

**Die Rolle der Bcl-2-Proteine
bei der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin
bei kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen**

Julia Biagosch

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. M. Reincke

**Die Rolle der Bcl-2-Proteine
bei der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin
bei kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Biagosch

aus

München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. A. Bergner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Volker Heinemann
Priv. Doz. Dr. Dominik Rüttinger
Priv. Doz. Dr. Markus Rentsch

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2013

gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Klinischer Hintergrund	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Karzinomtypen, Therapie und Prognose	2
1.1.3 „Targeted Therapies“ beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom.....	5
1.2 Cisplatin	6
1.2.1 Indikation	6
1.2.2 Wirkungsmechanismus	6
1.2.3 Pharmakokinetik	8
1.2.4 Pharmakodynamik	9
1.2.5 Unerwünschte Wirkungen einer Cisplatintherapie	9
1.2.6 Resistenzentwicklung	10
1.3 Molekulare Grundlagen	10
1.3.1 Apoptose und Signaltransduktion.....	11
1.3.2 Die Bcl-2-Genfamilie	13
1.3.3 Die Rolle der Bcl-2-Proteine bei der Apoptoseregulation.....	15
1.4 Zielsetzung und Fragestellung	20
2 Material	21
2.1 Tumorzelllinien.....	21
2.2 Zellkultur.....	21
2.3 Herstellung Cisplatin-teilresistenter Zellklone	22
2.4 Proteinanalytische Methoden	22
2.5 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	24
2.6 Small interfering (si)RNA Transfektion	25
2.7 Statistik	25
3 Methoden.....	26
3.1 Arbeiten mit Zellkulturen	26
3.1.1 Verwendete Tumorzelllinien	26
3.1.2 Kultivierung	28
3.2 Herstellung Cisplatin-teilresistenter Zellklone	30
3.3 Proteinanalytische Methoden	31
3.3.1 Proteinextraktion.....	31
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	31

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	34
3.4 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	37
3.5 Small interfering (si)RNA Transfektion.....	39
3.6 Statistische Auswertung.....	40
4 Ergebnisse	41
4.1 Herstellung Cisplatin-teilresistenter Zellklone	41
4.2 Western Blot	43
4.3 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	46
4.4 Auswirkungen einer verminderten Bax-Proteinexpression auf die Cisplatin- Sensitivität in H1339-SCLC-Zellen.....	49
4.5 Auswirkungen einer verminderten Bax-Proteinexpression auf die Cisplatin- Sensitivität in NCI-H187-SCLC Zellen.....	50
5 Diskussion.....	52
5.1 Diskussion der Methodik	52
5.1.1 Verwendete Tumorzelllinien	52
5.1.2 Herstellung Cisplatin-teilresistenter Zellklone	53
5.1.3 Expressionsanalysen der Bcl-2-Proteine	54
5.1.4 Small interfering (si)RNA Transfektion und Überlebenskurven.....	55
5.2 Diskussion der Ergebnisse	56
5.2.1 Herstellung Cisplatin-teilresistenter Zellklone	56
5.2.2 Expressionsanalysen der Bcl-2-Proteine	56
5.2.3 Auswirkungen einer verminderten Bax-Proteinexpression auf die Cisplatin-Sensitivität in H1339- und NCI-H187-Zellen.....	59
5.3 Weitere Mechanismen der Cisplatinresistenz	62
5.3.1. DNA-Reparaturmechanismen	62
5.3.2. Detoxifizierung von Cisplatin.....	65
5.4 Ausblick in die Zukunft	66
5.4.1 Bcl-2-Proteine als Ansatz für neue Therapien.....	66
5.4.2 Bcl-2-Proteine als prognostische Faktoren	67
6 Zusammenfassung	69
7 Literaturverzeichnis	71
8 Danksagung.....	85
9 Curriculum Vitae.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Signaltransduktionswege der Apoptose.....	13
Abb. 2:	Struktur und Funktion der Bcl-2-Proteine	14
Abb. 3:	Ablauf der Mitochondrienaktivierung durch Bax und Bak	16
Abb. 4:	BH3-only-Proteine.....	18
Abb. 5:	Belegungsplan der Mikrotiterplatte	34
Abb. 6:	Pipettierschema für die Probenaschen der Gelelektrophorese.....	35
Abb. 7:	Vergleich der Überlebensfraktionen vorbehandelter Zellen im Vergleich zu naiven Zellen der Zelllinie H1339 nach einer Inkubation mit 0,5 µg/ml Cisplatin für 3 Stunden	41
Abb. 8:	Vergleich der Überlebensfraktionen vorbehandelter Zellen im Vergleich zu naiven Zellen der Zelllinie EPLC32M1 nach einer Inkubation mit 0,5 µg/ml Cisplatin für 3 Stunden	42
Abb. 9:	Ergebnisse des Western Blot	43
Abb. 10:	Grafische Darstellung der Western Blot-Ergebnisse.....	44
Abb. 11:	Darstellung der Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzfärbung	47
Abb. 12:	Expressionsanalyse von Bax mittels Western Blot in H1339-Zellen nach der siRNA Transfektion.....	49
Abb. 13:	Überlebenskurven der mit siRNA transfizierten H1339-Zellen nach einer Inkubation mit 0,5 µg/ml Cisplatin.....	50
Abb. 14:	Überlebenskurven der mit siRNA transfizierten NCI-H187-Zellen nach einer Inkubation mit 0,5 µg/ml Cisplatin.....	51

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersichtstabelle zu den verwendeten Tumorzelllinien	27
Tab. 2: Zusammensetzung der Nährmedien für die Zellkulturen	29
Tab. 3: Verdünnungsreihe für die Standard-Eichkurve	32
Tab. 4: Verdünnungsreihe für die Proben	33
Tab. 5 : Herstellung der Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	38
Tab. 6: Gruppen für die (si)RNA Transfektion.....	39

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

1.1.1 Epidemiologie

Noch vor 100 Jahren galt das Lungenkarzinom als Rarität. Heutzutage stellt es in den Industrienationen unter malignen Tumoren die häufigste Todesursache sowohl bei Männern als auch bei Frauen dar [1, 2]. Weltweit wurde im Jahr 2002 bei geschätzt 1,35 Millionen Menschen ein Lungenkarzinom diagnostiziert, 1,18 Millionen Menschen starben daran. Das waren mehr Todesfälle als durch irgendein anderes Karzinom [3].

Dabei zeichnen sich bei der zu erwartenden zukünftigen Entwicklung und der geografischen Distribution des Lungenkarzinoms Unterschiede zwischen Industrienationen und Entwicklungsländern ab. Während in den USA und in Europa in den letzten zehn Jahren durch entsprechende Antiraucherkampagnen bei Frauen eine Stabilisierung und bei Männern ein Rückgang der Inzidenz- und Mortalitätsraten erzielt werden konnte, wird in Afrika und Asien ein Anstieg an Neuerkrankungen prognostiziert. Youlden *et al.* führen diese Entwicklung auf den ansteigenden Konsum von Tabakprodukten in Entwicklungsländern zurück [3]. Besonders in China, wo ein Drittel aller Raucher weltweit leben, ist diese Tendenz Besorgnis erregend. In der Mitte des 21. Jahrhunderts wird hier mit einer jährlichen Mortalitätsrate von bis zu 3 Millionen Menschen pro Jahr gerechnet [4].

Gegenwärtig und auch in Zukunft wird das Lungenkarzinom demnach erhebliche Auswirkungen auf die Gesundheitssysteme weltweit haben. Dabei fallen nicht nur die hohe Sterberate, sondern auch die dadurch entstehenden Kosten ins Gewicht. Eine in den USA durchgeführte Studie berechnete modellhaft die Kosten, die durchschnittlich bei der Therapie des Lungenkarzinoms anfallen. Demnach betragen die Therapiekosten für einen 72-jährigen Patienten in den USA, bei dem im Jahr 2000 Lungenkrebs diagnostiziert wurde, in den ersten 6 Monaten bereits zwischen 2687 US-D (ohne gezielte Therapie) und 9360 US-D (mit Radiochemotherapie) [5]. Die immer weiter steigende Lebenserwartung, eine jährliche Zunahme der Inzidenzrate des Lungenkarzinoms von 3 % [6], sowie die Entwicklung neuer Therapieansätze werden die Kosten noch weiter in die Höhe treiben.

Diese und andere Gesichtspunkte erfordern die intensive Forschung und Entwicklung neuer, effizienter und kostengünstiger Therapien.

1.1.2 Karzinomtypen, Therapie und Prognose

Die Weltgesundheitsorganisation hat das Lungenkarzinom histologisch in das Kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC), das bei 15 bis 20 % der Patienten vorkommt, und in das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) mit einem Vorkommen von 80 bis 85 % unterteilt [7]. Als nicht-kleinzellig werden histologische Karzinomtypen zusammengefasst, die keine kleinzelligen Anteile enthalten und nicht typischen Karzinoidtumoren entsprechend. Die Einteilung in SCLC und NSCLC ist weiterhin begründet durch ein unterschiedliches Tumorverhalten sowie verschiedene Therapieansätze und Prognosen. Andere Karzinomarten wie das Neuroendokrine Karzinom (NEC), das adenosquamöse Karzinom oder das sarkomatoide Karzinom treten hingegen nur selten auf (< 10 %) [8].

Kleinzelliges Lungenkarzinom

Das Kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC), auch als Haferzellkarzinom („oat cell carcinoma“) oder im Klinikalltag als Kleinzeller bezeichnet, geht von den neuroendokrinen APUD (Amine-Precursor-Uptake and Decarboxylation) – Zellen aus und ist meist zentral in der Lunge im Bereich der größeren Bronchien lokalisiert [9]. Aufgrund des neuroendokrinen Ursprungs führen Kleinzellige Lungenkarzinome nicht selten zu Paraneoplasien wie zum Beispiel dem Schwartz-Bartter-Syndrom durch eine vermehrte Ausschüttung von ADH (Antidiuretisches Hormon) [10] oder dem Cushing-Syndrom durch eine gesteigerte ACTH – Synthese (Adrenocorticotropes Hormon) [11]. Ein Lambert-Eaton Myasthenisches Syndrom (LEMS) kann das erste klinische Zeichen für einen Kleinzelligen Lungentumor sein [12].

Die Einteilung des Kleinzelligen Lungenkarzinoms erfolgt für die klinische Anwendung in der Regel nicht anhand der Stadien des TNM-Klassifikationssystems. Stattdessen unterscheidet man die Stadien der „Very Limited Disease“ (auf einen Hemithorax begrenzt), „Limited Disease“ (auf den Thorax begrenzt) und „Extensive Disease“ (weitergehend metastasiert) [13].

Das rasche Tumorwachstum, die frühe Metastasierungstendenz und die hohe Chemosensitivität stellen die Polychemotherapie bei der Behandlung des SCLC in den Vordergrund. Dabei stellt die Standardkombination aus Cisplatin und Etoposid seit Beginn der 90er Jahre den empfohlenen Standard der Erstlinientherapie dar [14, 15]. Der Therapieerfolg dieser Zweierkombination ließ sich durch das Hinzufügen weiterer Substanzen bisher nicht signifikant verbessern [16]. In lokoregionär begrenzten Tumorstadien können lokale Therapien wie die chirurgische Resektion oder Radiotherapie mit kurativem

Therapieziel ergänzend eingesetzt werden. So sollte der Tumor bei Patienten in sehr frühen Tumorstadien ohne Lymphknotenbefall (T 1-2, N 0, M 0) wenn möglich chirurgisch entfernt werden und eine adjuvante Chemotherapie erfolgen. Eine zusätzliche, prophylaktische Schädel-Hirn-Bestrahlung wird nach kompletter lokaler Remission empfohlen. Patienten im Stadium der „Limited Disease“ mit potenziell kurativem Therapieziel erhalten in der Regel vier bis sechs Zyklen Chemotherapie im Abstand von drei bis höchstens vier Wochen. Dabei kann sich die Kombination mit thorakaler Radiatio positiv auf die lokale Tumorkontrolle und das Überleben auswirken. Bei gutem Therapieansprechen sollte zusätzlich eine Schädelbestrahlung zur Prophylaxe zerebraler Metastasierung erwogen werden. Wird die Diagnose im fortgeschrittenen Stadium der „Extensive Disease“ gestellt, erhalten die Patienten in der Regel vier bis sechs Zyklen Chemotherapie mit primär palliativem Therapieziel. Spricht der Tumor auf die Therapie an, kann eine vorbeugende Radiatio des Schädels sinnvoll sein. Eine zusätzliche Radiotherapie sollte in diesem Stadium lediglich symptomorientiert erfolgen [16, 17].

Wesentlich für die Prognose des SCLC ist die Ausbreitung des Tumors bei Therapiebeginn. Bei Diagnosestellung befinden sich 60 % der Patienten im metastasierten Stadium der „Extensive Disease“ [16]. Die medianen Überlebenszeiten bei „Limited Disease“ liegen zwischen 10 und 16 Monaten [18], die Fünfjahres-Überlebensrate bei 5 % [19]. Patienten mit „Extensive Disease“ überleben im Mittel 7 bis 11 (nach kompletter Remission 12 bis 16 [16]) Monate, wobei ein Überleben nach fünf Jahren die absolute Ausnahme darstellt (< 1 %) [20].

Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

Die beiden häufigsten Typen des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) sind das Adenokarzinom und das Plattenepithelkarzinom (jeweils 30-40 %), gefolgt von dem weniger häufigen großzelligen Karzinom (15 %) [7]. Da die meisten Tumore verschiedene histologische Anteile besitzen [21], findet man diesbezüglich unterschiedliche Prozentzahlen in der Literatur. Das Adenokarzinom entsteht bevorzugt aus Narbengewebe (z.B. bei Zustand nach einer Lungentuberkulose) und tritt in der peripheren Lunge im Bereich der kleinen Bronchien auf. Histologisch werden verschiedene Subtypen unterschieden (azinär, papillär, bronchoalveolär und solide schleimbildend) [22]. Im Gegensatz zu anderen histopathologischen Karzinomtypen tritt das Adenokarzinom bei Nichtrauchern am häufigsten auf [23]. Eine seltene Sonderform stellt das Alveolarzellkarzinom dar. Es ist ein bronchoalveoläres Adenokarzinom, das in den terminalen Bronchien und Alveolen auftritt und zum Teil von entarteten Pneumozyten Typ 2 und zum Teil von Clarazellen abstammt.

Durch das diffuse Wachstum entsteht radiologisch ein Pneumonie-ähnliches Bild [22]. Das Plattenepithelkarzinom entsteht über eine Plattenepithelmetaplasie nach einer chronischen Schleimhautreizung. Es ist an den Aufzweigungen der Subsegmentbronchien lokalisiert und zeichnet sich makroskopisch häufig durch Ulzerationen, Nekrosen und Blutungen aus. Histologisch unterscheidet man weiter in einen verhornenden und nicht verhornenden Typ. Die klinische Relevanz ist begründet durch eine schlechtere Prognose des nichtverhornenden Typs aufgrund der geringeren Zelldifferenzierung [24]. Das seltene großzellige Bronchialkarzinom stellt eine Ausschlussdiagnose dar. Es besteht wahrscheinlich aus entdifferenzierten Adeno- oder Plattenepithelkarzinomzellen, die mikroskopisch als solche nicht mehr identifiziert werden können [25].

Die Stadieneinteilung des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms erfolgt anhand der Kategorien des TNM-Klassifikationssystems nach einem Vorschlag der UICC (Union internationale contre le cancer) [26].

Die Therapie der Wahl beim NSCLC der lokal begrenzten Stadien ist die radikale chirurgische Resektion. Diese sollte in den Stadien II und III A sowie gegebenenfalls auch im Stadium IB ($T > 4$ cm) postoperativ durch eine Cisplatin-haltige Chemotherapie ergänzt werden. Eine adjuvante Radiotherapie sollte in frühen Stadien und bei nicht vollständiger Resektion diskutiert werden. In lokal fortgeschritteneren Stadien (III A und III B) und bei inoperablen Tumoren steht die simultane Radiochemotherapie, unter Berücksichtigung der zumutbaren Toxizität, im Vordergrund. Patienten im disseminierten Stadium IV erhalten in der Regel vier bis sechs Zyklen einer Cisplatin-haltigen Zweierkombination aus Vinorelbin, Gemcitabin, Taxan und/oder Pemetrexed. Alternativ kann in Einzelfällen eine Monotherapie mit einem der neueren zytostatischen Arzneistoffe von Nutzen sein. Die Resektion singulärer Metastasen kann in Grenzfällen sinnvoll sein. [27, 28, 29]

Die Prognose des NSCLC ist vom jeweiligen Stadium abhängig, aber mit einer 5-JÜR im Stadium I von etwa 40 % und im Stadium IV von nur 2 % insgesamt sehr schlecht [27]. Ausschlaggebend für die Prognose ist die Radikalität der chirurgischen Resektion [30], wobei eine primäre Operation nur bei 25 bis 30 % aller Patienten möglich ist [27]. Die mittlere Überlebenszeit, das heißt die Zeit, nach der 50 % der Patienten noch leben und 50 % gestorben sind, liegt bei etwa 8 bis 11 Monaten [31].

1.1.3 „Targeted Therapies“ beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom

Die neuen zielgerichteten Behandlungsoptionen mit verschiedenen, zum Teil bereits etablierten und zum Teil noch in der Entwicklung befindlichen molekularbiologischen Substanzen haben bei der Therapie des lokal fortgeschrittenen NSCLC bereits einen klinischen Stellenwert [28]. Während in den vergangenen Jahrzehnten die Chemotherapie dominierte, so ist das erste Jahrzehnt des 21. Jahrhunderts durch die zielgerichtete Tumorthherapie oder „targeted therapy“ geprägt. Die dabei zum Einsatz kommenden antineoplastisch wirksamen Substanzen entstammen unterschiedlichen pharmakologischen Gruppierungen und können sowohl „zytotoxisch“ als auch „zytostatisch“ wirksam sein. Zudem unterscheiden sie sich in ihrer Struktur und ihrem Wirkmechanismus von der klassischen Chemotherapie. Dabei können sie in Kombination mit dieser, aber auch als Monotherapie eingesetzt werden [32]. Es sind jedoch weitere randomisierte Studien notwendig um eine signifikante Überlegenheit dieser neueren Substanzen gegenüber den bisherigen Therapieregimen zu belegen.

So kann beispielsweise Gefitinib, ein oral verfügbarer epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)-Tyrosinkinaseinhibitor, als effektive Monotherapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder bereits metastasiertem NSCLC eingesetzt werden, insbesondere bei Vorliegen einer Mutation des EGFR-Rezeptors [33].

Die zusätzliche Applikation des Angiogeneseinhibitors Bevacizumab (Avastin®) wiederum stellt eine Therapieoption in der palliativen Therapie des Adeno- und Großzelligen Lungenkarzinoms für bereits mit Platinum-haltiger Chemotherapie vorbehandelte Patienten dar [34].

Die Entwicklung dieser neuen Generation von Medikamenten hat bereits therapeutische Fortschritte mit sich gebracht. Jedoch ist ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, der Resistenzentwicklung und der bislang verwendeten zytostatischen Substanzen für die weitere Entwicklung zielgerichteter, molekularbiologischer Therapien notwendig.

1.2 Cisplatin

1.2.1 Indikation

Cisplatin (Diamindichloridoplatin) ist ein weit verbreitetes Zytostatikum bei der Therapie solider Tumore. Die zytostatische Wirkung platinhaltiger Komplexe wurde 1965 durch Dr. Rosenberg zufällig entdeckt als er mithilfe von Platinelektroden die Wirkung von Wechselstrom auf *Escheria coli* Bakterien untersuchte. Dabei kam es zu einer Hemmung des Zellwachstums, die kurze Zeit später auf die Komplexverbindung cis-Diammintetrachloroplatin zurückgeführt werden konnte [35, 36]. In der Tumorthherapie wurde Cisplatin nach erfolgreicher Testung im Mausmodell [37] erstmalig 1974 im Rahmen einer Studie im Universitätsklinikum von Indiana zur Therapie eines Hodenkarzinoms eingesetzt [38]. Heutzutage kommt es neben dem Hodenkarzinom bei der Therapie des Bronchial-, Ovarial-, Harnblasen- und Zervixkarzinoms, den Plattenepithelkarzinomen an Kopf und Hals sowie dem Chorionkarzinom zum Einsatz. Dabei wird Cisplatin fast ausschließlich in Kombination mit anderen Zytostatika in der Erstlinien-Therapie verwendet, aber auch adjuvant nach operativer Behandlung oder Radiotherapie [39].

1.2.2 Wirkungsmechanismus

Cisplatin oder cis-Diamindichloridoplatin (II) stellt einen planaren Komplex dar, der am zentralen Platinatom zwei cis-ständige Chloridoliganden und zwei Amminliganden gebunden hat [40, 41]. Dabei ist die cis-Konfiguration Voraussetzung für die antineoplastische [42]. Nach der Aufnahme von Cisplatin in die Zelle, muss die Verbindung zunächst durch Hydrolyse aktiviert werden. Dabei kommt es auf die Chloridkonzentration an. Extrazellulär verhindert eine hohe Chloridkonzentration (~ 130 mM) die Hydrolyse. In der Zelle dagegen werden die Chloridliganden aufgrund der intrazellulär niedrigen Chloridkonzentration (4 mM), durch Wasser ersetzt. Die dabei entstehenden Aqua- und Hydroxokomplexe sind elektrophil und reagieren mit einer Vielzahl von Nucleophilen, einschließlich den Nucleinsäuren und Sulfhydrylgruppen von Proteinen [43].

Hemmung der DNA-Replikation

Cisplatin wirkt ähnlich wie bifunktionelle Alkylantien unter anderem über eine Querverknüpfung von DNA-Strängen. Dabei bilden geformte Aqua-Cisplatin-Komplexe, bedingt durch die hohe Elektrophilie, Addukte mit der DNA und zwar bevorzugt mit dem N7-Atom der DNA-Basen Guanin und Adenin. Dabei entstehen 1,2- oder 1,3- Intrastrand-Addukte innerhalb des DNA-Strangs und zu einem geringeren Prozentsatz Interstrand-

Addukte zwischen benachbarten DNA-Strängen. Man geht davon aus, dass die Intrastrand-Addukte zwischen zwei benachbarten Guanin-Rückständen für die Zytotoxizität von Cisplatin verantwortlich sind. Die Bildung dieser DNA-Addukte verändert die Struktur der DNA durch die chemische Modifikation der DNA-Basen und führt so zu einer fehlerhaften DNA-Replikation und -Transkription. Es kommt neben anderen Mechanismen zu einer Aktivierung der Apoptose und der programmierte Zelltod wird eingeleitet [43]. Einige Studien konnten zeigen, dass das Level der DNA-Addukte mit der Effektivität platinumhaltiger Therapien korreliert [44, 45, 46, 47], auch wenn dies in anderen veröffentlichten Arbeiten nicht der Fall war [44, 48, 49]. Dabei sind die DNA-Addukte vor allem im nukleären Chromatin und in Mitochondrien lokalisiert, wobei das höchste Level in sich schnell-teilenden Zellen vorliegt [50]. Die Zytotoxizität von Cisplatin ist am höchsten während der postmitotischen G1-Phase des Zellzyklus, in der sich die Zelle auf die nachfolgende Synthesephase und DNA-Replikation vorbereitet. Am wenigsten zytotoxisch wirkt Cisplatin während der prämitotischen G2-Phase und der Mitose-Phase des Zellzyklus [51]. Durch eine geringere Methylierung der Histone kann die Chromatindichte der DNA vermindert werden. Dadurch hat Cisplatin einen besseren Zugang zur DNA und die Effektivität der Therapie wird gesteigert [52].

Hemmung der DNA-Reparatur

Die Inhibition der DNA-Replikation alleine ist jedoch nicht ausreichend für die Zytotoxizität von Cisplatin. Ein weiteres wichtiges Wirkungsprinzip von Cisplatin ist die Hemmung der DNA-Reparatur. Dabei spielt das humane Tumorsuppressorprotein p53 eine wichtige Rolle. p53 wird als Antwort auf eine DNA-Schädigung vermehrt synthetisiert. In der Folge kommt es zu einem Zellzyklusarrest. Dadurch gewinnt die Zelle Zeit um DNA-Reparaturmechanismen in Gang zu setzen oder den programmierten Zelltod einzuleiten. Eine weitere Funktion des p53 Proteins ist die direkte Aktivierung von Zelltodsignalen, die zur Apoptose führen [53]. Das bedeutet, dass p53 den Cisplatin-induzierten Zelltod über verschiedene Mechanismen reguliert. Abedini et al. konnten zeigen, dass Cisplatin in Ovarialkarzinomzellen über eine vermehrte Expression von p53 zu einer Down-Regulation des antiapoptotischen Regulatorproteins FLIP (FLICE-like inhibitory protein) führt und somit die Apoptose induziert [54]. Das p53-Protein treibt die Cisplatin-induzierte Apoptose auch an, indem es direkt an Bcl-X_L bindet und so der anti-apoptotischen Wirkung von Bcl-X_L entgegenwirkt [55]. Allerdings wurde das p53 Proteins nicht nur bezüglich seiner Rolle bei der Wirksamkeit und Zytotoxizität von Cisplatin in vielen Studien untersucht und in der

Literatur vielfach bestätigt, sondern auch mit einer Resistenz gegenüber Cisplatin in Zusammenhang gebracht. Auf die bisherigen Erkenntnisse dazu wird an anderer Stelle, im Diskussionsteil dieser Arbeit, näher eingegangen werden. Doch obwohl es viele Hinweise auf eine wichtige Rolle von p53 bei der Cisplatin-induzierten DNA-Schädigung gibt, sprechen auch p53-negative Zellen auf eine Cisplatintherapie an. Dies deutet daraufhin, dass Cisplatin noch über weitere Mechanismen verfügt, um die DNA zu schädigen. Einige Signal-Transduktionswege spielen dabei eine Rolle. Dazu gehören zum Beispiel der MAP (mitogen-activated protein)-Kinase-Weg, die Tyrosinkinase c-Abl und weitere Proteinkinasen wie zum Beispiel die Proteinkinase C (PKC) [56].

1.2.3 Pharmakokinetik

Cisplatin wird als Infusion verabreicht, da die orale Aufnahme eine Hydrolyse durch die Magensäure zur Folge hätte. Cisplatin wird normalerweise als Puder in 250 ml einer 3%-igen Kochsalzlösung gelöst und in einer Dosis von 50 bis 100 mg/m² in wöchentlich oder dreiwöchentlichen Abständen appliziert. Dabei stellt das Auftreten einer Thrombozytopenie bei wöchentlichen Cisplatininfusionen in einer Dosierung von 80 mg/m² eine dosis-limitierende Nebenwirkung dar [57, 58]. Cisplatin wird zu 90 % an Serumproteine (z.B. Albumin) gebunden und unterliegt einer dreiphasigen Eliminationskinetik ($t_{\alpha} = 20-30$ Minuten, $t_{\beta} = 40-70$ Minuten und $t_{\gamma} = 24$ Stunden). In der tertiären Phase wird das plasmaproteingebundene Cisplatin eliminiert [59]. Die Elimination von Cisplatin erfolgt hauptsächlich renal, wobei Bajorin *et al.* nur eine geringe Ausscheidung von Cisplatin im Urin 24 Stunden nach der Administration gemessen haben. Das könnte durch die starke Bindung von Cisplatin an Plasmaproteine und parenchymatöse Gewebe begründet sein [60]. Die Verteilung von Cisplatin führt zu besonders hohen Konzentrationen in parenchymatösen Bauchorganen (Nieren, Nebennieren, Leber, Milz und Pankreas) sowie in der Prostata, Harnblase und Muskulatur. Die Aufnahme in das zentrale Nervensystem ist dagegen gering [61]. Die renale Clearance von Cisplatin scheint, zumindest in der Anfangsphase, eher eine untergeordnete Rolle zu spielen [57, 60]. Stellt man die Konzentration von gebundenem Cisplatin und die Gesamt-Cisplatin-Konzentration (d.h. gebundenes und ungebundenes Cisplatin) über die Zeit nach der Gabe von Cisplatin grafisch dar, verlaufen die Kurven nicht parallel. Das könnte bedeuten, dass die Bindung von Cisplatin an Plasmaproteine irreversibel ist [62, 63]. Einige Studien haben eine Korrelation zwischen der klinischen Wirkung und kinetischen Parametern von ungebundenem Cisplatin nachgewiesen. Demzufolge scheint die Clearance des pharmakologisch aktiven, ungebundenen Cisplatin ausschlaggebend für den Therapieerfolg zu sein. Die Forschungsgruppe von de Jongh *et al.* hat gezeigt, dass

verschiedene demografische Variablen und Covariablen wie Comedikation, Tumortyp und Dosierung keinen Einfluss auf die Clearance von ungebundenem Cisplatin haben [57]. Dies wurde auch in anderen Studien bestätigt [64, 65]. Allerdings wurde bei Männern eine 15 % schnellere Clearance von ungebundenem Cisplatin im Vergleich zu Frauen festgestellt, wobei die Ursachen nicht ganz klar sind. Außerdem wurde gezeigt, dass die Clearance von Cisplatin zwar mit der Körperoberfläche des Patienten korreliert, diese Korrelation aber nur schwach ausgeprägt ist, so dass eine Dosierung in Abhängigkeit der Körperoberfläche von de Jongh *et al.* als nicht mehr zeitgemäß und notwendig betrachtet wird. Stattdessen schlagen sie feste Anwendungsschemata mit einer therapeutischen Dosierung zwischen 50 und 100 mg/m² vor [57].

