krüger et al., 2015). Folglich induzieren alle Substanzen die Apoptose in den untersuchten Zellen.

Um weitere Aussagen über die Induktion der Apoptose und auch zur Nekrose treffen zu können, müssten auch hier weitere Versuche auf funktioneller Ebene durchgeführt werden. Die Genexpressionsanalyse deutet aber daraufhin, dass alle Substanzen die Apoptose einleiten. Die starke vermehrte Expression von *PMAIP1* deutet weiterhin darauf hin, dass die Substanzen bevorzugt den intrinsischen Apoptoseweg induzieren. Außerdem werden vermehrt p53-abhängige Gene exprimiert. Dies deutet außerdem auf eine Induktion der Apoptose über p53 hin.



**Abbildung 5.36: Genexpression von apoptosebeteiligten Genen nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanz in ciPTEC Zellen.** Ausdifferenzierte ciPTEC Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen platinbasierten Substanz inkubiert. Im Anschluss wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR bestimmt. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

### 5.3.9 Vergleich der Genexpressionsprofile von Cisplatin behandelten ciPTEC Zellen mit Nierennormalgewebe

In Kapitel 5.3.1 wurde die Problematik von *in vitro*, aber auch *in vivo* Modellen zur Untersuchung von Nephrotoxizität diskutiert. Aufgrund der quasi unendlichen Verfügbarkeit von ciPTEC Zellen und deren nachgewiesenem proximalen Tubuluscharakter wurde sich in den hier durchgeführten Studien für diese Zelllinie entschieden. Um eine abschließende Validierung der Studien in ciPTEC Zellen abzugeben, wurden die Ergebnisse der Genexpression von 20 µM Cisplatin mit Untersuchungen in Normalgewebe verglichen. Hierfür wurde renales Normalgewebe von Patienten aus dem Universitätsklinikum Mainz mit 20 µM Cisplatin für 24 h inkubiert und anschließend wurde ebenfalls die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR ermittelt. Renales Primärgewebe eignet sich am besten für Untersuchungen auf Nephrotoxizität, da es den *in vivo* Status am ehesten wiedergeben kann. Problem dabei ist allerdings die begrenzte Verfügbarkeit, weshalb auch in den hier



durchgeführten Studien lediglich eine Konzentration von Cisplatin eingesetzt werden konnte und nur zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt werden konnten. Dennoch eignen sich die Ergebnisse für einen Vergleich mit den Ergebnissen aus den ciPTEC Zellen.

Das Ergebnis der Studien ist in Abbildung 5.37 dargestellt. Dabei wurden die Profile der einzelnen Gencluster jeweils in einem Netzdiagramm zur Veranschaulichung übereinander gelegt. Verglichen wurden die jeweiligen Behandlungen der Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  Cisplatin. Es lässt sich erkennen, dass das Normalgewebe ähnliche Profile aufwies wie die ciPTEC Zellen, jedoch war das Ausmaß der Veränderungen der Gene nicht so ausgeprägt wie in den ciPTEC Zellen. Dies war z.B. für die Gencluster der Transkriptionsfaktoren, aber auch der Apoptose zu erkennen. CiPTEC Zellen scheinen demnach sensitiver gegenüber platinbasierten Substanzen zu sein.

Der einzige deutliche Unterschied, der zwischen den Zellen erkennbar war, zeigte sich in der Expression von DNA-Reparaturgenen. Während diese in ciPTEC Zellen vermehrt exprimiert wurden, wurden sie im Normalgewebe größtenteils vermindert exprimiert. Dies könnte mit dem Differenzierungsgrad der Zellen zusammenhängen. In sogenannten terminal differenzierten Zellen sind DNA-Reparatursysteme herunterreguliert, da im Normalfall die Zelle sich nicht mehr weiter teilt und ihre Energie hierfür einsparen will (Nospikel und Hanawalt, 2002). Dies spiegelt sich auch in der limitierten Regenerationskapazität der Niere nach einer AKI wieder (Benigni et al., 2010).

Bei Untersuchungen im Normalgewebe ist jedoch auch die Variation der Spender zu beachten. Jeder Spender weist eine andere genetische Varianz auf, wodurch es innerhalb der Spender zu unterschiedlichen zellulären Antworten kommen kann. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde Probenmaterial von nur zwei Spendern untersucht. Um eine vollständige Varianz zu erhalten, müsste mehr unterschiedliches Spendergewebe untersucht werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass Normalgewebe zwar die Realität am besten widerspiegelt, aber nur limitiert verfügbar ist, stellen ciPTEC Zellen eine gute Alternative dar. Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten außerdem, dass ein normales *in vitro* Modell in einer einfachen Zellkulturschale für Nephrotoxizitätsstudien nicht ausreicht. Denn alle vier untersuchten platinbasierten Substanzen wiesen ein hohes zytotoxisches Potential auf und führten zu einer ähnlichen zellulären Antwort in ciPTEC Zellen. Dies spiegelt nicht die Klinik wieder, da nur Cisplatin nephrotoxisch ist. Deshalb sollte auch bezüglich des nephrotoxischen Potentials von PN149 noch keine Aussage getroffen werden.

In Anbetracht der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der ciPTEC Zellen und der A498 Zellen ist außerdem hervorzuheben, dass sich Tumorzelllinien deutlich von Normalzellen unterscheiden. Für mechanistische Studien einer Substanz in Normalgewebe wird deshalb abgeraten, Tumorzelllinien zu verwenden.

In Untersuchungen in ciPTEC und A498 Zellen, kultiviert in einem Transwellssystem, zeigte sich, dass das Kultivierungsmodell Einfluss auf die Aufnahme von Cisplatin hatte. Dies verdeutlicht, wie wichtig es ist, das richtige Modell für Untersuchungen zur Nephrotoxizität zu wählen. Die Niere ist ein hochkomplexes Organ, das dominiert wird von Transportprozessen. Dies adequat *in vitro* nachzubilden, stellt die Forschung vor eine große Herausforderung.

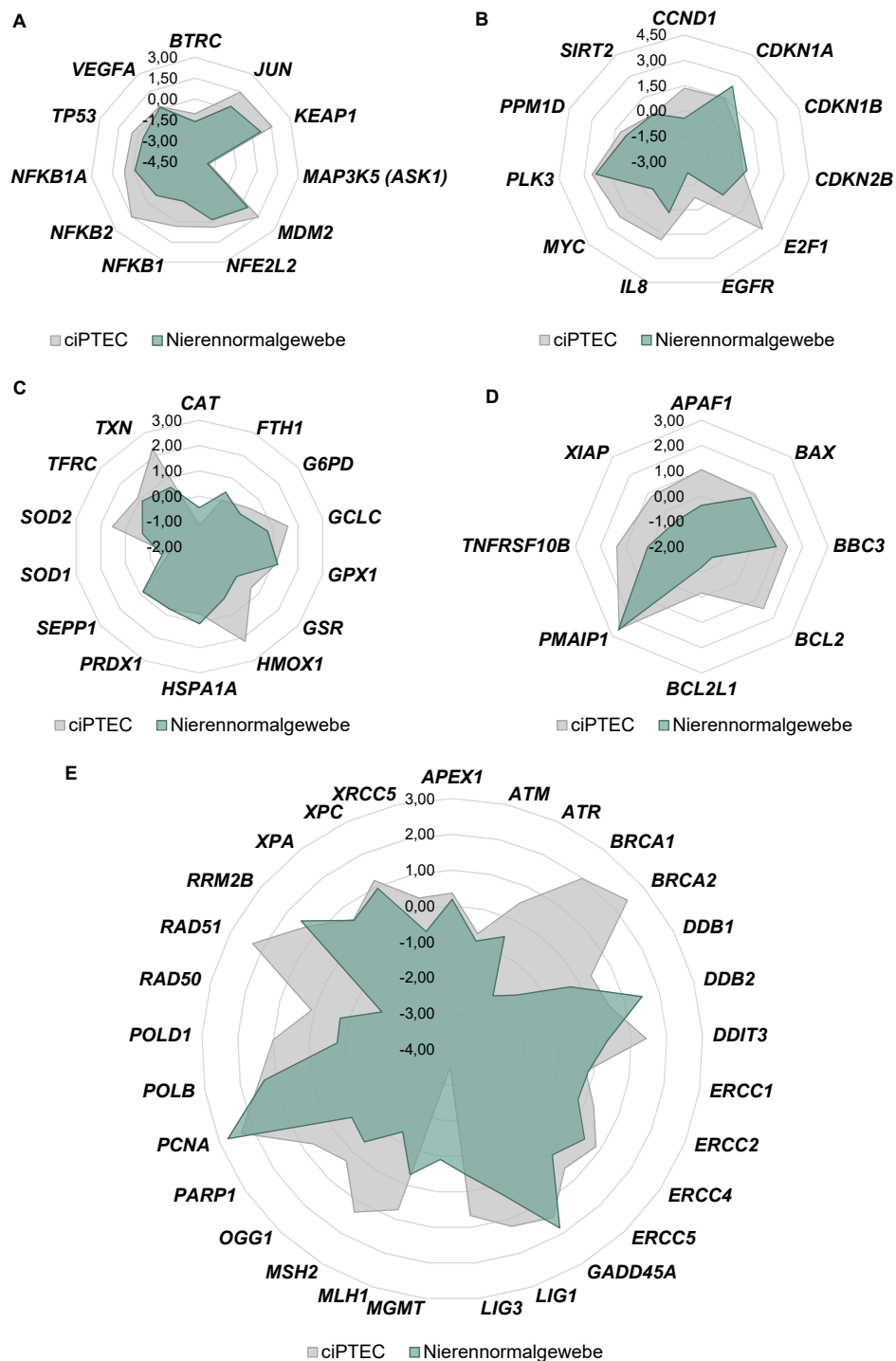


Abbildung 5.37: Vergleich der Genexpressionsprofile von ciPTEC Zellen mit Normalgewebszellen nach Behandlung mit 20  $\mu$ M Cisplatin. **A:** Transkriptionsfaktoren. **B:** Zellzyklus und Proliferation. **C:** (Oxidative) Stressantwort. **D:** Apoptose. **E:** DNA-Schadensantwort und -Reparatur. Ausdifferenzierte ciPTEC Zellen und Normalgewebszellen wurden mit 20  $\mu$ M Cisplatin für 24 h behandelt. Im Anschluss wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR ermittelt. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die  $\log_2$  Werte aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Neueste Entwicklungen auf diesem Gebiet stellen sogenannte *kidney-on-a-chip* Modelle dar. In dieser Vorrichtung werden Zellen auf einer porösen Membran kultiviert, die mit ECM (*extra cellular matrix*) Bestandteilen beschichtet sein können. Um dieses *Interface* befinden sich Mikrokanäle, die mit einem Fluid durchströmt werden. Dadurch wird ein tubulärer Fluss erzeugt, durch den zum einen Scherkräfte auf die Zellen einwirken können, gleichzeitig werden die Zellen aber auch mit Nährstoffen versorgt und der Abtransport von Ausscheidprodukten wird gewährleistet (Jang et al., 2013; Wilmer et al., 2016). Dadurch werden realistischere Transportbedingungen erhalten, die für die Niere besonders wichtig sind.

Um weitere Aussagen über das nephrotoxische Potential von platinbasierten Substanz treffen zu können, wäre es von Vorteil, Untersuchungen in einem vergleichbaren Modell durchzuführen, da es scheint, dass vor allem Transportprozesse für die nephrotoxische Wirkung der Substanzen verantwortlich sind.



---

### Zusammenfassende Diskussion

---

Eine zunehmende Tumorinzidenz ruft eine zunehmende Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten von Krebs hervor. Als Meilenstein der Tumorbehandlung mit Chemotherapeutika galt damals die Entdeckung von Cisplatin. Durch Weiterentwicklung entstanden über die Jahre Carboplatin und Oxaliplatin, die weltweit zur Behandlung von Tumoren zugelassen sind. Zusammengefasst als platinbasierte Chemotherapeutika gelten sie heute als eine der am häufigsten eingesetzten Chemotherapieform zur Behandlung von Tumoren. Etwa 50 % aller Chemotherapiebehandlungspläne beinhalten ein platinbasiertes Chemotherapeutikum (Wheate et al., 2010). Eine 95 %ige Erfolgsrate bei der Behandlung von Hodentumoren mit Cisplatin spricht weiterhin für den Erfolg der Substanzen (Johnstone et al., 2016). Dennoch weist die platinbasierte Chemotherapie erhebliche Nachteile auf. Alle drei Substanzen führen zu verschiedenen dosislimitierenden toxischen Nebenwirkungen. Dosislimitierende Nebenwirkung von Cisplatin stellt dabei die Nephrotoxizität dar. Carboplatin und Oxaliplatin führen respektive zu Myelosuppression und Neurotoxizität. Außerdem stellen Resistenzen ein erhebliches Problem dar (Oun et al., 2018; Wheate et al., 2010). Angesichts dessen ist es essentiell, weiterhin an dieser Therapieform zu forschen und sie stetig weiter zu entwickeln.

Daran zu forschen bedeutet auch, die vorhandenen Substanzen weiter zu untersuchen, d.h. ihre Wirkmechanismen ausgiebig miteinander zu vergleichen, aber auch ihr Wirkspektrum weiter zu untersuchen. Über Cisplatin wurde über die Jahre schon ausgiebig der Wirkmechanismus in Tumoren untersucht. Diese Forschung sollte sich aber nicht nur auf den Wirkmechanismus in Tumorarten, welche in der Klinik mit Cisplatin behandelbar sind, fokussieren. Um das volle Spektrum einer Substanz zu verstehen, sollten weiterhin auch nicht behandelbare Tumorarten untersucht werden. Hierzu zählt u.a. das klarzellige Nierenkarzinom (ccRCC). Es gilt allgemein als chemotherapie-resistent. Über die Gründe der Resistenz gibt es bisher wenig Informationen (Rini et al., 2009).

Deswegen fanden die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in A498 Zellen, einer ccRCC Zelllinie, statt. Zu Beginn der Untersuchungen stellte sich jedoch direkt heraus, dass die Zellen an sich keine Resistenz gegenüber Cisplatin aufwiesen. Weitere Studien aus der Literatur hierüber erwiesen sich als widersprüchlich (Rixe et al., 1996; Trivedi et al., 2016). Trotz der unerwarteten Sensitivität der Zelllinie gegenüber Cisplatin wurden weitere Studien in dieser Zelllinie, im Hinblick auf den Vergleich der Wirkmechanismen aller drei platinbasierten Substanzen, durchgeführt. Denn im Vergleich zu Cisplatin sind Carboplatin und vor allem Oxaliplatin weniger erforscht.

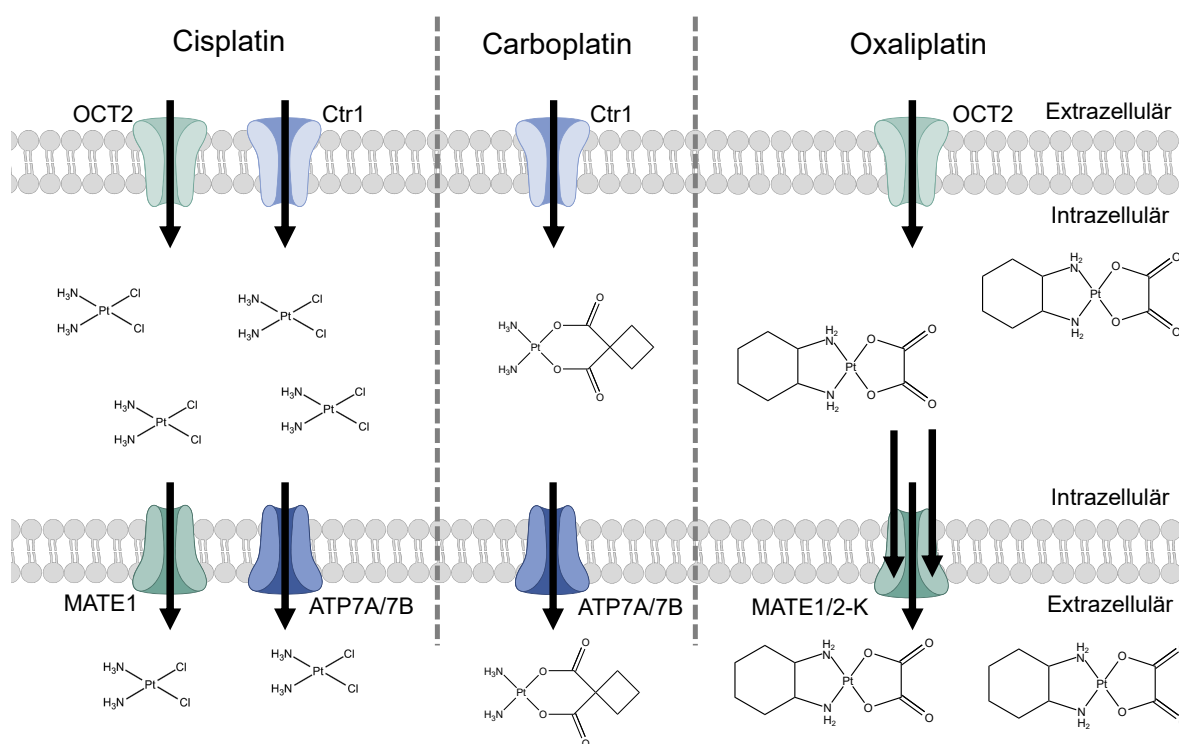
Über Carboplatin ist bekannt, dass es die gleichen DNA-Schäden wie Cisplatin verursacht, aber eine langsamere Reaktionskinetik aufweist. Über den Wirkmechanismus von Oxaliplatin ist im Detail nur sehr wenig bekannt. Bisher ist es auch nur zur Behandlung von Kolonkarzinomen zugelassen (Johnstone et al., 2016). Doch genau hier liegt der Unterschied von Oxaliplatin zu Cisplatin bzw. Carboplatin. Während letztere in ihrem Wirkmechanismus u.a. von der DNA-Schadenserkennung durch MMR Proteine abhängig sind, werden Oxaliplatin-induzierte DNA-Schäden unabhängig von MMR Proteinen prozessiert. Da Kolonkarzinome häufig MMR-defizient sind, ist Oxaliplatin effektiv in diesen Tumoren (Kweekel et al., 2005). Offensichtlich gibt es demnach einen Unterschied in der Wirkung der Substanzen. Dieser Unterschied wird dem DACH-Liganden von Oxaliplatin zugeschrieben, da dieser die DNA anders als Cisplatin und Carboplatin verzerrt. Über die zelluläre Antwort auf Oxaliplatin-induzierte DNA-Schäden gibt es bisher aber nur wenige Studien. Deshalb wurden in dieser Arbeit detaillierte Studien auf molekularer und funktioneller Ebene zur Aufklärung und zum direkten Vergleich der Wirkmechanismen der drei Substanzen durchgeführt.

Zytotoxizitätsstudien zeigten, dass Oxaliplatin und Carboplatin ebenso effektiv wie Cisplatin in A498 Zellen wirkten. Die Untersuchung der relativen Zellzahl offenbarte, dass Cisplatin und Oxaliplatin eine ähnliche Effektivität in A498 Zellen aufwiesen, im Langzeittoxizitätstest unterschied sich die Effektivität jedoch etwas. Dabei war Oxaliplatin etwas weniger effektiv im Vergleich zu Cisplatin. Carboplatin musste im Vergleich zu den beiden anderen Substanzen in der 10-fachen Konzentration eingesetzt werden, um dieselbe Effektivität aufzuweisen. Generell zeigte sich ein eher flacher Verlauf der Zytotoxizitätskurven für Carboplatin. Dies lässt sich anhand der langsameren Reaktionskinetik von Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin erklären. Carboplatin verliert in der Zelle deutlich langsamer seinen Cyclobutanring als Cisplatin seine Chloridionen (Knox et al., 1986). Dadurch verzögert sich die Bildung von DNA-Schäden, die letztlich für die zytotoxische Wirkung der Substanz verantwortlich ist.