1.2.4 Pharmakodynamik

Cisplatin hat ein weites Wirkspektrum gegen verschiedene solide Tumore (Lungen-, Harnblasen-, Hoden- und Ovarial-CA sowie gegen Karzinome im Kopf- und Halsbereich). Durch eine ausreichende Hydratation und Substitution von Kalium und Magnesium hat sich die Zytotoxizität von Cisplatin von der dosis-limitierenden Nephrotoxizität eher hin zur Neuro- und Ototoxizität verschoben [57]. Im Gegensatz zu Carboplatin, dessen Dosierung stark abhängig von der Kreatinin Clearance erfolgt [66], gibt es bei Cisplatin aufgrund des beschriebenen Toxizitätsprofils keinen klinisch brauchbaren Überwachungsparameter für eine dosis-limitierende Toxizität und Dosierungsanpassung [57]. Cisplatin wird häufig in Kombination mit anderen zytotoxischen Substanzen verwendet. Hierbei muss mit einer additiven Toxizität gerechnet werden. Des Weiteren kann es zu Interaktionen mit anderen nephro- und ototoxischen Substanzen und renal ausgeschiedenen Medikamenten kommen, sowie mit Antikonvulsiva und Medikamenten bei der Gicht-Behandlung [67].

1.2.5 Unerwünschte Wirkungen einer Cisplatintherapie

Cisplatin ist nephrotoxisch, ototoxisch und neurotoxisch. Die Nephrotoxizität stellte lange den dosislimitierenden Faktor dar und erfordert eine ausreichende Hydratation. Außerdem führt Cisplatin zu starker Übelkeit und Erbrechen häufig mit einer Dauer von > 24 Stunden [68]. Die durch Cisplatin verursachte Knochenmarksdepression ist in der Regel mäßig schwerwiegend [57]. Bei Vorliegen von pulmonalen und/oder kardialen Begleiterkrankungen ist der Einsatz von Cisplatin begrenzt. Generell erfordert eine Chemotherapie mit Cisplatin aufwendige routinemäßige Begleittherapien (Flüssigkeitsersatz, Antiemetika, etc.) sowie eine engmaschige Überwachung des Patienten während und nach der Behandlung [67]. Aus diesen

und anderen Gründen sind die Entwicklung Platin-freier Chemotherapien oder molekularbiologisch zielgerichteter Behandlungen seit langem Ziel der klinischen Forschung.

1.2.6 Resistenzentwicklung

Der Stellenwert der Chemotherapie im Therapiekonzept des Lungenkarzinoms ist in den vergangenen Jahren deutlich gestiegen. Aus verfügbaren Metaanalysen geht hervor, dass Cisplatin-haltige Zytostatikakombinationen im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika den größten Überlebensvorteil bringen [69, 70, 71]. Doch obwohl Cisplatin-haltige Chemotherapien bei Behandlungsbeginn häufig ermutigende Therapieerfolge erzielen, ist die Prognose für das Langzeitüberleben schlecht. Beim fortgeschrittenen NSCLC (Stadium III B und IV) beispielsweise konnte die Überlebenszeit dadurch nur um bis zu maximal 3 Monate verlängert werden [72].

Cisplatin, das neben seiner Anwendung beim Lungenkarzinom einen festen Stellenwert in der Chemotherapie verschiedener solider Tumore hat [73], wirkt über eine Hemmung der DNA-Replikation durch Quervernetzung zwischen benachbarten DNA-Strängen. Beim Versuch der Tumorzellen, die DNA-Schädigung zu reparieren, kommt es zum Zellzyklus-Arrest mit aberranter Mitose und schließlich zur Auslösung der Apoptose [74]. Manchen Lungenkarzinomzellen gelingt es, über noch ungeklärte Mechanismen diesem Prozess zu entkommen. Diesbezüglich werden eine gesteigerte Verstoffwechslung und Entgiftung des Zytostatikums, eine erfolgreiche Reparatur der DNA-Schäden oder die Fähigkeit der Zellen, die Apoptose erfolgreich zu umgehen, diskutiert [75]. Die Forschung der letzten Jahre hat bereits mehr als 100 Proteine ausgemacht, die möglicherweise an der Resistenzentwicklung beteiligt sind. Dabei könnten die Proteine der Bcl-2-Genfamilie als Regulatoren der Apoptose eine maßgebliche Rolle spielen. Doch bisher besteht keine Klarheit über zugrunde liegende Mechanismen und keines der Proteine, mit Ausnahme des Tumorsuppressorproteins p53, bewiesen bisher klinische Relevanz [76]. Demzufolge ist das Problem der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin bei der Therapie des Lungenkarzinoms nach wie vor nicht gelöst und gibt, wie auch für die vorliegende Arbeit, Anlass für weitere Nachforschungen.

1.3 Molekulare Grundlagen

Zum besseren Verständnis der Beteiligung der Bcl-2-Proteine an der Regulation der Apoptose werden zunächst die verschiedenen Signaltransduktionswege zusammenfassend erläutert. Anschließend wird die Bcl-2-Proteinfamilie charakterisiert und die bisherigen Erkenntnisse und Theorien zur Rolle der Bcl-2-Proteine bei der Apoptose beschrieben.

1.3.1 Apoptose und Signaltransduktion

Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein natürlicher Mechanismus zur Selbstzerstörung von Zellen. In gesunden Geweben herrscht dabei ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Zellproliferation durch mitotische Teilung und dem Zelltod durch Apoptose. Dieser Prozess wird durch komplexe Regulationsmechanismen, bei denen die Bcl-2-Proteine eine wesentliche Rolle spielen, engmaschig kontrolliert [77].

Eine Deregulation der Apoptose stellt, neben anderen Prozessen, die Grundlage für die Entstehung von Neoplasien dar und ist an der Entstehung von Therapieresistenzen beteiligt [78]. Da Chemotherapeutika wie Cisplatin über eine Schädigung der DNA als nukleäres Stresssignal den programmierten Zelltod auslösen [74], könnte eine Störung dieser Mechanismen für die Resistenzentwicklung verantwortlich sein.

Ablauf der Apoptose

Die Apoptose wird im Wesentlichen durch zwei Signalwege ausgelöst. Beim extrinsischen Signalweg kommt es zur Aktivierung durch Todesrezeptoren und Zelltodliganden aus der Zellumgebung. Der intrinsische Signalweg wird an Mitochondrien und dem endoplasmatischen Reticulum (ER) über intrazelluläre Stresssignale wie z. B. eine nukleäre DNA-Schädigung oder ER-Stress aktiviert.

Die Selbstzerstörung der Zelle verläuft dabei in zwei Phasen: die Initiationsphase und die Effektorphase. Bei beiden Signalwegen kommt es in der Initiationsphase zur Bildung eines zytosolischen, todesinduzierenden Signaltransduktionskomplexes (DISC; death-inducing signaling complex). Diese Proteinkomplexe rekrutieren Adapterproteine, welche die Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -10 oder -12) binden und aktivieren. An die Initiationsphase schließt sich die Effektorphase an. In dieser Phase aktivieren die Initiator-Caspasen durch limitierte Proteolyse die in der Signalkaskade nachgeschalteten Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7). Diese spalten wichtige strukturelle und regulatorische zelleigene Proteine wie zum Beispiel Aktin (als Teil des Zytoskeletts) und Lamin (einen Bestandteil der Zellmembran). Des Weiteren kommt es Caspasen-vermittelt zur Unterdrückung der DNA-Reparatur und zur Aktivierung sekundärer Zielproteine wie der DNase, die im Rahmen der Apoptose die nukleäre DNA spaltet. Die Zelle schnürt sich daraufhin in kleinen Vesikeln ab und wird irreversibel zerstört [79].

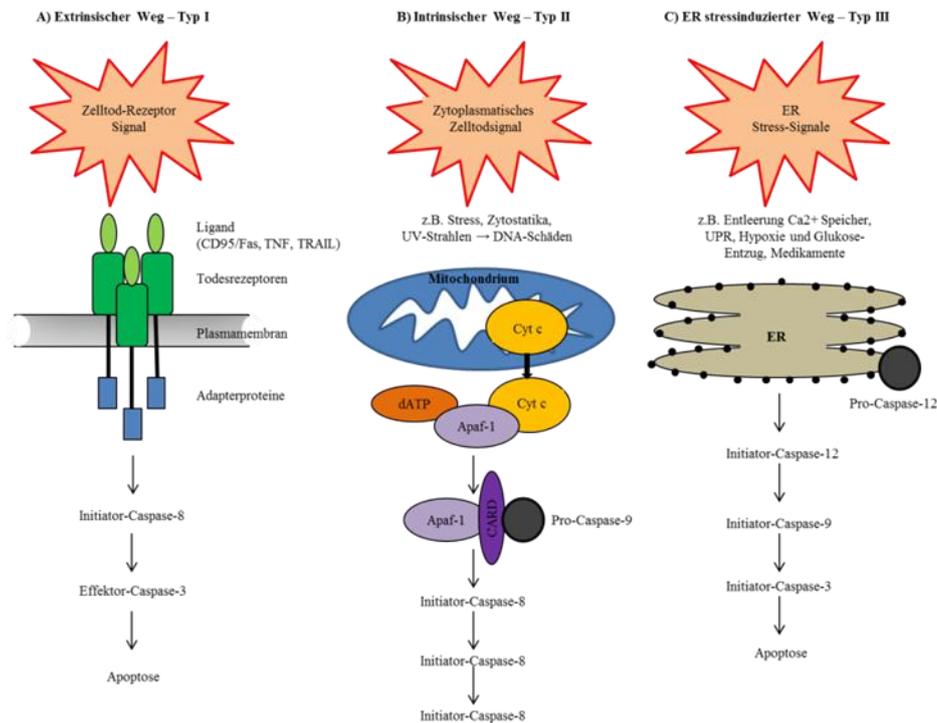
Signaltransduktionswege

Am besten erforscht ist die extrinsische Aktivierung über Ligandenbindung an transmembranöse Zelltod-Rezeptoren (Death-Rezeptoren) in Mitochondrien (Abbildung 1 A). Durch Bindung des CD95-/Fas-Liganden, TNF (Tumornekrosefaktor) oder TRAIL („TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand“) an Death-Rezeptoren der TNF-Rezeptorsubfamilie kommt es zur Rekrutierung von Adapterproteinen wie FADD („Fas Associated Death Domain“), RIP1 („Receptor Interacting Protein 1“) und RAIDD („RIP-Associated ICH-1/Ced-3-homologous protein with a Death Domain“). Über diese Adapterproteine, vor allem über FADD, wird die bei diesem Signalweg dominante Initiator-Caspase-8 aktiviert [75, 79, 80].

Der mitochondriale Apoptose-Signalweg (Abbildung 1 B) wird intrinsisch aktiviert. Dabei werden über noch unklare Mechanismen Cytochrom c und weitere Caspase-aktivierende Proteine wie Smac/DIABLO („Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low pI“) und die Serinprotease Omi/HtrA2 aus Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt. Den DISC bilden das zytosolische Adapterprotein Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) mit dem Cytochrom c und dATP als Kofaktoren, deren Bindung eine Konformationsänderung von Apaf-1 bedingt. Dadurch wird die Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) von Apaf-1 für die Procaspase-9 zugänglich und ermöglicht die autolytische Aktivierung zur Caspase-9. Analog zur Caspase-8 aktiviert die Caspase-9 nachgeschaltete Effektor-Caspasen und es kommt zum irreversiblen Zelltod [75, 79].

Neuere Daten zeigen, dass die Apoptose auch am ER durch Stress-Signale über die Aktivierung der ER-spezifischen Caspase-12 induziert werden kann (Abbildung 1 C). Auslösende Stresssignale sind eine fehlerhafte Entleerung des Calciumspeichers, eine übermäßige Anhäufung missgefalteter Proteine (Unfolded Protein Response, UPR) im Rahmen von Virusinfektionen oder die Akkumulation pathologischer Proteine wie dem Amyloid-Protein bei Morbus Alzheimer [81]. Eine UPR kann auch durch Medikamente wie zum Beispiel Tunicamycin ausgelöst werden, das zur Hemmung der Proteinglykosylierung am Golgi-Apparat und zur Retention von Proteinen am ER führt. Des Weiteren kommt es beim gleichzeitigen Auftreten von Hypoxie und Glukose-Entzug neben der Induktion von Chaperonen (BiP/GRP78 und GRP94) zur Aktivierung der Caspase-12 [75]. Weitere Substanzen und Zellkonditionen, die als Stresssignale am ER die Apoptose auslösen, wurden in der Arbeit von Lee beschrieben [82].

Abb. 1: Signaltransduktionswege der Apoptose



Die Abbildung zeigt die verschiedenen Signaltransduktionswege der Apoptose. A) Extrinsische Aktivierung über die Bindung von Todesliganden an Zelltod-Rezeptoren B) Intrinsische Aktivierung und Freisetzung von Cytochrom c C) ER-vermittelte Aktivierung über Stress-Signale

1.3.2 Die Bcl-2-Genfamilie

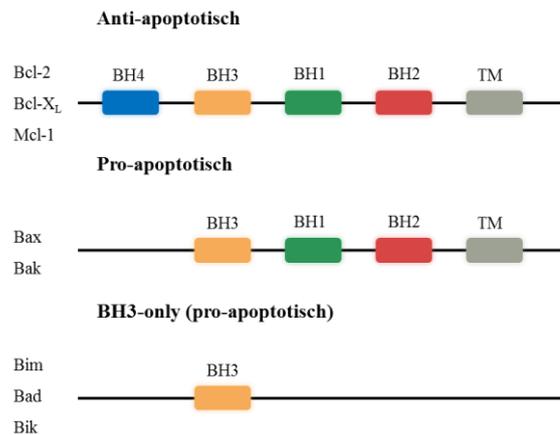
Bcl-2 ist ein Protein, dessen Gen erstmals im B-Zell-Lymphom (daher auch der Name „Bcl“) isoliert wurde [83]. Das Bcl-2-Protein stellt den Prototyp einer gleichnamigen Proteinfamilie dar, deren einzelne Mitglieder in der Literatur häufig als Bcl-2-Proteine zusammengefasst werden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose-Regulation und die Funktionen einzelner Bcl-2-Proteine wurden vor allem für die Signaltransduktion an Mitochondrien untersucht [84]. Neuere Studien belegen jedoch, dass sie auch für die ER-vermittelte Apoptose von Bedeutung sind [85]. Allgemein unterscheidet man pro-apoptotische Bcl-2-Proteine, die den programmierten Zelltod fördern, von anti-apoptotischen Mitgliedern, die ihn verhindern [86].

Struktur und Funktion

Bei der Analyse der Proteinstruktur der Bcl-2-Genfamilie wurden insgesamt vier Domänen identifiziert, die als BH1-, BH2-, BH3- und BH4-Domäne bezeichnet werden und α -Helix-Segmenten entsprechen [84]. Die BH1- und BH2-Domänen können die Aktivität von

Ionenkanälen beeinflussen und somit die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien regulieren. Die BH3-Domäne hat eine Apoptose-fördernde Funktion, während die BH4-Domäne die Apoptose durch eine Dimerisierung mit pro-apoptotischen Proteinen hemmt [87, 88]. Häufig werden die Bcl-2-Proteine nach ihren strukturellen Eigenschaften in drei funktionelle Gruppen unterteilt (Abbildung 2) [89, 90, 91]:

Abb. 2: Struktur und Funktion der Bcl-2-Proteine



Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau und die Funktion einiger Bcl-2 Proteine, die eine unterschiedliche Anzahl an BH-Domänen besitzen und teilweise mit einer Transmembrandomäne (TM) ausgestattet sind.

Gruppe I bilden anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) und Bcl-X_L (B-cell lymphoma-extra large) und Mcl-1 (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1). Sie besitzen alle vier BH-Domänen und sind mit einem C-terminalen hydrophoben Schwanz, der Transmembrandomäne (TM), in den Membranen von Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum oder in der Hülle des Zellkerns verankert.

Gruppe II setzt sich aus pro-apoptotischen Proteinen wie Bax (Bcl-2 associated X protein) und Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) zusammen. Bis auf das Fehlen der BH4-Domäne haben sie eine ähnliche Struktur wie die Proteine der Gruppe I.

Gruppe III besteht ebenfalls aus pro-apoptotischen Proteinen, die auch „BH3-only-Proteine“ genannt werden, da sie ausschließlich die Apoptose-fördernde BH3-Domäne besitzen. Zu den BH3 (Bcl-2 homology 3)-only Proteinen zählen Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death), Bad (Bcl-2 antagonist of cell death) und Bik (Bcl-2 interacting killer). Die Gemeinsamkeit dieser Proteine liegt, neben strukturellen Eigenschaften, in der Fähigkeit, die Permeabilität intrazellulärer Membranen für Ionen und Proteine zu regulieren [92] und die Apoptose zu fördern.

Es gibt noch weitere Proteine, die der Bcl-2-Proteinfamilie zugeordnet werden [84]. Die vorausgehende Abbildung stellt einige von ihnen exemplarisch dar.

Lokalisation in der Zelle

Bcl-2-Proteine kommen in Abhängigkeit ihres Aktivitätszustands und dem Vorhandensein einer Transmembrandomäne (TM) zytosolisch oder membranassoziiert vor [89]. Das Bcl-2-Protein, mit Ausnahme der Bcl-2 α -Spleißvariante ohne TM, ist an der äußeren Mitochondrienmembran, dem ER und der Zellkernmembran lokalisiert. Bcl-X_L befindet sich im inaktiven Zustand im Zytosol oder membrangebunden. Bei der Apoptose wird Bcl-X_L zur äußeren Mitochondrienmembran und zum ER transloziert [93, 94]. Die pro-apoptischen Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie befinden sich größtenteils im Zytosol und werden durch ein Apoptose-stimulierendes Signal zu verschiedenen Zellorganellen transportiert. Inaktives Bax ist im Zytosol gelegen und wird auf einen apoptotischen Stimulus hin zur äußeren Mitochondrienmembran transloziert. Bak ist in der äußeren Mitochondrienmembran und dem ER nachweisbar [79].

1.3.3 Die Rolle der Bcl-2-Proteine bei der Apoptoseregulation

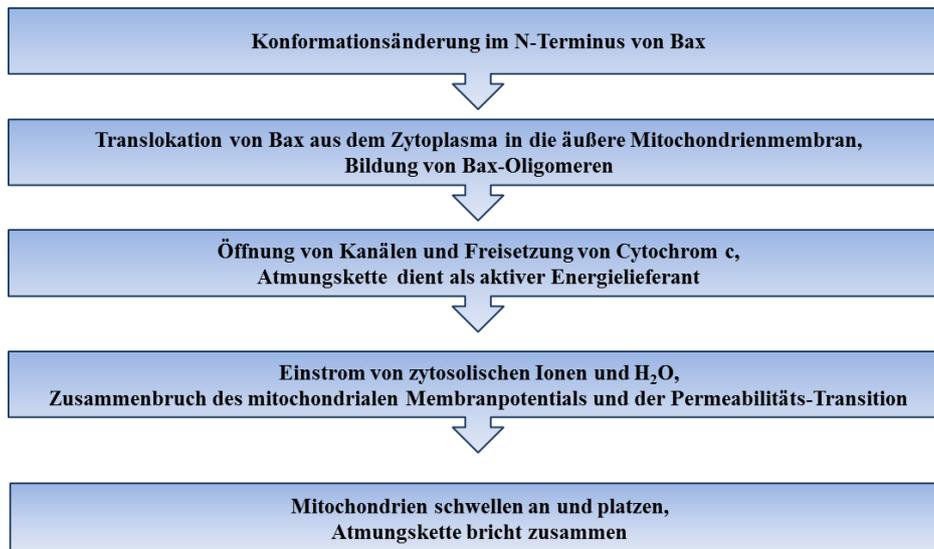
Man geht davon aus, dass die Apoptose im Wesentlichen durch Proteininteraktionen zwischen pro- und anti-apoptischen Bcl-2-Proteinen reguliert wird [95]. Dabei wird die Funktion einzelner Bcl-2-Proteine über die jeweils vorhandenen BH-Domänen vermittelt [79].

Mitochondriale Apoptose

Die mitochondriale Apoptose wird durch Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 und weitere anti-apoptische Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie gehemmt [96]. Bei den Apoptose-fördernden Proteinen unterscheidet man zwei Subgruppen, die an der Aktivierung der mitochondrialen Signalkaskade beteiligt sind: die Bax-homologen Proteine Bax und Bak sowie die wachsende Familie der BH3-only-Proteine [97, 98].

Mitochondrienaktivierung durch Bax und Bak

Der genaue Mechanismus der Mitochondrienaktivierung durch Bcl-2-Proteine ist noch unklar. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass Bax und Bak Mitochondrien direkt aktivieren und zur Freisetzung von Cytochrom c führen. Die Aktivierung erfolgt wie in Abbildung 3 dargestellt [75].

Abb. 3: Ablauf der Mitochondrienaktivierung durch Bax und Bak

Die Aktivierung von Bak erfolgt analog zu Bax mit einer N-terminalen Konformationsänderung und Oligomerbildung. Die Translokation entfällt, da Bak bereits konstitutiv an der Mitochondrienmembran lokalisiert ist [99].

Beteiligung der Bcl-2-Proteine an der Freisetzung von Cytochrom c

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass pro-apoptotische Bcl-2-Proteine zur Freisetzung von Cytochrom c führen, während anti-apoptotische Mitglieder diesen Vorgang verhindern [87, 100]. Der genaue Mechanismus, wie Cytochrom c die äußere Mitochondrienmembran passiert, ist noch unklar. Es existieren verschiedene Hypothesen, von denen bisher allerdings keine eindeutig nachgewiesen werden konnte [90]:

1. **Bcl-2-Proteine bilden Kanäle, die den Transport von Proteinen erleichtern**

Bcl-X_L hat strukturelle Ähnlichkeit mit einer Poren bildenden Untereinheit des Diphtherie-Toxins [101]. Daraus entstand die Annahme, dass Bcl-2-Proteine nach einer Konformationsänderung möglicherweise in die äußere Mitochondrienmembran inseriert werden, wo sie Kanäle oder große Poren bilden. Bcl-2-Proteine können tatsächlich in synthetische Lipidschichten eingefügt werden, Oligomere bilden und Kanäle mit geringer Leitfähigkeit formen [102]. Aber es ist fraglich, ob diese Kanäle groß genug wären, um Proteine zu transportieren.

2. **Bcl-2-Proteine interagieren mit anderen Proteinen, um Kanäle zu bilden**

Proteine der Bcl-2-Genfamilie interagieren mit einer Vielzahl anderer Proteine [102]. Daher könnte die Rekrutierung weiterer Proteine dazu dienen, großporige Kanäle zu bilden. Als potenzieller Kandidat für einen derartigen Kanal wurde der Voltage-

Dependent Anion Channel (VDAC) vorgeschlagen, da sich einige Bcl-2-Proteine an ihn binden und seine Aktivität regulieren können [103]. Da der VDAC jedoch ebenfalls zu klein ist, um Proteine zu transportieren, müsste er eine Konformationsänderung durchlaufen - möglicherweise induziert durch die Bindung von Bcl-2-Proteinen.

3. **Bcl-2-Proteine induzieren die Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran**

Bei dieser Modellvorstellung verändern apoptotische Signale die Physiologie der Mitochondrien (z. B. durch Ionenaustausch oder oxidative Phosphorylierung), sodass die Organelle anschwillt und die äußere Mitochondrienmembran rupturiert. Cytochrom c gelangt demnach durch entstandene Lücken in der Mitochondrienmembran ins Zytosol. Die mitochondriale Homöostase könnte dabei entweder direkt durch Proteine der Bcl-2-Genfamilie (z. B. durch intrinsische Aktivität an Ionenkanälen) oder indirekt durch Modifizierung anderer mitochondrialer Proteine beeinflusst werden [90]. Auch bei diesem Regulationsmechanismus könnte der VDAC eine Rolle spielen, da er eine Untereinheit der mitochondrialen Permeability Transition Pore (PTP) darstellt. Bei Öffnung der PTP, einem großen Kanal, kommt es zum Verlust des Membranpotenzials und folglich zum Anschwellen und Platzen der Mitochondrien. Cytochrom c wird freigesetzt und der apoptotische Zelltod eingeleitet. Dafür spricht auch die Tatsache, dass eine Hemmung der PTP durch pharmakologische Inhibitoren die Cytochrom c Freisetzung und die Apoptose verhindern [104]. Andere Studien zeigten jedoch, dass Cytochrom c auch ohne den Verlust des Membranpotenzials freigesetzt wird [104, 105]. Demzufolge kann die PTP zumindest nicht der einzige Angriffspunkt der Bcl-2-Proteine sein.

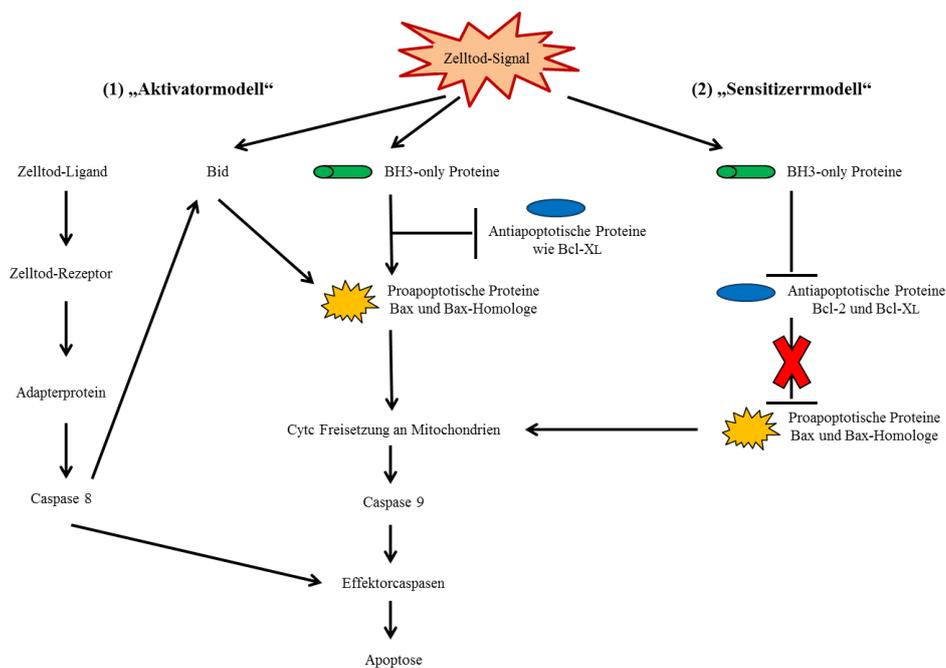
Neben Cytochrom c werden noch weitere Faktoren aus Mitochondrien freigesetzt, die am Caspase-unabhängigen Zelltod beteiligt sind. Dazu zählen unter anderem AIF (Apoptosis Inducing Factor), HSP10 (Hitzeschockprotein) und Smac/DIABLO [84].