Im Weiteren wurde die Aufnahme der Substanzen sowie deren DNA-Platinierung gemessen. In beiden Untersuchungen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Substanzen. Cisplatin wies dabei die höchste Akkumulation auf und zeigte gleichzeitig auch die höchste DNA-Platinierung. Die Aufnahme von Oxaliplatin war im Vergleich zu Cisplatin um 1/3 reduziert. Weiterhin wies Oxaliplatin die geringste DNA-Platinierung auf. Hier konnten Studien bereits zeigen, dass Oxaliplatin zu weniger DNA-Schäden führt, aber dennoch dieselbe Effektivität wie Cisplatin aufweist (Hector et al., 2001; Saris et al., 1996; Woynarowski et al., 1998, 2000). Bei einer Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  zeigte Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin und Oxaliplatin die geringste Aufnahme. Erst ab einer

Behandlung mit 300  $\mu\text{M}$  war die Aufnahme von Carboplatin vergleichbar mit Cisplatin. Die Streuung der Ergebnisse der DNA-Platinierung für Carboplatin erwies sich als relativ hoch. Dennoch zeigte Carboplatin bei 50  $\mu\text{M}$  eine geringere DNA-Platinierung als Cisplatin. Dies unterstützt die These, dass Carboplatin eine geringere Reaktionskinetik aufweist.

Die Unterschiede in der Aufnahme der Substanzen lassen sich vermutlich durch unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Transportsystemen begründen (Abbildung 6.1). Eine Rolle sollen dabei die Influxtransporter Ctr1 und der OCT2 sowie die Effluxtransporter ATP7A/7B und MATE1/2-K spielen (Burger et al., 2010; Hall et al., 2008).



**Abbildung 6.1: Einfluss verschiedener Transporter am Influx und Efflux von platinbasierten Chemotherapeutika.** Für den Influx von Cisplatin sind sowohl der organische Kationentransporter 2 (OCT2) als auch der Kupfertransporter 1 (Ctr1) verantwortlich. Im Gegensatz dazu wird Carboplatin nur über den Ctr1 und Oxaliplatin nur über den OCT2 in die Zelle aufgenommen. Der Efflux erfolgt im Falle von Cisplatin über den MATE1 (*multidrug and extrusion 1*) und den ATP7A/7B (*ATPase copper transporting alpha/beta*). Carboplatin wird dagegen nur über den ATP7A/7B ausgeschleust. Für Oxaliplatin zeigt sich eine vermehrte Ausschleusung über den MATE1 und den MATE2-K.

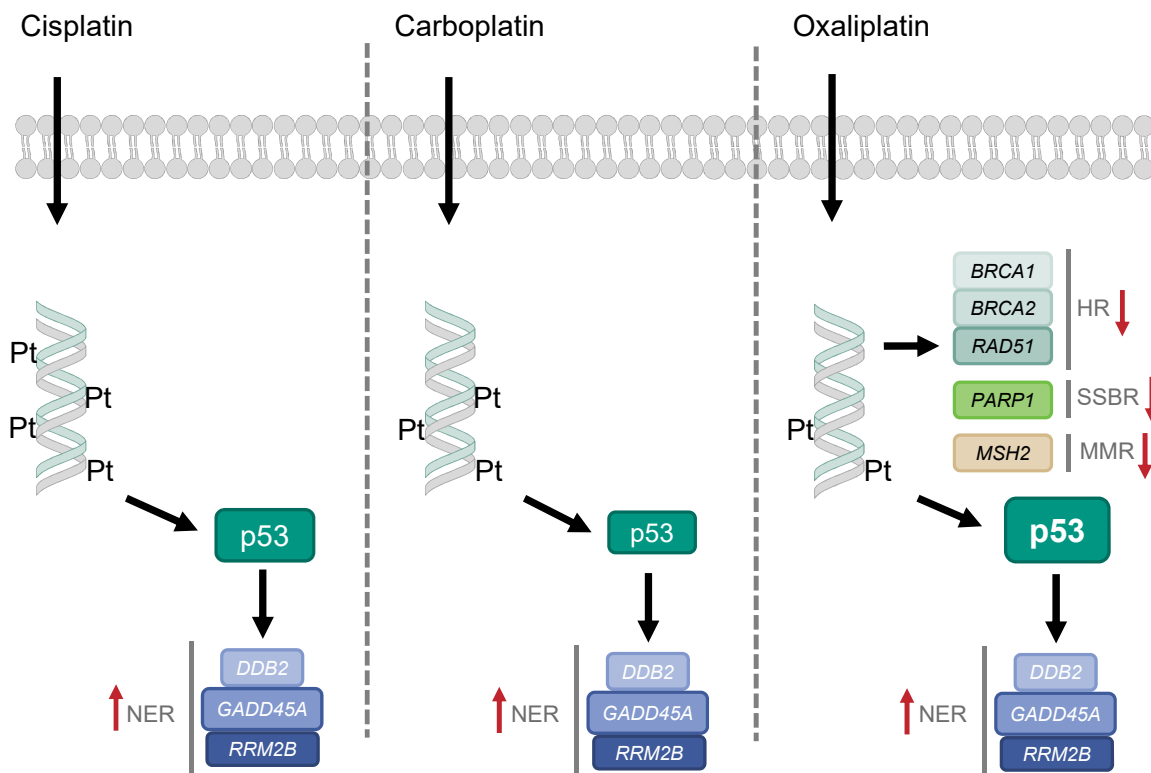
Auf molekularer Ebene, mittels Genexpressionsanalyse, zeigten sich im weiteren Verlauf teilweise ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den Substanzen. Eine Untersuchung des Transkriptionsfaktors *MDM2* zeigte für alle drei Substanzen eine vermehrte Expression des Gens. Diese war vor allem für Oxaliplatin sehr deutlich. *MDM2* gilt dabei als Gegenspieler von p53. Beide Proteine

befinden sich in einer negativen Feedbackschleife, d.h. p53 induziert MDM2, das wiederum zum Abbau von p53 führt (Levine und Oren, 2009). Die vermehrte Expression des Gens deutete folglich auf eine Involvierung des Tumorsuppressors p53 hin. Eine Analyse des p53 Proteinlevels offenbarte, dass alle drei platinbasierten Substanzen zu einem erhöhten p53 Proteinlevel in A498 Zellen führten. Dabei zeigte vor allem Oxaliplatin eine deutliche Erhöhung des Proteinlevels, wohingegen Carboplatin, selbst bei der höchsten Konzentration, nur zu einer geringen Erhöhung führte. Obwohl Cisplatin und Carboplatin identische DNA-Schäden verursachen, kam es in den A498 Zellen zu einer unterschiedlichen Antwort bezüglich des p53 Proteinlevels. Dies könnte mit der unterschiedlichen Reaktivität der beiden Substanzen zusammenhängen. P53 kann u.a. auch durch reaktive Sauerstoffspezies induziert werden. Diese sollen durch Cisplatin vermehrt induziert werden (Bae et al., 2006; Bragado et al., 2007; Jiang et al., 2007). Demnach scheinen nicht nur die DNA-Schäden von Cisplatin zur zytotoxischen Wirkung beizutragen.

Die Aktivierung von p53 ist Teil der Signalkaskade die durch Cisplatin-induzierte DNA-Schäden hervorgerufen wird. Die Genexpressionsanalyse offenbarte eine vermehrte Expression von p53-abhängigen DNA-Schadensantwort und -Reparaturgenen. Dabei wurden die NER beteiligten Gene *DDB2*, *GADD45A* sowie *RRM2B* sowohl durch Cisplatin als auch durch Carboplatin vermehrt exprimiert. Trotz geringerem p53 Proteinlevel nach Behandlung von A498 Zellen mit Carboplatin, führten beide Substanzen dennoch zu einer vergleichbar starken Veränderung der Gene. Für Oxaliplatin zeigten sich in der DNA-Schadensantwort und -Reparatur deutliche Unterschiede zu Cisplatin und Carboplatin. A498 Zellen führten nach Behandlung mit Oxaliplatin zu einer deutlich verminderten Expression der HR-beteiligten Gene *BRCA1*, *BRCA2* und *RAD51*. Daneben wurden weiterhin das MMR beteiligte Gen *MSH2* sowie das an der Einzelstrangbruchreparatur beteiligte Gen *PARP1* vermindert exprimiert (Abbildung 6.2). In der Literatur wurde dieses Phänomen bisher noch nicht beschrieben. Eine Erklärung könnten Bruno und Kollegen liefern. Sie untersuchten die DNA-Schadensantwort von Oxaliplatin anhand des DNA-Schadensmarker  $\gamma$ -H2AX. Dabei konnten sie keine  $\gamma$ -H2AX-Focibildung feststellen. Eine Untersuchung von DNA-Schäden mittels Comet Assay blieb auch negativ (Bruno et al., 2017). Weitere Untersuchungen führten sie zu der Hypothese, dass Oxaliplatin nicht über DNA-Schäden und der dadurch ausgelösten DDR den Zelltod einleiten, sondern über ribosomalen Stress, welcher über p53 direkt den Zelltod aktivieren kann (Bruno et al., 2017; Golomb et al., 2014). Dies würde bedeuten, dass Oxaliplatin über einen gänzlich anderen Mechanismus zum Tod der Tumorzelle führt.

Diese Hypothese wurde durch die Untersuchungen des Zellzyklus und der Proliferation unterstützt. Auf Genexpressionsebene führten alle drei Substanzen zu einer vermehrten Expression der p53-abhängigen zellzyklusregulierenden Gene *CDKN1A*, *PLK3* und *PPM1D*. Für Cisplatin und Carboplatin deutete dies auf einen Zellzyklusarrest hin, welcher durch die Bestimmung der Zellzyklusverteilung bestätigt werden konnte. Beide Substanzen führten zunächst zu einem S-Phasenarrest nach 24 h, der in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest nach 48 h überging. Oxaliplatin führte im Vergleich dazu weiterhin zu einer vermehrten Expression der Proliferationsgene *CCND1* und *EGFR*. Ebenfalls wurde das Mitose-Checkpoint-beteiligte Gen *SIRT2* vermehrt exprimiert. Ein weiterer Unterschied zu Cis-



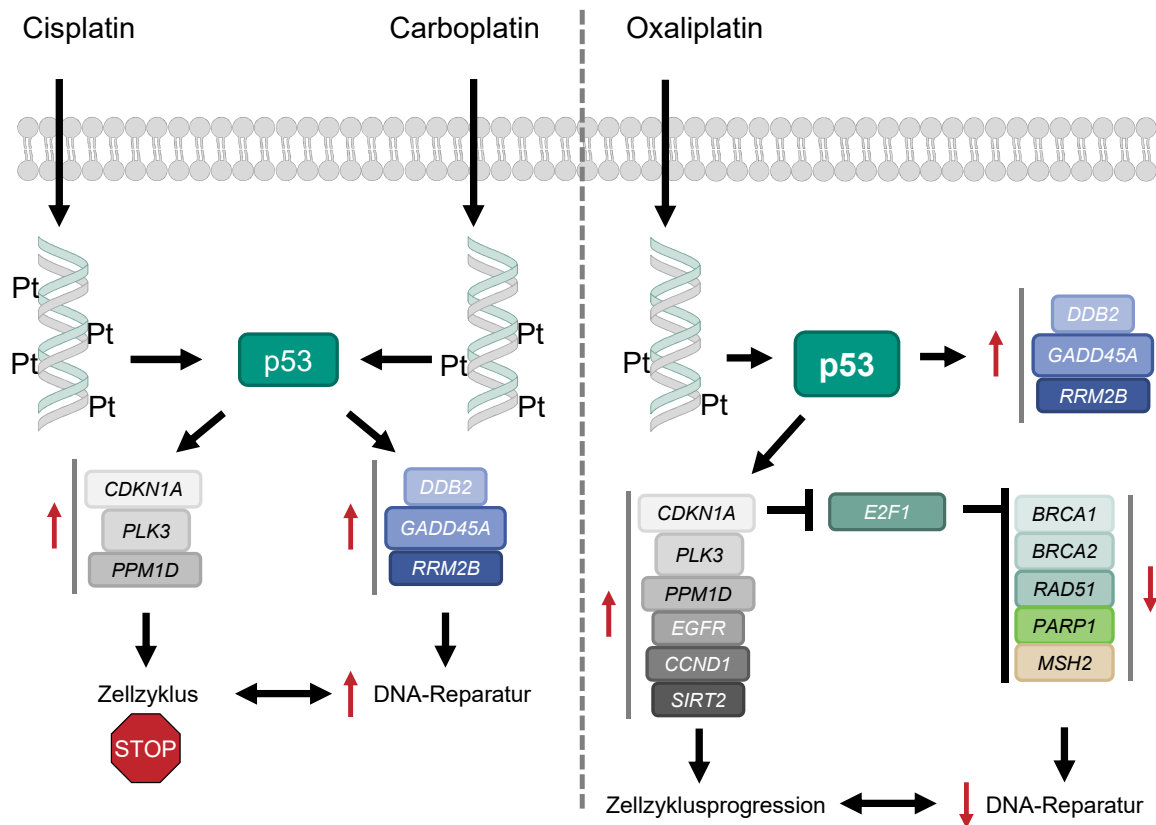


**Abbildung 6.2: DNA-Schadensantwort der platinbasierten Chemotherapeutika in A498 Zellen.** Alle drei Substanzen führten in der Zelle zu einem vermehrten p53 Proteinlevel, wobei Oxaliplatin das höchste Level und Carboplatin das geringste Level aufwies. Auf Genexpressionsebene wurden die p53-abhängigen DNA-Schadensantwort- und -Reparaturgene der NER *DDB2*, *GADD45A* sowie *RRM2B* vermehrt exprimiert. Eine Inkubation mit Oxaliplatin führte zusätzlich zu einer verminderten Expression verschiedener Reparaturgene.

platin und Carboplatin konnte in der Genexpression des Transkriptionsfaktors *E2F1* festgestellt werden. Das Gen wurde nach Behandlung mit Oxaliplatin deutlich vermindert exprimiert. Studien zeigten eine Korrelation zwischen p21 und E2F1. Indem p21 an E2F1 bindet, wird so dessen Funktion als Transkriptionsfaktor inhibiert (Delavaine und La Thangue, 1999; Devgan et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen *E2F1* und verschiedenen DNA-Reparaturgenen, u.a. *BRCA1* und *MSH2*, besteht. Die Studien zeigten, dass eine verminderte Expression von *E2F1* gleichzeitig zu einer verminderten Expression dieser Gene führte (Ren et al., 2002; Wang et al., 2000). Dies könnte die verminderte Expression mehrerer DNA-Reparaturgene nach Behandlung mit Oxaliplatin erklären. Eine vermehrte Expression von *CDKN1A*, d.h. p21, könnte verantwortlich sein für eine verminderte Expression von *E2F1*, die wiederum verantwortlich für eine verminderte Expression von DNA-Reparaturgenen sein könnte (Abbildung 6.3).

Weiterhin hatte Oxaliplatin kaum einen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung in A498 Zellen. Lediglich bei einer Inkubation von 50  $\mu\text{M}$  zeigte sich ein minimaler G<sub>2</sub>/M-Arrest nach 72 h. Im

Gegensatz dazu führten Cisplatin und Carboplatin im Zuge der Zellzyklusverteilung zu deutlichen Veränderungen. Die Zelle induziert einen Zellzyklusarrest nach einem DNA-Schaden, um sich selbst mehr Zeit zur Reparatur zu geben. Da Oxaliplatin zu einer verminderten Expression von DNA-Reparaturgenen führte, könnte postuliert werden, dass die Zelle keinen Versuch anstrebt, den Schaden zu reparieren, sondern direkt die Apoptose einleitet. Eine fehlende DNA-Reparatur könnte weiterhin die negativen Ergebnisse von Bruno und Kollegen erklären, da erst durch DNA-Reparaturprozesse sekundär aus *Crosslinks* DNA-Strangbrüche entstehen. Entstehen sekundär keine DNA-Strangbrüche sind sowohl der  $\gamma$ -H2AX als auch der Comet Assay negativ (Bruno et al., 2017). Die Ergebnisse des Zellzyklus unterstreichen weiterhin die Hypothese, dass Oxaliplatin einen unterschiedlichen Wirkmechanismus wie Cisplatin und Carboplatin aufweist.



**Abbildung 6.3: Zusammenhang des Zellzykluses und der DNA-Reparatur nach Behandlung von A498 Zellen mit platinbasierten Substanzen.** Eine Behandlung von A498 Zellen mit Cisplatin und Carboplatin führte zu einem p53-abhängigen Zellzyklusarrest. Dadurch wurde der Zelle vermutlich mehr Zeit für eine Reparatur der DNA gegeben. Im Gegensatz dazu kam es nach Behandlung mit Oxaliplatin zu einem Fortschreiten des Zellzyklus. Dadurch kommt es vermutlich zu einer verminderten DNA-Reparatur.

Reaktive Sauerstoffspezies und Inflammationsprozesse sind oft Auslöser für Nebenwirkungen induziert durch Chemotherapeutika. Auch für platinbasierte Chemotherapeutika wird postuliert, dass sie zur vermehrten Bildung von ROS führen. Die Untersuchung der oxidativen Stressantwort auf Genebene führte jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis. Cisplatin führte zu einer vermehrten Ex-

pression von *GPX2*. Oxaliplatin induzierte eine vermehrte Expression von *GPX1* und *SOD2*. Beide Substanzen führten gleichzeitig aber auch zu einer verminderten Expression von *HMOX1* und *SEPP1*. Aufgrund dessen lassen sich hier keine konkreten Aussagen treffen. Lediglich die Genexpression nach Behandlung mit Carboplatin legt nahe, dass Carboplatin zu keiner vermehrten Bildung von ROS führt. Funktionelle Assays führten zu keinem Ergebnis. Hier besteht folglich noch weiterer Forschungsbedarf.

Als Inflammationsmarker wurde die Expression von *IL-8* untersucht. Die Analyse ergab eine vermehrte Expression des Gens nach Behandlung mit allen drei Substanzen, wobei Oxaliplatin die deutlichste Veränderung hervorrief. Weiterhin sind außerdem NF- $\kappa$ B sowie VEGFA an Inflammationsprozessen beteiligt. Beide Gene, die für das jeweilige Protein codieren, wurden durch Cisplatin als auch Oxaliplatin vermehrt exprimiert, jedoch nicht durch Carboplatin. Reaktive Sauerstoffspezies und Inflammationsprozesse stehen außerdem in Korrelation zueinander, weshalb die Ergebnisse weiterhin daraufhin deuten, dass Carboplatin nicht zur Bildung von ROS führt. Für weitere Aussagen müssen dennoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Das Ende der induzierten Signalkaskade ist der Zelltod. Hier zeigte sich für alle drei Substanzen ein ähnliches Bild. Auf Genexpressionsebene wurden sowohl Gene des intrinsischen als auch des extrinsischen Apoptosewegs vermehrt exprimiert. Dabei zeigten vor allem die p53-abhängigen Gene *BBC3* und *PMAIP1* eine deutliche vermehrte Expression. Eine durchflusszytometrische Untersuchung der Apoptose bzw. Nekrose und Spätenapoptose bestätigte die Genexpressionsanalyse. Alle drei Substanzen führten bereits nach 24 h zur Induktion der Apoptose.

Die Untersuchungen der Wirkmechanismen der drei Substanzen in A498 Zellen offenbarten zusammenfassend deutliche Unterschiede zwischen den Substanzen. Aufgrund der langsameren Reaktionskinetik von Carboplatin führte erst eine im Vergleich zu Cisplatin 10-fache Konzentration zu einem vergleichbaren zytotoxischen Effekt. Die zelluläre Antwort der beiden Substanzen unterschied sich größtenteils kaum. Oxaliplatin hingegen zeigte einen hierzu abweichenden Wirkmechanismus. Im Gegensatz zu Cisplatin und Carboplatin führte eine Behandlung mit Oxaliplatin zu einer Zellzyklusprogression. Die Genexpressionsanalyse deutete weiterhin darauf hin, dass diese Progression mit einer verminderten DNA-Reparatur einhergeht. Gemeinsam hatten dennoch alle drei Substanzen einen p53-abhängigen Wirkmechanismus. Und letztenendes führten alle drei Substanzen zur Induktion der Apoptose.

Weitere Untersuchungen zu den Wirkmechanismen von platinbasierten Substanzen tragen außerdem zur Entwicklung neuer Substanzen bei. Neueste Entwicklungen auf diesem Gebiet stellen Platin(IV)-Komplexe dar. Aufgrund ihrer Struktur können sie zum einen als *prodrug* eingesetzt werden, zum anderen sind sie aber auch weniger anfällig für Ligandensubstitutionen, weshalb sie weniger reaktiv sind (Kenny et al., 2017). PN149 stellt als Platin(IV)-nitroxyl-Komplex einen dieser Komplexe dar. Es weist zusätzlich zwei lipophile Gruppen sowie einen Aminonitroxyliganden auf. Angesichts des lipophilen Charakters der Substanz soll PN149 unabhängig von Transportern in die Zelle aufgenommen werden. Der Aminonitroxyligand birgt ein zusätzliches antioxidatives

Potential, wodurch Nebenwirkungen, die durch ROS induziert werden, reduziert werden sollen. Untersuchungen zeigten, dass dieser Komplex fähig war, die Cisplatin-Resistenz in einem Modellsystem aus einer sensitiven und einer resistenten Blasenkarzinomzelllinie zu überwinden (Cetraz et al., 2017). In Anbetracht dessen wurde ebenfalls der Wirkmechanismus von PN149 in A498 Zellen untersucht und mit den Wirkmechanismen von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin verglichen. Zytotoxizitätsstudien zeigten eine zu Cisplatin vergleichbare Zytotoxizität von PN149 in A498 Zellen. Untersuchungen zur intrazellulären Akkumulation und DNA-Platinierung offenbarten eine deutlich höhere Akkumulation von PN149, welche einherging mit einer höheren DNA-Platinierung im Vergleich zu den anderen drei Substanzen. Trotz dieser höheren DNA-Platinierung ergab sich ein ähnlicher zytotoxischer Effekt von PN149 und Cisplatin. Demnach scheinen die durch PN149 gebildeten DNA-Schäden nicht so effektiv zu sein wie die von Cisplatin.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich die zelluläre Antwort nach PN149-induzierten DNA-Schäden lediglich in ihrer Ausprägung zu der von Cisplatin unterschied. Die erstellten Genexpressionsprofile ähnelten sehr stark denen von Cisplatin. Eine Untersuchung des p53 Proteinlevels offenbarte ebenfalls ein erhöhtes Level. Allerdings war dies erst ab der höchsten Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) erhöht und weiterhin weniger erhöht als nach einer Inkubation mit Cisplatin. Das Proteinlevel ähnelte viel mehr dem von Carboplatin. Die DNA-Schadensantwort und -Reparatur beinhaltete gleichermaßen wie für Cisplatin eine vermehrte Expression von p53-abhängigen Genen. Gleiches zeigte sich weiterhin bei zellzyklus- und proliferationsbeteiligten Genen. PN149 führte zu einer Veränderung in den Genen *CDKN1A*, *PLK3* sowie *PPM1D*. Trotz niedrigerem p53 Proteinlevel zeigte sich hier dennoch eine Veränderung auf demselben Niveau wie für Cisplatin. Der Hinweis auf einen Zellzyklusarrest, den die Genexpression ergab, konnte durch die Zellzyklusverteilung bestätigt werden. PN149 führte nach 24 h zu einem S-Phasenarrest, der nach 48 h in einen G<sub>2</sub>/M-Arrest überging. Damit entsprechen die Veränderungen in der Zellzyklusverteilung denen von Cisplatin und Carboplatin.

Aufgrund seines Aminonitroxyliganden wird PN149 eine antioxidative Wirkung zugesprochen. In einem zellfreien Assay aus bakterieller *supercoiled* DNA zeigte sich, dass PN149, im Vergleich zu Cisplatin, nicht zu oxidativen Basenschäden in der DNA führte (Cetraz et al., 2017). Auf Genexpressionsebene zeigte sich jedoch ein ähnliches Bild wie für Cisplatin, wenn auch nicht so stark ausgeprägt. Da sich für Cisplatin keine konkrete Aussage treffen ließ, lässt sich auch für PN149 keine Aussage bezüglich oxidativem Stress treffen. Weitere Methoden, die zur Untersuchung von oxidativem Stress durchgeführt wurden, ergaben kein Ergebnis. Deshalb besteht hier noch weiterer Forschungsbedarf.

Inflamationsprozesse sind wie oxidativer Stress oft an Nebenwirkungen von Chemotherapeutika beteiligt. Studien zeigten, dass Nitroxyl-Radikale eine potentielle anti-inflammatorische Wirkung aufweisen könnten (Flores-Santana et al., 2012; Soule et al., 2007). Die Untersuchung des Inflammationsmarkers *IL-8* zeigte auf Genebene kaum eine Veränderung nach Behandlung der Zellen mit PN149. Diese potentielle anti-inflammatorische Wirkung könnte jedoch auch auf die antioxidative Eigenschaft der Substanz zurückzuführen sein, da ROS zu einer Induktion von Inflammations-

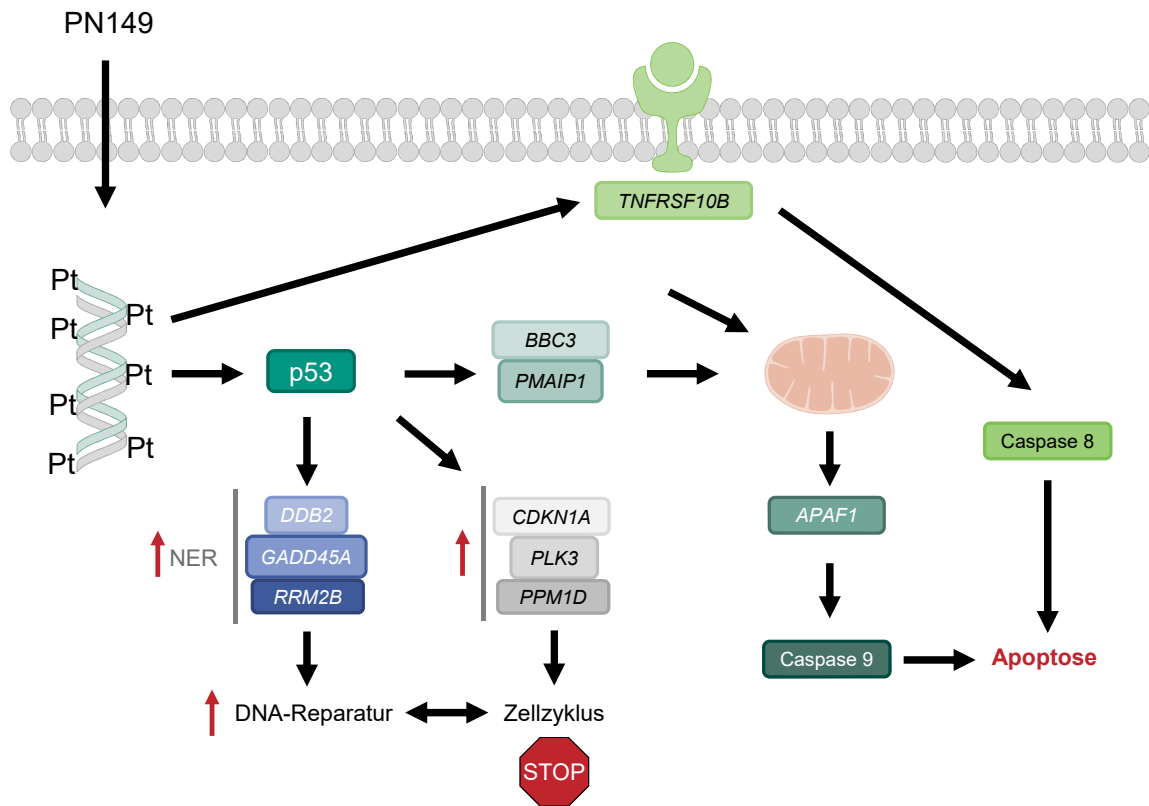
prozessen führen können (Soule et al., 2007). Außerdem handelt es sich bei *IL-8* nur um einen Inflammationsmarker, weshalb hier eine Untersuchung weiterer Inflammationsmarker für genauere Aussagen nötig wäre.

Wichtigster Schritt in der Wirkung eines Chemotherapeutikums ist die Induktion des Zelltods. Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin lösten alle den Zelltod über die Apoptose aus. Gleiches konnte für PN149 gezeigt werden. Das Genexpressionsprofil von apoptosebeteiligten Genen zeigte außerdem eine vermehrte Expression von p53-abhängigen Genen nach Behandlung von A498 Zellen mit PN149. Damit ähneln sich alle vier Substanzen im Bezug auf die Einleitung der Apoptose. Um weiter zwischen intrinsischem und extrinsischem Apoptoseweg unterscheiden zu können, wurde ein Assay zur spezifischen Caspaseaktivität durchgeführt. Dieser legte dar, dass PN149 vergleichbar mit Cisplatin sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptoseweg induziert.

Zusammenfassend offenbarte sich für PN149 ein Wirkmechanismus, der dem von Cisplatin und Carboplatin entspricht (Abbildung 6.4). Obwohl PN149 ebenfalls wie Oxaliplatin einen sperrigen Liganden aufweist, zeigten sich hier kaum Gemeinsamkeiten. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich jedoch für PN149 in der Aufnahme und der DNA-Platinierung. Hier konnten für PN149 höhere Werte für beide Parameter ermittelt werden. Trotz einer höheren DNA-Platinierung konnte dennoch keine stärkere zytotoxische Wirkung festgestellt werden. Im Zuge dessen müssten weitere Untersuchungen im Bezug auf DNA-Schadensantwort und -Reparatur durchgeführt werden. Eventuell werden durch PN149 induzierte DNA-Schäden vermehrt repariert. Obwohl Cisplatin und PN149 auf molekularer Ebene kaum einen Unterschied in der DNA-Schadensantwort und -Reparatur aufwiesen, könnte es einen Unterschied auf funktioneller Ebene geben. Dennoch erwies sich PN149 als äußerst effektiv in A498 Zellen.

Neben dem Vergleich der antineoplastischen Wirkung ist es weiterhin essentiell, Nebenwirkungen der Substanzen zu untersuchen. Dosislimitierende Nebenwirkung von Cisplatin ist die Nephrotoxizität. Jeder dritte Patient leidet nach Cisplatin Behandlung unter renalen Schäden, die sich auch nach dem Ende der Behandlung weiterhin manifestieren können (Barabas et al., 2008; Pabla et al., 2008). Der genaue Mechanismus ist bis heute nicht genau erforscht. Mögliche Gründe für die Nephrotoxizität finden sich in der erhöhten Akkumulation in der Niere, der Bildung von ROS, Inflammationsprozessen, DNA-Schäden, p53, der Induktion der Apoptose sowie der Bildung eines Nephrotoxins durch GSH (Manohar und Leung, 2018). Folglich spielt eine Vielzahl an möglichen Mechanismen eine Rolle.

Carboplatin und Oxaliplatin führen in der Klinik beide nicht zu renalen Schäden. Überraschenderweise gibt es in der Literatur kaum Studien, die den Einfluss der drei Substanzen auf Nierenzellen vergleichend untersuchen. Die wenigen Studien, die existieren, wurden oft entweder in weniger geeigneten *in vitro* Modellen oder *in vivo* Versuchen, welche schlecht übertragbar auf den Menschen sind, durchgeführt (Huang, 2001; Jang et al., 2013; Krüger et al., 2015; Tiong et al., 2014). Humanes Primärgewebe würde sich für *in vitro* Untersuchungen am besten eignen, aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit sind hier ausgiebige Studien jedoch schwierig zu realisieren (Sánchez-Romero et al., 2016). Aufgrund dessen wurde nach ausgiebiger Recherche entschlossen, die Studien zum nephro-



**Abbildung 6.4: Wirkmechanismus von PN149 in A498 Zellen.** PN149 führt in der Zelle zur Platinierung der DNA. Diese DNA-Schäden verursachen eine Signalkaskade über p53. Dabei werden sowohl DNA-Reparaturgene sowie zellzyklusbeteiligte Gene vermehrt exprimiert. Dadurch kommt es zu einem Zellzyklusarrest, während dem die Zelle versucht den Schaden zu beheben. Ist der Schaden zu groß, wird sowohl über den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg die Apoptose eingeleitet.

toxischen Potential der Substanzen in ciPTEC Zellen durchzuführen. Hierbei handelt es sich um immortalisierte Zellen des proximalen Tubulus, die bei 33 °C proliferieren und letztlich bei 37 °C wieder ausdifferenzieren. Sie wurden explizit im Hinblick auf Transportstudien im Zuge von Nephrotoxizitätsstudien entwickelt und charakterisiert (Wilmer et al., 2010).

Die Untersuchung der relativen Zellzahl offenbarte, dass alle vier platinbasierten Substanzen ein hohes toxisches Potential in ciPTEC Zellen aufwiesen. Die  $IC_{50}$  Werte der Substanzen waren durchweg niedriger als in den A498 Zellen. PN149 wies dabei den niedrigsten Wert auf. In *in vitro* Studien in MDCK und HEK293 Zellen sowie einer weiteren Studie in NRK-52E Zellen wurden ähnliche zytotoxische Wirkungen von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin ermittelt (Krüger et al., 2015; Zhang et al., 2006). Keine dieser Studien merkte jedoch den Umstand an, dass offensichtlich alle Substanzen toxisch auf die verwendeten Nierenzellen sind. Dies spiegelt jedoch nicht die Realität in der Klinik wieder. Demnach muss der niedrige  $IC_{50}$  Wert von PN149 in ciPTEC Zellen nicht unbedingt auf eine potentielle nephrotoxische Wirkung der Substanz deuten.

Aufnahmestudien der Substanzen in ciPTEC Zellen offenbarten, wie bereits in den A498 Zellen,

eine etwa 20-fache Aufnahme von PN149 im Vergleich zu den anderen Substanzen. Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin zeigten untereinander ähnliche Aufnahmewerte. Auch in einer anderen *in vitro* Studie in HEK293 Zellen konnte kein Unterschied in der Akkumulation der Substanzen festgestellt werden (Yonezawa et al., 2006). In einer *in vivo* Studie zeigte sich jedoch eine deutlich höhere Akkumulation von Cisplatin in der Niere im Vergleich zu Carboplatin und Oxaliplatin. In eigenen Untersuchungen sowie einer weiteren Studie aus der Literatur (Ludwig et al., 2004) offenbarten sich Unterschiede in der Aufnahme von Zellen kultiviert in einem Transwellssystem und Zellen kultiviert in einer Zellkulturschale. Zum einen unterscheidet sich die Aufnahme im Transwellssystem bei Applikation der Substanzen entweder in das basolaterale oder das apikale Kompartiment (Ludwig et al., 2004). Zum anderen nahmen Zellen kultiviert in einem Transwellssystem nur einen Bruchteil der Substanzen auf im Vergleich zur Kultivierung in der Zellkulturschale. Dies verdeutlicht die Schwachstelle von einfachen *in vitro* Modellen. Aufgrund der vielseitigen und komplexen Transportvorgänge in der Niere reicht ein Modell in einer einfachen Zellkulturschale nicht aus.

Dennoch wurden für alle Substanzen Genexpressionsprofile in ciPTEC Zellen angefertigt. Hierbei zeigte sich zwar ein deutlicher Unterschied zur antineoplastischen Wirkung in A498 Zellen, jedoch konnten zwischen den Substanzen kaum Unterschiede ausgemacht werden. Auch in den ciPTEC Zellen kam es zu einer vermehrten Expression des p53-Gegenspielers *MDM2*. Weiterhin wurden weitere p53-Targetgene bezüglich der DNA-Schadensantwort und -Reparatur, dem Zellzyklus sowie der Apoptose vermehrt exprimiert. Demnach scheinen die Substanzen auch in ciPTEC Zellen einen p53-abhängigen Mechanismus auszulösen.

Alle Substanzen führten außerdem zu einer vermehrten Expression der HR beteiligten Gene *BRCA1*, *BRCA2* und *RAD51*. Diese wurden im Falle von Oxaliplatin in A498 Zellen noch vermindert exprimiert. Demnach scheint sich die antineoplastische Wirkung von Oxaliplatin zu der im Normalgewebe deutlich zu unterscheiden. Die vermehrte Expression der Reparaturgene deutet auf eine Induktion von Doppelstrangbrüchen hin. Diese entstehen durch platinbasierte Substanzen erst sekundär während der Reparatur der *Crosslinks*.

Eine vermehrte Induktion von Reparaturgenen deutet auf einen Zellzyklusarrest hin. Normalerweise durchlaufen ausdifferenzierte Normalzellen keinen Zellzyklus mehr, sondern befinden sich in der G<sub>0</sub>-Phase. Durch DNA-Schäden können die Zellen aber in die G<sub>1</sub>-Phase übergehen und den Zellzyklus durchlaufen (Price et al., 2009). Die Genexpressionsanalyse von zellzyklus- und proliferationsbeteiligten Genen deutete auf diesen Umstand hin. Alle vier Substanzen führten zu einer vermehrten Expression der proliferationsbeteiligten Genen *CCND1*, *E2F1*, *PCNA* und *JUN*. Außerdem wurde das *E2F1* regulierende Gen *MYC* durch alle Substanzen vermehrt exprimiert. Demnach scheinen ciPTEC Zellen durch Behandlung mit den platinbasierten Chemotherapeutika in einen Proliferationsstatus überzugehen. Weiterhin wurden die p53-abhängigen Gene *CDKN1A*, *PLK3* und *PPM1D* vermehrt exprimiert. Dies spricht wiederum für einen Zellzyklusarrest. Eine Abfolge an Proliferation und Zellzyklusarrest deutet daraufhin, dass ciPTEC Zellen zunächst versuchen, DNA-Schäden zu reparieren, bevor sie den Zelltod einleiten. Um weitere Aussagen über den Zellzyklus und die DNA-Reparatur treffen zu können, müssten hierzu allerdings noch weitere Studien durchgeführt

werden.

Oxidativer Stress und Inflamationsprozesse stellen weitere postulierte Mechanismen der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität dar. Dabei können vermehrt reaktive Sauerstoffspezies durch eine verminderte Expression von antioxidativen Enzymen sowie einer GSH Depletion entstehen (Hanigan und Devarajan, 2003). Sie können aber auch durch mitochondriale Schäden oder Fehlregulation in den Mitochondrien vermehrt induziert werden (Yang et al., 2014). CiPTEC Zellen zeigten für alle vier Substanzen eine verminderte Expression der antioxidativen Enzyme *CAT* und *SOD2* nach Behandlung mit der jeweiligen platinbasierten Substanz. Eine vermehrte Expression des Gens *GCLC*, das an der GSH Synthese beteiligt ist, deutete außerdem auf eine Veränderung im GSH Spiegel hin. Neben der verminderten Expression von *CAT* und *SOD2* wurde *SOD1* durch alle Substanzen vermehrt exprimiert. *SOD2* und *SOD1* codieren beide für die Superoxiddismutase, sie unterscheiden sich aber in der Lokalisation. *SOD2* wird in den Mitochondrien und *SOD1* im Zytoplasma exprimiert (Zelko et al., 2002). Dies könnte folglich auf eine Beeinflussung der Mitochondrien hindeuten. Weitere Untersuchungen wären hierfür aber für genauere Aussagen von Nöten.

Neben bereits erwähnten Genen wurden außerdem durch alle Substanzen die Gene *HMOX1*, *TFRC*, *TXN* und *TXNRD1* vermehrt exprimiert. Eine vermehrte Expression dieser Gene deutet auf vermehrte Oxidationsvorgänge hin. Außerdem wurde der allgemeine Stressmarker *HSPA1A* durch alle vier Substanzen vermehrt exprimiert.

Die Daten der Genexpressionsanalyse von oxidativen Stressantwortgenen deuten zusammenfassend auf eine vermehrte Induktion von oxidativem Stress durch alle vier Substanzen hin.