BH3-only-Proteine als funktionelle Bindeglieder zwischen den Signalkaskaden

BH3-only-Proteine fungieren als Bindeglieder zwischen verschiedenen Signalkaskaden und wirken über die Aktivierung von Bax und Bak zelltodfördernd [97]. Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist noch unklar. Es existieren im Wesentlichen zwei hypothetische Modellvorstellungen (Abbildung 4): (1) das „Aktivatormodell“ und (2) das „Sensitizermodell“ [79]. Beim Aktivatormodell geht man davon aus, dass die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak durch BH3-only-Proteine direkt aktiviert werden. So induziert Bid eine Konformationsänderung von Bax und die Insertion in die äußere Mitochondrienmembran. Dieser Prozess wird durch Bcl-X_L gehemmt [106, 107]. Das BH3-

only-Protein Bid wird durch Spaltung zum trunkierten Bid (tBid) aktiviert und verknüpft, wie in Abbildung 4 dargestellt, den Todesrezeptor- mit dem mitochondrialen Signalweg [108]. Eine gerade veröffentlichte Studie deutet darauf hin, dass Bim ebenfalls über eine Hemmung anti-apoptotischer Proteine indirekt zur Aktivierung von Bax führt [109]. Das Sensitizermodell postuliert eine hohe Affinität von BH3-only-Proteinen zu anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen. Bcl-2 und Bcl-X_L binden normalerweise an aktiviertes Bax und Bak und hemmen dadurch die Freisetzung von Cytochrom c [79]. Durch Bindung von BH3-only-Proteinen werden sie funktionell sequestriert und ihre Apoptose-hemmende Wirkung auf Bax und Bak aufgehoben [97]. Die meisten Arbeitsgruppen befürworten ein Mischmodell, bei dem BH3-only-Proteine als Aktivatoren von Bax und Bak fungieren und gleichzeitig Inhibitoren von Bcl-2 und Bcl-X_L sind [110].

Abb. 4: BH3-only-Proteine



Die Abbildung zeigt die Funktion der BH3-only-Proteine. (1) Beim Aktivatormodell werden die proapoptischen Proteine Bax und Bak direkt über BH3-only-Proteine bzw. Bid aktiviert. Durch Bid sind der Todesrezeptor- und der mitochondriale Signalweg verknüpft. (2) Das Sensitizermodell postuliert eine Bindung der BH3-only-Proteine an Bcl-2 und Bcl-X_L und hebt so deren anti-apoptische Wirkung auf Bax und Bax-Homologe auf.

Rolle der Bcl-2-Proteine bei der ER-vermittelten Apoptose

Die Forschung der letzten Jahre hat sich vor allem auf die Regulationsmechanismen der mitochondrialen Apoptose konzentriert. Neuere Daten deuten auch auf eine Mitwirkung der Bcl-2-Proteine bei der ER-vermittelten Apoptose hin [96]. Rudner *et al.* postulieren eine Hemmung der Caspasen-Aktivierung durch das am ER lokalisierte anti-apoptotische Bcl-2-Protein [85]. Andere Studien demonstrieren eine Beteiligung der Caspase-12 an der ER-vermittelten Apoptoseregulation [81]. So konnte an renal-tubulären Epithelzellen die durch Cisplatin induzierte Apoptose durch die Gabe eines Anti-Caspase-12-Antikörpers signifikant vermindert werden [111]. Hacki *et al.* ist es gelungen, mit einer ER-spezifischen Bcl-2-Variante (Bcl-2/Cb5) nach Apoptoseinduktion mit Brefeldin A und Tunicamycin die Freisetzung von Cytochrom c an Mitochondrien zu blockieren [112]. Dies deutet darauf hin, dass ER-spezifisches Bcl-2 auch Einfluss auf die Apoptoseregulation in Mitochondrien hat. Somit scheinen am ER mindestens zwei Caspase-Systeme involviert zu sein und es bestehen möglicherweise weitere Verbindungen zwischen der mitochondrialen und der ER-vermittelten Signalkaskade.

Weitere Funktionen

Eine weitere wichtige Funktion der Bcl-2-Proteine ist die Regulation der Calciumhomöostase im Rahmen der Apoptose. Durch einen Apoptose-Stimulus wird normalerweise Calcium aus dem Extrazellulärraum und dem ER ausgeschüttet und es kommt zu einem Anstieg der mitochondrialen Calcium-Konzentration. Daraufhin werden die PTP geöffnet und es wird Cytochrom c freigesetzt. Es ist vorstellbar, dass Bcl-2-Proteine die Zelltod bringende Calcium-Freisetzung vermindern, indem sie die Freisetzung hemmen oder die Wiederaufnahme von Calcium in Mitochondrien und ER beschleunigen. Nachdem die ATPase SERCA für die Calcium-Aufnahme am ER verantwortlich ist und Bcl-2 mit einer vermehrten Expression von SERCA assoziiert ist [113], wäre eine Modulation dieses Transporters durch Bcl-2-Proteine denkbar. Des Weiteren haben Schrödl *et al.* gezeigt, dass eine verminderte endoplasmatische Calcium-Konzentration zu einer partiellen Resistenzentwicklung von Lungenkarzinomzellen gegenüber Cisplatin führt [114].

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, die Rolle der Bcl-2-Proteine bei der Resistenzentwicklung gegen Cisplatin beim kleinzelligen (SCLC) und nicht-kleinzelligen (NSCLC) Lungenkarzinom zu untersuchen. Mithilfe von Zellkulturen wurden zunächst kleinzellige und nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzellen mit Cisplatin behandelt, um teilresistente Zellklone zu erhalten. Anschließend sollte die Expression der Bcl-2-Proteine zwischen naiven und teilresistenten Zellen verglichen und ihr Einfluss auf die Resistenzentwicklung getestet werden.

Daraus ergab sich folgende Fragestellung: Gibt es Unterschiede im Expressionsniveau der Bcl-2-Proteine zwischen naiven und Cisplatin-teilresistenten Zellen des kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms und, wenn ja, sind diese verantwortlich für die Resistenzentwicklung?

2 Material

2.1 Tumorzelllinien

EPLC32M1	Zur Verfügung gestellt von Dr. G. Jaques, Philipps-Universität Marburg, Deutschland
EPLC32M1 teilresistente Zellklone	Zur Verfügung gestellt von Dr. Kathrin Schrödl und Hamza Oelmez, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland
H1339	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
NCI-H187	Zur Verfügung gestellt von Prof. Gudermann, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

2.2 Zellkultur

Phosphate buffered Saline (PBS) 10 mM, pH 7,4	Gibco-Lifetechnologies Ltd., Paisley, UK
VLE RPMI 1640 Medium (1x) w 2.0 g/l NaHCO w/o L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
GIBCO Foetal Bovine Serum	Invitrogen Ltd., Paisley, UK
L-Glutamine 200 mM (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
GIBCO Fungizone Amphotericin B 250 UG/ml	Invitrogen Ltd., Paisley, UK
Trypsin-EDTA (1x) 0,05 %/0,02 % in D-PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
BD Falcon Tissue Culture Flask, 250 ml Cauted Neck and 0,2 µm Vented Blue Plug Set	Becton Dickinson Labware Franklin Lakes, NJ, USA
50 ml Falcon Tubes	Becton Dickinson Labware Franklin Lakes, NJ, USA
Safe-Lock Tubes (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zählkammer (0,1 x 0,0025 mm ²)	Neubauer, BRAND GmbH & Co., Wertheim,

	Deutschland
Elektrische Pipette 10 ml	Sterilin Ltd., Caerphilly, UK
Elektrische Pipette 25 ml	Corning Incorporated, NY, USA
Elektronischer Pipettenregler	Gilson, Inc. , Middleton, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber Cell Scraper (28 cm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kryoröhrchen Cryo vials	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Wasserbad Techne TE-10D	Tempunit Gesellschaft für Laborgeräte mbH, Wertheim, Deutschland
Hettich-Zentrifugen Universal 16A	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Hettich-Zentrifugen EBA 12R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Brutschrank Heraeus Lamin Air	Fa. Schultheiss, München, Deutschland
Herasafe Steril Flow	Thermo Electron Corp., Langenselbold, Deutschland

2.3 Herstellung Cisplatin-teilresistenter Zellklone

Cisplatin	Apotheke Großhadern, München, Deutschland
-----------	---

2.4 Proteinanalytische Methoden

Cytobuster™ Protein Extraction Reagent for soluble proteins	Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Non-Interfering Protein Assay Kit	Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland
SeeBlue®Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Laemmli Sample Buffer 32,5 mM Tris, 2,5 % β-mercaptoethanol, 1 % SDS und 12 % Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS) 10mM, pH 7,4	Gibco-Lifetechnologies Ltd., Paisley, UK
Gel Bis-Tris 10 % NuPAGE®	Invitrogen, Carlsbad, Kanada

NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, Kanada
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, Kanada
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, Kanada
Scotch Brite-Schwämme XCell SureLock™ Buffer Dam for Mini-Gel	Invitrogen, Carlsbad, Kanada
Criterion™ Blotting Sandwiches 0,45 µm Nitrocellulose with Filter paper	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kanada
10 % Tween 20 Solution (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kanada
10x TBS (Tris-Buffered Saline)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kanada
Fluka BioChemika Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Bcl-2 Family Rabbit Monoclonal Antibody Sample Kit (primärer AK)	Epitomics Inc., Burlingame, USA
Goat-anti-rabbit IgG (HRP) (sekundärer AK)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
Mouse anti-β-Actin (HRP) (Ladekontrolle)	Abcam plc, Cambridge, UK
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
Amersham Biosciences Hypercassette (Filmkassette)	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
Amersham Hyperfilm™ ECL High Performance Chemiluminescence Film	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
AGFA Rapid Fixer G354 For medical x-ray processing	AGFA-Gevaert AG, Mortsel, Belgien
AGFA Developer for Curix 60 G153 For Medical X-Ray Film Processing	AGFA-Gevaert AG, Mortsel, Belgien
Aqua bidest	Braun AG, Melsungen, Deutschland
96-wel-Mikrotiterplatte	Falcon, BD Biosciences Labware, NJ, USA
BD Falcon (25 cm ²)	
50ml Falcon Tubes	Becton Dickinson Labware Franklin Lakes, NJ, USA
Safe-Lock Tubes (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

XCell SureLock™ Mini-Cell For leak free electrophoresis of mini-gels	Invitrogen Ltd., Paisley, UK
XCell IITM Blot Module	Invitrogen, Carlsbad, Kanada
Vortex Genie 2™	Scientific Industries, New York, USA
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waage Scout™ Pro SPU 123	OHAUS, Pine Brook, USA
Hettich-Zentrifugen Universal 16A	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Hettich-Zentrifugen EBA 12R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Schüttler	Heidolph GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Lambda Spectral 340 Microplate Spectrophometer	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Sigma Plot 2000	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland
Image J	Public domain/freie Software

2.5 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Thermo-Scientific-Objektträger	Menzel-Gläser, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Tissue Culture Dish 100 x 20 mm Style	Becton Dickinson Labware franklin Lakes, NJ, USA
HEPES 1M	Invitrogen, Paisley, UK
HBSS (Hanks' Balanced Salt solution) modified without phenol red and sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NCS (Newborn Calf Serum)	Gibco-Lifetechnologies Ltd., Paisley, UK
Filter System 500 ml, 0.22 µm filter	Corning Incorporated, NY, USA
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bcl-2 Family Rabbit Monoclonal Antibody Sample Kit (primär)	Epitomics Inc., Burlingame, USA
Texas Red Conjugated Secondary Anti-Rabbit Antibody (sekundär)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Immersion Oil For Fluorescence Microscopy Immersion Oil For Fluorescence Microscopy	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Scion Image	Public domain / freie Software

2.6 Small interfering (si)RNA Transfektion

Bax siRNA (h): sc-29212	Santa Cruz Biotechnology Inc., Europe
Control siRNA-A: sc-37007	Santa Cruz Biotechnology Inc., Europe
siRNA Dilution Buffer sc-45064	Santa Cruz Biotechnology Inc., Europe
siRNA Transfection Reagent sc-29528	Santa Cruz Biotechnology Inc., Europe
siRNA Transfection Medium sc-36868	Santa Cruz Biotechnology Inc., Europe

2.7 Statistik

SigmaStat	Jandel Scientific, Chicago, IL, USA
-----------	-------------------------------------

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Zellkulturen

3.1.1 Verwendete Tumorzelllinien

EPLC32M1-Zellen (NSCLC)

Die EPLC32M1-Tumorzelllinie wurde freundlicherweise von PD Dr. G. Jaques aus Marburg zur Verfügung gestellt. Die Zellen entstammen einer Lymphknoten-Metastase eines Patienten mit einem mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinom der Lunge vor Therapiebeginn. Um eine stabile Tumorzelllinie zu etablieren, wurden die Zellen in thymusaplastische Nacktmäuse transplantiert und die gewachsenen Tumore kultiviert. Bei EPLC32M1-Zellen handelt es sich um epitheloide Zellen mit adhärentem Wachstum. Morphologisch charakteristisch sind die Zellkerne, die ein regelmäßiges Chromatinmuster sowie perinukleäre Granulationen aufweisen und zwei oder mehr Nukleoli besitzen. Die Generationszeit liegt zwischen 16 und 20 Stunden und die Kolonieformationseffizienz beträgt 5,12 %. Die Tumorzellen exprimieren das c-MYC Onkogen und weitere biochemische Marker wie NSE (Neuron-specific enolase), hCG (Human chorionic gonadotropin), DDC (L-Dopa decarboxylase) und EGF (epidermal growth factor). Neben der Produktion von Procathepsin L (Vorläufer eines lysosomalen Cystein-Proteins) und Cathepsin B wurden immunhistochemisch Glukokortikoidrezeptoren nachgewiesen [115, 116, 117, 118]. Die Zelllinie wurde mit GFP (Green Fluorescence Protein) transfiziert. (Die zelllinienspezifischen Informationen wurden ebenfalls von Dr. G. Jaques bereitgestellt) GFP ist ein Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das erstmals 1961 von einem japanischen Biochemiker beschrieben wurde und bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert [119].

H1339-Zellen (SCLC)

Bei H1339 handelt es sich um eine Zelllinie des Kleinzelligen Lungenkarzinoms der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) [120]. Die Tumorzelllinie wurde 1986 aus dem Pleuraergusspunktat einer 49 Jahre alten Patientin mit fortgeschrittenem SCLC vor Therapiebeginn etabliert. Die Patientin sprach nur eingeschränkt auf die Chemotherapie an. Die Zellen sind epitheloidförmig und weisen ein adhärentes Wachstum in Monolayern auf. Die Verdopplungsrate liegt zwischen 50 und 90 Stunden. Immunhistochemisch reagiert die Zelllinie positiv auf Vimentin und negativ auf Cytokeratin-7, Cytokeratin-8, Cytokeratin-17, Cytokeratin-18, Desmin, Endothel, GFAF und Neurofilament (Herstellerinformationen der DSMZ).

NCI-H187-Zellen (SCLC)

Die humane SCLC-Tumorzelllinie NCI-H187 wurde ursprünglich von Dr. A. Gazdar und seinen Kollegen etabliert und uns freundlicherweise von Prof. Gudermann aus dem Institut für Physiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie entstammt den Zellen eines malignen Pleuraergusses, die einem 47-jährigen männlichen Patienten mit SCLC vor Beginn der Radiotherapie entnommen wurden [121]. Die Zellen weisen eine amorphe und unregelmäßige Form auf und wachsen in relativ dicht gepackten schwimmenden Zellaggregaten. NCI-H187-Zellen exprimieren vermehrt die vier biochemischen Marker des SCLC (Neuronen-spezifische Enolase, das Gehirn-Isoenzym der Kreatinkinase, L-Dopa-Carboxylase und die Bombesin-like Immunreaktivität) [122].

Tab. 1 Übersichtstabelle zu den verwendeten Tumorzelllinien

Zelllinie	EPLC32M1	H1339	NCI-H187
Karzinomtyp	Plattenepithelkarzinom	SCLC	SCLC
Bezugsquelle	Dr. Jaques, Marburg	DSMZ, Braunschweig	LMU, München
Herkunft	Lymphknoten-Metastase eines Patienten mit mäßig differenziertem Plattenepithelkarzinom der Lunge	Zellen aus dem Pleuraerguss einer Patientin mit SCLC	Zellen aus dem Pleuraerguss eines Patienten mit SCLC
Zellmorphologie	Epitheloid, Zellkerne mit regelmäßigem Chromatinmuster sowie perinukleären Granulationen und ≥ 2 Nucleoli	Epitheloidförmig	Amorphe und unregelmäßige Zellform
Wachstumsform	Adhärentes Wachstum, Monolayer	Adhärentes Wachstum, Monolayer	Relativ dicht gepackte, schwimmende Zellaggregate
Generationszeit	16 bis 20 Stunden	50 bis 90 Stunden	57 Stunden
KFE*	5,12 %	Keine Angaben.	Keine Angaben.

Immunhisto- chemische Charakterisierung	Expression der biochemischen Marker: NSE, hCG, DDC und EGF. Produktion von Procathepsin L und Cathepsin B. Expression des c-MYC Oncogens. Vorkommen von Glukokortikoid- rezeptoren.	Vimentin positiv. Cytokeratin-7, Cytokeratin-8, Cytokeratin-17, Cytokeratin-18, Desmin, Endothel, GFAP und Neurofilament negativ.	Expression der biochemischen Marker: NSE, Kreatinkinase (BB), L-Dopa Carboxylase und Bombesin-like Imunoreaktivität. Expression der Onkogene: c-kit und N-myc. Enthält Spuren von RB mRNA.
Besondere Merkmale	GFP (Green Fluorescence Protein)- transfiziert	Keine.	Keine.

*KFE = Kolonieformationseffizienz

3.1.2 Kultivierung

Sämtliche Arbeiten mit Tumorzellen wurden weitestgehend unter sterilen Bedingungen in einer Reinluftarbeitsbank (Flow) und unter Verwendung autoklavierter Substanzen und Geräte durchgeführt. Die Zellen wurden in 75 cm² großen Kulturflaschen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO² und 100 % Luftfeuchtigkeit in jeweils 15 ml Flüssigmedium. Hierfür wurde je nach Zelllinie ein spezielles RPMI-Tumormedium mit Zusätzen verwendet (siehe Tabelle 2). Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt. Das Wachstum der Zellen wurde unter 20-facher Vergrößerung mikroskopisch verfolgt. Bei annähernder Konfluenz wurden die Zellen gesplittet.

Tab. 2: Zusammensetzung der Nährmedien für die Zellkulturen

Bestandteil	EPLC32M1-Zellen	H1339- und NCI-H187-Zellen
RPMI 1640	500 ml	500 ml
FBS	50 ml	100 ml
L-Glutamin	5 ml	5 ml
Amphotericin B	2400 µl	2400 µl
Pen Strep	1200 µl	1200 µl

Splitten

Zunächst wurde das Medium abgezogen und die Wachstumsoberfläche dreimal mit PBS gespült. Um die adhärenen Zellen von der Wachstumsoberfläche zu lösen, wurden sie mit 5 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt und für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die gelösten Zellen wurden dann in ca. 3 ml frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe unten) wurde das berechnete Volumen auf neue Kulturflaschen verteilt. Abschließend wurden die Flaschen mit frischem Medium (Gesamtvolumen 15 ml) aufgefüllt und zur weiteren Kultivierung in den Brutschrank gestellt.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop die äußeren Quadranten (4 x 16 Felder) ausgezählt. Die Zellzahl/ml wurde unter Anwendung der folgenden Formel berechnet: $\text{Zellzahl der äußeren Quadranten} / 4 \times 10.000 = \text{Zellzahl/ml}$.

Aufbewahrung und Konservierung

Zur Konservierung für nachfolgende Versuche wurden Gefrierkulturen sämtlicher Zellreihen, einschließlich der resistenten Zellklone, angelegt. Dazu wurde als Erstes das Medium abgezogen und die Wachstumsoberfläche zweimal mit PBS gespült, um Rückstände und abgestorbene Zellen zu entfernen. Zum Ablösen adhärenter Zellen von der Wachstumsoberfläche wurden diese mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt und für 5 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden daraufhin in frischem Medium resuspendiert und für 10 Minuten bei 300 bis 400 g pelletiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Zellpellet in 1 ml frischem Medium gelöst. Dann wurde

die Zellsuspension mit DMSO (10 %) vermischt und in Kryoröhrchen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zum Wiederauftauen wurde das Kryoröhrchen in der Hand leicht angetaut und der Zellblock in Medium aufgelöst. Die Zellen wurden daraufhin zweimal für jeweils 5 bis 10 Minuten bei 300 bis 400 g pelletiert und anschließend in frischem Medium resuspendiert. Zuletzt wurde die Zellsuspension auf neue Kulturflaschen verteilt und frisches Medium hinzugefügt.

3.2 Herstellung Cisplatin-teilresistenter Zellklone

Zur Herstellung teilresistenter Zellklone wurde eine Chemotherapie mit vier „Zyklen“ Cisplatin gemäß dem nachfolgenden Versuchsprotokoll simuliert. Die Cisplatin-Behandlung erfolgte für EPLC32M1- und H1339-Zellen analog.

Versuchsprotokoll

Am Vortag wurden in 15 Kulturflaschen (75 cm^2) pro Zelllinie jeweils 300.000 Zellen ausgesät. Dann wurde zellspezifisch Medium hinzugefügt (Gesamtvolumen 15 ml) und die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Abnahme des alten Nährmediums folgte die Behandlung mit Cisplatin. Dazu wurden jeweils zehn Kulturflaschen pro Zelllinie mit $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Cisplatin in 5 ml zellspezifischem Nährmedium für 3 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Die restlichen Kulturflaschen, die als Kontrolle dienen, erhielten je 5 ml frisches Medium und wurden ebenfalls für 3 Stunden in den Brutschrank gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde bei den mit Cisplatin behandelten Zellen das Cisplatinhaltige Nährmedium abgenommen und 15 ml frisches Medium hinzugefügt. Analog dazu wurde bei den Kontrollzellen das alte Nährmedium verworfen und 15 ml frisches Medium dazugegeben. Anschließend wurde den Zellen eine Erholungszeit von sieben Tagen gewährt, bevor die bereits einmal mit Cisplatin vorbehandelten Zellen erneut mit 5 ml eines $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Cisplatinhaltigen Nährmediums, und die Kontrollzellen mit jeweils 5 ml frischem Medium für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Nach insgesamt vier Zyklen, wurden sowohl die Kontrollzellen als auch die bereits viermal mit Cisplatin vorbehandelten Zellen nach Abnahme des alten Mediums mit $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Cisplatin in 5 ml Nährmedium behandelt. Anschließend wurden die Überlebensraten zwischen naiven (d. h. unbehandelten) und vorbehandelten Zellen verglichen. Dazu wurde am Tag der Behandlung (Tag 0) die absolute Zellzahl von jeweils einer Kontroll - Kulturflasche und einer vorbehandelten - Kulturflasche, wie unter 3.1.2 beschrieben, bestimmt und 100 % gleichgesetzt. Auch an den vier Folgetagen (Tage 1 bis 4 nach Exposition) wurde jeweils die absolute Zellzahl einer Kontroll - und einer vorbehandelten - Kulturflasche bestimmt und in Relation zur jeweiligen Zellzahl von Tag 0 (entspricht 100 %) in Prozent ausgedrückt. Die Zellen der übrigen

vorbehandelten Kulturflaschen wurden, wie unter 3.1.2 beschrieben, geerntet und für nachfolgende Versuche als teilresistente Zellklone kryokonserviert.

3.3 Proteinanalytische Methoden

3.3.1 Proteinextraktion

Zur Vorbereitung auf den Western Blot galt es zunächst, Proteinlysate aus den Zellen zu gewinnen. Es wurde jeweils das Gesamtprotein der folgenden Zellreihen extrahiert:

EPLC32M1 Naiv	H1339 Naiv
EPLC32M1 Teilresistent	H1339 Teilresistent

Die Proteinextraktion erfolgte mit dem Cyto Buster™ Protein Extraction Reagent für lösliche Proteine nach dem Herstellerprotokoll der Firma Merck Biosciences. Das Protokoll wurde für die Extraktion von Zellen, die in Form eines Monolayers in Kulturflaschen mit einer Größe von 25 cm² wachsen, entsprechend modifiziert. Um den Abbau der Proteine durch Peptidasen zu verhindern, wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail hinzugefügt. Die gesamte Proteinextraktion erfolgte bei Raumtemperatur. Die erhaltenen Proteinlysate wurden direkt für die weitere Analyse verwendet oder bis dahin bei minus 20 °C eingefroren.

Versuchsprotokoll

Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. In einem Blue Cap wurden pro Kulturflasche jeweils 5 µl Protease Inhibitor in 500 µl Cyto Buster™ Protein Extraction Reagent gelöst. Anschließend wurden die Zellen gleichmäßig mit der Lösung bedeckt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Verbliebene adhärente Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Wachstumsoberfläche gelöst. Die Proteinsuspension wurde daraufhin in ein Eppendorfgefäß umgefüllt und für 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand, der dem Gesamtproteinextrakt entsprach, wurde mit der Pipette abgezogen und für nachfolgende Versuche auf neue Eppendorfgefäße verteilt.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinexpression der Bcl-2-Proteine zwischen naiven und teilresistenten Zellen mit einem Western Blot anhand der Schwärzung der Proteinbanden vergleichen zu können, wurden die Gelkammern der SDS-Gelelektrophorese mit der gleichen Proteinmenge beladen. Dazu wurde die Konzentration jedes einzelnen Proteinextrakts bestimmt. Anschließend wurden alle Extrakte mit dem Cyto Buster™ Protein Extraction Reagent auf die gleiche

Proteinmenge verdünnt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach unten stehendem Versuchsaufbau mit dem Non-Interfering Protein Assay Kit der Firma Merck Biosciences durchgeführt.

Versuchsprotokoll

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden zuerst 17 Eppendorfgefäße (2 ml) durchnummeriert. Für die Standard-Eichkurve wurden jeweils 50 µl Aqua bidest bzw. 50 µl des Standard Proteins in die ersten fünf Eppendorfgefäße, entsprechend den Angaben aus Tabelle 3, pipettiert.

Tab. 3: Verdünnungsreihe für die Standard-Eichkurve

Eppendorf Nr.	Standard Protein	Volumen Standard [µl]	Proteinkonzentration [µg/ml]
1	Aqua bidest	50	0
2	0,25	50	250
3	0,5	50	500
4	0,75	50	750
5	1,0	50	1000

Anschließend wurde die Verdünnungsreihe für die Proben angesetzt. Dazu wurde je nach Verdünnung ein unterschiedliches Probenvolumen, wie in Tabelle 4 angegeben, in die Eppendorfgefäße pipettiert.