Obwohl alle vier Substanzen vermutlich oxidativen Stress auslösen, führten nur Cisplatin und Oxaliplatin zu einer vermehrten Induktion des Inflamationsmarkers *IL-8*. PN149 und Carboplatin führten hingegen zu einer verminderten Expression des Gens. Beide Gene zeigten bereits in A498 Zellen keine relevante inflammatorische Antwort. Als Regulator von weiteren Inflamationsgenen gilt NF- $\kappa$ B (Vyas et al., 2014). Eine Untereinheit des Komplexes *NFKB2* wurde durch Cisplatin und Oxaliplatin ebenfalls vermehrt exprimiert, nicht aber durch PN149 und Carboplatin. Demnach deuten die Ergebnisse nur auf eine inflammatorische Response von Cisplatin und Oxaliplatin hin. Es stellte sich heraus, dass der Zelltod, der letztlich bei einer Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität eingeleitet wird, bei hohen Dosen über die Nekrose und bei niedrigen Dosen über die Apoptose eingeleitet wird (Lau, 1999; Lieberthal et al., 1996). Im Zuge der Apoptose soll sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Weg induziert werden (Pabla et al., 2008). Die Genexpressionsanalyse von apoptosebeteiligten Genen offenbarte eine deutlich vermehrte Expression von *PMAIP1* durch alle vier Substanzen, wobei Cisplatin und Oxaliplatin die stärksten Veränderungen aufwiesen. Cisplatin zeigte generell die stärksten Veränderungen der apoptosebeteiligten Gene. Dabei wurden die proapoptotischen Gene *BBC3*, *APAF1*, *BAX* und *TNFRSF10B* vermehrt exprimiert. Cisplatin scheint folglich die Apoptose sowohl über den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg zu induzieren. Alle anderen Substanzen führten neben *PMAIP1* nur zu einer vermehrten Expression von *TNFRSF10B*. Dies deutet folglich ebenfalls auf eine Induktion der Apoptose über den intrinsischen und den extrinsischen Weg hin. Weitere Untersuchungen sind auch hier noch nötig, um genauere



Aussagen treffen zu können. Eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose wäre hier interessant, da PN149 zu deutlich weniger Veränderungen führte, obwohl es zytotoxischer in ciPTEC Zellen ist. Eventuell könnte hier der Zelltod vermehrt über die Nekrose eingeleitet werden.

Es zeigte sich zusammenfassend folglich, dass alle vier Substanzen zu einer vergleichbaren zellulären Antwort in ciPTEC Zellen führten. Bezüglich der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität deutet dies darauf hin, dass sofern alle Substanzen in die Zelle gelangen, sie alle zu zellulären Schäden führen würden. Demnach scheinen vor allem Transportprozesse das Problem der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität darzustellen.

Abschließend wurde das ciPTEC Modell mit renalem Normalgewebe verglichen. Hierfür wurde eine Genexpressionsanalyse mit 20  $\mu$ M Cisplatin in Normalgewebe durchgeführt. Ein Vergleich der Gencluster zeigte, dass die zelluläre Antwort in Normalgewebe in geringerem Maße ausgeprägt war als in ciPTEC Zellen. CiPTEC Zellen sind folglich sensitiver gegenüber platinbasierten Chemotherapeutika. Hierbei gilt jedoch die Spendervarianz von Normalgewebe zu beachten, da jeder Spender eine andere genetische Varianz mit sich bringt. Da nur Probenmaterial von zwei verschiedenen Spendern untersucht wurde, konnte hier nicht die vollständige Varianz ermittelt werden. Es wäre demnach notwendig, weiteres Probenmaterial von verschiedenen Spendern zu untersuchen. Hier offenbart sich das Problem von Normalgewebe. Es spiegelt zwar die *in vivo* Bedingungen am besten wider, jedoch ist es nur sehr begrenzt verfügbar. In Anbetracht dessen scheinen ciPTEC Zellen eine geeignete Alternative zu sein.

Weiterhin muss aber auch beachtet werden, dass ein normales Zellkulturmodell offensichtlich nicht die Klinik widerspiegeln kann. In den hier durchgeführten Studien zeigte sich, dass alle platinbasierten Chemotherapeutika zytotoxisch in Nierenzellen waren. In der Klinik ist aber nur Cisplatin nephrotoxisch. Demnach kann auch für PN149 keine abschließende Aussage über dessen nephrotoxisches Potential getroffen werden. Hierzu müssten weitere Studien in weiteren Modelle durchgeführt werden. Allein die Kultivierung in einem Transwellsystem zeigte deutliche Unterschiede in der Aufnahme von Cisplatin. Ein weiterentwickeltes Modell stellt der sogenannte *kidney-on-a-chip* dar. Dabei können auf einer Membran kultivierte Nierenzellen mit einem Fluid umströmt werden, wodurch ein tubulärer Fluss entsteht, der zum einen Scherkräfte auf die Zellen ausübt, zum anderen werden die Zellen dadurch mit Nährstoffen versorgt und gleichzeitig Ausscheidungsprodukte abtransportiert. Dadurch lassen sich Transportprozesse, die die Niere hauptsächlich ausmachen, besser simulieren. Bisher gibt es, im Gegensatz zu anderen Organen, jedoch noch kein validiertes Modell, das für Nephrotoxizitätsstudien eingesetzt werden kann. *In vivo* Studien bringen das Problem der Interspeziesvariationen mit sich. Viele Medikamente, die in *in vivo* Studien kein nephrotoxisches Potential aufwiesen, fallen in der klinischen Phase durch, da sie im Menschen doch zu Nierenschäden führen. Folglich besteht hier noch großer Forschungsbedarf.



## A.1 Chemikalien

**Tabelle A.1:** Auflistung der verwendeten Chemikalien sowie deren Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
RPMI-1640	Sigma-Aldrich (Steinheim)
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
AAS-Platinstandard (1 g/L in 10 % HCl)	Perkin Elmer (Rodgau)
Albumin Fraktion V	Roth (Karlsruhe)
Amersham ECL Western Blotting Detection	GE Healthcare (Buckinghamshire)
Ammoniumacetat, $\geq 96$ %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Annexin V-FITC	BioLegend (San Diego)
BioRad Bradfordreagenz	BioRad (München)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Carboplatin (10 mg/mL)	Accord Healthcare (München)
CasyTon®	Roche (Mannheim)
Chloroform, HPLC grade	Roth (Karlsruhe)
Cisplatin (1 g/L)	Städtisches Klinikum Karlsruhe
DAPI (CyStain® DNA/Protein)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

D-Glucose (CELLPURE®), ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥ 99 %, p.A.	Sigma-Aldrich (Steinheim)
di-Natriumhydrogenphosphat, ≥ 99 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
DMEM-Ham's/F12 phenolrotfrei	Gibco, Thermo Fisher Scientific, (Dreieich)
DNA Suspension Buffer	TEKnova (Kristiansand)
EDTA Di-Natriumsalz Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethanol (96 %)	Roth (Karlsruhe)
Exonuklease I (20 U/µL)	New England Bio Labs (Frankfurt)
Exonuklease Reaktionspuffer	New England Bio Labs (Frankfurt)
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen (Darmstadt)
Giemsa®-Färbelösung	Roth (Karlsruhe)
Glycerin (Rotipuran®), ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Glycin®, ≥ 99 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Hydrocortison	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Insulin, Transferrin, Selen (ITS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid, ≥ 99 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat, ≥ 99 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid, ≥ 98,5 %	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat, 98,2 %	VWR International (Darmstadt)
Methanol, HPLC grade	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid, ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat, ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Oxaliplatin (5 mg/mL)	Accord Healthcare (München)
PAGE Ruler Prestained Protein Ladder (10 - 170 kDa)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
PCR Certified Water	TEKnova (Kristiansand)
Penicillin/Streptomycin (P: 5000 U/mL, S: 5 mg/L)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PN149	Vasily Sen (Institute of Problems, of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russian Federation)
Primer Eurofins	Eurofins (Ebersberg)
Primer Fluidigm	Fluidigm (San Francisco)
Propidiumiodid (PI) (1 g/L)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete)	Roche (Mannheim)
Proteinase K	Merck Millipore (Darmstadt)
Roti®-Load 1 4x (Ladepuffer)	Roth (Karlsruhe)
Roti®-Phenol	Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese® (Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40 %))	Roth (Karlsruhe)
Rotisol (Ethanol 100 %)	Roth (Karlsruhe)
Salpetersäure Supra Qualität (65 %)	Roth (Karlsruhe)
SDS (10 %)	AppliChem (Darmstadt)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix mit Low ROX	BioRad (München)
Staurosporin (1 mM)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
TE-Puffer	TEKnova (Kristiansand)
Triiodthyronin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris Ultra Qualität	Roth (Karlsruhe)
Triton X 100	Roth (Karlsruhe)
Trypsin, 0,25 % Trypsin in EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween® 20	Roth (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid Supra Qualität (30 %)	Roth (Karlsruhe)

## A.2 Puffer und Lösungen

**Tabelle A.2:** Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Extraktionspuffer (pH 8,0)	0,01 M Tris
	0,1 M EDTA
	0,5 % SDS
	20 µg/mL RNase A (hitzeinaktiviert)
HBSS (pH 7,4)	1,26 mM CaCl <sub>2</sub>
	0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,4 mM MgSO <sub>4</sub>
	5,3 mM KCl
	0,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	4,2 mM NaHPO <sub>4</sub>
	138 mM NaCl
	0,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

---

	5,6 mM D-Glucose
Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris 1,92 M Glycin
Laufpuffer (1x)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl 250 NaCl 1 mM EDTA 0,1 % Triton X-100
PBS (pH 7,4)	0,1 M NaCl 0,0045 M KCl 0,007 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,003 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-EDTA (pH 7,4)	0,5 mM EDTA in PBS
PBST	0,05 % Tween in PBS
Ringer-Lösung	147 mM NaCl 402 mM KCl 297 mM CaCl <sub>2</sub>
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 6,25 mM EDTA
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol
Trypsin-Lösung	0,25 % Trypsin in PBS-EDTA

---

### A.3 Antikörper

**Tabelle A.3:** Verwendete Antikörper und deren Hersteller.

Antikörper	Hersteller
p53 (DO-7, <i>monoclonal mouse</i> )	DAKO (Santa Clara)
<i>donkey anti-mouse</i>	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz)
ERK2 ( <i>polyclonal rabbit</i> )	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz)
<i>donkey anti-rabbit</i>	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz)

### A.4 Verwendete Kits

**Tabelle A.4:** Verwendete Kits und deren Hersteller.

Verwendetes Kit	Hersteller
qScript™ cDNA Synthesis Kit	QuantaBio (Beverly)
NucleoSpin RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Caspase-Glo 8/9 Assay Systems	Promega (Madison)

### A.5 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle A.5:** Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,2 mL Sample Cups (AAS)	Perkin Elmer (Rodgau)
1,5/2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
15 mL/50 mL Plastik-Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
96-well Optical Plate PolymerBase	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
96-well Platte	TPP (Trasadingen)
Casy-Cups	Roche (Mannheim)
Dynamic Array IFC	Fluidigm (San Francisco)
Einmalspritzen (10 mL)	B.Braun (Melsungen)
Handschuhe (Latex)	VWR International (Darmstadt)
Handschuhe (Nitril)	Ansell (Richmond)
Kanülen (Sterican®) 1,20 x 40 mm	B.Braun (Melsungen)
Kryoröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Pipettenspitzen 1 - 200 $\mu\text{L}$	Ratiolab (Deieck)
Pipettenspitzen 10 - 100 $\mu\text{L}$	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen 10 $\mu\text{L}$	Metler-Toledo (Gießen)
Pipettenspitzen 100 - 1000 $\mu\text{L}$	Brandt (Wertheim)
Pipettenspitzen 5 mL	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen 5 mL	Brandt (Wertheim)
PVDF Membran	GE Healthcare (Buckinghamshire)
Sterilfilter	VWR International (Darmstadt)
Sterilindikatorband Autoklav	Roth (Karlsruhe)
Sterilindikatorband Heißluftsterilisator	Roth (Karlsruhe)
Whatmanpaper	Roth (Karlsruhe)
Zellkulturflasche (T25, T75)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschale (6, 20, 15 cm)	Sarstedt (Nümbrecht)

## A.6 Instrumente und Software

**Tabelle A.6:** Auflistung der verwendeten Instrumente und Software sowie deren Hersteller.

<b>Instrument/Software</b>	<b>Hersteller</b>
Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900 T	Perkin Elmer (Waltham)
Autoklav D-150	Systec (Linden)
Biomark	Fluidigm (San Francisco)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold)
Casy® TTC Cell Couter & Analyser System	Roche (Mannheim)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Colony Counter BZG-30	WTW (Weilheim)
Durchflusszytometer LSR Fortessa	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Electrophoresis power supply PowerPac Basic	Bio-Rad (Hercules, USA)
Eppendorf Pipette 1000-5000 $\mu\text{l}$	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 100-1000 $\mu\text{l}$	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 10-100 $\mu\text{l}$	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 2,5-10 $\mu\text{l}$	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 20-200 $\mu\text{l}$	Eppendorf (Hamburg)
Feinwaage BP 61 S	Sartorius (Göttingen)
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International (Darmstadt)
Gelelektrophorese Kammer	Bio-Rad (Hercules, USA)
Gelhalter Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad (Hercules, USA)



---

Glaspipetten 5, 10, 20 ml	Roth (Karlsruhe)
Heißluftsterilisator	Memmert (Büchenbach)
Heizschüttler Thermomixer C	Eppendorf (Hamburg)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco)
Laborspülmaschine Professional G7883	Miele (Güterloh)
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm (Düsseldorf)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
MicroCentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Feldbach)
Multipette DISTRIMAN	Gilson (Limburg an der Lahn, D)
Multipipette Pipete Lite XLS® 0,5-10 µl	Mettler Toledo (Gießen)
NanoQuant Platte	Tecan Group (Crailsheim)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt)
Software AA Winlab 322	Perkin Elmer (Waltham)
Software AIDA Image Analyzer	Raytest (Straubenhardt)
Software BD FACSDiva	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Software Fluidigm Real Time PCR Analysis	Fluidigm (San Francisco)
Software GenEx	MultiD Analyses (Göteborg)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold)
T100 Thermal Cycler	BioRad (München)
Taumler 3012	GFL (Burgwedel)
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim)
Tischzentrifuge Eppireaktionsgefäße	VWR International (Darmstadt)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Memert (Schwabach)

---

## A.7 Genliste der Hochdurchsatz RT-qPCR

In Tabelle A.7 sind alle Gene in ihren zugehörigen Genclustern aufgelistet, die in der Hochdurchsatz RT-qPCR verwendet wurden. Die Primersequenzen der jeweiligen Gene sind (Fischer et al., 2016) zu entnehmen.

Tabelle A.7: Auflistung der Gencluster sowie deren Gene der Hochdurchsatz RT-qPCR.

Transkriptionsfaktoren	DNA-Schadensantwort und -Reparatur	Zellzyklus und Proliferation	(oxidative) Stressantwort	Inflammationsmarker	Apoptose	Fremdstoffmetabolismus	Metallhomöostase	Referenzgene
<i>AXIN2</i>	<i>APEX1</i>	<i>CCND1</i>	<i>CAT</i>	<i>IL-8</i>	<i>APAF1</i>	<i>ABCB1</i>	<i>MT1X</i>	<i>ACTB</i>
<i>BTRC</i>	<i>ATM</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>FTH1</i>		<i>BAX</i>	<i>ABCC1</i>	<i>MT2A</i>	<i>B2M</i>
<i>JUN</i>	<i>ATR</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>G6PD</i>		<i>BBC3</i>	<i>ADH1B</i>	<i>SLC30A1</i>	<i>GAPDH</i>
<i>KEAP1</i>	<i>BRCA1</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>GCLC</i>		<i>BCL2</i>	<i>ALDH1A1</i>		<i>GUSB</i>
<i>MAP3K5</i>	<i>BRCA2</i>	<i>E2F1</i>	<i>GPX1</i>		<i>BCL2L1</i>	<i>CYP1A1</i>		<i>HPRT1</i>
<i>MDM2</i>	<i>DDB1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GPX2</i>		<i>PMAIP1</i>	<i>EPHX1</i>		
<i>NFE2L2</i>	<i>DDB2</i>	<i>MYC</i>	<i>GSR</i>		<i>TNFRSF10B</i>	<i>GSTP1</i>		
<i>NFKB1</i>	<i>DDIT3</i>	<i>PLK3</i>	<i>HMOX1</i>		<i>XIAP</i>	<i>NAT1</i>		
<i>NFKB2</i>	<i>ERCC1</i>	<i>PPM1D</i>	<i>HSPA1A</i>			<i>NQO1</i>		
<i>NFKBIA</i>	<i>ERCC2</i>	<i>SIRT2</i>	<i>PRDX1</i>			<i>SULT1A1</i>		
<i>TP53</i>	<i>ERCC4</i>		<i>SEPP1</i>			<i>UGT1A</i>		
<i>VEGFA</i>	<i>ERCC5</i>		<i>SOD1</i>					
	<i>GADD45A</i>		<i>SOD2</i>					
	<i>LIG1</i>		<i>TFRC</i>					
	<i>LIG3</i>		<i>TXN</i>					
	<i>MGMT</i>		<i>TXNRD1</i>					
	<i>MLH1</i>							
	<i>MSH2</i>							
	<i>OGG1</i>							
	<i>PARP1</i>							
	<i>PCNA</i>							
	<i>POLB</i>							
	<i>POLD1</i>							
	<i>RAD50</i>							
	<i>RAD51</i>							
	<i>RRM2B</i>							
	<i>XPA</i>							
	<i>XPC</i>							
	<i>XRCC5</i>							

## B.1 DNA-Platinierung in A498 Zellen

**Tabelle B.1:** Auflistung der Einzelwerte der DNA-Platinierung in A498 Zellen aller platinbasierten Substanzen.

	[nmol Pt/g DNA]				
	V1	V2	V3	Mittelwert	SD
<b>Cisplatin</b>	369,6	138,5	642,4	383,5	252,2
<b>Carboplatin</b>	26,2	883,8	7,8	306,0	500,6
<b>Oxaliplatin</b>	64,5	213,4	170,4	149,5	76,6
<b>PN149</b>	572,3	689,8	641,2	634,4	59,0

## B.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose in A498 Zellen nach Behandlung mit 200 $\mu$ M Carboplatin

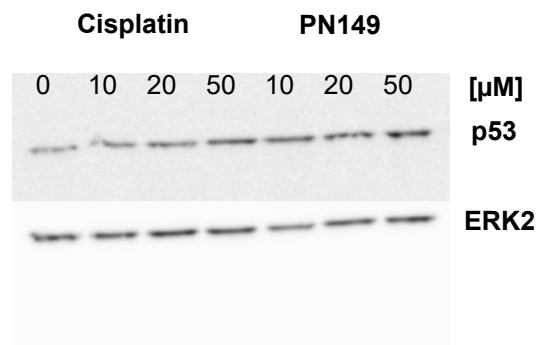
**Tabelle B.2:** Prozentuale Verteilung von A498 Zellen nach Behandlung mit 200  $\mu$ M Carboplatin in apoptotische, nekrotische + spät-apoptotische und lebende Zellen.