Beschriftung der Proben:

EN: EPLC32M1 Naiv

HN: H1339 Naiv

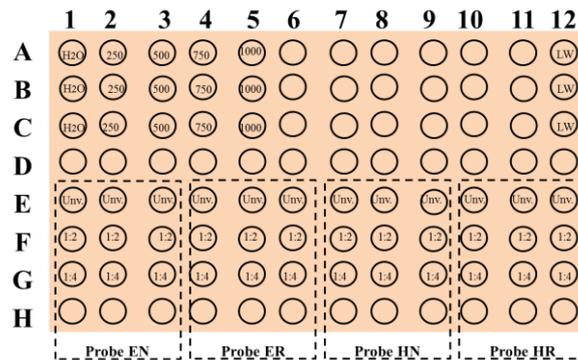
ER: EPLC32M1 Teilresistent

HR: H1339 Teilresistent

Tab. 4: Verdünnungsreihe für die Proben

Eppendorf Nr.	Probe	Volumen Probe [μ l]	Verdünnung
6	EN	50	1 : 1
7	EN	25	1 : 2
8	EN	12,5	1 : 4
9	ER	50	1 : 1
10	ER	25	1 : 2
11	ER	12,5	1 : 4
12	HN	50	1 : 1
13	HN	25	1 : 2
14	HN	12,5	1 : 4
15	HR	50	1 : 1
16	HR	25	1 : 2
17	HR	12,5	1 : 4

Im nächsten Schritt wurde 500 μ l UPPA-I zu jedem Proteinextrakt hinzugefügt und für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von jeweils 500 μ l UPPA-II. Anschließend wurden die Proteingemische mit dem Vortexer gemischt und für 8 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde die Reagenz-II angesetzt. Dazu wurde für jedes Proteingemisch jeweils 1 ml ColorAgent A mit 10 μ l ColorAgent B gemischt. Nach Abschluss der Zentrifugation wurde der Überstand aus den Eppendorfgläsern behutsam entfernt. Zu jedem Pellet wurden dann nacheinander 100 μ l Reagenz-I, 400 μ l Aqua bidest und 1 ml Reagenz-II hinzugefügt und zum Schluss mit dem Vortexer gemischt. Dann wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte gemäß dem Schema aus Abbildung 5 mit je 200 μ l Proteingemisch belegt.

Abb. 5: Belegungsplan der Mikrotiterplatte

Die Extinktion wurde in einem Zeitfenster von 15 bis 20 Minuten nach Beginn der Inkubation mit Reagenz-II im Spektrometer gemessen. Die Messwellenlänge betrug 490 nm gegen Aqua bidest als Referenzwellenlänge.

Auswertung

Mithilfe von SigmaPlot 2000 wurde eine Regressionsgerade aus den Standard Proteinkonzentrationen (y-Achse) und den gemessenen Absorbanswerten (x-Achse) erstellt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der linearen Regression aus den gemessenen Absorbanswerten und der verwendeten Verdünnung ermittelt.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden im elektrischen Feld mit der Gelelektrophorese nach ihrer Größe und Ladung im Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Vorbereitung der Proteinextrakte

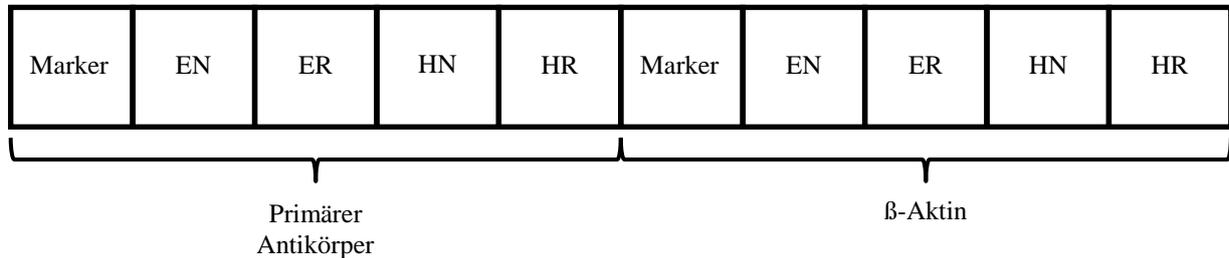
Zur Vorbereitung auf die Gelelektrophorese wurden die Proteinlysate nach der Ermittlung der jeweiligen Proteinkonzentration mit Cyto BusterTM Protein Extraction Reagent auf die gleiche Proteinmenge verdünnt. Dann wurden die Proben in einem Verhältnis von 1 : 1 mit Laemmli-Buffer gemischt. Anschließend wurden sie für 10 Minuten bei 85 °C im Heizblock erhitzt, 2 Minuten auf Eis gekühlt und nach kurzem Mischen mit dem Vortexer für 1 Minute bei 10.000 g zentrifugiert. Die fertigen Proben wurden dann auf Eis gesetzt und direkt für die Gelelektrophorese verwendet oder bis dahin bei minus 20 °C eingefroren.

Versuchsprotokoll

Als Erstes wurde der Laufpuffer, bestehend aus 1 ml Antioxidant und 50 ml Running Buffer, gelöst in 1 Liter Aqua bidest, hergestellt. Dann wurden die Probenaschen im Gel, wie in

Abbildung 6 dargestellt, mit 15 μ l Proteinmarker als Referenz und mit jeweils 30 μ l der Proteinproben und 30 μ l β -Aktin als Ladekontrolle befüllt.

Abb. 6: Pipettierschema für die Probentaschen der Gelelektrophorese



Daraufhin wurde die Elektrophoresekammer bis über den oberen Rand des Gels mit Laufpuffer befüllt. Um sicherzustellen, dass die Elektrophoresekammer keine undichten Stellen enthält, wurde das Gerät, das die Kammer umgab, mit Aqua bidest gefüllt. Sofern sich das Niveau der beiden Flüssigkeiten nicht anglich, konnte davon ausgegangen werden, dass die Kammer dicht war. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 150 Volt für 90 Minuten.

3.3.4 Western Blot und immunologischer Proteinnachweis

Mit der Western Blot-Analyse konnte die Expression der einzelnen Bcl-2-Proteine spezifisch in Bezug auf ihre Lokalisation nach Auftrennung im Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Dazu wurden die mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und die Proteinbanden mithilfe von spezifischen Antikörpern, die daran binden, identifiziert.

Versuchsprotokoll

Als Erstes wurde der Transferpuffer aus 500 μ l Antioxidant, 25 ml Transfer Buffer und 75 ml Methanol hergestellt und mit Aqua bidest (Gesamtvolumen 500 ml) gemischt. Anschließend wurde das Gel - nach Abschluss der Gelelektrophorese - in eine Schale mit Transferpuffer gelegt und für 30 Minuten auf den Schüttler gestellt. Um die Proteine von dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran zu transferieren, wurden die einzelnen Komponenten des Blotting Sandwich in Transferpuffer getränkt und in nachstehender Reihenfolge auf die Grafitelektrode der Elektro-Blot-Apparatur geschichtet.

- a) 2 Scotsch-Brite-Schwämme
- b) 1 Latmann-Papier
- c) Gel
- d) 1 Nitrocellulose-Membran

- e) 1 Latmann-Papier
- f) 2 Scotsch-Brite-Schwämme

Bei diesem Vorgang wurde darauf geachtet, dass die in Transferpuffer getränkten Komponenten zu keinem Zeitpunkt austrocknen und dass sich zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen bilden. Die Elektro-Blot-Apparatur wurde dann mit der zweiten Elektrode verschlossen, in die Transfer-Apparatur gestellt und vollständig mit Transferpuffer gefüllt. Das Gerät um die Elektro-Blot-Apparatur wurde zur Kühlung mit Aqua bidest aufgefüllt. Der Transfer erfolgte bei 30 Volt für 60 Minuten. In der Zwischenzeit wurden TBS-T und die Blocking-Lösung vorbereitet. Für die Herstellung von TBS-T wurden 10 ml Tween 20 10 % mit 100 ml 10 x TBS gemischt und mit Aqua bidest auf 1 Liter aufgefüllt. Die Blocking-Lösung wurde aus 5 g Magermilchpulver, die in 100 ml TBS-T gelöst wurden, angefertigt. Nach erfolgtem Proteintransfer von dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran wurde diese in TBS-T gewaschen und nach Zugabe von 20 ml Blocking-Lösung für 1 Stunde auf den Schüttler gestellt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte für 24 Stunden bei 6 bis 9 °C unter fortwährendem Schwenken. Die primären Antikörper wurden dazu in jeweils 15 ml Blocking-Lösung in folgenden Konzentrationen verdünnt:

Bad	1 : 2000	Bax	1 : 2000
Bag-1	1 : 1000	Bcl-2	1 : 1000
Bim	1 : 1000	Bcl-X _L	1 : 1000

Nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den Primärantikörpern wurde die Nitrocellulose-Membran einmal kurz und dreimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Schwenken mit jeweils 20 ml TBS-T gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Dazu wurde zunächst der an Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelte Ziege-Anti-Hase-IgG (Goat-Anti-Rabbit-IgG) -Antikörper in einer Konzentration von 1 : 5000 in 15 ml Blocking-Lösung verdünnt. Die Membran wurde dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut einmal schnell und dreimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Schwenken in 20 ml TBS-T gewaschen, um bis dahin ungebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte die Anfertigung der ECL-Lösung aus 5 ml Lösung A und 125 µl Lösung B. Die Membran wurde daraufhin für 5 Minuten in einem abgedunkelten Raum in ECL-Lösung gebadet und anschließend mit einer transparenten Folie bedeckt in eine Röntgenkassette gelegt. Nach Auflegen eines Röntgenfilms im Fotolabor wurde die Membran

mit einer variablen Belichtungszeit, die durch Ausprobieren ermittelt wurde (i. d. R. zwischen 1 bis 15 Minuten), belichtet. Direkt danach wurde der Film erst in Fixierlösung und dann in Entwicklerlösung gebadet und zum Trocknen aufgehängt. Schließlich waren die Proteinbanden auf dem Röntgenfilm an den Stellen der spezifischen Antikörperbindung als schwarze Banden sichtbar und konnten mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image J ausgewertet werden.

Für jedes Protein wurden insgesamt drei Western Blot-Analysen durchgeführt und aus den drei ermittelten Werten für die Proteinexpression jeweils der Mittelwert gebildet.

3.4 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Die Bcl-2-Proteine wurden in EPLC32M1- und H1339-Zellen analog mittels indirekter Immunfluoreszenz angefärbt. Anschließend wurde die Expression zwischen naiven und teilresistenten Zellen durch Messung von Intensitätsunterschieden verglichen.

Versuchsprotokoll

Am Vortag wurden für jedes zu untersuchende Protein jeweils vier sterile Objektträger (OT) pro Zellreihe, d. h. insgesamt 16 Objektträger, wie folgt beschriftet:

EN	(= EPLC32M1 Naiv)	3 OT
EN-K	(= EPLC32M1 Naiv Kontrolle)	1 OT
ER	(= EPLC32M1 Teilresistent)	3 OT
ER-K	(= EPLC32M1 Teilresistent Kontrolle)	1 OT
HN	(= H1339 Naiv)	3 OT
HN-K	(= H1339 Naiv Kontrolle)	1 OT
HR	(= H1339 Teilresistent)	3 OT
HR-K	(= H1339 Teilresistent Kontrolle)	1 OT

Dann wurden unter der Laminar-Flow Sterilbank nach Bestimmung der Zellzahl jeweils 50.000 Zellen der entsprechenden Zellreihe in 1 ml Zellsuspension auf die beschrifteten Objektträger pipettiert und für 120 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden sie vollständig mit Medium bedeckt und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Als Nächstes wurden die Lösungen für die Immunhistochemie gemäß den Angaben aus Tabelle 5 hergestellt.

Tab. 5 : Herstellung der Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung

100 ml HEPES 250 mM (pH 7,4)	
5,956 g	HEPES-Pulver
gelöst in 100 ml	Aqua bidest
eingestellt auf pH 7,4 mit	NaOH bzw. HCl
Steril filtriert in sterile Filterflasche	
1 Liter sHBSS (mit 25 mM HEPES)	
1 Fläschchen (9,7 g)	HBSS-Pulver
100 ml	HEPES Lösung (250 mM)
gelöst in 1 Liter	Aqua bidest
eingestellt auf pH 7,4 mit	NaOH bzw. HCl
Steril filtriert in sterile Filterflasche	

Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Objektträger zweimal in sHBSS gewaschen und für 5 Minuten in Aceton bei minus 20 °C fixiert. Dann folgte ein Waschgang in sHBSS mit 10 % NCS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurden die Primärantikörper nach den Empfehlungen des Herstellers mit einer Konzentration von 1 : 100 in sHBSS mit 10 % NCS verdünnt. Nach der Fixierung wurde darauf geachtet, dass die Objektträger zu keinem Zeitpunkt austrockneten. Die anzufärbenden Zellen wurden mit jeweils 1 ml der Primärantikörper-Lösung bedeckt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Kontrollen wurden mit 1 ml sHBSS (mit 10 % NCS und ohne den Primärantikörper) zu identischen Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Objektträger in sHBSS mit 10 % NCS für 10 Minuten gewaschen. Währenddessen wurde der Sekundärantikörper analog zur Primärantikörper-Lösung mit einer Konzentration von 1 : 100 in sHBSS mit 10 % NCS verdünnt. Alle Zellen einschließlich der Kontrollen wurden mit jeweils 1 ml der Sekundärantikörper-Lösung bedeckt und erneut für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal mit sHBSS mit 10 % NCS und einmal mit sHBSS (ohne NCS) gewaschen. Dann wurden die Objektträger vorsichtig abgetupft und mit einem Deckglas versehen. Hierbei diente DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) als Eindeckmittel zwischen Objektträger und Deckglas. Die Präparate wurden lichtgeschützt gelagert und zeitnah unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und ausgewertet. Dabei wurde die

Fluoreszenzintensität mit der Bildanalyse-Software Scion Image gemessen. Bei jedem Objektträger wurde die Fluoreszenzintensität in jeweils 20 Zellen gemessen, die Werte gemittelt und auf zwei Dezimalstellen gerundet.

3.5 Small interfering (si)RNA Transfektion

Zur Unterdrückung der Proteinexpression von Bax in naiven H1339- und NCI-H187-Zellen wurden die Zellen mit gegen Bax gerichteter siRNA entsprechend dem Herstellerprotokoll der Santa Cruz Biotechnology Inc. transfiziert. Die Volumina sowie die Zellzahl wurden für die Verwendung von 25 cm² großen Kulturflaschen angepasst. Die Konzentration für die siRNA wurde durch das Austesten verschiedener Konzentrationen ermittelt.

Versuchsprotokoll

Am Vortag wurden pro Kulturflasche (25 cm²) je 400.000 EPLC32M1-Zellen und je 500.000 H1339- und NCI-H187-Zellen ausgesät. Die verwendete Zellzahl wurde zuvor anhand von Wachstumskurven mit unterschiedlichen Anfangs-Zellzahlen ermittelt und so gewählt, dass die Zellen am Ende der Transfektion 80 bis 100 % konfluent waren. Für die Transfektion wurden insgesamt 12 Gruppen (siehe Tabelle 6) gebildet. Die Zellen wurden dementsprechend in 12 Kulturflaschen ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Da das Transfektionsmedium lichtempfindlich ist, wurde der gesamte Versuch in einem abgedunkelten Raum durchgeführt und die Kulturflaschen zwischen den Arbeitsschritten zusätzlich mit Alufolie umwickelt.

Tab. 6: Gruppen für die (si)RNA Transfektion

EPLC32M1	H1339	NCI-H187
Naiv Kontrolle	Naiv Kontrolle	Naiv Kontrolle
Resistent Kontrolle	Resistent Kontrolle	Resistent Kontrolle
Naiv + ntRNA	Naiv + ntRNA	Naiv + ntRNA
Naiv + siRNA Bad	Naiv + siRNA Bax	Naiv + siRNA Bax

Als Erstes wurde für jede zu transfizierende Kulturflasche eine Stammlösung A und eine Stammlösung B hergestellt. Für die Stammlösung A wurden pro Kulturflasche jeweils 20 µl Bax siRNA in 250 µl Transfektionsmedium bzw. für die Kontrollen 5 µl non-targeting (nt) RNA in 250 µl Transfektionsmedium gelöst. Die Stammlösung B wurde aus jeweils 15 µl siRNA Reagenz und 250 µl Transfektionsmedium pro Kulturflasche hergestellt. Anschließend

wurde die Stammlösung A mit der Stammlösung B durch behutsames auf- und abpipettieren gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die zu transfizierenden Zellgruppen wurden mit je 2 ml Transfektionsmedium einmal gewaschen und die Wachstumsoberflächen mit der entsprechenden Transfektionsreagenz (bestehend aus der Stammlösung A und B) gleichmäßig bedeckt. Daraufhin wurden die Zellen für 7 Stunden im Brutschrank inkubiert. Es folgte die Zugabe von jeweils 2,5 ml Transfektionsmedium pro Kulturflasche zusätzlich zur Transfektionsreagenz. Bei den Kontrollflaschen erfolgte zeitgleich ein Mediumwechsel. Das Transfektionsmedium wurde verworfen und zellspezifisches Medium mit der zweifachen Serum- und Antibiotikakonzentration hinzugegeben. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde bei allen Kulturflaschen ein Mediumwechsel mit zellspezifischem Medium mit zweifacher Serum- und Antibiotikakonzentration durchgeführt.

Schließlich wurde jeweils das Gesamtprotein, wie unter 3.3.1 beschrieben, extrahiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte analog dem Versuchsprotokoll von 3.3.2 Die Verdünnungsreihe für die Proben und der Belegungsplan für die 96-Well-Mikrotiterplatte wurden für die Proben der neu gebildeten Gruppen entsprechend erweitert. Die SDS-Gelelektrophorese und der Western Blot wurden, wie unter 3.3.3 und 3.3.4 beschrieben, durchgeführt. Die vorbereiteten Proteinproben wurden für die Gelelektrophorese in nachstehender Reihenfolge in die Probentaschen pipettiert: Marker, naiv Kontrolle, teilresistent Kontrolle, naiv + non-targeting (nt)RNA und naive + small interfering (si)RNA.

3.6 Statistische Auswertung

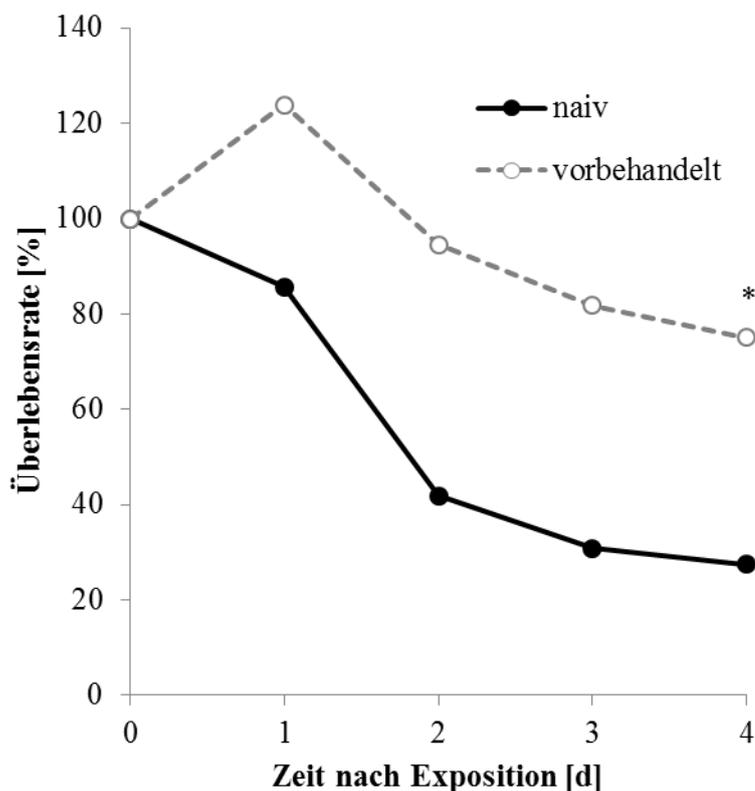
Die Daten wurden mit One-way oder Two-way ANOVA oder ANOVA Repeated Measurements (kombiniert mit mehrfach paarweisen Vergleichen) mit der SigmaStat-Software statistisch ausgewertet. Ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung Cisplatin-teilresistenter Zellklone

Zur Gewinnung Cisplatin-teilresistenter Zellen für die nachfolgenden Versuche wurden H1339-Zellen wiederholt mit 0,5 µg/ml Cisplatin für eine Dauer von jeweils drei Stunden behandelt. Die relative Resistenzentwicklung wurde anhand einer Überlebenskurve nach einer erneuten Behandlung mit Cisplatin verifiziert und mit der Überlebenskurve von naiven H1339-Zellen nach einmaliger Cisplatin-Applikation verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 grafisch dargestellt.

Abb. 7: Vergleich der Überlebensfraktionen vorbehandelter Zellen im Vergleich zu naiven Zellen der Zelllinie H1339 nach einer Inkubation mit 0,5 µg/ml Cisplatin für 3 Stunden

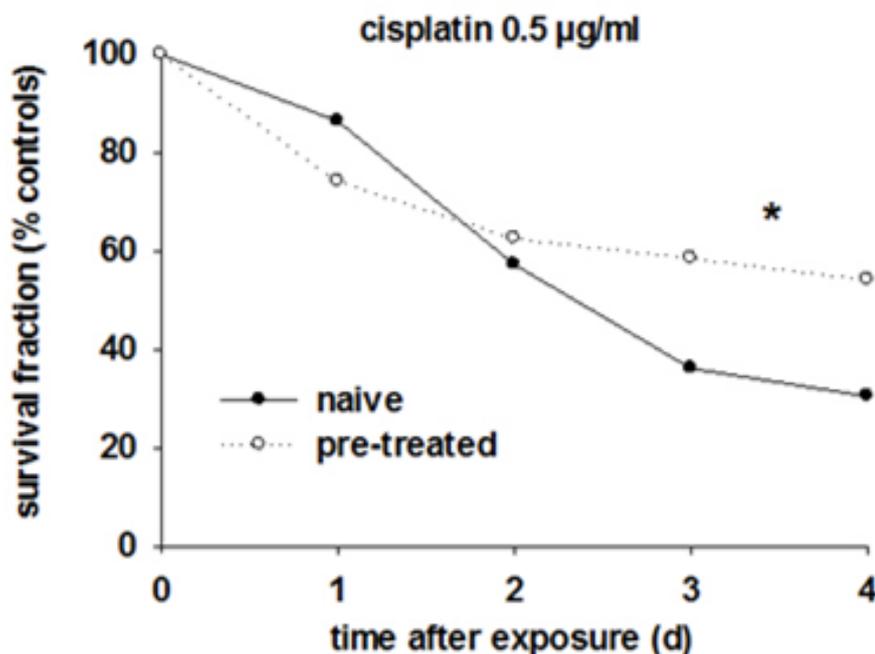


Die Grafik zeigt den Kurvenvergleich der Überlebensfraktionen von naiven und 4-fach mit 0,5 µg/ml Cisplatin vorbehandelten H1339-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit 0,5 µg/ml Cisplatin. Auf der x-Achse ist die Zeit nach der Exposition in Tagen (d) aufgetragen, auf der y-Achse die Überlebensfraktion der Zellen in Prozent (%) der 0-Kontrolle. Die kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie H1339 zeigt eine signifikant (* $P < 0,01$; Two-way ANOVA) größere Überlebensfraktion der vorbehandelten Zellen im Vergleich zu naiven Zellen.

Die kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie H1339 zeigt eine signifikant (* $P < 0,01$; Two-way ANOVA) größere Überlebensfraktion der vorbehandelten Zellen im Vergleich zu naiven Zellen. Folglich kann von einer relativen Resistenzentwicklung der 4-fach mit Cisplatin vorbehandelten Zellen ausgegangen werden. Sie werden daher im Folgenden als teilresistente Zellen bezeichnet. Die Cisplatin-Sensitivität wurde über fünf Passagen lang verfolgt. Dabei war keine Veränderung der relativen Cisplatin-Resistenz in teilresistenten Zellen zu beobachten.

Die teilresistenten Zellklone der NSCLC-Zelllinie EPLC32M1 wurden freundlicherweise von Dr. Kathrin Schrödl und Hamza Oelmez zur Verfügung gestellt. Die relative signifikante Resistenz der Zellen wurde bereits vorher (siehe Abbildung 8 [114]) von unserer Forschungsgruppe unter Anwendung der gleichen Methodik nachgewiesen.

Abb. 8: Vergleich der Überlebensfraktionen vorbehandelter Zellen im Vergleich zu naiven Zellen der Zelllinie EPLC32M1 nach einer Inkubation mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin für 3 Stunden

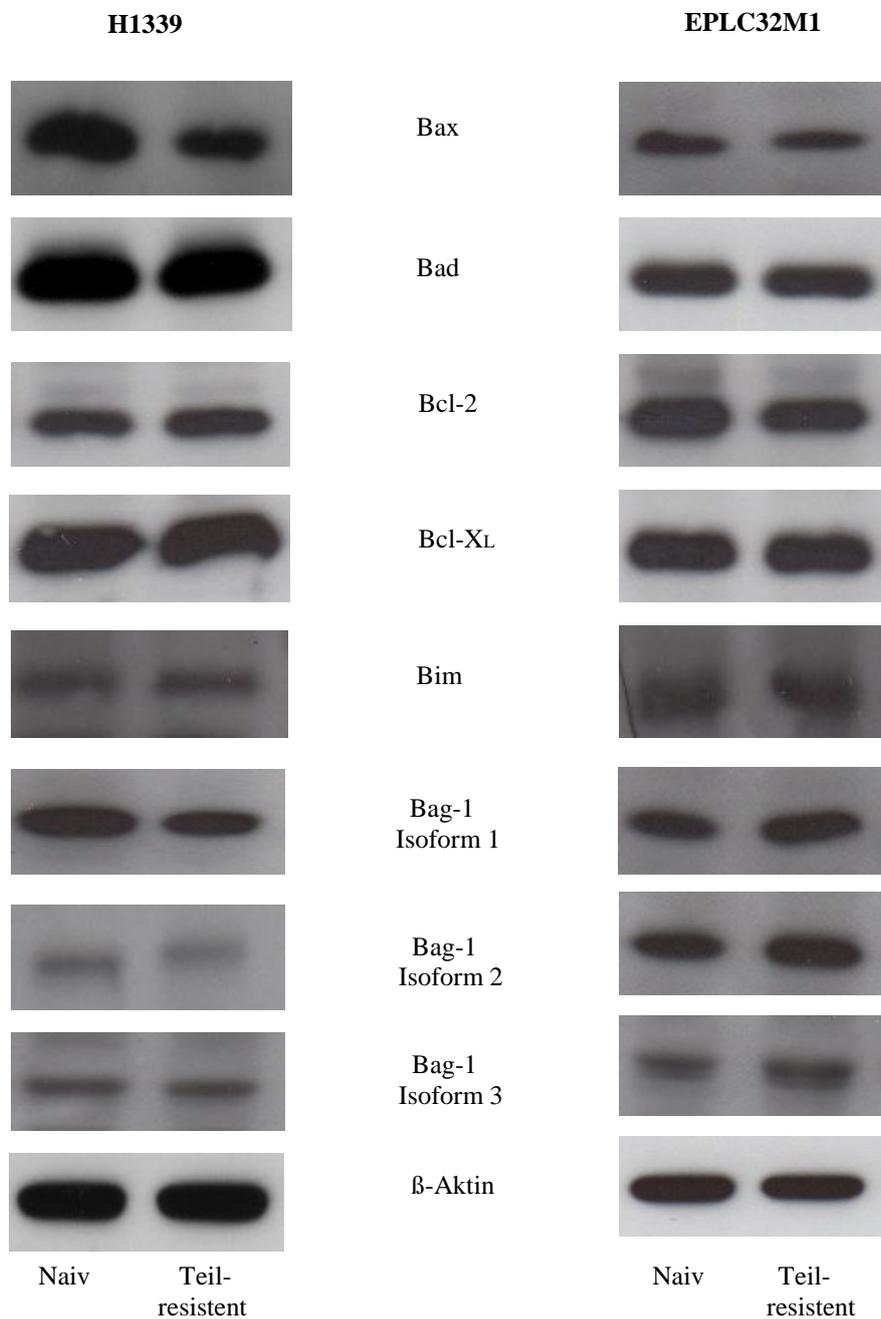


Die Grafik zeigt den Kurvenvergleich der Überlebensfraktionen von naiven und 4-fach mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin vorbehandelten EPLC32M1-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin. Auf der x-Achse ist die Zeit nach der Exposition in Tagen (d) aufgetragen, auf der y-Achse die Überlebensfraktion der Zellen in Prozent (%) der 0-Kontrolle. Die nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie EPLC32M1 zeigt eine signifikant (* $P < 0,05$; Two-way ANOVA) größere Überlebensfraktion der vorbehandelten Zellen im Vergleich zu naiven Zellen.

4.2 Western Blot

Mit einer Western Blot-Analyse wurde die Expression von Bcl-2-Proteinen in naiven und teilresistenten H1339- und EPLC32M1-Zellen verglichen. Dabei wurden die folgenden Proteine getestet: die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) und Bcl-X_L (B-cell lymphoma-extra large) sowie die pro-apoptotischen Proteine Bax (Bcl-2 associated X protein), Bad (Bcl-2 antagonist of cell death), Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) und die drei Isoformen von Bag-1 (Bcl-2 associated athanogene 1). Als Ladekontrolle diente β -Actin. In Abbildung 9 sind die Proteinbanden beispielhaft dargestellt.

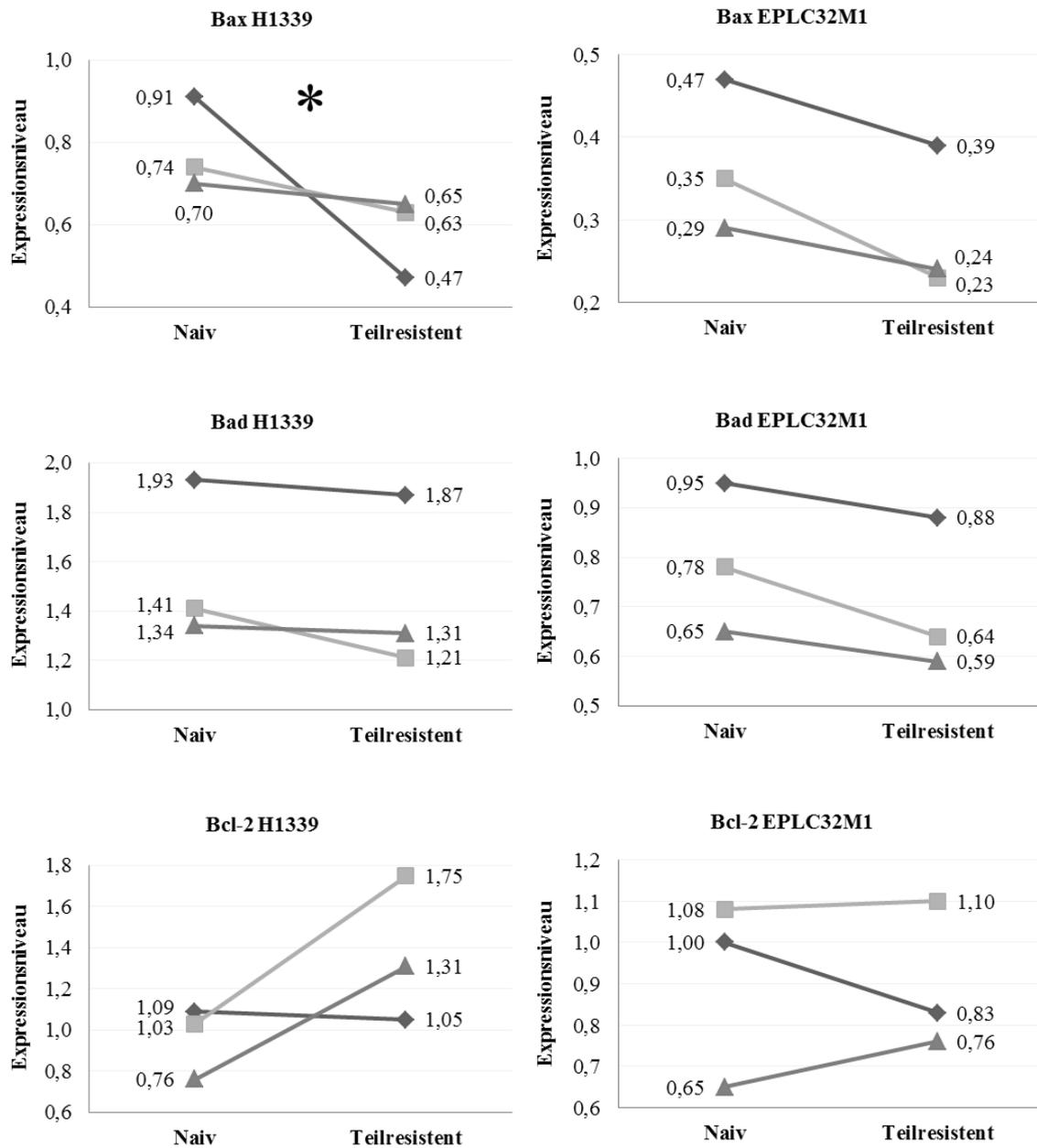
Abb. 9: Ergebnisse des Western Blot

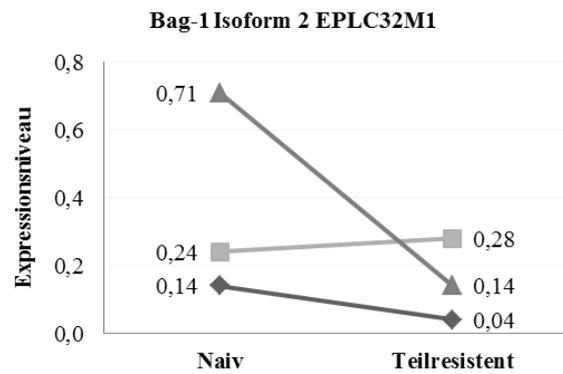
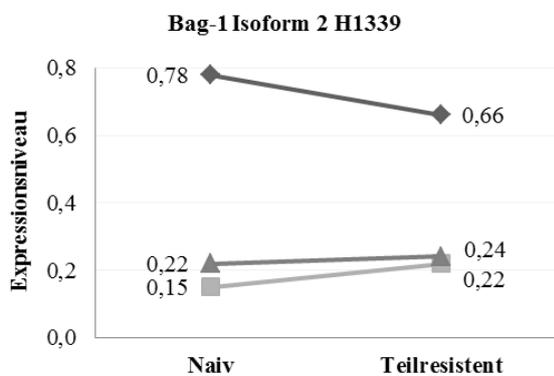
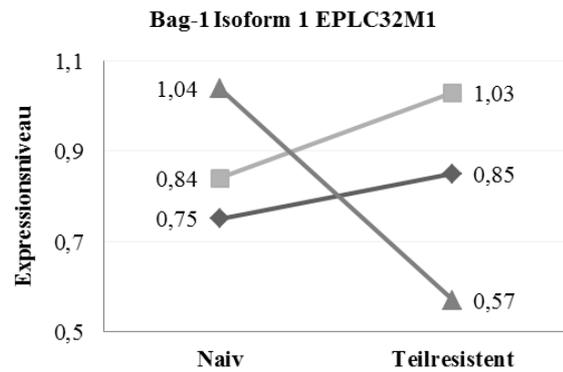
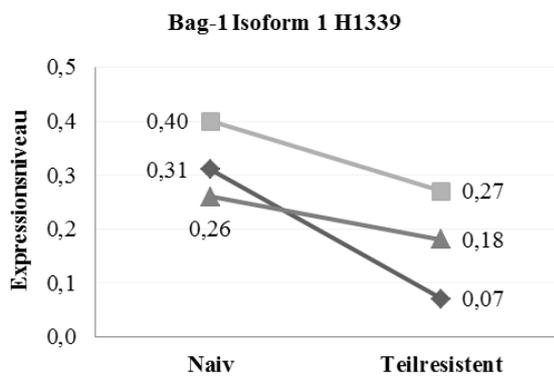
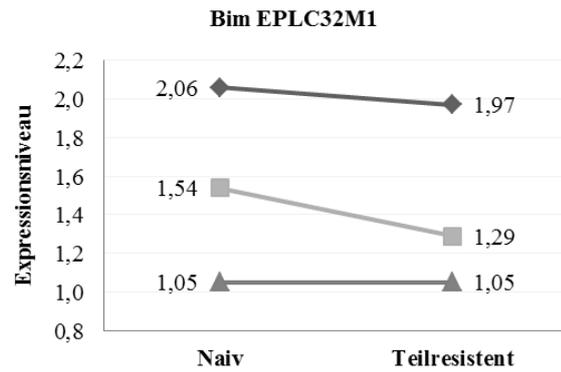
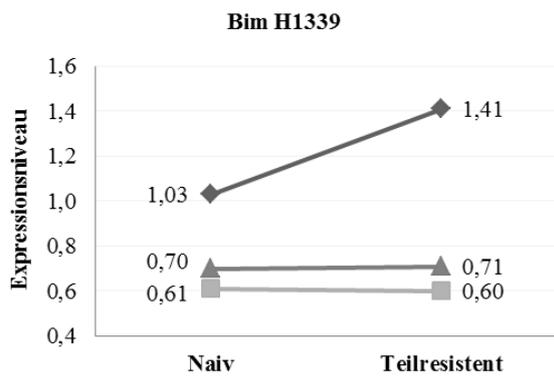
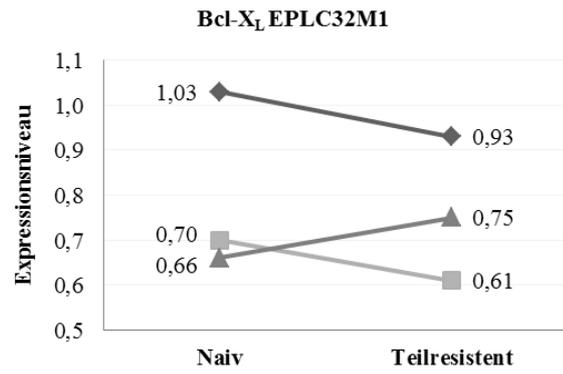
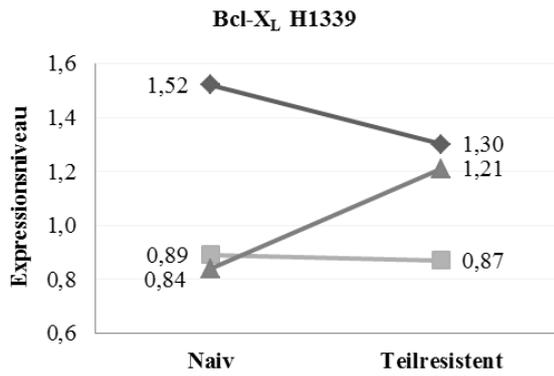


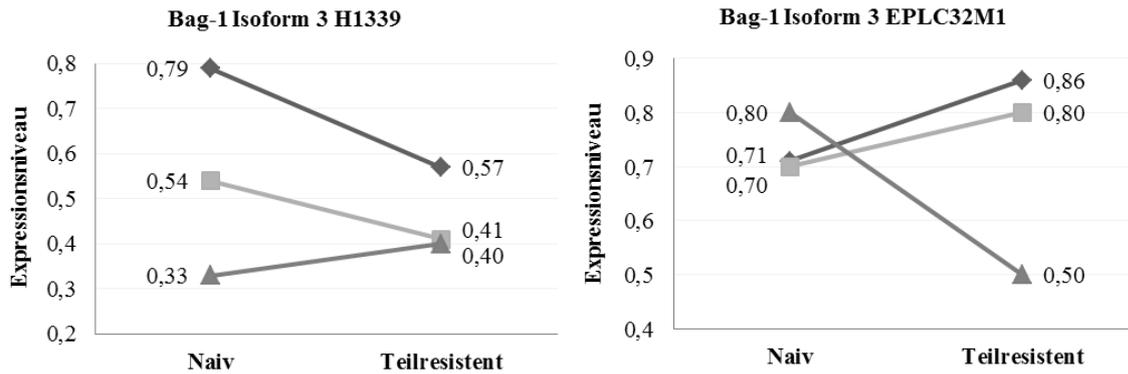
Die Abbildung zeigt jeweils ein Bild der Proteinbanden der getesteten Bcl-2-Proteine in naiven und teilresistenten H1339- und EPLC32M1-Zellen sowie der Ladekontrolle mit β -Aktin.

Nachfolgend ist die Auswertung der Western Blot-Analysen in Abbildung 10 dargestellt.

Abb. 10: Grafische Darstellung der Western Blot-Ergebnisse







Die Abbildung zeigt das Expressionsniveau der untersuchten Bcl-2 Proteine bzw. deren Isoformen in H1339- und EPLC32M1-Zellen. Dazu wurde die Dichteintensität der Proteinbanden im Western Blot gemessen und zwischen naiven und teilresistenten Zellen verglichen. Jede Einzelabbildung stellt drei Replikate dar. Auf der x-Achse sind jeweils die naiven unbehandelten Zellen und die teilresistenten mit Cisplatin vorbehandelten Zellen aufgetragen. Auf der y-Achse ist die entsprechende Dichteintensität der Schwärzung der Proteinbande des Western Blot Films als Maß für die Proteinexpression in Prozent der naiven Zellen angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede ($P < 0,05$; Paired t-Test) sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet.

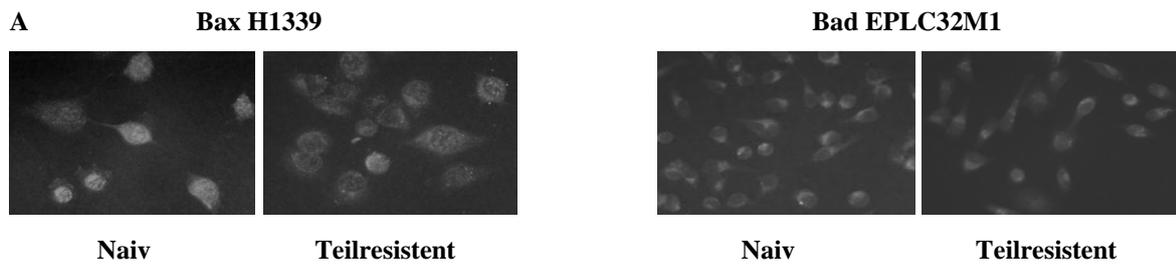
Bei den EPLC32M1-Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($n = 3$, * $P < 0,05$; Paired t-Test) in der Expression von Bax, Bad, Bcl-2, Bcl-X_L, Bim, Bag-1 Isoform 1, Bag-1 Isoform 2 und Bag-1 Isoform 3.

Die Western Blot-Analyse der H1339-Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede ($n = 3$, * $P < 0,05$; Paired t-Test) im Expressionsniveau von Bad, Bcl-2, Bcl-X_L, Bim, Bag-1 Isoform 1, Bag-1 Isoform 2 und Bag-1 Isoform 3 zwischen naiven und teilresistenten Zellen. Allerdings konnte im Vergleich zu naiven Zellen eine signifikant ($n = 3$, * $P < 0,05$; Paired t-Test) niedrigere Expression von Bax in teilresistenten Zellen nachgewiesen werden.

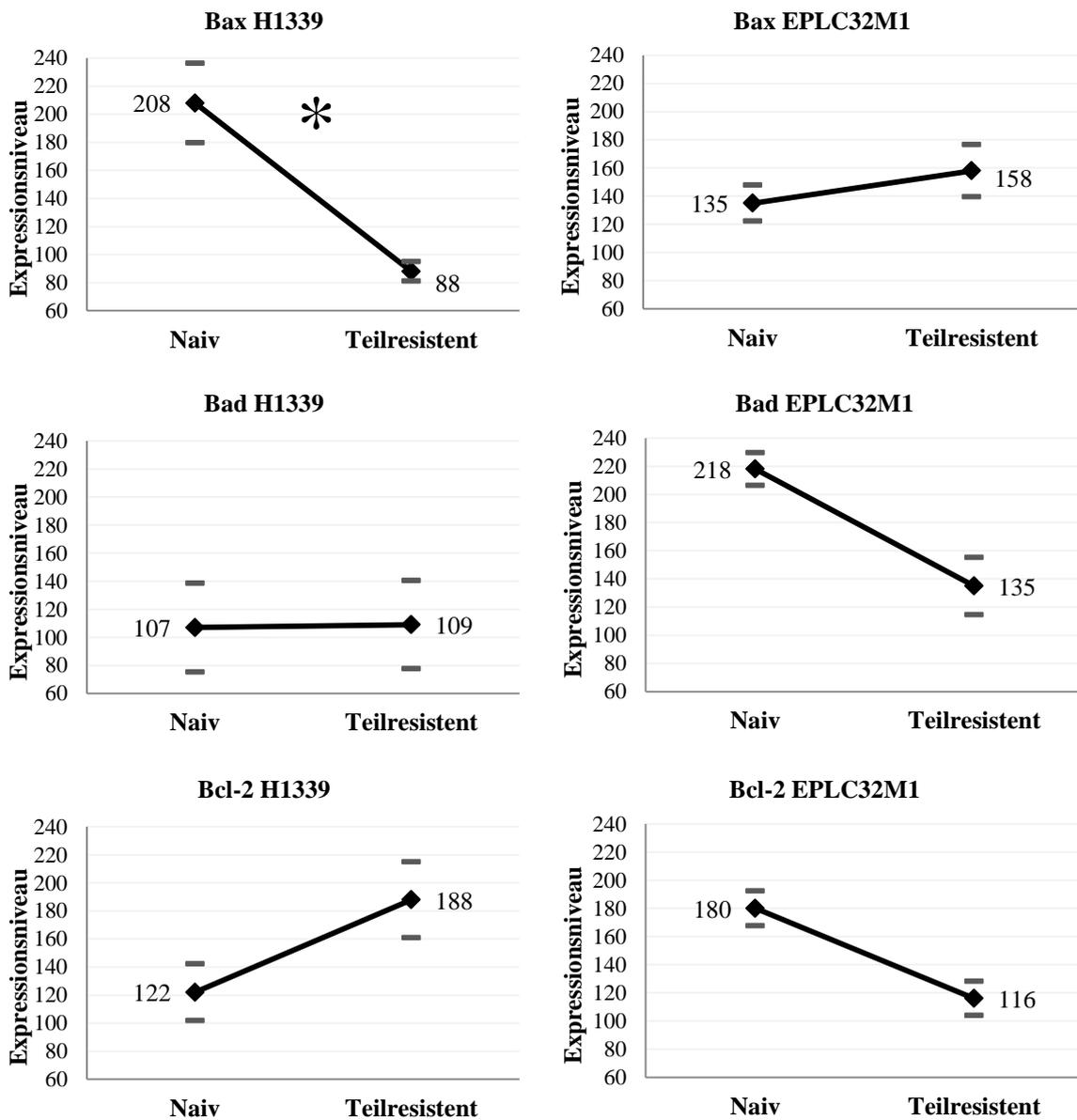
4.3 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

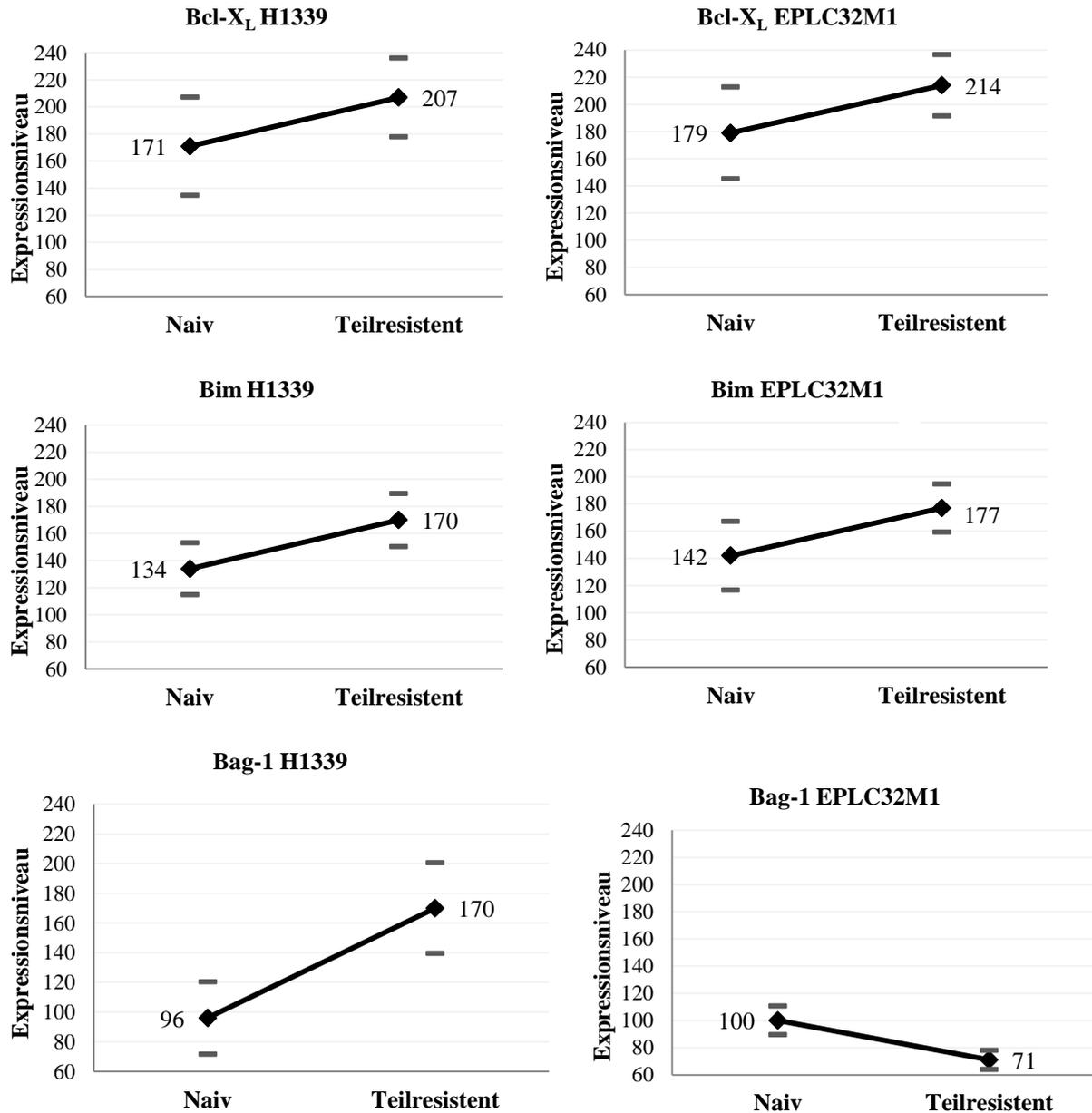
Um die Ergebnisse der Western Blot-Analysen durch eine weitere Methode zu bestätigen, wurden die Proteine Bax, Bad, Bcl-2, Bcl-X_L, Bim und Bag-1 jeweils in naiven und teilresistenten Zellen der Zelllinien EPLC32M1 und H1339 mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzfärbung beispielhaft bildlich und grafisch dargestellt.

Abb. 11: Darstellung der Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzfärbung



B





Die Abbildung zeigt das Expressionsniveau der untersuchten Bcl-2 Proteine in H1339- und EPLC32M1-Zellen. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität der immunhistochemisch gefärbten Proteine gemessen und zwischen naiven und teilresistenten Zellen verglichen. Die gezeigten Werte stellen die Mittelwerte aus 20 durchgeführten Messungen dar mit der jeweiligen Standardabweichung, die durch Balken gekennzeichnet ist. Auf der x-Achse sind jeweils die naiven unbehandelten Zellen und die teilresistenten mit Cisplatin vorbehandelten Zellen aufgetragen. Auf der y-Achse ist die entsprechende Leuchtintensität der Immunfluoreszenz als Maß für die Proteinexpression angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede ($P < 0,05$; Paired t-Test) sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet.

Bei der Expressionsanalyse der Bcl-2-Proteine in EPLC32M1-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau von Bax, Bcl-2, Bcl-X_L, Bim und Bag-1 ($n = 20$, * $P < 0,05$; Paired t-Test)

zwischen naiven und teilresistenten Zellen. Die Expression von Bad ($n = 20$, * $P < 0,05$; Paired t-Test) war in teilresistenten EPLC32M1-Zellen signifikant vermindert im Vergleich zu naiven Zellen dieser Zelllinie.

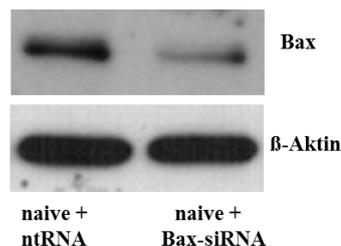
In H1339-Zellen war die Expression von Bax ($n = 20$, * $P < 0,01$; Paired t-Test) in teilresistenten Zellen im Vergleich zu naiven Zellen vermindert. Bei der Expression von Bad, Bcl-2, Bcl-X_L, Bim und Bag-1 ($n = 20$, * $P < 0,05$; Paired t-Test) waren keine signifikanten Unterschiede zwischen naiven und teilresistenten Zellen zu beobachten.

In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich sowohl in der Western Blot-Analyse als auch bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung eine signifikant verminderte Expression von Bax in teilresistenten H1339-Zellen im Vergleich zu naiven Zellen. Als Nächstes galt es zu testen, ob eine verminderte Expression des pro-apoptotischen Bax für die Resistenzentwicklung in H1339-SCLC-Zellen verantwortlich ist. Die verminderte Expression von Bad in teilresistenten EPLC32M1-Zellen zeigte sich lediglich in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung, konnte im Western Blot jedoch nicht bestätigt werden und wurde daher nicht weiter untersucht.

4.4 Auswirkungen einer verminderten Bax-Proteinexpression auf die Cisplatin-Sensitivität in H1339-SCLC-Zellen

Um die Expression von Bax in H1339-SCLC-Zellen zu reduzieren, wurden naive Zellen mit gegen Bax gerichteter siRNA transfiziert. Der Erfolg der siRNA-Transfektion wurde mit einem Western Blot verifiziert. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 12 dargestellt, eine verminderte Bax-Proteinexpression in transfizierten H1339-Zellen im Vergleich zu den mit non-targeting (nt)RNA behandelten Kontrollzellen.

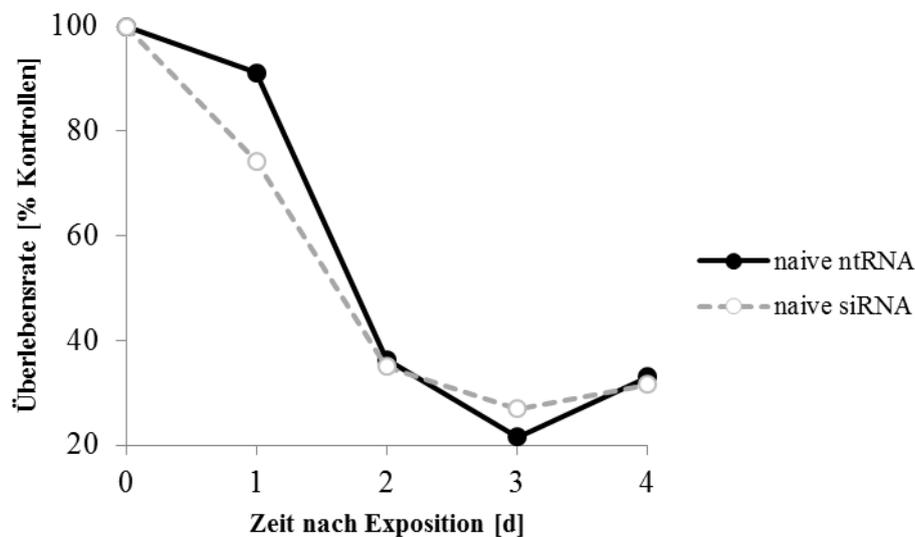
Abb. 12: Expressionsanalyse von Bax mittels Western Blot in H1339-Zellen nach der siRNA Transfektion



Die Abbildung zeigt eine verminderte Expression von Bax in naiven H1339-SCLC-Zellen, die 24 Stunden lang mit 10 μM Bax-Small interfering (si)RNA transfiziert wurden, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit 10 μM non-targeting (nt)RNA inkubiert wurden. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Anschließend wurden die mit Bax siRNA-transfizierten Zellen sowie die mit ntRNA behandelten Kontrollzellen mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin behandelt. Abbildung 13 zeigt den Kurvenvergleich der Überlebensraten.