	<b>Apoptose</b>		<b>Nekrose + späte Apoptose</b>		<b>Lebende Zellen</b>	
	Mittelwert [%]	$\pm$ SD [%]	Mittelwert [%]	$\pm$ SD [%]	Mittelwert [%]	$\pm$ SD [%]
0 h	15	7	6	2	72	3
24 h	32	10	9	2	59	11
48 h	35	11	9	2	55	13
72 h	32	10	6	0	62	10
96 h	10	1	5	0	83	1

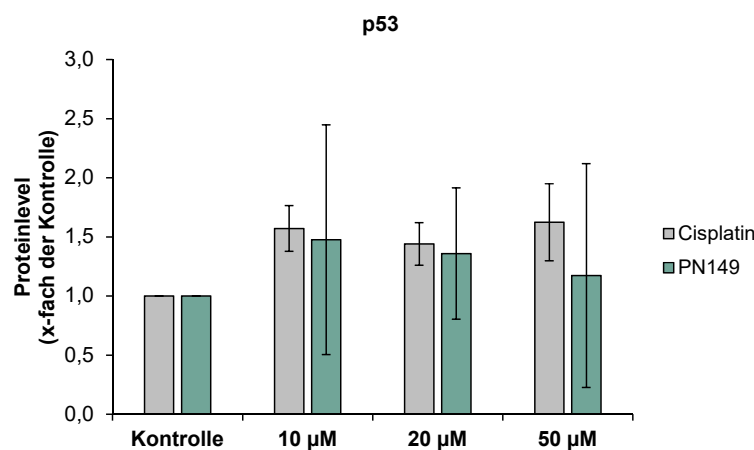
### B.3 Untersuchungen der Wirkmechanismen von Cisplatin und PN149 in RT112 Zellen

Zusätzlich zu den Untersuchungen in den A498 Zellen wurden die Wirkmechanismen von Cisplatin und PN149 in RT112 Zellen untersucht. Dabei wurden Genexpressionsprofile erstellt sowie verschiedene Untersuchungen auf funktioneller Ebene angestellt.

#### B.3.1 Einfluss von p53

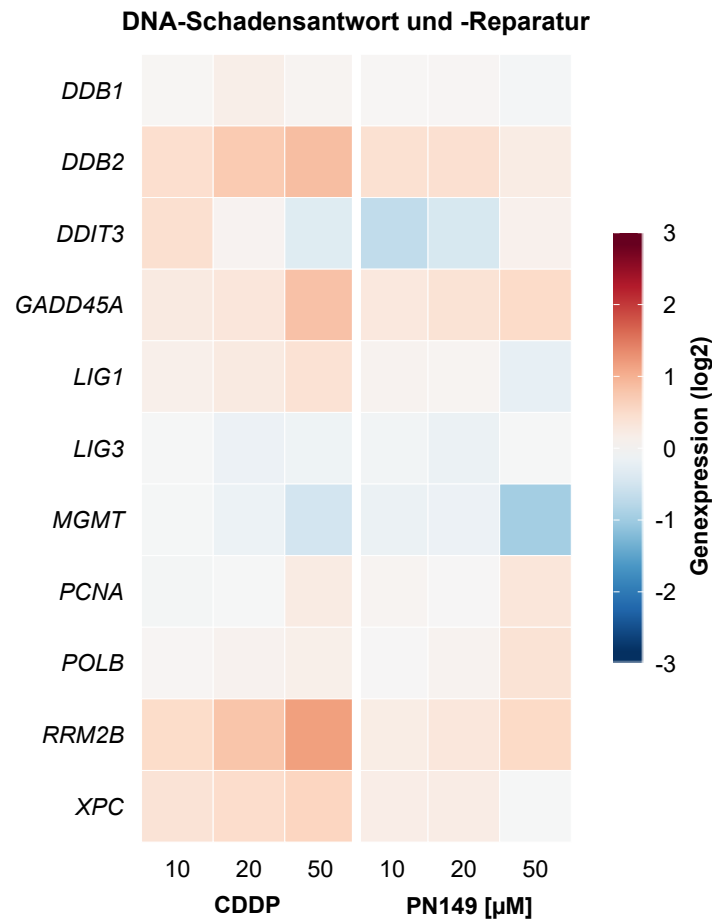


**Abbildung B.1: Proteinlevel von p53 nach Inkubation mit Cisplatin bzw. PN149.** RT112 Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin bzw. PN149 inkubiert und für 24 h weiterkultiviert. Mittels Immunoblot wurde das p53 Proteinlevel bestimmt, wobei ERK2 als Ladekontrolle diente. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei ein Versuch exemplarisch dargestellt ist.



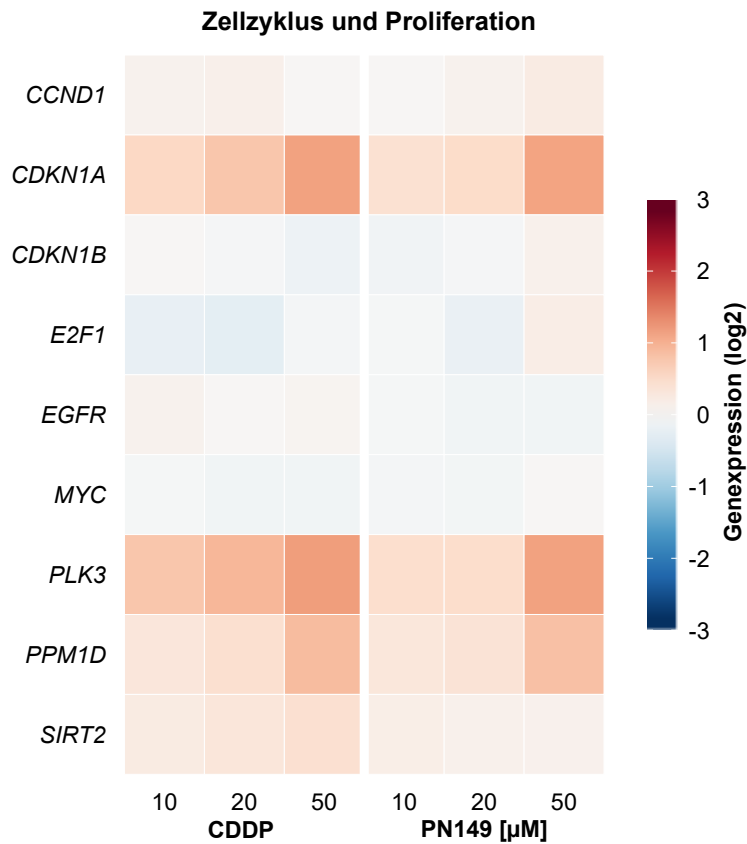
**Abbildung B.2: Semiquantitative Auswertung der Immunoblots von p53 in RT112 Zellen nach Inkubation mit Cisplatin bzw. PN149.** Es erfolgte eine 1 h Inkubation von RT112 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin bzw. PN149. Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Zur semiquantitativen Auswertung wurden die Bandenintensitäten der Ladekontrolle ERK2 miteinberechnet und auf die Kontrolle normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung.

## B.3.2 DNA-Schadensantwort und -Reparatur

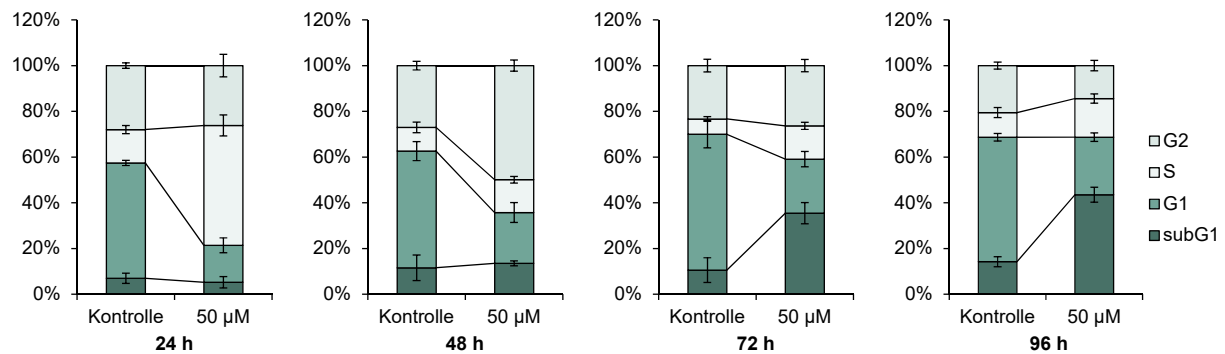
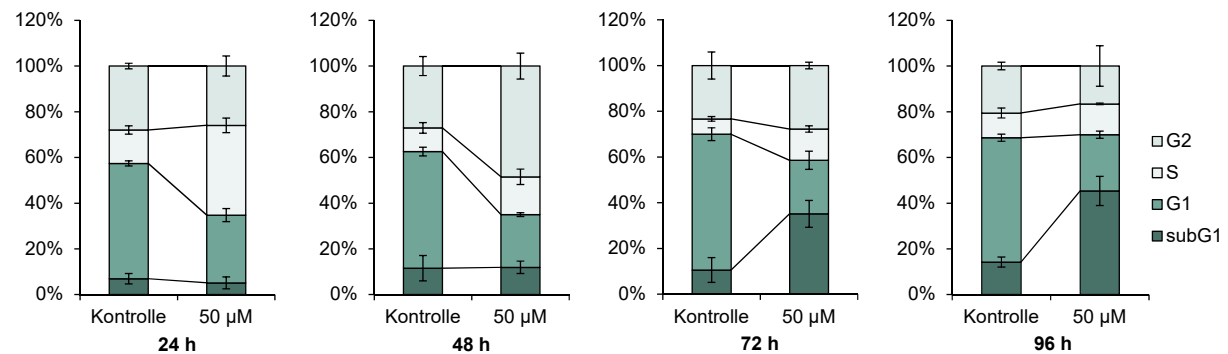


**Abbildung B.3: Genexpressionsprofile von DNA-Schadensantwort und -Reparaturgenen in RT112 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin bzw. PN149.** RT112 Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin bzw. PN149 inkubiert und im Anschluss für weitere 24 h kultiviert. Mit Hilfe der Hochdurchsatz RT-qPCR wurde anschließend die Genexpression analysiert. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

## B.3.3 Zellzyklus und -Proliferation



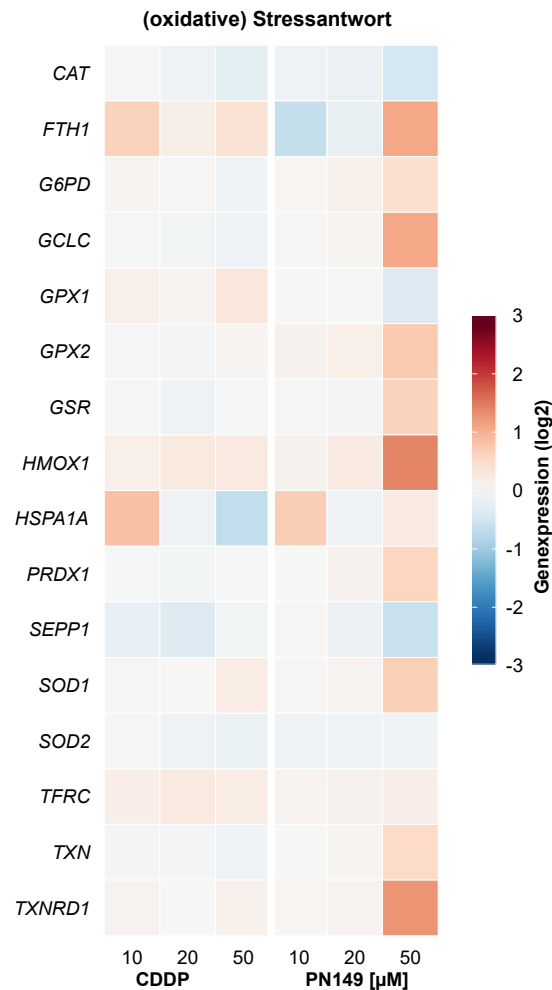
**Abbildung B.4: Genexpressionsprofile von zellzyklus- und proliferationsbeteiligten Genen in RT112 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin bzw. PN149.** RT112 Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin bzw. PN149 inkubiert und im Anschluss für weitere 24 h kultiviert. Mit Hilfe der Hochdurchsatz RT-qPCR wurde anschließend die Genexpression analysiert. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

**Cisplatin****PN149**

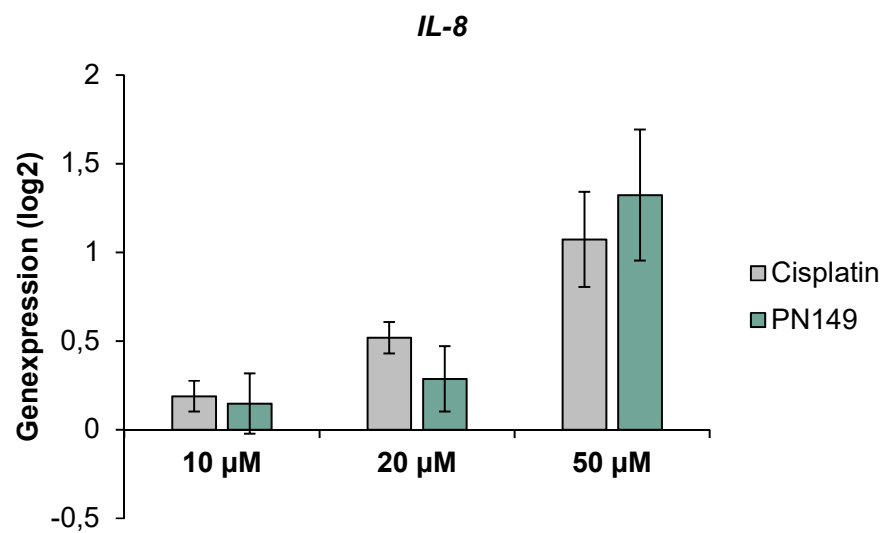
**Abbildung B.5: Zellzyklusverteilung von RT112 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin bzw. PN149.** RT112 Zellen wurden für 1 h mit 50 µM PN149 behandelt und im Anschluss für 24, 48, 72 und 96 h weiter kultiviert. Zur Messung der Zellzyklusverteilung wurden die Proben mit DAPI (4',6'-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung.



## B.3.4 Oxidative Stressantwort und Inflammation

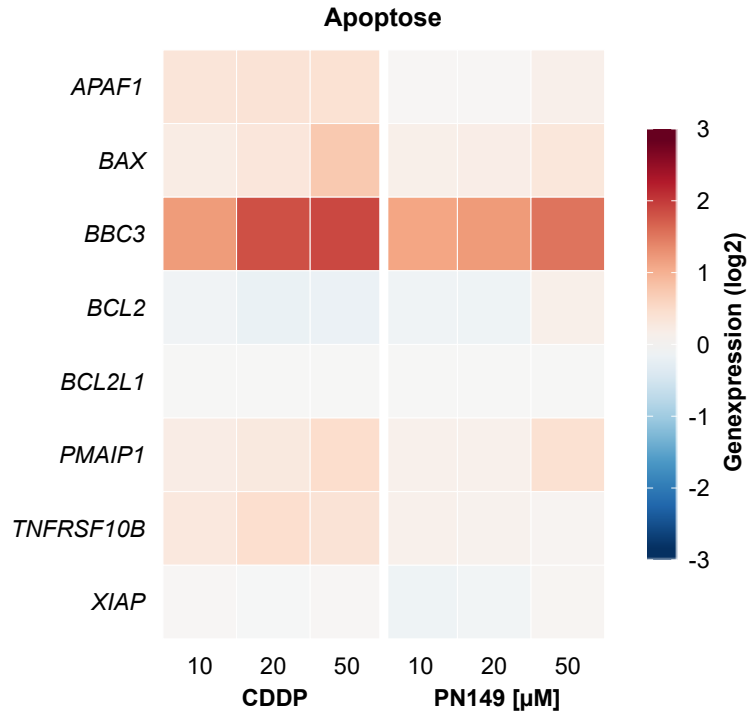


**Abbildung B.6: Genexpressionsprofile von Genen beteiligt an der (oxidativen) Stressantwort in RT112 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin bzw. PN149.** RT112 Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin bzw. PN149 inkubiert und im Anschluss für weitere 24 h kultiviert. Mit Hilfe der Hochdurchsatz RT-qPCR wurde anschließend die Genexpression analysiert. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

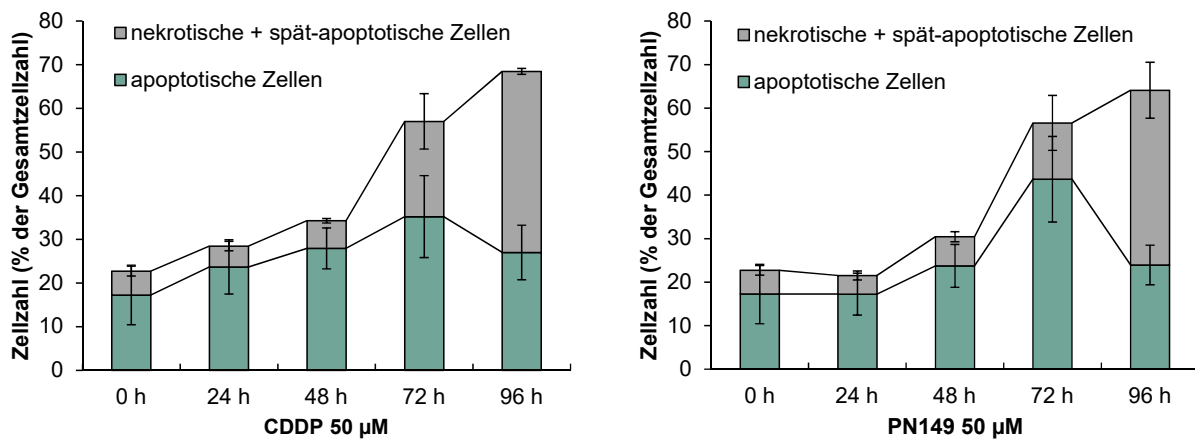


**Abbildung B.7: Genexpression von *IL-8* in RT112 Zellen nach Behandlung der jeweiligen platinbasierten Substanz.** RT112 Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin bzw. PN149 inkubiert und für weitere 24 h kultiviert. Darauffolgend wurde die Genexpression mittels Hochdurchsatz RT-qPCR ermittelt. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert und als log<sub>2</sub> Werte berechnet. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung.

## B.3.5 Induktion des Zelltods

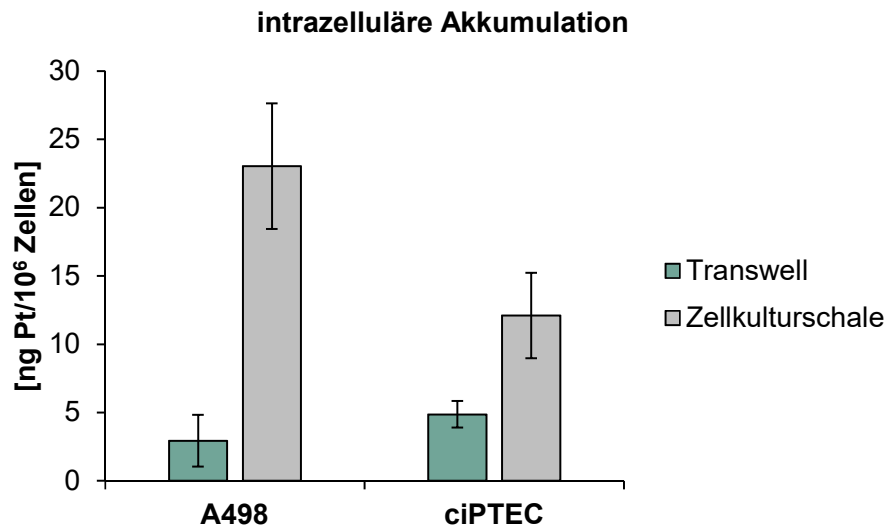


**Abbildung B.8: Genexpressionsprofile von Apoptosegenen in RT112 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin bzw. PN149.** RT112 Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin bzw. PN149 inkubiert und im Anschluss für weitere 24 h kultiviert. Mit Hilfe der Hochdurchsatz RT-qPCR wurde anschließend die Genexpression analysiert. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten Kontrollproben normiert. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.



**Abbildung B.9: Durchflusszytometrische Untersuchung der Induktion der Apoptose in RT112 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin bzw. PN149.** RT112 Zellen wurden für 1 h mit 50 µM Cisplatin bzw. PN149 behandelt und für 24, 48, 72 und 96 h weiter kultiviert. Im Anschluss wurden die Proben zur Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen + spät-apoptotischen Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) respektive angefärbt. Die angefärbten Proben wurde am Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

## B.4 Vergleich der intrazellulären Akkumulation von Cisplatin in unterschiedlichen Zellkulturmodellen



**Abbildung B.10:** Vergleich der intrazellulären Akkumulation von Cisplatin in A498 und ciPTEC Zellen kultiviert in der Zellkulturschale vs. im Transwell-System. A498 und ciPTEC Zellen wurden jeweils in der Zellkulturschale bzw. in einem Transwellsystem kultiviert. Es erfolgte in jedem Kultivierungssystem und der jeweiligen Zelllinie eine 2 h Inkubation mit 50  $\mu$ M Cisplatin. Nach saurem Aufschluss wurde der Platingehalt anschließend an der GF-AAS gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung.