Abb. 13: Überlebenskurven der mit siRNA transfizierten H1339-Zellen nach einer Inkubation mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin



Die Grafik zeigt den Kurvenvergleich der Überlebensraten von naiven, mit Bax siRNA transfizierten H1339-SCLC Zellen und naiven, mit ntRNA behandelten Kontrollzellen nach Inkubation mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin für 3 Stunden. Auf der x-Achse ist die Zeit nach der Exposition in Tagen (d) eingetragen, auf der y-Achse die Überlebensfraktion der Zellen in Prozent (%) der 0-Kontrolle.

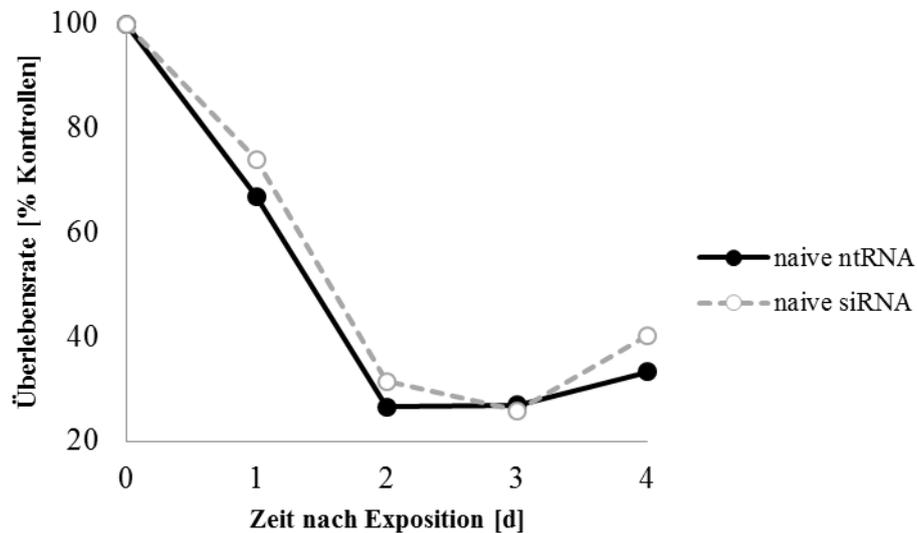
Der Kurvenvergleich zwischen naiven, mit Bax siRNA-transfizierten H1339-SCLC- und naiven, mit ntRNA-behandelten Kontrollzellen zeigte keinen signifikanten Unterschied der prozentualen Überlebensraten. Demzufolge ist eine verminderte Expression von Bax in H1339-Zellen alleine nicht ausreichend für eine Veränderung der Cisplatin-Sensitivität.

4.5 Auswirkungen einer verminderten Bax-Proteinexpression auf die Cisplatin-Sensitivität in NCI-H187-SCLC Zellen

Der Effekt einer gegen Bax gerichteten siRNA-Transfektion auf die Cisplatin-Sensitivität wurde bei einer weiteren Zelllinie des kleinzelligen Lungenkarzinoms untersucht. Dazu wurden naive NCI-H187-Zellen für 24 Stunden mit 10 μM Bax siRNA und die Kontrollzellen

mit 10 μM ntRNA transfiziert. In Abbildung 14 sind die prozentualen Überlebensraten nach einer Inkubation mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin dargestellt.

Abb. 14: Überlebenskurven der mit siRNA transfizierten NCI-H187-Zellen nach einer Inkubation mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin



Die Grafik zeigt den Kurvenvergleich der Überlebensraten von naiven, mit Bax siRNA transfizierten NCI-H187-SCLC-Zellen und naiven, mit ntRNA behandelten Kontrollzellen nach einer Inkubation mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin für 3 Stunden. Auf der x-Achse ist die Zeit nach der Exposition in Tagen (d) aufgetragen, auf der y-Achse die Überlebensfraktion der Zellen in Prozent (%) der 0-Kontrolle.

In NCI-H187-SCLC-Zellen führte eine gegen Bax gerichtete siRNA-Transfektion zu keiner Veränderung der Cisplatin-Sensitivität.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Verwendete Tumorzelllinien

Um die Bedeutung der Bcl-2-Proteinfamilie bei der Resistenzentwicklung auf Cisplatin bei Lungenkarzinomzellen zu untersuchen, wurden Monolayer-Zellkulturen etablierter Tumorzelllinien angelegt. Dabei wurde für NSCLC die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie EPLC32M1 und für SCLC die Tumorzelllinie H1339 gewählt. Die Gründe hierfür waren eine gute Differenzierung, ein relativ schnelles Wachstum und die wenig aufwändige Kultivierung dieser Zelllinien.

Die Expressionsanalyse der Bcl-2-Proteine ergab eine signifikant verminderte Expression von Bax in teilresistenten H1339-Zellen im Vergleich zu naiven Zellen, die jedoch zu keiner Veränderung der Cisplatin-Sensitivität führte. In einer weiteren SCLC-Tumorzelllinie, der NCI-H187-Zelllinie, hatte eine gegen Bax gerichtete siRNA-Transfektion ebenfalls keinen Einfluss auf das Überleben von NCI-H187-Zellen nach einmaliger Cisplatin-Behandlung. Bei diesem Ergebnis ist zu beachten, dass das Gelingen der Transfektion nicht gesondert verifiziert wurde. Ein Grund für die erneute Durchführung der siRNA-Transfektion bei einer zweiten SCLC-Zelllinie ist die Tatsache, dass etablierte Tumorzelllinien des SCLC morphologische und biochemische Unterschiede aufweisen. Diese können das Ansprechen auf zytotoxische Therapien beeinflussen [121]. Daher wurde die Transfektion mit gegen Bax gerichteter siRNA bei der NCI-H187-Zelllinie des SCLC wiederholt und der Einfluss auf die Cisplatin-Sensitivität getestet. Die NCI-H187-Zelllinie wurde ausgewählt, da sie eine klassische Zelllinie des SCLC ist, die alle vier Biomarker des SCLC exprimiert [121] und für die Durchführung von Transfektionen geeignet ist [120].

Trotz der genannten Vorteile besitzen *in vitro* kultivierte Tumorzelllinien durch die veränderten Eigenschaften nur noch wenige Gemeinsamkeiten mit dem Primärtumor. Daher lassen sich die Ergebnisse nur bedingt auf Karzinome *in vivo* übertragen [123]. Während spezielle Gegebenheiten das Anlegen und Erhalten von Zelllinien *in vitro* fördern, wie z. B. die spezifische Zusammensetzung des Nährmediums, sind diese Charakteristika für das Wachstum und die Ausbreitung von Tumorzellen *in vivo* nicht nötig. Lee *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass Nährmedien signifikante Veränderungen der Genexpression und chromosomale Veränderungen im Vergleich zu den ursprünglichen Patientenproben induzieren [124]. Für die verwendeten Zelllinien liegen nach dem Wissensstand der Autorin

bisher keine vergleichbaren Ergebnisse vor. Allerdings hat die Forschungsgruppe von Edelmann *et al.* dreidimensionale Organkulturen für GFP-transfizierte EPLC32M1-Zellen entwickelt [125], mit der die *In-vivo*-Situation besser nachgeahmt wird als in herkömmlichen Monolayer-Kulturen [126].

5.1.2 Herstellung Cisplatin-teilresistenter Zellklone

Cisplatin ist eines der effektivsten und am häufigsten eingesetzten Zytostatika bei der Therapie des kleinzelligen- und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. Dabei erhalten die Patienten in der Regel vier bis maximal sechs Zyklen Chemotherapie. Normalerweise wird die Behandlung nach spätestens sechs Zyklen beendet und bis zur Progression oder dem Auftreten eines Rezidivs pausiert [16, 28]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen mit vier Zyklen Chemotherapie behandelt. Die Inkubationsdauer von jeweils drei Stunden wurde basierend auf den Ergebnissen einer von de Jongh *et al.* durchgeführten Studie gewählt [57]. Die Forschungsgruppe hat eine Analyse von 268 erwachsenen Patienten mit soliden Tumoren durchgeführt, die in verschiedenen prospektiven Studien entweder mit einer Cisplatin-Monotherapie oder einer Cisplatin-basierten Kombinationstherapie behandelt worden waren. Die Mehrzahl dieser Patienten war an einem NSCLC erkrankt ($n = 80$). Cisplatin wurde dabei entweder wöchentlich ($n = 93$) oder in dreiwöchigen Abständen ($n = 175$) in einer Dosierung von $50 - 100 \text{ mg/m}^2$ Körperoberfläche in Form einer kontinuierlichen, drei-stündigen Infusion appliziert. Dabei schwankte die gemessene Plasmakonzentration von ungebundenem Cisplatin zwischen $0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ und $2,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Die höchste Konzentration wurde ca. 3 Stunden nach intravenöser Gabe erreicht und fiel danach rasch ab [57]. Eine Studie unserer Forschungsgruppe hat gezeigt, dass eine Cisplatin-Konzentration von $0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ausreichend für eine relative Resistenzentwicklung der Zellen ist [114]. Als zeitlichen Abstand zwischen den Behandlungen haben wir, wie auch de Jongh und seine Kollegen, einen Zeitraum von 7 Tagen gewählt. Dreiwöchige Abstände hätten zu einer Konfluenz der Zellen von über 100 % geführt und die Zellen hätten gesplittet werden müssen. Gehäuftes Passagieren der Zellkulturen führt jedoch zu einem starken Selektionsdruck mit der Gefahr der Entstehung neuer Subklone, die sich genotypisch und phänotypisch vom Ursprungstumor unterscheiden können [127]. Cisplatin-teilresistente EPLC32M1-Zellen wurden freundlicherweise von unserer Forschungsgruppe zur Verfügung gestellt. Naive H1339-Zellen wurden, wie unter 3.2. beschrieben, wiederholt mit Cisplatin behandelt. Die Teilresistenz der vierfach mit Cisplatin vorbehandelten Zellen wurde durch einen Vergleich der Überlebenskurve nach erneuter Cisplatin-Behandlung mit der Überlebenskurve von naiven H1339-Zellen nach einmaliger Cisplatin-Behandlung verifiziert. Auf eine zweimalige Wiederholung des

Versuches wurde aus Zeit- und Kostengründen verzichtet. Die Forschungsgruppe arbeitet seit langem mit Cisplatin-teilresistenten H1339-Zellen und die Methode hatte sich im Vorfeld mehrfach bewährt [128].

5.1.3 Expressionsanalysen der Bcl-2-Proteine

Unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern wurde die Expression einzelner Bcl-2-Proteine mithilfe von Western Blot-Analysen und indirekter Immunfluoreszenzfärbung in naiven und teilresistenten H1339- und EPLC32M1-Zellen bestimmt. Anschließend wurde jeweils die Proteinexpression zwischen naiven und teilresistenten Zellen verglichen.

Da sowohl unterschiedliche Zellzahlen als auch uneinheitliche Zellvolumina die exprimierte Proteinmenge beeinflussen würden, wurde vor der Western Blot-Analyse die Proteinmenge jeder einzelnen Probe des extrahierten Gesamtproteins bestimmt. Um die Proteinmenge so genau wie möglich zu determinieren, wurde ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Damit wurden dann die Proteinmengen der Proben anhand von Eichkurven aus gemessenem Standardprotein berechnet. Anschließend wurden die Proteinextrakte auf die gleichen Volumina verdünnt, bevor sie in die Gelkammern für die Gelelektrophorese aufgetragen wurden. Somit war nach der Entwicklung des Western Blot-Films über die Messung der Dichteintensität der Schwärzung der Proteinbanden ein direkter Expressionsvergleich zwischen naiven und teilresistenten Zellen möglich.

Um die Ergebnisse der Western Blot-Analysen zu verifizieren, wurde die Expression der Bcl-2-Proteine zusätzlich mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung untersucht und das Expressionsniveau zwischen naiven und teilresistenten Zellen verglichen. Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung ist generell eine mögliche Unspezifität der Antikörper zu bedenken. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb monoklonale Antikörper verwendet, um unspezifische Bindungen möglichst gering zu halten. Die Expressionsanalyse erfolgte durch die Messung von Fluoreszenzintensitätsunterschieden des jeweils angefärbten Proteins mit Scion Image. Dabei wurden pro Bcl-2-Protein jeweils drei Objektträger angefertigt und die Fluoreszenzintensität von insgesamt 20 Zellen gemessen, um möglichst genaue Messwerte zu erhalten. Die Auswahl der Messpunkte erfolgte subjektiv nach Augenmaß. Dabei wurde darauf geachtet, möglichst eindeutige und im Vergleich zur umgebenden Zelle klar abgegrenzte Fluoreszenzsignale auszuwählen. Zudem wurde die Messung von der gleichen Person und zu gleichen Bedingungen bei naiven und teilresistenten Zellen durchgeführt.

Zusammenfassend ergab die Expressionsanalyse eine verminderte Expression von Bax in teilresistenten H1339-Zellen im Vergleich zu naiven Zellen. Diese Verminderung der Proteinexpression könnte zum einen ursächlich am apoptotischen Zelltod beteiligt gewesen oder aber als unspezifische Konsequenz des offenkundigen Zellschadens durch die 4-fache Vorbehandlung mit Cisplatin entstanden sein. Auf der Grundlage rein biochemischer Methoden lassen sich diesbezüglich keine Rückschlüsse ziehen, da diese Untersuchungen sämtliche Zellen unabhängig von der Zellintegrität einbeziehen.

5.1.4 Small interfering (si)RNA Transfektion und Überlebenskurven

Um zu testen, ob eine verminderte Expression des pro-apoptischen Bax für die relative Resistenzentwicklung auf Cisplatin in H1339-SCLC-Zellen verantwortlich ist, gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Zum einen hätte man die Expression von Bax in resistenten Zellen erhöhen können, um so die Cisplatin-Sensitivität wiederherzustellen. Oder aber, man vermindert das Expressionsniveau von Bax in naiven H1339-Zellen und untersucht, ob es bei wiederholter Exposition mit Cisplatin zu einer Resistenzentwicklung kommt. Für diese Variante haben wir uns in der vorliegenden Arbeit entschieden. Dabei stellt die Transfektion mit einer spezifischen siRNA eine geeignete Methode dar, um gezielt Gene stillzulegen und somit die Translation des zu kodierenden Proteins selektiv zu hemmen [129]. Deshalb wurden naive H1339-Zellen mit gegen Bax gerichteter siRNA transfiziert. Das Gelingen der siRNA-Transfektion wurde mit dem Nachweis einer verminderten Expression von Bax in naiven, siRNA-transfizierten H1339-Zellen mittels Western Blot verifiziert. Anschließend wurden transfizierte Zellen sowie mit non-targeting RNA behandelte Kontrollzellen mit Cisplatin behandelt und die Überlebenskurven miteinander verglichen.

Eine weitere Zelllinie, NCI-H187, des klassischen SCLC wurde mit gegen Bax gerichteter siRNA transfiziert und mit vier Zyklen Cisplatin behandelt. Nach der Cisplatin-Behandlung wurde eine Überlebenskurve erstellt. Die Expression von Bax in teilresistenten NCI-H187 Zellen im Vergleich zu naiven Zellen dieser Zelllinie wurde vorher nicht untersucht. Im Gegensatz zu den H1339-Zellen wurde für die NCI-H187-Zellen nicht nachgewiesen, dass eine Cisplatin-Resistenz erreicht werden konnte. Ebenso wurde das Gelingen der siRNA-Transfektion nicht verifiziert. Dieser Versuch deutet also lediglich daraufhin, dass eine gegen Bax gerichtete siRNA-Transfektion möglicherweise auch in NCI-H187-Zellen keinen Einfluss auf das Überleben nach einer Cisplatin-Behandlung hat, ist aber keinesfalls beweiskräftig. Das Gelingen der siRNA-Transfektion mit einer verminderten Expression von

Bax in diesen Zellen kann lediglich angenommen werden, wurde jedoch nicht nachgewiesen. Diese Limitierung ist bei der Interpretation des Ergebnisses zu beachten.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Herstellung Cisplatin-teilresistenter Zellklone

Um teilresistente Zellklone der SCLC-Zelllinie H1339 zu gewinnen, wurden naive Zellen mit vier Zyklen Cisplatin behandelt. Um das Gelingen der Resistenzentwicklung zu testen, wurde anschließend ein Kurvenvergleich der Überlebensfraktionen von naiven (unbehandelten) und 4-fach mit Cisplatin vorbehandelten Zellen nach 3-stündiger Inkubationszeit mit 0,5 µg/ml Cisplatin angestellt. Die Überlebenskurve der vorbehandelten Zellen zeigte eine Zunahme der Zellzahl am Tag 1 nach der Behandlung und fiel dann langsam und stetig ab. Bei den naiven Zellen waren im Vergleich dazu signifikant kleinere Überlebensfraktionen der Zellen zu beobachten, die sich bereits am ersten Tag nach der Cisplatin-Behandlung zeigten. Die signifikanten Unterschiede der Kurvenverläufe lassen auf eine relative Cisplatin-Resistenz der vorbehandelten Zellen im Vergleich zu naiven Zellen schließen. Die so gewonnenen teilresistenten Zellklone wurden maximal vier Passagen lang kultiviert und dann verworfen, um eine konstante Resistenzlage zu gewährleisten.

Für die verwendeten, teilresistenten Zellklone der NSCLC-Zelllinie EPLC32M1 wurde bereits vorher von unserer Forschungsgruppe unter Anwendung der gleichen Methodik die signifikante relative Resistenz der Zellen nachgewiesen [114]. Die freundlicherweise von Dr. Kathrin Schrödl und Hamza Oelmez zur Verfügung gestellten Zellen wurden nach dem Auftauen ebenfalls maximal vier Passagen lang verwendet.

5.2.2 Expressionsanalysen der Bcl-2-Proteine

Viele Chemotherapien wirken über die Induktion der Apoptose in Krebszellen. Die Resistenzentwicklung gegen Apoptose führt demnach zu einer geringeren Sensitivität von Krebszellen gegenüber zytotoxischen Therapien. Die Chemotherapie-induzierte Apoptose steht dabei im Zusammenhang mit der Aktivierung pro-apoptotischer Faktoren und der Hemmung anti-apoptotischer Faktoren. Zunächst wurde daher die Expression pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine in kleinzelligen- und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen untersucht und das Expressionsniveau zwischen naiven und teilresistenten Zellklonen verglichen.

Die Expressionsanalyse der Bcl-2-Proteine in EPLC32M1-Zellen des NSCLC mittels Western Blot und indirekter Immunfluoreszenz zeigte mit Ausnahme von Bad keine signifikanten

Unterschiede im Expressionsniveau zwischen naiven und teilresistenten Zellen. Bad wurde in teilresistenten EPLC32M1-Zellen im Vergleich zu naiven Zellen bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung signifikant weniger exprimiert. Da sich dieses Ergebnis in der Western Blot-Analyse nicht bestätigt hat, wurde dieses Ergebnis für nachfolgende Versuche nicht verwendet. In H1339-Zellen des SCLC waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau der Bcl-2-Proteine zu beobachten - mit Ausnahme von Bax. Die Expression des pro-apoptotischen Bax war in Cisplatin-teilresistenten H1339-Zellen sowohl bei der Western Blot-Analyse als auch bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung signifikant reduziert.

Bei der Frage nach der Rolle der pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine bei der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin wären prinzipiell die drei nachfolgenden Mechanismen oder eine Kombination aus diesen vorstellbar: (1) Überexpression anti-apoptotischer Proteine, (2) Verminderte Expression pro-apoptotischer Proteine und/oder (3) Mutation bzw. Veränderung eines für die Apoptose essenziellen Proteins [76]. Darüber hinaus wurde beim Lungenkarzinom ein Abflachen der Dosis-Wirkungs-Kurven bei höheren Cisplatin-Dosierungen nachgewiesen. Dies könnte theoretisch darauf hindeuten, dass die Effektivität der Cisplatin-Therapie durch ein Aufbrauchen der für die Apoptose notwendigen Faktoren limitiert ist [130]. Demzufolge könnte eine verminderte Expression der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bax, Bad und Bim an der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin in Lungenkrebszellen beteiligt sein. In der Tat konnten wir mittels Western Blot und Immunfluoreszenz zeigen, dass die Proteinexpression von Bax in teilresistenten H1339-SCLC-Zellen im Vergleich zu naiven Kontrollzellen vermindert ist. Für die anderen Proteine konnten mit den angewandten Methoden diesbezüglich keine Veränderungen im Expressionsniveau zwischen naiven und teilresistenten H1339-Zellen nachgewiesen werden. Dies schließt nicht aus, dass hier weitere Expressionsunterschiede bestehen. Die Ergebnisse zeigen lediglich, dass mittels Western Blot und Immunfluoreszenz in H1339-Zellen keine weiteren Unterschiede nachweisbar sind.

Betrachtet man die Funktionen der Bcl-2-Proteine bei der Apoptoseregulation, kommt dem pro-apoptotischen Bax eine bedeutende Rolle zu. Beim programmierten Zelltod führen apoptotische Stimuli zu einer Translokation von Bax zu den Mitochondrien und verursachen eine erhöhte Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c und - über Effektor-Caspasen vermittelt - zum irreversiblen Zelltod. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Öffnung der mitochondrialen Permeability

Transition Pore (PTP) mit der Bindung von Bax an spezifische Komponenten dieses Komplexes assoziiert ist [131]. Ebenso induziert aktiviertes Bax die Bildung großer Poren in der äußeren Mitochondrienmembran, die einen strukturellen und funktionellen Kollaps der Mitochondrien bedingen [132]. Die BH3-only-Proteine sind dabei maßgeblich an der Aktivierung von Bax wie auch von Bak beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass Bim und Bid an das pro-apoptotische Bax binden und es somit aktivieren [108]. Im inaktiven Zustand ist Bax vorwiegend als Monomer im Zytosol lokalisiert [133], während Bak sich Mitochondrien-assoziiert befindet [134]. In Ausübung ihrer pro-apoptotischen Funktion formen diese beiden Proteine Homo-Dimere bzw. Homo-Oligomere [135]. Wei *et al.* beispielsweise konnten zeigen, dass Zellen, denen die beiden pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak fehlen, apoptoseresistent sind. Bei dem Vorhandensein eines der Proteine war das allerdings nicht der Fall [136]. Demnach scheint die Präsenz beider Proteine, Bax und Bak, essenziell für die Apoptose zu sein. Eine signifikante Veränderung der Expression von Bak konnten wir jedoch nicht nachweisen.

In der Literatur wurden Bcl-2-Proteine bereits vielfach als bedeutende Faktoren für die Entstehung und Prognose verschiedener maligner Tumore hervorgehoben [137, 138, 139, 140]. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurde in anderen Studien ebenfalls eine verminderte Expression des pro-apoptotischen Bax-Proteins in verschiedenen Tumorzelllinien aufgezeigt. So konnten Bargou *et al.* beispielsweise eine Downregulierung von Bax-alpha, einer Spleißvariante des Bax-Proteins, in malignen Brustkrebszellen nachweisen [141]. Sensitive Leukämiezellen der Tumorzelllinie CCRF-CEM wiesen ein hohes Expressionsniveau von Bax auf, das in der resistenten Variante um etwa 75 % reduziert war [142]. Des Weiteren haben Sturm *et al.* ein reduziertes Expressionsniveau von Bax in resezierten Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms festgestellt. Dabei war eine verminderte Bax-Proteinexpression mit einem fortgeschritteneren Tumorstadium bezüglich der Tumorgroße, des Differenzierungsgrads und des Lymphknotenstatus assoziiert [143]. Die Ursache bleibt jedoch in der Regel ungeklärt. Es wurde vermutet, dass die Ursache auf transkriptioneller Ebene liegt. Der Bax-Promotor besitzt eine hohe Dichte an Cytosinphosphatidyl-Guanin (CpG) -Nukleotiden, die als Grundlage für DNA-Methylierungen dienen. Fehlerhafte DNA-Methylierungen führen zu verminderter oder erhöhter Genaktivität und könnten somit die Ursache für eine verminderte Bax-Proteinexpression sein [75]. Bargou *et al.* gehen nicht davon aus, dass eine schwache Expression von Bax in genetischen Veränderungen des Bax Locus begründet liegt. Sie vermuten, dass es zu einer Downregulierung von Bax durch andere Gene kommt, da eine reduzierte Bax-Expression in

mehreren Tumoren und Zelllinien nachgewiesen werden konnte [141]. Das Tumorsuppressor-Protein p53 oder auch p53-regulierende Gene wären denkbare Kandidaten, da Bax ein Transkriptionsziel von p53 darstellt und p53 nachweislich an der Apoptoseregulation beteiligt ist [144, 145]. Bisher konnte jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen der Downregulierung von Bax und dem p53-Status nachgewiesen werden, so dass eine Beteiligung weiterer Gene anzunehmen ist [141, 146].

In der vorliegenden Arbeit konnte lediglich gezeigt werden, dass eine durch siRNA Transfektion verminderte Expression von Bax in H1339-Zellen des SCLC *in vitro* alleine nicht ausreichend ist, um eine Veränderung der Cisplatin-Sensitivität von H1339 Zellen zu bewirken. Auswirkungen einer Downregulation von Bax mittels siRNA auf andere Bcl-2 Proteine wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Einige Studien deuten jedoch daraufhin, dass eine verminderte Bax-Expression mit weiteren Veränderungen der Bcl-2 Proteinfamilie in Zusammenhang steht. Zum Beispiel haben Prokop *et al.* in ihrer Studie die p53/Bax/Caspase-3 Kaskade bei Kindern mit Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) *in vivo* untersucht und Vergleiche zwischen Kindern mit *de novo* ALL und Kindern mit einem Rezidiv bei ALL angestellt. Bei den Kindern mit einem Rezidiv war die Expression von Bax im Vergleich zur *de novo* ALL vermindert. Des Weiteren untersuchte die Forschungsgruppe Unterschiede in der Bcl-2 Expression zwischen *de novo* ALL und Rezidiven. Dabei ergab sich kein Unterschied im Expressionsniveau. Dennoch hat sich dadurch das Verhältnis von Bax/Bcl-2 verringert [147]. Dies zeigte sich auch in einer anderen Studie. Dabei war eher das Verhältnis von Bax/Bcl-2, das mittels Western Blot bestimmt wurde, anstatt Bcl-2 alleine für das Überleben von Leukämiezellen *in vitro* nach medikamentös induzierter Apoptose entscheidend und in großem Maße von Bax-alpha abhängig [148].

5.2.3 Auswirkungen einer verminderten Bax-Proteinexpression auf die Cisplatin-Sensitivität in H1339- und NCI-H187-Zellen

Als Nächstes galt es zu testen, ob eine verminderte Expression von Bax tatsächlich für die relative Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin in SCLC-Zellen verantwortlich ist. Dazu wurden naive H1339-Zellen mit gegen Bax gerichteter siRNA transfiziert. Danach wurden die transfizierten Zellen sowie die mit non-targeting RNA behandelten Kontrollzellen jeweils für 3 Stunden mit 0,5 µg/ml Cisplatin behandelt. Bei dem Kurvenvergleich der Überlebensfraktionen über 4 Tage nach der Cisplatin-Behandlung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der prozentualen Überlebensraten zwischen den transfizierten Zellen und den Kontrollzellen. Die siRNA-Transfektion wurde mit NCI-H187, einer weiteren

Zelllinie des SCLC wiederholt. In NCI-H187-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Überlebensfraktionen zwischen transfizierten Zellen und Kontrollzellen nach der Inkubation mit Cisplatin. Daraus lässt sich schließen, dass eine verminderte Expression von Bax alleine nicht ausreicht, um eine Veränderung der Cisplatin-Sensitivität in H1339-Zellen hervorzurufen. Es wird angenommen, dass dies möglicherweise auch bei NCI-H187-SCLC-Zellen nicht der Fall ist.

Eine mögliche Interpretation liefert die Vorstellung, dass ein reduziertes Expressionsniveau von Bax als Epiphänomen auftritt und keine Assoziation mit der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin besteht. Bax-mRNA wird differenziell in Bax- α , Bax- β und Bax- γ gespleißt. Es wurde noch eine weitere Spleißvariante Bax- δ , mit einem Exon weniger, geklont. Bax- α kodiert das pro-apoptotische Bax Protein. Die Funktion der β -, γ - und δ -Varianten ist unklar [147, 148]. Darüber hinaus wurden noch weitere Spleißvarianten entdeckt, denen teilweise eine pro-apoptotische Funktion zugesprochen wird [149, 150]. Die genaue Funktion des Proteins ist allerdings nicht vollständig geklärt und daher ist eine potenzielle Bedeutung von Bax, abgesehen von der Beteiligung bei Zelltodresistenzverursachenden Mechanismen, nicht auszuschließen. Kürzlich wurden von Danial *et al.* weitere Funktionen der Bcl-2-Proteine, die über eine Beteiligung bei der Apoptose hinausgehen, genauer untersucht [151].

Alternativ wäre es denkbar, dass eine verminderte Expression von Bax nur einer von mehreren Faktoren ist, die zur Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin bei der Therapie des kleinzelligen Lungenkarzinoms führen. Diese Interpretation beruht auf der Annahme, dass Bax zwar an der Resistenzentwicklung beteiligt ist, jedoch für sich allein genommen nicht ausreicht, um eine veränderte Cisplatin-Sensitivität hervorzurufen. Für dieses Argument spricht die Tatsache, dass Bax mit anderen Bcl-2-Proteinen Oligomere bildet [135] und mit BH3-only-Proteinen interagiert [108]. Des Weiteren gibt es eine Reihe anderer Proteine, die mit Bcl-2-Proteinen während der Apoptose zusammenspielen. So bewirkt beispielsweise die Interaktion von Bcl-2 mit Hsp27, einem Hitzeschockprotein, die Hemmung der Cytochrom c Freisetzung aus Mitochondrien [152]. Ein weiteres Beispiel ist die Serin- und Threonin-Kinase AKT. Eine Überexpression von AKT wurde mit der Resistenzentwicklung gegen Chemotherapie-induzierte Apoptose in Zusammenhang gebracht [153]. Bad wird durch AKT phosphoryliert, was wiederum die Dimerisation von Bcl-2 inhibiert und so zum Überleben der Zelle beiträgt [154]. Anhand dieser Beispiele wird einmal mehr deutlich, wie komplex die Mechanismen der Apoptose sind. Daher ist es gut möglich, dass noch weitere, bisher

unbekannte Faktoren und Gegebenheiten im Zusammenspiel mit Bax Voraussetzung für die Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin sind.

Der Verlust des pro-apoptotischen Bax wird in der Literatur mehrfach mit der Resistenz gegenüber Chemotherapien in Verbindung gebracht. So konnten Sakakura *et al.* eine verminderte Expression von Bax in malignem Brustgewebe und in Brustkrebszellen im Vergleich zu gesundem Gewebe bzw. nicht-transformierten Zelllinien nachweisen. Durch eine Überexpression von Bax in MCF-7-Brustkrebszellen konnten sie die Sensitivität gegenüber Cisplatin erhöhen. Dabei korrelierte das Expressionsniveau von Bax mit der Sensitivität gegenüber Cisplatin [155]. Gibson *et al.* dagegen haben einen dosis- und zeitabhängigen Anstieg der Bax-Proteinexpression bei Behandlung mit Etoposid in mehreren Zelllinien des Mammakarzinoms nachgewiesen. Allerdings korrelierte die Erhöhung der Bax-Proteinexpression alleine nicht mit dem Überleben der Zellen oder der Induktion der Apoptose in diesen Zelllinien [156]. Bei der B-Zell CLL (chronisch lymphatischen Leukämie) haben Bosanquet *et al.* gezeigt, dass eine verminderte Expression von Bax mit der Chemosensitivität gegenüber traditionellen Therapien (Anthracycline, Alkylantien und Vincristin) verbunden ist, jedoch keine Assoziation zu Nukleosidanaloga und Kortikosteroiden zeigt [157]. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Verminderung der Bax-Proteinexpression mit einer wirkstoffspezifischen Resistenzentwicklung korreliert und dass vermutlich noch andere Wirkmechanismen unabhängig von der mitochondrialen Apoptose existieren. Dies wäre theoretisch auch für die Cisplatin-Resistenz beim Lungenkarzinom denkbar. Zwar konnten wir eine verminderte Expression von Bax in teilresistenten SCLC-Zellen nachweisen, jedoch hatte dies keinen Einfluss auf die Cisplatin-Sensitivität.

Bislang ging man davon aus, dass Cisplatin vor allem über eine Schädigung der nukleären DNA durch Hemmung der DNA-Replikation wirkt [74]. Obwohl allgemein akzeptiert ist, dass die nukleäre DNA den kritischen Angriffspunkt für Cisplatin darstellt, reagiert tatsächlich nur 1 % des intrazellulären Cisplatin mit der DNA [158]. Darüber hinaus konnte in einigen Studien keine eindeutige Korrelation zwischen gebildeten DNA-Addukten und der Cisplatin-bedingten Zytotoxizität nachgewiesen werden [159, 160]. Demzufolge könnten weitere bisher noch unbekannt Mechanismen eine Rolle spielen, die möglicherweise spezifisch für Cisplatin sind. Mandic *et al.* haben gezeigt, dass Cisplatin auch am ER als Stressinduktor wirkt und vom Zellkern unabhängig die Apoptose auslöst. Bei einem anderen Chemotherapeutikum, dem Topoisomerase II Inhibitor Etoposid, war dies hingegen nicht der Fall. Bei Etoposid hing die Wirkung, im Gegensatz zu Cisplatin, allein von der nukleären

DNA-Schädigung ab und zeigte keinen vergleichbaren Effekt am ER [158]. Bisher wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die zur Entwicklung der Cisplatin-Resistenz führen könnten [161, 76], darunter auch eine veränderte Calciumhomöostase durch unsere Forschungsgruppe [114]. Aber es ist dennoch unklar, welche dieser Mechanismen klinisch die größte Relevanz haben.

5.3 Weitere Mechanismen der Cisplatinresistenz

5.3.1. DNA-Reparaturmechanismen

Man geht davon aus, dass die antineoplastische Aktivität von Cisplatin vorrangig auf der Interaktion mit chromosomaler DNA beruht [162, 163]. Die Effektivität einer Chemotherapie beruht jedoch nicht nur auf der Fähigkeit DNA-Schäden zu induzieren, sondern ist auch abhängig von DNA-Reparaturmechanismen der Zellen. Strukturveränderungen der DNA werden durch zelluläre Proteine erkannt und repariert. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass gesteigerte DNA-Reparaturmechanismen mit einer Resistenz gegenüber Cisplatin verbunden sind [164].

Cisplatin und die Nukleotidexzisionsreparatur(NER)

Da Cisplatin vor allem zu der Bildung von Intrastrand-Addukten führt, spielt die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) eine wichtige Rolle bei der Reparatur Cisplatin-induzierter DNA-Schäden [76]. Dabei gibt es zwei verschiedene Formen der Schadenserkennung in der DNA. Bei der Global Genome Repair (GGR) werden die DNA-Schäden in transkriptionsinaktiven Bereichen von dem Proteinkomplex XPC/HHRC23B erkannt. Schäden an der aktuell zu transkribierenden DNA werden vom Transcription Coupled Repair (TCR) Mechanismus erkannt. Die durch die DNA-Schädigung blockierte RNA-Polymerase II wird entfernt und den TCR-Proteinen so der Zugriff auf die DNA ermöglicht. Die weiteren Schritte sind identisch. XP complementation group A (XPA) und Replication protein A (RPA) dirigieren die Helikasen XPG und XPD zu der Läsion, welche die DNA in unmittelbarer Nähe der Schädigung entwinden. Anschließend schneiden die Endonukleasen XPG und XPF/ERCC1 (Excision repair cross-complementation group 1) den geschädigten DNA-Strang in 3' und 5' Richtung, so dass ein etwa 30 Basen umfassendes und die Schädigung enthaltendes Oligonukleotid freigesetzt wird. Der fehlende DNA-Abschnitt wird durch die Polymerase β und andere Faktoren ersetzt. Abschließend kommt es zur Ligation des neu synthetisierten DNA-Abschnitts durch die Ligase I.

Platinium-induzierte Schäden werden in erster Linie über das Nukleotidexzisionsreparatur System, vor allem über ERCC1 und ERCC1/XPF und die dazugehörigen Gene XPA und breast cancer 1 (BRCA1) repariert [165]. Genetische Variationen und somatische Mutationen dieser NER-Gene können Auswirkungen auf die Therapie mit Cisplatin haben. In einigen Studien war eine Überexpression von ERCC1 mit einem verminderten Therapieansprechen platinhaltiger Zytostatika beim NSCLC verbunden [166, 167]. In einer anderen Studie von Booton *et al.* war eine Korrelation zwischen der ERCC1 mRNA Expression mit dem Therapieerfolg und der Überlebensrate einer Cisplatintherapie beim NSCLC nicht nachweisbar [168]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ERCC1 vor allem bei der Reparatur von Interstrand-Addukten, anstelle der therapeutisch eigentlich relevanten Intrastrand-Addukte, beteiligt ist [169]. In einer Studie von Arora *et al.* diente der XPF-ERCC1 Komplex als Angriffspunkt um die Zytotoxizität und Effizienz von Cisplatin zu steigern. Dabei führte eine Downregulation der Expression von XPF-ERCC1 zu einer verminderten Kapazität der Zelle Cisplatin-induzierte DNA-Schäden zu reparieren [170]. Wu *et al.* konnten zeigen, dass ein vermindertes Expressionslevel von XPA mRNA mittels siRNA Transfektion zu einer erhöhten Cisplatinempfindlichkeit in Adenokarzinomzellen der Lunge führt [171]. Das zeigt einmal mehr das Potenzial zielgerichteter Therapien in der Tumorbehandlung.

Polymorphismen der XPD-Helikase sind teilweise mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cisplatin verbunden [172]. Des Weiteren sind sie in einigen Studien mit einem besseren Outcome beim NSCLC assoziiert [173], in anderen Studien jedoch nicht [174].

BRCA1 Mutationen erhöhen die Sensitivität von Lymphozyten gegenüber Cisplatin [175] und bei NSCLC Patienten, die mit einer neoadjuvanten Kombinationschemotherapie mit Cisplatin und Gemcitabine behandelt wurden, war eine niedrigere Expression der BRCA1 mRNA im Tumor mit einer besseren Überlebenschance assoziiert [176].

Einige Studien deuten auf Interaktionen zwischen dem Nukleotidexzisionsreparatur-System und zellulären Signaltransduktionswegen hin. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Signalweg die Cisplatin-induzierte Apoptose im Rahmen der NER, durch eine Aktivierung über XPC, vermindert [177]. Ein Fehlen des Tumorsuppressorproteins p53 war mit der Persistenz von Cisplatin-induzierten Intrastrand-Addukten assoziiert. Dies könnte auf eine Rolle des p53-Proteins bei der Regulation der NER von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden hinweisen [178]. Die NER wurde ebenfalls bereits in direkten Zusammenhang mit Bcl-2 Proteinen gebracht. Lomonaco *et al.* untersuchten die

Rolle des anti-apoptotischen Bcl-X_L Proteins bei dem NER-vermittelten Schutz der Zelle vor Cisplatin-induzierter Apoptose in normalen Fibroblasten und in XPA- und XPG- defizienten Fibroblasten. Sie konnten nachweisen, dass ein funktionales NER-System Voraussetzung für die erfolgreiche Transkription des anti-apoptotischen Bcl-X_L Proteins ist. So führte eine Behandlung der Zellen mit Cisplatin zu einem erhöhten Expressionsniveau von Bcl-X_L in den normalen Fibroblasten. In den XPA- und XPG- defizienten Fibroblasten war die Expression des Bcl-X_L Proteins nach der Behandlung mit Cisplatin dagegen vermindert. Ergebnisse immunhistochemischer Versuche derselben Forschungsgruppe lassen darauf schließen, dass ein funktionales NER Voraussetzung für die Translokation des NF-kappaB p65 vom Zytoplasma in den Nucleus ist und darüber hinaus, für die Regulation des Bcl-X_L Gens und und Bcl-X_L Proteins verantwortlich ist. Somit scheint die NER die Zelle vor Cisplatin-induzierter Apoptose über eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Bcl-X_L und die Aktivierung von NF-kappaB zu schützen und könnte somit eine Rolle bei der Resistenzentwicklung gegenüber einer Cisplatintherapie spielen [179].

Studien unterstützen die Hypothese, dass Komponenten des Nukleotidexzisionsreparatur-Systems eine Rolle bei der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin spielen könnten. Dennoch konnte eine klinische Relevanz dieses DNA-Reparaturmechanismus bei der Therapieresistenz gegenüber Cisplatin bislang nicht eindeutig gezeigt werden.

Cisplatin und Basenfehlpaarungsreparatur (Mismatch-Reparatur)

Bei diesem DNA-Reparaturmechanismus überprüfen DNA-Polymerasen und DNA-Mismatch-Reparaturproteine neu synthetisierte DNA-Stränge auf fehlerhafte Basenpaare. Das Mismatch-Reparatur (MMR)-System erkennt jedoch nicht nur Basenfehlpaarungen sondern auch durch Cisplatin-induzierte DNA-Addukte. Während Basenfehlpaarungen durch das MMR repariert werden können, kommt es bei Vorliegen von Chemotherapie-induzierten DNA-Addukten zur Apoptose. Ist das MMR-System der Zellen fehlerhaft, kann dies zu einer Resistenzentwicklung gegenüber der Cisplatin-induzierten Apoptose führen [180]. In einigen Studien waren MMR-defiziente Zellen oder Zellen mit einem verminderten Expressionsniveau nukleärer MMR-Proteine mit einer verminderten Apoptose und erhöhten Cisplatinresistenz verbunden [181, 182]. Des Weiteren wurden Mutationen in für die Mismatch-Reparatur wichtigen Genen (MSH2 und MLH1) in Cisplatin-resistenten Zellen nachgewiesen [183]. In Keimzelltumoren des Hodens konnte eine Methylierung und Downregulation des hMLH1 Gens nachgewiesen werden. Mit einer platinhaltigen Chemotherapie können bis zu 80 % dieser Keimzelltumore geheilt werden. Es wäre also

denkbar, dass ein fehlerhaftes MMR-Reparatursystem eine Bedeutung bei der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin hat. Eine klinische Relevanz dieser Ergebnisse konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden [184]. Andere Faktoren wie zum Beispiel das Tumorsuppressorprotein p53 könnten hier ebenfalls eine Rolle spielen [185].

5.3.2. Detoxifizierung von Cisplatin

Obwohl die nukleäre DNA den Hauptangriffspunkt von Cisplatin darstellt, bindet Cisplatin intrazellulär auch an Proteine und andere zelluläre Bestandteile [186]. Die für die Zytotoxizität und Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin wichtigsten Bestandteile sind, abgesehen von der DNA, die zytoplasmatischen Proteine Glutathion und Metallothionein [187].

Interaktion von Cisplatin mit Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein ubiquitäres Tripeptid aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin [188]. Bei der Behandlung von Tumorzellen mit Cisplatin bildet Glutathion einen Komplex mit dem Platinatom von Cisplatin. Der gesamte Komplex wird dann ATP-abhängig über GS-X Pumpen, die der Glutathion-Transporter-Familie angehören, aus der Zelle transportiert [189]. Godwin *et al.* haben gezeigt, dass eine vermehrte Synthese von Glutathion mit einer Cisplatinresistenz in Ovarialkarzinomzellen assoziiert war [190]. Eine neuere Studie analysierte eine mögliche Korrelation zwischen dem Expressionsniveau von Glutathion und der Zytotoxizität von vier platinhaltigen Medikamenten (Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin und dem Cisplatin Analogon 1,2-diaminocyclo-hexane-platinum (II) (DACH-Pt)) in insgesamt 14 naiven Tumorzelllinien verschiedener solider Tumore (Blasen-, Lungen-, Pankreas-, Ösophagus-, Zervix- und Brustkrebs-Karzinom) sowie in jeweils einer Leukämie- und Lymphom-Tumorzelllinie. Dabei konnte eine Korrelation zwischen dem Expressionslevel von Glutathion und der zellinhibitorischen Aktivität platinhaltiger Verbindungen in naiven Tumorzelllinien nicht nachgewiesen werden [191]. In einer Studie von Brouwers *et al.* wurde das zelluläre Expressionsniveau von GSH herabgesetzt, jedoch hatte es keinen Einfluss auf die Cisplatinresistenz [192]. Im Gegensatz dazu deutet eine von Chen *et al.* veröffentlichte Studie darauf hin, dass ein erhöhtes Glutathion-Level Tumorzellen möglicherweise gegenüber Cisplatin sensibilisiert, indem der hCtr1-Rezeptor (copper transporter), der die Aufnahme von Cisplatin in die Zellen fördert, hochreguliert wird [193]. Die zum Teil widersprüchliche Datenlage in der Literatur zeigt, dass bisher nicht eindeutig geklärt ist ob eine erhöhte Expression von Glutathion die Resistenzentwicklung gegenüber

Cisplatin fördert, Tumorzellen gegenüber Cisplatin sensibilisiert oder es womöglich kein relevanter Zusammenhang zwischen Glutathion und Cisplatin besteht [194].

Neben Glutathion wurde auch das Glutathion S-Transferase P1-1 Enzym (GSTP1-1) mit einer Resistenzentwicklung gegen Cisplatin-basierte Chemotherapien assoziiert [194]. Wenn Cisplatin von der Tumorzelle aufgenommen wurde, wird es durch Glutathion zytoplasmatisch inaktiviert. Diese Reaktion wird von der Glutathion S-Transferase (GST) katalysiert, wobei das GSTP1-1 Isoenzym das bedeutendste Mitglied der Enzymfamilie darstellt [194, 195, 196]. In einer Studie haben de Pasello *et al.* gezeigt, dass GSTP1-1 sowohl bei der Cisplatinresistenz in high-grade Osteosarkom-Zellen eine signifikante Rolle spielt, als auch für die Prognose der Patienten. Des Weiteren konnte die *in vitro* Wirksamkeit von NBDHEX, einem Inhibitor des GSTP1-1 Enzyms nachgewiesen werden, das möglicherweise in Zukunft irgendwann eine Therapiealternative für die Behandlung chemotherapieresistenter Osteosarkome darstellen könnte [197]. Andere Autoren postulierten, dass anstatt GSTP1-1 andere Enzyme der Glutathion Transferase-Familie entscheidend zu der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin beitragen würden [198]. Auch in diesem Bereich bedarf es noch weiterer Forschung [194].

Interaktion von Cisplatin mit Metallothionein

Metallothioneine (MT) sind zytoplasmatische Proteine mit vier Isoformen, die ubiquitär in menschlichen Zellen vorkommen und als besonderes Merkmal einen hohen Cysteingehalt haben. Studien mit Zellkulturen haben eine protektive Wirkung von Metallothioneinen gegen toxische Substanzen wie Cisplatin und Alkylantien nachgewiesen. Des Weiteren wurde berichtet, dass *in vivo* Tumore mit einer hohen Metallothionein-Konzentration ebenfalls eine Resistenz gegenüber diesen Substanzen aufweisen [199]. Metallothioneine scheinen einen wichtigen Beitrag zur Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber Cisplatin zu leisten [194].

5.4 Ausblick in die Zukunft

5.4.1 Bcl-2-Proteine als Ansatz für neue Therapien

Um die Resistenzentwicklung etablierter Tumorthérapien mit Zytostatika zukünftig durchbrechen zu können bzw. um neue oder zusätzliche Therapien zu entwickeln, ist es wichtig, die molekulare Grundlage apoptotischer Signalwege zu verstehen. Die Forschung der letzten Jahre hat diesbezüglich erhebliche Fortschritte gemacht. Dabei wurde die Rolle der an der Apoptose-Regulation beteiligten Bcl-2-Proteine, auch als potenzieller therapeutischer

Angriffspunkt, immer wieder hervorgehoben [200, 98]. In einigen Studien konnten mit neuen Therapieansätzen, die gezielt in diese molekularen Regulationsmechanismen eingreifen, bereits einige Erfolg versprechende Ergebnisse erzielt werden.

So wurde bereits eine neue Klasse niedermolekularer Substanzen mit einer Sequenzhomologie zur BH3-Domäne, die in der Literatur als „BH3-mimetics“ zusammengefasst werden, identifiziert. „BH3-mimetics“ antagonisieren Zelltodsignale, indem sie mit pro-apoptotischen Mitgliedern der Proteinfamilie Heterodimere bilden [201]. Normalerweise kommt es bei der Heterodimer-Bildung zu einer Bindung zwischen der BH3-Domäne pro-apoptotischer Proteine (Bax und seine Homologen) und der hydrophoben Bindestelle anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine (Bcl-2/Bcl-X_L). Die „BH3 mimetics“ fungieren als kompetitive Inhibitoren. Sie bewahren pro-apoptotische Proteine vor dieser Bindung, indem sie die Bindestelle der anti-apoptotischen Proteine blockieren. Die Antagonisierung der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine führt somit zur Freisetzung zelltodfördernder Bcl-2-Proteine und ermöglicht es, diesen Überlebensmechanismus der Tumorzellen gezielt zu verhindern [200].

Die Forschung auf diesem Gebiet hat schon mehrere dieser niedermolekularen Hemmsubstanzen mit Sequenzhomologie zur BH3-Domäne hervorgebracht [202, 203, 204]. Die Wirkung einiger so genannter „BH3-mimetics“ werden bereits in den frühen Phasen klinischer Studien getestet [205]. Hann *et al.* untersuchten die klinische Effektivität von ABT-737, einem selektiven Bcl-2/Bcl-X_L-Inhibitor, beim kleinzelligen Lungenkarzinom. Dabei führte ABT-737 zunächst zu einer deutlichen Regression von Tumoren aus verschiedenen SCLC-Zelllinien und war bei einem Xenotransplantat nach Abschluss der Behandlung kurzfristig nicht mehr nachweisbar. Allerdings kam es zu Rezidiven, die trotz erneuter Behandlung mit ABT-737 weiter fortschritten. Diese erworbene Resistenzentwicklung ging mit einer verminderten Expression von Bcl-2, Bax und Bim einher. Des Weiteren konnte die Forschungsgruppe zeigen, dass ABT-737 in Kombination mit Etoposid den Tumor effektiver bekämpfte als eine Monotherapie mit dem Bcl-2/Bcl-X_L-Inhibitor [206]. Demnach könnten zusätzliche kombinatorische Therapien, die gezielt auf Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie wirken, zukünftig relevant werden.

5.4.2 Bcl-2-Proteine als prognostische Faktoren

Möglicherweise könnte die Expression einzelner Bcl-2-Proteine zukünftig auch klinische Relevanz bei der Prognose für den Verlauf, das Therapieansprechen und das Resistenzverhalten bei der Therapie des Lungenkarzinoms haben. Wie eine Metaanalyse

gezeigt hat, ist die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins beim NSCLC mit einer besseren Prognose assoziiert. Die Datenlage zur Bcl-2-Expression beim SCLC hingegen war nicht ausreichend, um die prognostische Aussagekraft zu beurteilen [207]. Die Ergebnisse einer neueren Studie weisen erneut auf eine Korrelation zwischen der Bcl-2-Expression und der Prognose auch beim SCLC hin [208]. Jeong *et al.* haben kürzlich eine hohe Bcl-2-Expression als sinnvollen Prognosefaktor für Patienten mit lokal fortgeschrittenem NSCLC, die mit einer Cisplatin-basierten simultanen Radiochemotherapie behandelt wurden, nachgewiesen. Ein verändertes Expressionsniveau von Bax hatte allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate der Patienten [209].

Bei Tumoren des Gastrointestinaltrakts korrelierte eine veränderte Expression des pro-apoptotischen Bax mit der Prognose. Dabei war eine niedrige Bax-Proteinexpression beim primär resezierten kolorektalen Karzinom mit einem schlechteren Gesamtüberleben, insbesondere in Kombination mit einer Inaktivierung von p53, assoziiert [75]. Schelwies *et al.* wiesen eine verminderte Expression von Bax als unabhängigen negativen prognostischen Faktor für das Überleben bei Patienten mit Lebermetastasen kolorektaler Karzinome nach [210]. Dabei war eine hohe Expression von Bax beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit einer guten Prognose verbunden [211].

Insgesamt hat die Forschung der letzten Jahre relativ viele neue Erkenntnisse in Bezug auf den potenziellen Nutzen der Bcl-2-Proteine als Prognosefaktoren hervorgebracht. Dennoch ist die Datenlage bisher nicht eindeutig und aussagekräftig genug, um daraus einen direkten Nutzen für die alltägliche klinische Diagnostik und Behandlung des Lungenkarzinoms zu ziehen. Hierfür scheinen weitere Untersuchungen und möglicherweise ein besseres Verständnis der funktionellen Rolle der Bcl-2-Proteine beim Lungenkarzinom notwendig zu sein.

6 Zusammenfassung

Die Cisplatin-haltige Chemotherapie des kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms führt bei Therapiebeginn häufig zu einer viel versprechenden Reduktion des Tumolvolumens. Im Verlauf der Behandlung kommt es jedoch zu einer Resistenzentwicklung auf Cisplatin, die zu der niedrigen Lebenserwartung der Patienten beiträgt. Die für die Resistenzentwicklung verantwortlichen Mechanismen sind noch ungeklärt. Das Bcl-2-Protein stellt den Prototyp einer gleichnamigen Proteinfamilie dar, deren Mitglieder entweder die Apoptose fördern oder inhibieren.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Bcl-2-Proteine bei der Resistenzentwicklung auf Cisplatin bei kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen zu untersuchen. Zunächst wurden teilresistente Zellklone der kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie H1339 hergestellt. Dazu wurden die Zellen mit vier Zyklen Chemotherapie, analog der *in vivo* Pharmakokinetik von Cisplatin, behandelt. Anschließend wurde die Resistenzentwicklung anhand eines Kurvenvergleichs von Überlebensfraktionen zwischen naiven Kontrollzellen und vorbehandelten Zellen nach erneuter Cisplatin-Behandlung verifiziert. Die teilresistenten Zellklone der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie EPLC32M1 wurden freundlicherweise von Mitarbeitern aus der Forschungsgruppe zur Verfügung gestellt. Hier wurde die Proteinexpression der pro-apoptotischen Mitglieder Bax, Bad, Bim und Bag-1, sowie der anti-apoptotischen Mitglieder Bcl-2 und Bcl-X_L untersucht. Dazu wurden Western Blot-Analysen und indirekte Immunfluoreszenzfärbungen mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt und das Expressionsniveau der einzelnen Bcl-2-Proteine jeweils zwischen naiven und teilresistenten Zellen der Zelllinien H1339 und EPLC32M1 verglichen. Dabei war die Expression aller Bcl-2-Proteine in naiven und teilresistenten Zellen vergleichbar - mit Ausnahme von Bax. Die Expression des pro-apoptotischen „Bcl-2 associated x protein“ Bax war im Vergleich zu naiven Zellen in teilresistenten H1339 SCLC-Zellen signifikant vermindert. Um zu testen, ob die reduzierte Bax-Proteinexpression verantwortlich für die Resistenzentwicklung auf Cisplatin ist, wurden naive Zellen der Tumorzelllinie H1339 und einer weiteren Zelllinie des SCLC, der Tumorzelllinie NCI-H187, mit gegen Bax gerichteter Small interfering (si)RNA transfiziert. Das Gelingen der Transfektion wurde mithilfe eines Western Blot, der eine verminderte Expression von Bax in transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zeigte, verifiziert. Bei der anschließenden Behandlung mit Cisplatin führte die verminderte Bax-Proteinexpression allerdings weder in H1339- noch in NCI-H187-Zellen zu einer Veränderung der Cisplatin-Sensitivität.

Daraus folgt, dass eine reduzierte Bax-Proteinexpression alleine nicht ausreichend ist, um eine Resistenzentwicklung auf Cisplatin in kleinzelligen Lungenkarzinomzellen zu induzieren. Ob die signifikant verminderte Expression von Bax in teilresistenten Zellen dennoch von klinischer Relevanz für das Ansprechen von Lungenkarzinomen auf zytotoxische Therapien mit Cisplatin ist, muss noch geklärt werden.