## Publikationsliste

**Publikationen in Fachzeitschriften**

**Schoch, S.**, Sen', V., Gajewski, S., Golubev, V., Strauch, B., Hartwig, A. und Köberle, B. (2018), *Activity profile of the cisplatin analogue PN149 in different tumor cell lines*, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 156, pp. 109–119.

Cetraz, M., Sen, V., **Schoch, S.**, Streule, K., Golubev, V., Hartwig, A. and Koberle, B. (2017), *Platinum(IV)-nitroxyl complexes as possible candidates to circumvent cisplatin resistance in RT112 bladder cancer cells*, *Archives of toxicology*, Vol. 91 No. 2, pp. 785–797.

**Publikationen in Vorbereitung**

**Schoch, S.**, Gajewski, S., Hartwig, A. und Köberle, B., *Comparing studies of the mode of action of platinum-based chemotherapeutics*

**Schoch, S.**, Hartwig, A. und Köberle, B., *Nephrotoxicity studies of the clinical approved platinum-based chemotherapeutics*

Hufnagel, M., **Schoch, S.**, Wall, J., Strauch, B. M., Hartwig, A., *Revealing the toxicity of nanoparticles using air-liquid interface exposure combined with gene expression analysis*

**Vorträge auf Fachtagungen**

**Schoch, S.**, Sen, V., Gajewski, S., Golubev V., Strauch, B., Hartwig, A., Köberle, B., *Cisplatin and its analogue PN149: Different responses in bladder and renal tumor cells*, 15th Biennial Meeting of the DGDR – DNA Repair 2018, 9. – 12.09.2018, Karlsruhe (DE)

**Schoch, S.**, Cetraz, M., Streule, K., Sen, V., Hartwig, A., Köberle, B., *The role of the human copper transporter hCTR1 in cisplatin resistance and how to overcome the barrier*, 19th Barrier- and Transporter Meeting, 15. – 17.05.2017, Bad Herrenalb (DE)

**Schoch, S.**, Schumacher, P., Wessbecher, I., Brenner, W., Hartwig, A., Köberle, B., *Unraveling the mechanisms of cisplatin induced nephrotoxicity: Effects of cisplatin in renal tubule cells*, Symposium on DNA damage response, genetic instability and cancer, 25. – 26.11.2016, Mainz (DE)

**Schoch, S.**, Cetraz, M., Streule, K., Sen, V., Hartwig, A., Köberle, B., „Platinum(IV)-nitroxyl-complexes as possible candidates to overcome cisplatin resistance in human bladder cancer cells”, 4. Fachtagung der Experimentellen und Klinischen Pharmakologen und Toxikologen in Baden-Württemberg, 15.07.2016, Konstanz (DE)

#### **Posterbeiträge auf Fachtagungen**

**Schoch, S.**, Cetraz, M., Streule, K., Sen, V., Hartwig, A., Köberle, B., *Overcoming cisplatin resistance: Platinum(IV)-nitroxyl-complexes as potential new anticancer drugs*, 14th Biennial Meeting of the DGDR – DNA Repair 2016, 12 - 16.09.2016, Essen (DE)



---

### Danksagung

---

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den Leuten bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt und begleitet haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter PD. Dr. Beate Köberle. Beate, deine motivierende Art und deine Begeisterung für die Wissenschaft haben mich erst selbst zu einem leidenschaftlichen Forscher werden lassen. Durch deine positive Art habe ich nie die Motivation und Begeisterung für meine Arbeit verloren. Danke, für die vielen wissenschaftlichen und unwissenschaftlichen Diskussionen, z.B. über die olfaktorischen Wahrnehmungen im Zug nach Stuttgart, die wir über die Jahre miteinander geführt haben. Danke, dass ich so viel von dir lernen konnte und immer noch kann.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Andrea Hartwig bedanken. Danke, dass du mir die Chance gegeben hast meine Promotion mit einem Thema durchzuführen für das ich leidenschaftlich brenne. Bei Prof. Dr. Ute Schepers möchte ich mich zudem für die Übernahme des Korreferenten-Amtes bedanken.

Mein Dank gilt außerdem meinen Masterranden Philipp, Sabine, Alessia, Johanna, Sirin und Jana. Mir hat die Arbeit mit euch immer sehr viel Spaß gemacht, auch wenn es mal wieder nicht so gut im Labor lief. Danke, dass jeder von euch seinen Teil zu meiner Arbeit beigetragen hat.

Eine Arbeit macht nur halb so viel Spaß ohne die richtigen Kollegen. Glücklicherweise durfte ich über die Jahre vielen großartigen Kollegen begegnen, die das Arbeiten noch einmal leichter gemacht haben. An erster Stelle muss hier natürlich Matze genannt werden. Danke, für die letzten 9 1/2 Jahre Freundschaft in denen wir viele (!) sinnvolle aber auch sinnlose Diskussionen geführt haben und du stets für mich da warst. Sabine, doppeltgemoppelt hält besser. Danke, dass du nicht nur meine Masterandin sondern auch HIWI und Bürokollegin (und Yogalehrerin) warst. Deine Arbeit

und den Austausch den wir hatten, hat einen maßgeblichen Teil zu meiner Arbeit beigetragen. Auch wenn sie schon eine ehemalige Kollegin ist, möchte ich mich bei Rebecca für das offene Ohr, dass du immer für mich hattest, besonders bedanken. Ein Dank gilt auch meiner ehemaligen Bürokollegin Barabara. Danke, für die vielen wissenschaftlichen, aber auch unwissenschaftlichen Gespräche über die nie enden wollende Hausbaustelle, die wir geführt haben. Außerdem möchte ich mich bei allen jetzigen Kollegen Tizia, Ronja, Alexandra, Paul, Vivien, Wera und Doro, aber auch bei den ehemaligen Kollegen Nadin, Betty und Elena für die gemeinsame Zeit bedanken. Und natürlich gilt mein Dank auch Sonya, deren Tür immer offen für Unterhaltungen war.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Mirko Bunzel und seinem Arbeitskreis für die gemeinsame Zeit bedanken. Herr Bunzel, danke, dass Sie mich über die Jahre hinweg ertragen haben. Es ist Ihnen hochanzurechnen. Hier möchte ich mich auch besonders bei den ehemaligen Kollegen Felix und Martin bedanken. Danke, für die vielen hoch eloquenten und intellektuellen Gespräche. Sie waren stets eine Bereicherung im Arbeitsalltag. Bei Beate und Andi möchte ich mich weiterhin für unsere gemeinsamen Kaffeepausen und Unterhaltungen bedanken. Gespräche über Fahrräder waren mir eine willkommene Abwechslung zum Alltag. Mein Dank gilt weiterhin allen anderen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern Jan, Hendrik, Julia, Caro, Flo, Antje, Lea, Daniel, Judith und Rachel.

Neben den Kollegen möchte ich mich außerdem bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Huck, danke, dass du immer für mich da bist und dir stets mein Gewäsch anhören musst. Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem Bruder David bedanken. Danke, für deine viele Unterstützung, wenn ich dich mal wieder nerven musste, weil mal wieder was nicht in R funktionierte und den Austausch über das Leben als Akademiker. Meinem Bruder Alexander möchte ich genauso für seine Unterstützung und Unterhaltungen über nicht akademische Dinge danken. Natürlich gilt mein Dank besonders auch meinen Eltern. Ihr habt mich mein Leben lang stets bei allem unterstützt und mir so viel ermöglicht. Und zum Schluss möchte ich der wichtigsten Person in meinem Leben danken. Jan, danke, dass du mich in jeder Lebenslage immer unterstützt und für mich da bist. Danke, dass du stets Verständnis für sämtliche Situationen zeigst.

---

## Literaturverzeichnis

---

- Abbas, T. und Dutta, A. (2009). p21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer*, 9(6):400–414.
- Agarwal, A., Balla, J., Alam, J., Croatt, A. J., und Nath, K. A. (1995). Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney International*, 48(4):1298–1307.
- Agarwal, A. und Nick, H. S. (2000). Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 11(5):965–973.
- Alcindor, T. und Beauger, N. (2011). Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 18(1):18–25.
- Apps, M. G., Choi, E. H. Y., und Wheate, N. J. (2015). The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocrine-related cancer*, 22(4):R219–33.
- Arnér, E. S. J. und Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267(20):6102–6109.
- Bae, I., Kang, S., Yoon, S., und Um, H.-D. (2006). Cellular components involved in the cell death induced by cisplatin in the absence of p53 activation. *Oncology Reports*.
- Baek, S. M., Kwon, C. H., Kim, J. H., Woo, J. S., Jung, J. S., und Kim, Y. K. (2003). Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 142(3):178–186.
- Bai, J. und Cederbaum, A. I. (2001). Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biological signals and receptors*, 10(3-4):189–199.

- Barabas, K., Milner, R., Lurie, D., und Adin, C. (2008). Cisplatin: A review of toxicities and therapeutic applications. *Veterinary and comparative oncology*, 6(1):1–18.
- Barnard, C. (2017). Platinum Group Metal Compounds in Cancer Chemotherapy. *Johnson Matthey Technology Review*, 61(1):52–59.
- Bedford, P., Walker, M. C., Sharma, H. L., Perera, A., McAuliffe, C. A., Masters, J. R., und Hill, B. T. (1987). Factors influencing the sensitivity of two human bladder carcinoma cell lines to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Chemico-biological interactions*, 61(1):1–15.
- Benigni, A., Morigi, M., und Remuzzi, G. (2010). Kidney regeneration. *Lancet*, 375:1310–1317.
- Berndtsson, M., Hägg, M., Panaretakis, T., Havelka, A. M., Shoshan, M. C., und Linder, S. (2007). Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *International journal of cancer*, 120(1):175–180.
- Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K., und Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4832):1386–1392.
- Bohnke, A., Westphal, F., Schmidt, A., El-Awady, R. A., und Dahm-Daphi, J. (2004). Role of p53 mutations, protein function and DNA damage for the radiosensitivity of human tumour cells. *International journal of radiation biology*, 80(1):53–63.
- Boiteux, S., Bichara, M., Fuchs, R. P. P., und Laval, J. (1989). Excision of the imidazole ring-opened form of N<sup>2</sup>-aminofluorene-C(8)-guanine adduct in poly(dG-dC) by Escherichia coli fonnamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Carcinogenesis*, 10(10):1905–1909.
- Bourdon, J.-C. (2007). p53 and its isoforms in cancer. *British journal of cancer*, 97(3):277–282.
- Boyle, W. J., Smeal, T., Defize, L. H., Angel, P., Woodgett, J. R., Karin, M., und Hunter, T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell*, 64(3):573–584.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2):248–254.
- Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A., und Porras, A. (2007). Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 12(9):1733–1742.
- Branch, P., Masson, M., Aquilina, G., Bignami, M., und Karran, P. (2000). Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells. *Oncogene*, 19(28):3138–3145.

- Britten, R. A., Liu, D., Tessier, A., Hutchison, M. J., und Murray, D. (2000). ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells. *International Journal of Cancer*, 89(5):453–457.
- Bruno, P. M., Liu, Y., Park, G. Y., Murai, J., Koch, C. E., Eisen, T. J., Pritchard, J. R., Pommier, Y., Lippard, S. J., und Hemann, M. T. (2017). A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nature medicine*, 23(4):461–471.
- Bukau, B. und Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell*, 92(3):351–366.
- Burger, H., Loos, W. J., Eechoute, K., Verweij, J., Mathijssen, R. H. J., und Wiemer, E. A. C. (2011). Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 14(1):22–34.
- Burger, H., Nooter, K., Boersma, A. W., Kortland, C. J., und Stoter, G. (1997). Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *International Journal of Cancer*, 73(4):592–599.
- Burger, H., Zoumaro-Djayoon, A., Boersma, A. W. M., Helleman, J., Berns, E M J J, Mathijssen, R. H. J., Loos, W. J., und Wiemer, E. A. C. (2010). Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2). *British journal of pharmacology*, 159(4):898–908.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., und Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4):611–622.
- Campbell, L. M., Maxwell, P. J., und Waugh, D. J. J. (2013). Rationale and Means to Target Pro-Inflammatory Interleukin-8 (CXCL8) Signaling in Cancer. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(8):929–959.
- Cepeda, V., Fuertes, M., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., und Perez, J. (2007). Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7(1):3–18.
- Cersosimo, R. J. (2005). Oxaliplatin-associated neuropathy: a review. *The Annals of pharmacotherapy*, 39(1):128–135.
- Cetraz, M., Sen, V., Schoch, S., Streule, K., Golubev, V., Hartwig, A., und Koberle, B. (2017). Platinum(IV)-nitroxyl complexes as possible candidates to circumvent cisplatin resistance in RT112 bladder cancer cells. *Archives of toxicology*, 91(2):785–797.

- Chaney, S. G., Campbell, S. L., Bassett, E., and Wu, Y. (2005). Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Critical reviews in oncology/hematology*, 53(1):3–11.
- Chaney, S. G., Campbell, S. L., Temple, B., Bassett, E., Wu, Y., and Faldu, M. (2004). Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(10):1551–1559.
- Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y., and Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: An exit from cell cycle control. *Nature reviews. Cancer*, 9(11):785–797.
- Chen, Y., Jungsuwadee, P., Vore, M., Butterfield, D. A., and St Clair, D. K. (2007). Collateral damage in cancer chemotherapy: Oxidative stress in nontargeted tissues. *Molecular interventions*, 7(3):147–156.
- Choi, S., Filotto, C., Bisanzo, M., Delaney, S., Lagasee, D., Whitworth, J. L., Jusko, A., Li, C., Wood, N. A., Willingham, J., Schwenker, A., and Spaulding, K. (1998). Reduction and Anticancer Activity of Platinum(IV) Complexes. *Inorganic Chemistry*, 37(10):2500–2504.
- Chresta, C. M., Masters, J. R., and Hickman, J. A. (1996). Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. *Cancer research*, 56(8):1834–1841.
- Ciarimboli, G. (2014). Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. *Anticancer research*, 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., and Schlatter, E. (2010). Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *The American journal of pathology*, 176(3):1169–1180.
- Ciarimboli, G., Ludwig, T., Lang, D., Pavenstädt, H., Koepsell, H., Piechota, H.-J., Haier, J., Jaehde, U., Zisowsky, J., and Schlatter, E. (2005). Cisplatin Nephrotoxicity Is Critically Mediated via the Human Organic Cation Transporter 2. *The American journal of pathology*, 167(6):1477–1484.
- Ciccia, A. and Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2):179–204.
- Cummings, B. S. (2002). Cisplatin-Induced Renal Cell Apoptosis: Caspase 3-Dependent and -Independent Pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(1):8–17.
- Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J. J., and Reed, E. (1994). Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *The Journal of clinical investigation*, 94(2):703–708.

- Dabkeviciene, D., Jonusiene, V., Zitkute, V., Zalyte, E., Grigaitis, P., Kirveliėne, V., und Sasnauskienė, A. (2015). The role of interleukin-8 (CXCL8) and CXCR2 in acquired chemoresistance of human colorectal carcinoma cells HCT116. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 32(12):258.
- de Feudis, P., Debernardis, D., Beccaglia, P., Valenti, M., Graniela Siré, E., Arzani, D., Stanzione, S., Parodi, S., D'Incalci, M., Russo, P., und Broggin, M. (1997). DDP-induced cytotoxicity is not influenced by p53 in nine human ovarian cancer cell lines with different p53 status. *British journal of cancer*, 76(4):474–479.
- de Jongh, F. E., Gallo, J. M., Shen, M., Verweij, J., und Sparreboom, A. (2004). Population pharmacokinetics of cisplatin in adult cancer patients. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 54(2):105–112.
- de Jongh, F. E., Verweij, J., Loos, W. J., de Wit, R., de Jonge, M. J., Planting, A. S., Nooter, K., Stoter, G., und Sparreboom, A. (2001). Body-surface area-based dosing does not increase accuracy of predicting cisplatin exposure. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(17):3733–3739.
- Delavaine, L. und La Thangue, N. B. (1999). Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene*, 18(39):5381–5392.
- Deng, C., Zhang, P., Wade Harper, J., Elledge, S. J., und Leder, P. (1995). Mice Lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, 82(4):675–684.
- Devgan, V., Mammucari, C., Millar, S. E., Briskin, C., und Dotto, G. P. (2005). p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. *Genes & Development*, 19(12):1485–1495.
- Di Cesare Mannelli, L., Pacini, A., Bonaccini, L., Zanardelli, M., Mello, T., und Ghelardini, C. (2013a). Morphologic features and glial activation in rat oxaliplatin-dependent neuropathic pain. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, 14(12):1585–1600.
- Di Cesare Mannelli, L., Pacini, A., Micheli, L., Tani, A., Zanardelli, M., und Ghelardini, C. (2014). Glial role in oxaliplatin-induced neuropathic pain. *Experimental neurology*, 261:22–33.
- Di Cesare Mannelli, L., Zanardelli, M., Failli, P., und Ghelardini, C. (2012). Oxaliplatin-induced neuropathy: Oxidative stress as pathological mechanism. Protective effect of silibinin. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, 13(3):276–284.
- Di Cesare Mannelli, L., Zanardelli, M., Failli, P., und Ghelardini, C. (2013b). Oxaliplatin-induced oxidative stress in nervous system-derived cellular models: Could it correlate with in vivo neuropathy? *Free radical biology & medicine*, 61:143–150.

- Dilruba, S. und Kalayda, G. V. (2016). Platinum-based drugs: Past, present and future. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 77(6):1103–1124.
- dos Santos, N. A. G., Rodrigues, M. A. C., Martins, N. M., und Dos Santos, A. C. (2012). Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. *Archives of toxicology*, 86(8):1233–1250.
- Dryden, S. C., Nahhas, F. A., Nowak, J. E., Goustin, A.-S., und Tainsky, M. A. (2003). Role for Human SIRT2 NAD-Dependent Deacetylase Activity in Control of Mitotic Exit in the Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 23(9):3173–3185.
- Edinger, A. L. und Thompson, C. B. (2004). Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology*, 16(6):663–669.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4):495–516.
- Ertosun, M. G., Hapil, F. Z., und Osman Nidai, O. (2016). E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling. *Cytokine & growth factor reviews*, 31:17–25.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S. N., Hidalgo, O. F., Vanaclocha, V., Baylin, S. B., und Herman, J. G. (2000). Inactivation of the DNA-Repair Gene MGMT and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. *The New England Journal of Medicine*.
- Faivre, S., Chan, D., Salinas, R., Woynarowska, B., und Woynarowski, J. M. (2003). DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 66(2):225–237.
- Fan, S., Smith, M. L., Rivet, D. J., Duba, D., Zhan, Q., Kohn, K. W., Fornace, A. J., und O'Connor, P. M. (1995). Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer research*, 55(8):1649–1654.
- Ferry, K. V., Hamilton, T. C., und Johnson, S. W. (2000). Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 60(9):1305–1313.
- Filipski, K. K., Loos, W. J., Verweij, J., und Sparreboom, A. (2008). Interaction of Cisplatin with the human organic cation transporter 2. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(12):3875–3880.
- Fischer, B. M., Neumann, D., Piberger, A. L., Risnes, S. F., Köberle, B., und Hartwig, A. (2016). Use of high-throughput RT-qPCR to assess modulations of gene expression profiles related to genomic stability and interactions by cadmium. *Archives of toxicology*, 90(11):2745–2761.
- Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*, 36(28):3943–3956.



- Flores-Santana, W., Moody, T., Chen, W., Gorczynski, M. J., Shoman, M. E., Velázquez, C., Thetford, A., Mitchell, J. B., Cherukuri, M. K., King, S. B., und Wink, D. A. (2012). Nitroxide derivatives of non-steroidal anti-inflammatory drugs exert anti-inflammatory and superoxide dismutase scavenging properties in A459 cells. *British journal of pharmacology*, 165(4b):1058–1067.
- Fulda, S. und Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34):4798–4811.
- 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.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., Castedo, M., und Kroemer, G. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell death & disease*, 5:e1257.
- Gariboldi, M. (1998). Antiproliferative Effect of the Piperidine Nitroxide Tempol on Neoplastic and Nonneoplastic Mammalian Cell Lines. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(6):913–923.
- Gartel, A. L. und Radhakrishnan, S. K. (2005). Lost in transcription: P21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer research*, 65(10):3980–3985.
- Gerson, S. L. (2004). MGMT: Its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nature reviews. Cancer*, 4(4):296–307.
- Ghezzi, A., Aceto, M., Cassino, C., Gabano, E., und Osella, D. (2004). Uptake of antitumor platinum(II)-complexes by cancer cells, assayed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(1):73–78.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., und Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5):1417–1423.
- Giglia-Mari, G., Zotter, A., und Vermeulen, W. (2011). DNA damage response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1):a000745.
- Go, R. S. und Adjei, A. A. (1999). Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(1):409–422.
- Goldstein, S., Merenyi, G., Russo, A., und Samuni, A. (2003). The role of oxoammonium cation in the SOD-mimic activity of cyclic nitroxides. *Journal of the American Chemical Society*, 125(3):789–795.
- Golomb, L., Volarevic, S., und Oren, M. (2014). p53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. *FEBS letters*, 588(16):2571–2579.

- Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C., und Perez, J. M. (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular pharmacology*, 59(4):657–663.
- Gorrini, C., Harris, I. S., und Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(12):931–947.
- Gourdier, I., Crabbe, L., Andreau, K., Pau, B., und Kroemer, G. (2004). Oxaliplatin-induced mitochondrial apoptotic response of colon carcinoma cells does not require nuclear DNA. *Oncogene*, 23(45):7449–7457.
- Gresner, P., Gromadzinska, J., Jablonska, E., Kaczmarski, J., und Wasowicz, W. (2009). Expression of selenoprotein-coding genes SEPP1, SEP15 and hGPX1 in non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 65(1):34–40.
- Hall, M. D. und Hambley, T. W. (2002). Platinum(IV) antitumour compounds: Their bioinorganic chemistry. *Coordination Chemistry Reviews*, 232(1-2):49–67.
- Hall, M. D., Mellor, H. R., Callaghan, R., und Hambley, T. W. (2007). Basis for design and development of platinum(IV) anticancer complexes. *Journal of medicinal chemistry*, 50(15):3403–3411.
- Hall, M. D., Okabe, M., Shen, D.-W., Liang, X.-J., und Gottesman, M. M. (2008). The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 48:495–535.
- Hanigan, M. H. und Devarajan, P. (2003). Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer therapy*, 1:47–61.
- Hanigan, M. H., Gallagher, B. C., Townsend, D. M., und Gabarra, V. (1999).  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Carcinogenesis*, 20(4):553–559.
- Hanigan, M. H., Lykissa, E. D., Townsend, D. M., Ou, C.-N., Barrios, R., und Lieberman, M. W. (2001).  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase-Deficient Mice Are Resistant to the Nephrotoxic Effects of Cisplatin. *The American journal of pathology*, 159(5):1889–1894.
- Harrach, S. und Ciarimboli, G. (2015). Role of transporters in the distribution of platinum-based drugs. *Frontiers in Pharmacology*, 6.
- Haupt, S. und Haupt, Y. (2017). P53 at the start of the 21st century: Lessons from elephants. *F1000Research*, 6:2041.
- Hayakawa, J., Depatie, C., Ohmichi, M., und Mercola, D. (2003). The activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)-dependent enhanced DNA repair. *The Journal of biological chemistry*, 278(23):20582–20592.

- Hayakawa, J., Mittal, S., Wang, Y., Korkmaz, K. S., Adamson, E., English, C., Ohmichi, M., Omichi, M., McClelland, M., und Mercola, D. (2004). Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Molecular cell*, 16(4):521–535.
- Hayward, R. L., Macpherson, J. S., Cummings, J., Monia, B. P., Smyth, J. F., und Jodrell, D. I. (2004). Enhanced oxaliplatin-induced apoptosis following antisense Bcl-xl down-regulation is p53 and Bax dependent: Genetic evidence for specificity of the antisense effect. *Molecular cancer therapeutics*, 3(2):169–178.
- Hector, S., Bolanowska-Higdon, W., Zdanowicz, J., Hitt, S., und Pendyala, L. (2001). In vitro studies on the mechanisms of oxaliplatin resistance. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 48(5):398–406.
- Helmke, C., Becker, S., und Strebhardt, K. (2016). The role of Plk3 in oncogenesis. *Oncogene*, 35(2):135–147.
- Hinz, J. M. (2010). Role of homologous recombination in DNA interstrand crosslink repair. *Environmental and molecular mutagenesis*, 51(6):582–603.
- Ho, Y.-P., Au-Yeung, S. C. F., und To, K. K. W. (2003). Platinum-based anticancer agents: Innovative design strategies and biological perspectives. *Medicinal research reviews*, 23(5):633–655.
- Holzer, A. K., Manorek, G. H., und Howell, S. B. (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Molecular pharmacology*, 70(4):1390–1394.
- Huang, Q. (2001). Assessment of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Microarray Technology. *Toxicological Sciences*, 63(2):196–207.
- Husain, K., Morris, C., Whitworth, C., Trammell, G. L., Rybak, L. P., und Somani, S. M. (1998). Protection by ebselen against cisplatin-induced nephrotoxicity: Antioxidant system. *Molecular and cellular biochemistry*, 178(1-2):127–133.
- Husain, K., Whitworth, C., Somani, S. M., und Rybak, L. P. (2001). Carboplatin-induced oxidative stress in rat cochlea. *Hearing research*, 159(1-2):14–22.
- Iida, M., Sasaki, T., und Komatani, H. (2009). Overexpression of Plk3 causes morphological change and cell growth suppression in Ras pathway-activated cells. *Journal of biochemistry*, 146(4):501–507.
- Inguaggiato, P., Gonzalez-Michaca, L., Croatt, A. J., Haggard, J. J., Alam, J., und Nath, K. A. (2001). Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis. *Kidney International*, 60(6):2181–2191.
- Inoue, T., Hiratsuka, M., Osaki, M., und Oshimura, M. (2007). The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(9):1011–1018.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22):14298–14302.
- Ishida, S., McCormick, F., Smith-McCune, K., und Hanahan, D. (2010). Enhancing Tumor-Specific Uptake of the Anticancer Drug Cisplatin with a Copper Chelator. *Cancer Cell*, 17(6):574–583.
- Iwatsuki, M., Mimori, K., Yokobori, T., Tanaka, F., Tahara, K., Inoue, H., Baba, H., und Mori, M. (2009). A platinum agent resistance gene, POLB, is a prognostic indicator in colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*, 100(3):261–266.
- Jamieson, E. R. und Lippard, S. J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chemical Reviews*, 99(9):2467–2498.
- Jang, K.-J., Mehr, A. P., Hamilton, G. A., McPartlin, L. A., Chung, S., Suh, K.-Y., und Ingber, D. E. (2013). Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 5(9):1119–1129.
- Jansen, J., Schophuizen, C. M. S., Wilmer, M. J., Lahham, S. H. M., Mutsaers, H. A. M., Wetzels, J. F. M., Bank, R. A., van den Heuvel, L. P., Hoenderop, J. G., und Masereeuw, R. (2014). A morphological and functional comparison of proximal tubule cell lines established from human urine and kidney tissue. *Experimental cell research*, 323(1):87–99.
- 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. *Biochemical Pharmacology*, 73(9):1499–1510.
- Jiang, M., Wei, Q., Wang, J., Du, Q., Yu, J., Zhang, L., und Dong, Z. (2006). Regulation of PUMA- $\alpha$  by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. *Oncogene*, 25(29):4056–4066.
- Jiang, M., Yi, X., Hsu, S., Wang, C.-Y., und Dong, Z. (2004). Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: Dependence on p53 transcriptional activity. *American journal of physiology. Renal physiology*, 287(6):F1140–7.
- Johnstone, T. C., Suntharalingam, K., und Lippard, S. J. (2016). The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chemical reviews*, 116(5):3436–3486.
- Jordan, P. und Carmo-Fonseca, M. (2000). Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(8):1229–1235.
- Jundi, K. und Greene, C. M. (2015). Transcription of Interleukin-8: How Altered Regulation Can Affect Cystic Fibrosis Lung Disease. *Biomolecules*, 5(3):1386–1398.

- Kalayda, G. V., Wagner, C. H., Buss, I., Reedijk, J., und Jaehde, U. (2008). Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC cancer*, 8:175.
- Kalimutho, M., Minutolo, A., Grelli, S., Formosa, A., Sancesario, G., Valentini, A., Federici, G., und Bernardini, S. (2011). Satraplatin (JM-216) mediates G2/M cell cycle arrest and potentiates apoptosis via multiple death pathways in colorectal cancer cells thus overcoming platinum chemoresistance. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 67(6):1299–1312.
- Kasahara, K., Fujiwara, Y., Nishio, K., Ohmori, T., Sugimoto, Y., Komiya, K., Matsuda, T., und Saijo, N. (1991). Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer research*, 51(12):3237–3242.
- Kaspar, J. W., Niture, S. K., und Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free radical biology & medicine*, 47(9):1304–1309.
- Katano, K., Kondo, A., Safaei, R., Holzer, A., Samimi, G., Mishima, M., Kuo, Y.-M., Rochdi, M., und Howell, S. B. (2002). Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer research*, 62(22):6559–6565.
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8):573–584.
- Kennedy, R. D., Quinn, J. E., Mullan, P. B., Johnston, P. G., und Harkin, D. P. (2004). The role of BRCA1 in the cellular response to chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(22):1659–1668.
- Kenny, R. G., Chuah, S. W., Crawford, A., und Marmion, C. J. (2017). Platinum(IV) Prodrugs - A Step Closer to Ehrlich's Vision? *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017(12):1596–1612.
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., und Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47:89–116.
- Kiyonari, S., Iimori, M., Matsuoka, K., Watanabe, S., Morikawa-Ichinose, T., Miura, D., Niimi, S., Saeki, H., Tokunaga, E., Oki, E., Morita, M., Kadomatsu, K., Maehara, Y., und Kitao, H. (2015). The 1,2-Diaminocyclohexane Carrier Ligand in Oxaliplatin Induces p53-Dependent Transcriptional Repression of Factors Involved in Thymidylate Biosynthesis. *Molecular cancer therapeutics*, 14(10):2332–2342.
- Knight, K. R. G., Kraemer, D. F., und Neuwelt, E. A. (2005). Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: Underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(34):8588–8596.

- Knox, R. J., Friedlos, F., Lydall, D. A., und Roberts, J. J. (1986). Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: Evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer research*, 46(4 Pt 2):1972–1979.
- Knudsen, K. E., Booth, D., Naderi, S., Sever-Chroneos, Z., Fribourg, A. F., Hunton, I. C., Feramisco, J. R., Wang, J. Y. J., und Knudsen, E. S. (2000). RB-Dependent S-Phase Response to DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 20(20):7751–7763.
- Köberle, B., Tomicic, M. T., Usanova, S., und Kaina, B. (2010). Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1806(2):172–182.
- Koepsell, H. und Endou, H. (2004). The SLC22 drug transporter family. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 447(5):666–676.
- Kohno, K., Wang, K.-Y., Takahashi, M., Kurita, T., Yoshida, Y., Hirakawa, M., Harada, Y., Kuma, A., Izumi, H., und Matsumoto, S. (2015). Mitochondrial Transcription Factor A and Mitochondrial Genome as Molecular Targets for Cisplatin-Based Cancer Chemotherapy. *International journal of molecular sciences*, 16(8):19836–19850.
- Koivusalo, R., Krausz, E., Ruotsalainen, P., Helenius, H., und Hietanen, S. (2002). Chemoradiation of cervical cancer cells: Targeting human papillomavirus E6 and p53 leads to either augmented or attenuated apoptosis depending on the platinum carrier ligand. *Cancer research*, 62(24):7364–7371.
- Komleva, N. V., Lapshina, M. A., Kostyuk, G. V., Ivanov, A. V., Parkhomenko, I. I., Papina, R. I., Sen', V. D., und Terentiev, A. A. (2015). Comparative analysis of cytotoxic effects and intracellular accumulation of platinum(IV) nitroxyl complexes. *Russian Chemical Bulletin*, 64(5):1178–1182.
- Kothandapani, A. und Patrick, S. M. (2013). Evidence for base excision repair processing of DNA interstrand crosslinks. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 743-744:44–52.
- Krishna, M. C., Grahame, D. A., Samuni, A., Mitchell, J. B., und Russo, A. (1992). Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(12):5537–5541.
- 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 (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(3):685–698.

- Kuo, M. T., Chen, H. H. W., Song, I.-S., Savaraj, N., und Ishikawa, T. (2007). The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(1):71–83.
- Kuwahara, D. (2000). Caspase-9 regulates cisplatin-induced apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Letters*, 148(1):65–71.
- Kweekel, D. M., Gelderblom, H., und Guchelaar, H.-J. (2005). Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy. *Cancer treatment reviews*, 31(2):90–105.
- Lange, S. S., Takata, K.-i., und Wood, R. D. (2011). DNA polymerases and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 11(2):96–110.
- 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. *Molecular pharmacology*, 75(2):324–330.
- Lau, A. H. (1999). Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney International*, 56(4):1295–1298.
- Launay-Vacher, V., Rey, J.-B., Isnard-Bagnis, C., Deray, G., und Daouphars, M. (2008). Prevention of cisplatin nephrotoxicity: State of the art and recommendations from the European Society of Clinical Pharmacy Special Interest Group on Cancer Care. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 61(6):903–909.
- Lee, J.-H., Jang, H., Cho, E.-J., und Youn, H.-D. (2009). Ferritin binds and activates p53 under oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(3):399–404.
- Levens, D. (2002). Disentangling the MYC web. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9):5757–5759.
- Levine, A. J. und Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nature reviews. Cancer*, 9(10):749–758.
- Levrero, M., de Laurenzi, V., Costanzo, A., Gong, J., Wang, J. Y., und Melino, G. (2000). The p53/p63/p73 family. *Journal of cell science*, Seiten 1661–1670.
- Lewis, K. A., Lilly, K. K., Reynolds, E. A., Sullivan, W. P., Kaufmann, S. H., und Cliby, W. A. (2009). Ataxia telangiectasia and rad3-related kinase contributes to cell cycle arrest and survival after cisplatin but not oxaliplatin. *Molecular cancer therapeutics*, 8(4):855–863.
- Li, Y., Womer, R. B., und Silber, J. H. (2004). Predicting cisplatin ototoxicity in children: The influence of age and the cumulative dose. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 40(16):2445–2451.
- Lieberthal, W., Triaca, V., und Levine, J. (1996). Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis.

- Lin, A., Frost, J., Deng, T., Smeal, T., al Alawi, N., Kikkawa, U., Hunter, T., Brenner, D., und Karin, M. (1992). Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell*, 70(5):777–789.
- Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon, L., und Hung, M. C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature cell biology*, 3(9):802–808.
- Liu, H. und Baliga, R. (2003). Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. *Kidney International*, 63(5):1687–1696.
- Liu, H. und Baliga, R. (2005). Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16(7):1985–1992.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4):402–408.
- Lo, H.-W. und Hung, M.-C. (2006). Nuclear EGFR signalling network in cancers: Linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *British journal of cancer*, 94(2):184–188.
- Lock, E. A., Reed, C. J., Kinsey, G. R., und Schnellmann, R. G. (2007). Caspase-dependent and -independent induction of phosphatidylserine externalization during apoptosis in human renal carcinoma Cak(1)-1 and A-498 cells. *Toxicology*, 229(1-2):79–90.
- Lu, X., Nannenga, B., und Donehower, L. A. (2005). PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes & development*, 19(10):1162–1174.
- Ludwig, T., Riethmuller, C., Gekle, M., Schwerdt, G., und Oberleithner, H. (2004). Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney International*, 66(1):196–202.
- Maddika, S., Ande, S. R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K. D., Wiechec, E., und Los, M. (2007). Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 10(1-2):13–29.
- Mani, S., Graham, M. A., Bregman, D. B., Ivy, P., und Chaney, S. G. (2002). Oxaliplatin: A Review of Evolving Concepts. *Cancer Investigation*, 20(2):246–263.
- Manohar, S. und Leung, N. (2018). Cisplatin nephrotoxicity: A review of the literature. *Journal of nephrology*, 31(1):15–25.



- Marchetti, P., Galla, D. A. P., Russo, F. P., Ricevuto, E., Flati, V., Porzio, G., Ficorella, C., and Cifone, M. G. (2004). Apoptosis induced by oxaliplatin in human colon cancer HCT15 cell line. *Anticancer research*, 24(1):219–226.
- Martin, D., Galisteo, R., und Gutkind, J. S. (2009). CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *The Journal of biological chemistry*, 284(10):6038–6042.
- 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., Hepburn, P. J., Walker, L., Highman, W. J., Trejdosiewicz, L. K., Povey, S., Parkar, M., Hill, B. T., Riddle, P. R., und Franks, L. M. (1986). Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer research*, 46(7):3630–3636.
- Matsukawa, J., Matsuzawa, A., Takeda, K., und Ichijo, H. (2004). The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *Journal of biochemistry*, 136(3):261–265.
- Mayer, M. P. und Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(6):670–684.
- McQuade, R. M., Carbone, S. E., Stojanovska, V., Rahman, A., Gwynne, R. M., Robinson, A. M., Goodman, C. A., Bornstein, J. C., und Nurgali, K. (2016). Role of oxidative stress in oxaliplatin-induced enteric neuropathy and colonic dysmotility in mice. *British journal of pharmacology*, 173(24):3502–3521.
- 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. *The Journal of clinical investigation*, 101(4):777–782.
- Meijer, C., Mulder, N. H., Timmer-Bosscha, H., Sluiter, W. J., Meersma, G. J., und de Vries, E. G. (1992). Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer research*, 52(24):6885–6889.
- Mellish, K. J., Kelland, L. R., und Harrap, K. R. (1993). In vitro platinum drug chemosensitivity of human cervical squamous cell carcinoma cell lines with intrinsic and acquired resistance to cisplatin. *British journal of cancer*, 68(2):240–250.
- Meneghini, R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free radical biology & medicine*, 23(5):783–792.

- Meyer zu Schwabedissen, H. E., Verstuyft, C., Kroemer, H. K., Becquemont, L., und Kim, R. B. (2010). Human multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) transporter: functional characterization, interaction with OCT2 (SLC22A2), and single nucleotide polymorphisms. *American journal of physiology. Renal physiology*, 298(4):F997–F1005.
- Micheau, O., Solary, E., Hammann, A., Martin, F., und Dimanche-Boitrel, M.-T. (1997). Sensitization of Cancer Cells Treated With Cytotoxic Drugs to Fas-Mediated Cytotoxicity. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 89(11):783–789.
- Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G., und Reeves, W. B. (2010). Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins*, 2(11):2490–2518.
- Misset, J. L., Bleiberg, H., Sutherland, W., Bekradda, M., und Cvitkovic, E. (2000). Oxaliplatin clinical activity: a review. *Critical reviews in oncology/hematology*, 35(2):75–93.
- Mitchell, J. B., Samuni, A., Krishna, M. C., DeGraff, W. G., Ahn, M. S., Samuni, U., und Russo, A. (1990). Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics.
- Miyaji, T., Kato, A., Yasuda, H., Fujigaki, Y., und Hishida, A. (2001). Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 12(5):900–908.
- Moll, U. M., Wolff, S., Speidel, D., und Deppert, W. (2005). Transcription-independent proapoptotic functions of p53. *Current opinion in cell biology*, 17(6):631–636.
- Muniandy, P. A., Liu, J., Majumdar, A., Liu, S.-t., und Seidman, M. M. (2010). DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: Step by step. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 45(1):23–49.
- Nair, P., Lu, M., Petersen, S., und Ashkenazi, A. (2014). Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. *Methods in enzymology*, 544:99–128.
- Nakamura, T., Yonezawa, A., Hashimoto, S., Katsura, T., und Inui, K.-i. (2010). Disruption of multidrug and toxin extrusion MATE1 potentiates cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochemical Pharmacology*, 80(11):1762–1767.
- Nakayama, K., Kanzaki, A., Ogawa, K., Miyazaki, K., Neamati, N., und Takebayashi, Y. (2002). Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *International journal of cancer*, 101(5):488–495.
- Nakayama, K. I. und Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: Cell-cycle control and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6(5):369–381.

- Nehmé, 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. *British journal of cancer*, 79(7-8):1104–1110.
- Nemirovski, A., Kasherman, Y., Tzaraf, Y., und Gibson, D. (2007). Reduction of cis,trans,cis-PtCl<sub>2</sub>(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> by aqueous extracts of cancer cells. *Journal of medicinal chemistry*, 50(23):5554–5556.
- Nieskens, T. T., Peters, J. G., Dabaghie, D., Korte, D., Jansen, K., van Asbeck, A. H., Tavraz, N. N., Friedrich, T., Russel, F., Masereeuw, R., und Wilmer, M. J. (2018). Expression of organic anion transporter 1 or 3 in human kidney proximal tubule cells reduces cisplatin sensitivity. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., und Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(12):3448–3459.
- Ning, Y., Manegold, P. C., Hong, Y. K., Zhang, W., Pohl, A., Lurje, G., Winder, T., Yang, D., LaBonte, M. J., Wilson, P. M., Ladner, R. D., und Lenz, H.-J. (2011). Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *International journal of cancer*, 128(9):2038–2049.
- Nospikel, T. und Hanawalt, P. C. (2002). DNA repair in terminally differentiated cells. *DNA Repair*, 1(1):59–75.
- Nurgali, K., Jagoe, R. T., und Abalo, R. (2018). Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Frontiers in pharmacology*, 9:245.
- O'Connor, P. M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T. G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D. A., Monks, A., Sausville, E. A., Weinstein, J. N., Friend, S., Fornace, A. J., und Kohn, K. W. (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer research*, 57(19):4285–4300.
- Oda, E. (2000). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, 288(5468):1053–1058.
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., und Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043):839–843.
- O'Dwyer, P. J., Stevenson, J. P., und Johnson, S. W. (2000). Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs*, 59 Suppl 4:19–27.
- Ormerod, M. G., Orr, R. M., und Peacock, J. H. (1994). The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: A flow cytometric study. *British journal of cancer*, 69(1):93–100.

- Oun, R., Moussa, Y. E., und Wheate, N. J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 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. *AJP: Renal Physiology*, 296(3):F505–F511.
- Park, M. S., de Leon, M., und Devarajan, P. (2002). Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(4):858–865.
- Perego, P. und Robert, J. (2016). Oxaliplatin in the era of personalized medicine: From mechanistic studies to clinical efficacy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 77(1):5–18.
- Potapova, O., Basu, S., Mercola, D., und Holbrook, N. J. (2001). Protective role for c-Jun in the cellular response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry*, 276(30):28546–28553.
- Potapova, O., Haghghi, A., Bost, F., Liu, C., Birrer, M. J., Gjerset, R., und Mercola, D. (1997). The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin. *The Journal of biological chemistry*, 272(22):14041–14044.
- Price, P. M., Safirstein, R. L., und Megyesi, J. (2009). The cell cycle and acute kidney injury. *Kidney International*, 76(6):604–613.
- Rabik, C. A. und Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer treatment reviews*, 33(1):9–23.
- Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Okon, E., und Samuni, A. (1994). A novel antiulcerogenic stable radical prevents gastric mucosal lesions in rats. *Gut*, 35(9):1181–1188.
- Ramesh, G. und Reeves, W. B. (2002). TNF- $\alpha$  Mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 110(6):835–842.
- Ramesh, G. und Reeves, W. B. (2003). TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *American journal of physiology. Renal physiology*, 285(4):F610–8.
- Ramesh, G. und Reeves, W. B. (2005). p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *American journal of physiology. Renal physiology*, 289(1):F166–74.
- Reinhardt, H. C. und Yaffe, M. B. (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current opinion in cell biology*, 21(2):245–255.

- Reithofer, M. R., Valiahdi, S. M., Jakupec, M. A., Arion, V. B., Egger, A., Galanski, M., und Keppeler, B. K. (2007). Novel di- and tetracarboxylatoplatinum(IV) complexes. Synthesis, characterization, cytotoxic activity, and DNA platination. *Journal of medicinal chemistry*, 50(26):6692–6699.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R. A., und Dynlacht, B. D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes & development*, 16(2):245–256.
- Rini, B. I., Campbell, S. C., und Escudier, B. (2009). Renal cell carcinoma. *The Lancet*, 373(9669):1119–1132.
- Rixe, O., Ortuzar, W., Alvarez, M., Parker, R., Reed, E., Paull, K., und Fojo, T. (1996). Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: Spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute’s Anticancer Drug Screen panel. *Biochemical Pharmacology*, 52(12):1855–1865.
- Roos, W. P. und Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters*, 332(2):237–248.
- 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.
- Rybak, L. P., Mukherjea, D., Jajoo, S., und Ramkumar, V. (2009). Cisplatin Ototoxicity and Protection: Clinical and Experimental Studies. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 219(3):177–186.
- Sadzuka, Y., Shoji, T., und Takino, Y. (1992). Effect of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 43(8):1872–1875.
- Sahni, V., Choudhury, D., und Ahmed, Z. (2009). Chemotherapy-associated renal dysfunction. *Nature Reviews Nephrology*, 5(8):450–462.
- Sánchez-Romero, N., Schophuizen, C. M. S., Giménez, I., und Masereeuw, R. (2016). In vitro systems to study nephrotoxicology: 2D versus 3D models. *European journal of pharmacology*, 790:36–45.
- Santos, N. A. G., Catão, C. S., Martins, N. M., Curti, C., Bianchi, M. L. P., und Santos, A. C. (2007). Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Archives of toxicology*, 81(7):495–504.
- Saris, C. P., van de Vaart, P., Rietbroek, R. C., und Bloramaert, F. (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.

- Schaaf, G. J., Maas, R., de Groene, E. M., und Fink-Gremmels, J. (2009). Management of Oxidative Stress by Heme Oxygenase-1 in Cisplatin-induced Toxicity in Renal Tubular Cells. *Free Radical Research*, 36(8):835–843.
- Schafer, K. A. (1998). The cell cycle: A review. *Veterinary pathology*, 35(6):461–478.
- Schierl, R., Rohrer, B., und Hohnloser, H. (1995). Long-term platinum excretion in patients treated with cisplatin. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 36(1):75–78.
- Schoch, S., Sen, V., Gajewski, S., Golubev, V., Strauch, B., Hartwig, A., und Köberle, B. (2018). Activity profile of the cisplatin analogue PN149 in different tumor cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 156:109–119.
- Sen', V. D., Golubev, V. A., Lugovskaya, N. Y., Sashenkova, T. E., und Konovalova, N. P. (2006). Synthesis and Antitumor Properties of New Platinum(IV) Complexes with Aminonitroxyl Radicals. *ChemInform*, 37(40):62.
- Sen', V. D., Golubev, V. A., Lugovskaya, N. Y., Sashenkova, T. E., und Konovalova, N. P. (2010). Synthesis and antitumor properties of new platinum(IV) complexes with aminonitroxyl radicals. *Russian Chemical Bulletin*, 55(1):62–65.
- Sen', V. D., Terntiev, A. A., und Konovalova, Nina, P., Herausgeber (2012). *Platinum Complexes with Bioactive Nitroxyl Radicals: Synthesis and Antitumor Properties*. Nitroxides - Theory Experiment and Applications. InTech.
- Shaulian, E. (2010). AP-1–The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cellular signalling*, 22(6):894–899.
- Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E. F., und Karin, M. (2000). The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*, 103(6):897–907.
- Sheth, S., Mukherjea, D., Rybak, L. P., und Ramkumar, V. (2017). Mechanisms of Cisplatin-Induced Ototoxicity and Otoprotection. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11:338.
- Shiraishi, F., Curtis, L. M., Truong, L., Poss, K., Visner, G. A., Madsen, K., Nick, H. S., und Agarwal, A. (2000). Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *American journal of physiology. Renal physiology*, 278(5):F726–36.
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47):7265–7279.
- Song, I.-S., Savaraj, N., Siddik, Z. H., Liu, P., Wei, Y., Wu, C. J., und Kuo, M. T. (2004). Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Molecular cancer therapeutics*, 3(12):1543–1549.

- Sorenson, C. M., Barry, M. A., und Eastman, A. (1990). Analysis of Events Associated With Cell Cycle Arrest at G2 Phase and Cell Death Induced by Cisplatin. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(9):749–755.
- Sorenson, C. M. und Eastman, A. (1988). Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: Role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer research*, 48(16):4484–4488.
- Soule, B. P., Hyodo, F., Matsumoto, K.-I., Simone, N. L., Cook, J. A., Krishna, M. C., und Mitchell, J. B. (2007). The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free radical biology & medicine*, 42(11):1632–1650.
- Sprowl, J. A., Lancaster, C. S., Pabla, N., Hermann, E., Kosloske, A. M., Gibson, A. A., Li, L., Zeeh, D., Schlatter, E., Janke, L. J., Ciarimboli, G., und Sparreboom, A. (2014). Cisplatin-induced renal injury is independently mediated by OCT2 and p53. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(15):4026–4035.
- Stewart, B. W. und Wild, C. P. (2014). *World Cancer Report 2014*. EBL-Schweitzer. International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, Lyon, online-ausg. Auflage.
- Sun, C. C., Bodurka, D. C., Weaver, C. B., Rasu, R., Wolf, J. K., Bevers, M. W., Smith, J. A., Wharton, J. T., und Rubenstein, E. B. (2005). Rankings and symptom assessments of side effects from chemotherapy: Insights from experienced patients with ovarian cancer. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 13(4):219–227.
- Surowiak, P., Materna, V., Maciejczyk, A., Pudelko, M., Markwitz, E., Spaczyński, M., Dietel, M., Zabel, M., und Lage, H. (2007). Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 450(3):279–285.
- Suy, S., Mitchell, J. B., Samuni, A., Mueller, S., und Kasid, U. (2005). Nitroxide tempo, a small molecule, induces apoptosis in prostate carcinoma cells and suppresses tumor growth in athymic mice. *Cancer*, 103(6):1302–1313.
- Tanabe, K., Tamura, Y., Lanaspá, M. A., Miyazaki, M., Suzuki, N., Sato, W., Maeshima, Y., Schreiner, G. F., Villarreal, F. J., Johnson, R. J., und Nakagawa, T. (2012). Epicatechin limits renal injury by mitochondrial protection in cisplatin nephropathy. *American journal of physiology. Renal physiology*, 303(9):F1264–74.
- Tanihara, Y., Masuda, S., Katsura, T., und Inui, K.-i. (2009). Protective effect of concomitant administration of imatinib on cisplatin-induced nephrotoxicity focusing on renal organic cation transporter OCT2. *Biochemical Pharmacology*, 78(9):1263–1271.

- Tiong, H. Y., Huang, P., Xiong, S., Li, Y., Vathsala, A., und Zink, D. (2014). Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models. *Molecular pharmaceuticals*, 11(7):1933–1948.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., und Ichijo, H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO reports*, 2(3):222–228.
- Trivedi, R., Dihazi, G. H., Eltoweissy, M., Mishra, D. P., Mueller, G. A., und Dihazi, H. (2016). The antioxidant protein PARK7 plays an important role in cell resistance to Cisplatin-induced apoptosis in case of clear cell renal cell carcinoma. *European journal of pharmacology*, 784:99–110.
- Tsutsumishita, Y., Onda, T., Okada, K., Takeda, M., Endou, H., Futaki, S., und Niwa, M. (1998). Involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242(2):310–312.
- Usanova, S., Piée-Staffa, A., Sied, U., Thomale, J., Schneider, A., Kaina, B., und Köberle, B. (2010). Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression. *Molecular cancer*, 9:248.
- Vaisman, A. und Chaney, S. G. (2000). The Efficiency and Fidelity of Translesion Synthesis past Cisplatin and Oxaliplatin GpG Adducts by Human DNA Polymerase  $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry*, 275(17):13017–13025.
- Vallabhapurapu, S. und Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*, 27:693–733.
- van Hennik, M. B., van der Vijgh, W J, Klein, I., Elferink, F., Vermorken, J. B., Winograd, B., und Pinedo, H. M. (1987). Comparative pharmacokinetics of cisplatin and three analogues in mice and humans. *Cancer research*, 47(23):6297–6301.
- Vermeulen, K., van Bockstaele, D. R., und Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3):131–149.
- Voland, C., Bord, A., Péleraux, A., Pénarier, G., Carrière, D., Galiègue, S., Cvitkovic, E., Jbilo, O., und Casellas, P. (2006). Repression of cell cycle-related proteins by oxaliplatin but not cisplatin in human colon cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 5(9):2149–2157.
- Vousden, K. H. und Lu, X. (2002). Live or let die: The cell's response to p53. *Nature reviews. Cancer*, 2(8):594–604.
- Vyas, D., Laput, G., und Vyas, A. K. (2014). Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. *OncoTargets and therapy*, 7:1015–1023.
- Wang, D. und Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(4):307–320.



- Wang, L. G. und Setlow, R. B. (1989). Inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in HeLa cells by cisplatin. *Carcinogenesis*, 10(9):1681–1684.
- Wang, X., Martindale, J. L., und Holbrook, N. J. (2000). Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 275(50):39435–39443.
- Wang, Y.-l., Qian, J., Lin, J., Yao, D.-m., Qian, Z., Zhu, Z.-h., und Li, J.-y. (2010). Methylation status of DDIT3 gene in chronic myeloid leukemia. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 29:54.
- Warenius, H. M., Jones, M., Gorman, T., McLeish, R., Seabra, L., Barraclough, R., und Rudland, P. S. (2000). Combined RAF1 protein expression and p53 mutational status provides a strong predictor of cellular radiosensitivity.
- Wei, Q., Dong, G., Yang, T., Megyesi, J., Price, P. M., und Dong, Z. (2007). Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity. *American journal of physiology. Renal physiology*, 293(4):F1282–91.
- Weickhardt, A., Wells, K., und Messersmith, W. (2011). Oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer. *Journal of oncology*, 2011:201593.
- Westwick, J. K., Weitzel, C., Minden, A., Karin, M., und Brenner, D. A. (1994). Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase. *The Journal of biological chemistry*, 269(42):26396–26401.
- Wexselblatt, E. und Gibson, D. (2012). What do we know about the reduction of Pt(IV) pro-drugs? *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117:220–229.
- Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., und Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, 39(35):8113–8127.
- William-Faltaos, S., Rouillard, D., Lechat, P., und Bastian, G. (2006). Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer research*, 26(3A):2093–2099.
- Wilmer, M. J., Ng, C. P., Lanz, H. L., Vulto, P., Suter-Dick, L., und Masereeuw, R. (2016). Kidney-on-a-Chip Technology for Drug-Induced Nephrotoxicity Screening. *Trends in biotechnology*, 34(2):156–170.
- Wilmer, M. J., Saleem, M. A., Masereeuw, R., Ni, L., van der Velden, T. J., Russel, F. G., Mathieson, P. W., Monnens, L. A., van den Heuvel, L. P., und Levchenko, E. N. (2010). Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters. *Cell and tissue research*, 339(2):449–457.

- Wilmes, A., Bielow, C., Ranninger, C., Bellwon, P., Aschauer, L., Limonciel, A., Chassaigne, H., Kristl, T., Aiche, S., Huber, C. G., Guillou, C., Hewitt, P., Leonard, M. O., Dekant, W., Bois, F., und Jennings, P. (2015). Mechanism of cisplatin proximal tubule toxicity revealed by integrating transcriptomics, proteomics, metabolomics and biokinetics. *Toxicology in Vitro*, 30(1):117–127.
- Witzgall, R., Brown, D., Schwarz, C., und Bonventre, J. V. (1994). Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *The Journal of clinical investigation*, 93(5):2175–2188.
- Wolter, M., Scharwächter, C., Reifenberger, J., Koch, A., Pietsch, T., und Reifenberger, G. (2003). Absence of detectable alterations in the putative tumor suppressor gene BTRC in cerebellar medulloblastomas and cutaneous basal cell carcinomas. *Acta neuropathologica*, 106(4):287–290.
- Woynarowski, J. M., Chapman, W. G., Napier, C., Herzig, M. C. S., und Juniewicz, P. (1998). Sequence- and Region-Specificity of Oxaliplatin Adducts in Naked and Cellular DNA. *Molecular Pharmacology*, 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. *Molecular Pharmacology*, 58(5):920–927.
- Yamamoto, K., Ichijo, H., und Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 Is Phosphorylated and Inactivated by an ASK1/Jun N-Terminal Protein Kinase Pathway Normally Activated at G 2 /M. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12):8469–8478.
- Yang, J. (1997). Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*, 275(5303):1129–1132.
- Yang, J., Parsons, J., Nicolay, N. H., Caporali, S., Harrington, C. F., Singh, R., Finch, D., D’Atri, S., Farmer, P. B., Johnston, P. G., McKenna, W. G., Dianov, G., und Sharma, R. A. (2010). Cells deficient in the base excision repair protein, DNA polymerase beta, are hypersensitive to oxaliplatin chemotherapy. *Oncogene*, 29(3):463–468.
- Yang, Y., Liu, H., Liu, F., und Dong, Z. (2014). Mitochondrial dysregulation and protection in cisplatin nephrotoxicity. *Archives of toxicology*, 88(6):1249–1256.
- Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N., und Nugent, K. (2007). Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. *The American Journal of the Medical Sciences*, 334(2):115–124.
- Yokoo, S., Yonezawa, A., Masuda, S., Fukatsu, A., Katsura, T., und Inui, K.-i. (2007). Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochemical Pharmacology*, 74(3):477–487.

- Yonezawa, A. und Inui, K.-i. (2011). Organic cation transporter OCT/SLC22A and H(+)/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochemical Pharmacology*, 81(5):563–568.
- Yonezawa, A., Masuda, S., Nishihara, K., Yano, I., Katsura, T., und Inui, K.-i. (2005). Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochemical Pharmacology*, 70(12):1823–1831.
- Yonezawa, A., Masuda, S., Yokoo, S., Katsura, T., und Inui, K.-i. (2006). Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 319(2):879–886.
- Yoshizawa, K., Nozaki, S., Kitahara, H., Ohara, T., Kato, K., Kawashiri, S., und Yamamoto, E. (2007). Copper efflux transporter (ATP7B) contributes to the acquisition of cisplatin-resistance in human oral squamous cell lines. *Oncology Reports*.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. (2001). PUMA Induces the Rapid Apoptosis of Colorectal Cancer Cells. *Molecular cell*, 7(3):673–682.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., und Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine*, 33(3):337–349.
- 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 International*, 72(1):37–44.
- Zhang, L. und Hanigan, M. H. (2003). Role of Cysteine S-Conjugate -Lyase in the Metabolism of Cisplatin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(3):988–994.
- Zhang, S., Lovejoy, K. S., Shima, J. E., Lagpacan, L. L., Shu, Y., Lapuk, A., Chen, Y., Komori, T., Gray, J. W., Chen, X., Lippard, S. J., und Giacomini, K. M. (2006). Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer research*, 66(17):8847–8857.
- Zhu, S., Pabla, N., Tang, C., He, L., und Dong, Z. (2015). DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Archives of Toxicology*, 89(12):2197–2205.
- Zong, W.-X. und Thompson, C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes & development*, 20(1):1–15.
- Zsengeller, Z. K., Ellezian, L., Brown, D., Horvath, B., Mukhopadhyay, P., Kalyanaraman, B., Parikh, S. M., Karumanchi, S. A., Stillman, I. E., und Pacher, P. (2012). Cisplatin Nephrotoxicity Involves Mitochondrial Injury with Impaired Tubular Mitochondrial Enzyme Activity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*.