Zukünftig könnte jedoch ein besseres Verständnis der Apoptose-Regulation durch Bcl-2-Proteine klinisch von Nutzen sein und dazu beitragen, neue pharmakologische Substanzen zu entwickeln bzw. bestehende Therapiestrategien zu verbessern.

7 Literaturverzeichnis

- [1] **Spiro, S. G. und G. A. Silvestri** (2005). "One hundred years of lung cancer." *Am J Respir Crit Care Med* 172(5): 523-529.
- [2] **Alberg, A. J., J. G. Ford, et al.** (2007). "Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)." *Chest* 132(3 Suppl): 29S-55S.
- [3] **Youlden, D. R., S. M. Cramb, et al.** (2008). "The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends." *J Thorac Oncol* 3(8): 819-831.
- [4] **Zhang, H. und B. Cai** (2003). "The impact of tobacco on lung health in China." *Respirology* 8(1): 17-21.
- [5] **Cipriano, L. E., D. Romanus, et al.** (2011). "Lung cancer treatment costs, including patient responsibility, by disease stage and treatment modality, 1992 to 2003." *Value Health* 14(1): 41-52.
- [6] **Pirozynski, M.** (2006). "100 years of lung cancer." *Respir Med* 100(12): 2073-2084.
- [7] **Galanski M., Dettmer S., Keberle M., Opherk J.P. und Ringe K.** (2010). "Pareto-Reihe Radiologie Thorax." *Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart-Feuerbach.*
- [8] **Müller-Höcker J.** (2000) MANUAL Tumoren der Lunge und des Mediastinums. "Pathomorphologie und Molekulargenetik der Lungenkarzinoms." *Tumorzentrum München.*
- [9] **Braun J., Dalhoff K. und Reck M.** (2012) Histologie "Kleinzelliges Karzinom". Internetplattform "Bronchialkarzinom 2012", zugegriffen am 12.11.2012, <http://www.bronchialkarzinom-aktuell.de/index.php?id=72>.
- [10] **von Rohr A., Cerny T., et al.** (1991) "Syndrome of inappropriate ADH secretion (SIADH) in small-cell bronchus carcinoma." *Schweiz Med Wochenschr.*; 121(36):1271-82.
- [11] **Shepherd F.A., Laskey J., et al.** (1992) "Cushing's syndrome associated with ectopic corticotropin production and small-cell lung cancer." *J Clin Oncol*; 10(1):21-7.
- [12] **Gilhus N.E.** (2011) "Lambert-eaton myasthenic syndrome; pathogenesis, diagnosis, and therapy." *Autoimmune Dis*; 2011:973808.
- [13] **Wolf M. und Havemann K.** (1995) "Kleinzellige Bronchialkarzinome." In: Seeber S. und Schütte J (Hrsg) *Therapiekonzepte Onkologie. 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York*, pp 420-445.
- [14] **Wolf M., K. Havemann, R. Holle, et al.** (1987) "Cisplatin/etoposide versus ifosfamide/etoposide combination chemotherapy in small-cell lung cancer: a multicenter German randomized trial." *J Clin Oncol* 5(12):1880-9.
- [15] **Wilke H., W. Achterrath, H.J. Schmoll, et al.** (1988) "Etoposide and split-dose cisplatin in small-cell lung cancer." *Am J Clin Oncol*; 11(5):572-8.
- [16] **Deutsche Krebsgesellschaft e.V.** (2004) "Therapie des kleinzelligen Lungenkarzinoms." *AWMF-online* Nr. 032/006, zugegriffen am 15.09.2011, <http://www.bronchialkarzinom-aktuell.de/fileadmin/media/pdf/awmf-sclc.pdf>

- [17] **Sorensen M. und Felip E.** (2009) "Small-cell lung cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* 20 (suppl 4): iv71-iv72, zugegriffen am 20.09.2011, http://annonc.oxfordjournals.org/content/20/suppl_4/iv71.full.pdf+html
- [18] **Zochbauer-Muller, S., R. Pirker, et al.** (1999). "Treatment of small cell lung cancer patients." *Ann Oncol* 10 Suppl 6: 83-91.
- [19] **Minna, J.D.; Schiller J.H.** (2008) "Harrison's Principles of Internal Medicine.(17th ed.)" *McGraw-Hill*. pp. 551–562. ISBN 0-07-146633-9.
- [20] **Hong W.K., Tsao A.S.** (2008) "Lung Carcinoma." *Merck Manual Online Edition*, zugegriffen am 17.09.2011, http://www.merckmanuals.com/professional/pulmonary_disorders/tumors_of_the_lungs/lung_carcinoma.html?qt=&sc=&alt=
- [21] **Rouquette I.** (2012) "Mixed lung tumors: pathological update." *Bull Cancer* [Epub ahead of print]
- [22] **Braun J., Dalhoff K. und Reck M.** (2012) Histologie "Adenokarzinom". Internetplattform "Bronchialkarzinom 2012", zugegriffen am 13.11.2012, <http://www.bronchialkarzinom-aktuell.de/index.php?id=70>
- [23] **Herbst R.S., Heymach J.V. und Lippman S.M.** (2008) "Lung cancer." *N Engl J Med*; 359:1367-1380.
- [24] **Braun J., Dalhoff K. und Reck M.** (2012) Histologie "Plattenepithelkarzinom". Internetplattform "Bronchialkarzinom 2012", zugegriffen am 13.11.2012, <http://www.bronchialkarzinom-aktuell.de/index.php?id=69>
- [25] **Braun J., Dalhoff K. und Reck M.** (2012) Histologie "Großzelliges Karzinom". Internetplattform "Bronchialkarzinom 2012", zugegriffen am 13.11.2012, <http://www.bronchialkarzinom-aktuell.de/index.php?id=71>
- [26] **Wittekind C.H. und Wagner G.** (Hrsg) (1997) "UICC TNM-Klassifikation maligner Tumore." *Springer*, Berlin Hiedelberg New York.
- [27] **Deutsche Krebsgesellschaft e.V.** (2004) "Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms." *AWMF-online* Nr. 032/007, zugegriffen am 15.09.2011, <http://www.bronchialkarzinom-aktuell.de/fileadmin/media/pdf/awmf-nsclc.pdf>
- [28] **D'Addario G. und Felip E.** (2009) "Non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* 20 (suppl 4): iv68-iv70, zugegriffen am 23.09.2011, http://annonc.oxfordjournals.org/content/20/suppl_4/iv68.full
- [29] **Huber R.M.** (2005) "Therapiestrategien beim Lungenkarzinom. " Abstract präsentiert bei der Medizinischen Kongressorganisation Nürnberg AG, zugegriffen am 01.08.2011, http://www.mcn-nuernberg.de/bik/abstracts-2005/Abstract_Huber.pdf
- [30] **Riquet M., K. Achour, et al.** (2010). "Microscopic residual disease after resection for lung cancer: a multifaceted but poor factor of prognosis." *Ann Thorac Surg* 89(3): 870-875.

- [31] **Hotta, K., Y. Fujiwara, et al.** (2007). "Recent improvement in the survival of patients with advanced nonsmall cell lung cancer enrolled in phase III trials of first-line, systemic chemotherapy." *Cancer* 109(5): 939-948.
- [32] **Prof. Dr. Wolfgang Hilbe** (2007) "Targeted Therapies" beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom. 1. Auflage – Bremen: *UNI-MED SCIENCE*, ISBN 978-3-89599-984-0.
- [33] **Sanford M. und Scott L.J.** (2009) "Gefitinib: a review of its use in the treatment of locally advanced/metastatic non-small cell lung cancer." *Drugs*; 69(16):2303-28.
- [34] **Tamiya M., Tamiya A., et al.** (2012) "Efficacy of Carboplatin and Paclitaxel with Bevacizumab as Salvage Chemotherapy for Non-small Cell Lung Cancer after Failure of Platinum-doublet Chemotherapy." *Anticancer Res*; 32(8):3553-7.
- [35] **Rosenberg B.** (1985) "Fundamental studies with cisplatin." *Cancer*, vol. 55, no. 10, pp. 2303–2316.
- [36] **Rosenberg B., Van Camp L. und Krigas T.** (1965) "Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. " *Nature*, vol. 205, no. 4972, pp. 698–699.
- [37] **Rosenberg B., VanCamp L., et al.** (1969) "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents." *Nature*, vol. 222, no. 5191, pp. 385–386.
- [38] **The Testicular Cancer Research Center** (2010) "Testicular Cancer Treatments: Chemotherapy", zugegriffen am 01.08.2012, <http://tcrc.acor.org/chemo.html>
- [39] **Basu A. und Krishnamurthy S.** (2011) "Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage." *Journal of Nucleic Acids*, Volume 2011, Article ID 201367, doi:10.4061/2011/201367.
- [40] **Todd R.C. und Lippard S.J.** (2009) "Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds." *Metallomics*, vol. 1, no. 4, pp. 280–291.
- [41] **Zamble D.B. und Lippard S.J.** (1995) "Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy." *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 20, no. 10, pp. 435–439.
- [42] **Zamble D.B. und Lippard S.J.** (1995) "Ciplatin and DNA repair in cancer chemotherapy." *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 20, no. 10, pp. 435-439.
- [43] **Sedletska Y., Giraud-Panis M.-J., et al.** (2005) "Cisplatin is a DNA-damaging antitumor compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways." *Current Medicinal Chemistry: Anti-Cancer Agents*, vol. 5, no. 3, pp. 251-165.
- [44] **Poirier M.C., Egorin M.J, et al.** (1998) "DNA adducts of cisplatin and carboplatin in tissues of cancer patients." *IARC Sci Publi.*, pp. 313-29.
- [45] **Reed E., Ostchega Y., et al.** (1990) "Evaluation of platinum-DNA adduct levels relative to known prognostic variables in a cohort of ovarian cancer patients." *Cancer Res*, 50:2256-60.

- [46] **Parker R.J., Gill I., et al.** (1991) "Platinum-DNA damage in leukocyte DNA of patients receiving carboplatin and cisplatin chemotherapy, measured by atomic absorption spectrometry." *Carcinogenesis*, 12:1253-8.
- [47] **Reed E., Parker R.J., et al.** (1993) "Platinum-DNA adduct in leukocyte DNA of a cohort of 49 patients with 24 different types of malignancies." *Cancer Res*, 53:3694-9.
- [48] **Motzer R.J., Reed E., et al.** (1994) "Platinum-DNA adducts assayed in leukocytes of patients with germ cell tumors measured by atomic absorbance spectrometry and enzyme-linked immunoabsorbent assay." *Cancer*, 73:2843-52.
- [49] **Poirer M.C., Reed E., et al.** (1993) "Platinum-drug DNA interactions in human tissues measured by cisplatin-DNA enzyme-linked immunosorbent assay and atomic absorbance spectroscopy." *Environ Health Perspect*, 99:149-54.
- [50] **Meijera C., van Luyn M.J., et al.** (2001) "Ultrastructural morphology and localisation of cisplatin-induced platinum DNA-adducts in a cisplatin-sensitive and – resistant human small cell lung cancer cell line using electron microscopy." *Biochem Pharmacol*, 61:573-8.
- [51] **Shirazi F.** (1998) "Cell cycle dependency of cisplatin cytotoxicity on ovarian cancer cells." *PhD Thesis, Department of Cellular and Molecular Medicine*. Ottawa, Canada: University of Ottawa.
- [52] **Abbosh P.H., Montgomery J.S., et al.** (2006) "Dominant negative histone H3 lysine 27 mutant depresses silenced tumor suppressor genes and reverses the drug-resistant phenotype in cancer cells." *Cancer Res*, 66:5582-91.
- [53] **Löffler G.** (2004) "Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie." 6. Auflage. *Springer Medizin Verlag Heidelberg*. ISBN: 3-54023885-9. Seite 722.
- [54] **Abedini M.R., Muller E.J., et al.** (2008) "Cisplatin Induces p53-Dependent FLICE-Like Inhibitory Protein Ubiquitination in Ovarian Cancer Cells." *Cancer Res*; 68(12):4511-7.
- [55] **Kutuk O., Arisan E.D., et al.** (2009) "Cisplatin overcomes Bcl-2-mediated resistance to apoptosis via preferential engagement of Bak: critical role of Noxa-mediated lipid peroxidation." *Carcinogenesis*; 30(9):1517-27.
- [56] **Basu A. und Krishnamurthy S.** (2010) "Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage." *J Nucleic Acids*. pii: 201367.
- [57] **de Jongh F.E., Verweij J., et al.** (2001) "Body-surface area-based dosing does not increase accuracy of predicting cisplatin exposure." *Clin Oncol*, Vol 19, No 17, pp 3733-3739.
- [58] **Schellens J.H., Ma J., et al.** (1996) "Relationship between the exposure to cisplatin: DNA-adduct formation in leucocytes and tumour response in patients with solid tumours." *Br J Cancer* 73: 1569-1575.
- [59] **Braun J., Dalhoff K. und Reck M.** (2012) Medikamente "Cisplatin". Internetplattform "Bronchialkarzinom 2012", zugegriffen am 12.11.2012, <http://www.bronchialkarzinom-aktuell.de/?id=162>

- [60] **Bajorin D.F., Bosl G.J., et al.** (1986) "Pharmacokinetics of cis-diaminedichloroplatinum(II) after administration in hypertonic saline." *Cancer Res* 46: 5969-5972.
- [61] **Lüllmann H. und Mohr K.** (2006) "Pharmakologie und Toxikologie." 16. Auflage. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart. ISBN .978-3-13-368516-0. Seite 421.
- [62] **Ivanov A.I., Christodoulou J., et al.** (1998) "Cisplatin binding sites on human albumin." *J Biol Chem* 273: 14721-14730.
- [63] **Takada K., Kawamura T., et al.** (1999) "Irreversible binding of cisplatin in rat serum." *Pharm Pharmacol Commun* 5: 449-453.
- [64] **Schellens J.H., Maliepaard M., et al.** (1997) "Population pharmacokinetics and limited sampling model (LSM) of cisplatin." *Proc Am Soc Clin Oncol*; 16: 206.
- [65] **Nagai N., Ogata H., et al.** (1998) "Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisplatin in patients with cancer: Analysis with the NONMEM program." *J Clin Pharmacol*; 38: 1025-1034.
- [66] **Calvert A.H., Newell D.R., et al.** (1989) "Carboplatin dosage: Prospective evaluation of a simple formula based on renal function." *J Clin Oncol*; 1748-1756.
- [67] **MEDSAFE.** Information for Health Professionals. Data Sheet "Cisplatin", zugegriffen am 14.10.2012, <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/c/Cisplatininj.htm>.
- [68] **Karow K. und Lang-Roth R.** (2007) "Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie." Hrsg aus Pulheim. 15. Auflage. p 865.
- [69] (1995). "Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group." *BMJ* 311(7010): 899-909.
- [70] **Mascaux, C., M. Paesmans, et al.** (2000). "A systematic review of the role of etoposide and cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assessment and meta-analysis." *Lung Cancer* 30(1): 23-36.
- [71] **Pujol, J. L., L. Carestia, et al.** (2000). "Is there a case for cisplatin in the treatment of small-cell lung cancer? A meta-analysis of randomized trials of a cisplatin-containing regimen versus a regimen without this alkylating agent." *Br J Cancer* 83(1): 8-15.
- [72] **Sorenson, S., B. Glimelius, et al.** (2001). "A systematic overview of chemotherapy effects in non-small cell lung cancer." *Acta Oncol* 40(2-3): 327-339.
- [73] **Voigt, W., A. Dietrich, et al.** (2006). "[Overview of development status and clinical action. Cisplatin and its analogues]." *Pharm Unserer Zeit* 35(2): 134-143.
- [74] **Lippert B. und Eastman A.** (2006) "Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug." *Verlag Helvetica Chimica Acta* Chapter 4. Online ISBN: 9783906390420
- [75] **Daniel P.** (2002) "Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren." Zugegriffen am 14.08.2011. <http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/daniel-peter-2002-11-05/HTML/>

- [76] **Stewart, D. J.** (2007). "Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin." *Crit Rev Oncol Hematol* 63(1): 12-31.
- [77] **Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al.** (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-257.
- [78] **Evan, G. I. und K. H. Vousden** (2001). "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer." *Nature* 411(6835): 342-348.
- [79] **Ganten D. und Ruckpaul K.** (2008) "Grundlagen der molekularen Medizin." *Springer Verlag* S.159-203. ISBN 978-3-540-69412-0
- [80] **De Feudis, P., S. Vignati, et al.** (2000). "Driving p53 response to Bax activation greatly enhances sensitivity to taxol by inducing massive apoptosis." *Neoplasia* 2(3): 202-207.
- [81] **Nakagawa, T., H. Zhu, et al.** (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." *Nature* 403(6765): 98-103.
- [82] **Lee, A. S.** (2001). "The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications." *Trends Biochem Sci* 26(8): 504-510.
- [83] **Tsujimoto, Y., J. Cossman, et al.** (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." *Science* 228(4706): 1440-1443.
- [84] **Donovan, M. und T. G. Cotter** (2004). "Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death." *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3): 133-147.
- [85] **Rudner, J., V. Jendrossek, et al.** (2002). "New insights in the role of Bcl-2 Bcl-2 and the endoplasmic reticulum." *Apoptosis* 7(5): 441-447.
- [86] **Cory, S. und J. M. Adams** (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* 2(9): 647-656.
- [87] **Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, et al.** (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." *Science* 275(5303): 1132-1136.
- [88] **Yang, J., X. Liu, et al.** (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." *Science* 275(5303): 1129-1132.
- [89] **Adams, J. M. und S. Cory** (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* 281(5381): 1322-1326.
- [90] **Hengartner, M. O.** (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407(6805): 770-776.
- [91] **Borner, C.** (2003). "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions." *Mol Immunol* 39(11): 615-647.
- [92] **Sharpe, J. C., D. Arnoult, et al.** (2004). "Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members." *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3): 107-113.
- [93] **Hockenbery, D., G. Nunez, et al.** (1990). "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death." *Nature* 348(6299): 334-336.

- [94] **Krajewski, S., S. Tanaka, et al.** (1993). "Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes." *Cancer Res* 53(19): 4701-4714.
- [95] **Youle, R. J. und A. Strasser** (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1): 47-59.
- [96] **Rong, Y. und C. W. Distelhorst** (2008). "Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis." *Annu Rev Physiol* 70: 73-91.
- [97] **Fletcher, J. I. und D. C. Huang** (2006). "BH3-only proteins: orchestrating cell death." *Cell Death Differ* 13(8): 1268-1271.
- [98] **Tait, S. W. und D. R. Green** (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(9): 621-632.
- [99] **Chandra, D., G. Choy, et al.** (2005). "Bax-dependent regulation of Bak by voltage-dependent anion channel 2." *J Biol Chem* 280(19): 19051-19061.
- [100] **Finucane, D. M., E. Bossy-Wetzel, et al.** (1999). "Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL." *J Biol Chem* 274(4): 2225-2233.
- [101] **Muchmore, S. W., M. Sattler, et al.** (1996). "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death." *Nature* 381(6580): 335-341.
- [102] **Reed, J. C.** (1997). "Double identity for proteins of the Bcl-2 family." *Nature* 387(6635): 773-776.
- [103] **Shimizu, S., M. Narita, et al.** (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." *Nature* 399(6735): 483-487.
- [104] **Loeffler, M. und G. Kroemer** (2000). "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita." *Exp Cell Res* 256(1): 19-26.
- [105] **Gross, A., J. M. McDonnell, et al.** (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* 13(15): 1899-1911.
- [106] **Eskes, R., S. Desagher, et al.** (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." *Mol Cell Biol* 20(3): 929-935.
- [107] **Roucou, X., T. Rostovtseva, et al.** (2002). "Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes." *Biochem J* 363(Pt 3): 547-552.
- [108] **Ghiotto, F., F. Fais, et al.** (2010). "BH3-only proteins: the death-puppeteer's wires." *Cytometry A* 77(1): 11-21.
- [109] **Juhasova, B., M. Mentel, et al.** (2011). "BH3-only protein Bim inhibits activity of antiapoptotic members of Bcl-2 family when expressed in yeast." *FEBS Lett.*
- [110] **Letai, A., M. C. Bassik, et al.** (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." *Cancer Cell* 2(3): 183-192.

- [111] **Liu, H. und R. Baliga** (2005). "Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis." *J Am Soc Nephrol* 16(7): 1985-1992.
- [112] **Hacki, J., L. Egger, et al.** (2000). "Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2." *Oncogene* 19(19): 2286-2295.
- [113] **Kuo, T. H., H. R. Kim, et al.** (1998). "Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2." *Oncogene* 17(15): 1903-1910.
- [114] **Schrodl, K., H. Oelmez, et al.** (2009). "Altered Ca²⁺-homeostasis of cisplatin-treated and low level resistant non-small-cell and small-cell lung cancer cells." *Cell Oncol* 31(4): 301-315.
- [115] **Hofmann J., Kaiser U., et al.** (1995) "Glucocorticoid receptors and growth inhibitory effects of dexamethasone in human lung cancer cell lines." *Eur J Cancer*; 31A(12):2053-8.
- [116] **Heidtmann H.H., Salge U., et al.** (1993) "Secretion of a latent, acid activatable cathepsin L precursor by human non-small cell lung cancer cell lines." *Oncol Res.* 5:441-451
- [117] **Heidtmann H.H., Salge U., et al.** (1997) "Cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors in human cancer cell lines." *Clin Exp Metastasis*; 15(4):368-381.
- [118] **Bepler G., Koehler A., et al.** (1988) "Characterization of the state of differentiation of six newly established human non-small-cell lung cancer cell lines." *Differentiation*; 37(2):158-71.
- [119] **Shimomura, O.** (2005). "The discovery of aequorin and green fluorescent protein." *J Microsc* 217(Pt 1): 1-15.
- [120] **Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.** "Cell line: H-1339." Zugegriffen am 15.10.2011. [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-506.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-506.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192)
- [121] **MethDB-database for DNA methylation and environmental epigenetic effects** (2000) "Tissue: lung - NCI-H187 cells." Zugegriffen am 01.10.2011. <http://www.methdb.de/>
- [122] **Carney, D. N., A. F. Gazdar, et al.** (1985). "Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features." *Cancer Res* 45(6): 2913-2923.
- [123] **Li, A., J. Walling, et al.** (2008). "Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas." *Mol Cancer Res* 6(1): 21-30.
- [124] **Lee, J., S. Kotliarova, et al.** (2006). "Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines." *Cancer Cell* 9(5): 391-403.
- [125] **Edelmann, M., A. Tufman, et al.** (2011). "Organ-cocultures (COCs) for long term in vitro studies of lung cancer using 2-photon microscopy." *Technol Cancer Res Treat* 10(3): 275-279.

- [126] **Kim, J. B.** (2005). "Three-dimensional tissue culture models in cancer biology." *Semin Cancer Biol*; 15(5):365-77.
- [127] **Bernhardt G., Spruß T., et al.** (1991) "Einsatz menschlicher Tumorzellkulturen als Testmodelle bei der Entwicklung von Wirkstoffen für die Krebstherapie." Forum für interdisziplinäre Forschung, pp 24-28.
- [128] **LMU Klinikum der Universität München.** "Experimentelle Pneumologie: Lungenkarzinom." Zugegriffen am 10.09.2012. http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Medizinische-Klinik-und-PoliklinikIV/Pneumologie/de/Exp_Pneumo/Lungenkarzinom/index.html.
- [129] **Elbashir, S. M., J. Harborth, et al.** (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* 411(6836): 494-498.
- [130] **Stewart, D. J., G. Chiritescu, et al.** (2007). "Chemotherapy dose--response relationships in non-small cell lung cancer and implied resistance mechanisms." *Cancer Treat Rev* 33(2): 101-137.
- [131] **Marzo, I., C. Brenner, et al.** (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." *Science* 281(5385): 2027-2031.
- [132] **Schafer, B., J. Quispe, et al.** (2009). "Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation." *Mol Biol Cell* 20(8): 2276-2285.
- [133] **Hsu, Y. T., K. G. Wolter, et al.** (1997). "Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3668-3672.
- [134] **Wei, M. C., T. Lindsten, et al.** (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." *Genes Dev* 14(16): 2060-2071.
- [135] **Westphal, D., G. Dewson, et al.** (2011). "Molecular biology of Bax and Bak activation and action." *Biochim Biophys Acta* 1813(4): 521-531.
- [136] **Wei, M. C., W. X. Zong, et al.** (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." *Science* 292(5517): 727-730.
- [137] **Kusenda, J.** (1998). "Bcl-2 family proteins and leukemia. Minireview." *Neoplasma* 45(3): 117-122.
- [138] **Serrone, L. und P. Hersey** (1999). "The chemoresistance of human malignant melanoma: an update." *Melanoma Res* 9(1): 51-58.
- [139] **Becker, K. F., G. Keller, et al.** (2000). "The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer." *Surg Oncol* 9(1): 5-11.
- [140] **Hamilton, A. und M. Piccart** (2000). "The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2." *Ann Oncol* 11(6): 647-663.
- [141] **Bargou, R. C., C. Wagener, et al.** (1996). "Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice." *J Clin Invest* 97(11): 2651-2659.

- [142] **Nuessler, V., O. Stotzer, et al.** (1999). "Bcl-2, bax and bcl-xL expression in human sensitive and resistant leukemia cell lines." *Leukemia* 13(11): 1864-1872.
- [143] **Sturm, I., C. H. Kohne, et al.** (1999). "Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases." *J Clin Oncol* 17(5): 1364-1374.
- [144] **Miyashita, T., S. Krajewski, et al.** (1994). "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." *Oncogene* 9(6): 1799-1805.
- [145] **Miyashita, T. und J. C. Reed** (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." *Cell* 80(2): 293-299.
- [146] **McCurrach, M. E., T. M. Connor, et al.** (1997). "bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2345-2349.
- [147] **Prokop A., Wieder T., et al.** (2000) "Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo." *Leukemia*; 14(9):1606-13.
- [148] **Salomons G.S., Brady H.J., et al.** (1997) "The Bax alpha:Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukaemic cells and is highly variable in childhood acute leukaemia." *Int J Cancer*; 71: 959-965.
- [147] **Oltvai, Z. N., C. L. Millman, et al.** (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." *Cell* 74(4): 609-619.
- [148] **Apte, S. S., M. G. Mattei, et al.** (1995). "Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta." *Genomics* 26(3): 592-594.
- [149] **Schmitt, E., C. Paquet, et al.** (2000). "Characterization of Bax-sigma, a cell death-inducing isoform of Bax." *Biochem Biophys Res Commun* 270(3): 868-879.
- [150] **Jin, K. L., S. H. Graham, et al.** (2001). "Bax kappa, a novel Bax splice variant from ischemic rat brain lacking an ART domain, promotes neuronal cell death." *J Neurochem* 77(6): 1508-1519.
- [151] **Danial, N. N., A. Gimenez-Cassina, et al.** (2010). "Homeostatic functions of BCL-2 proteins beyond apoptosis." *Adv Exp Med Biol* 687: 1-32.
- [152] **Kim, R., K. Tanabe, et al.** (2002). "Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy." *Cancer Chemother Pharmacol* 50(5): 343-352.
- [153] **Page, C., H. J. Lin, et al.** (2000). "Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis." *Anticancer Res* 20(1A): 407-416.
- [154] **Datta, S. R., H. Dudek, et al.** (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." *Cell* 91(2): 231-241.
- [155] **Sakakura, C., E. A. Sweeney, et al.** (1997). "Overexpression of bax sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and etoposide." *Surg Today* 27(7): 676-679.

- [156] **Gibson, L. F., J. Fortney, et al.** (1999). "Regulation of BAX and BCL-2 expression in breast cancer cells by chemotherapy." *Breast Cancer Res Treat* 55(2): 107-117.
- [157] **Bosanquet, A. G., I. Sturm, et al.** (2002). "Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia." *Leukemia* 16(6): 1035-1044.
- [158] **Mandic, A., J. Hansson, et al.** (2003). "Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling." *J Biol Chem* 278(11): 9100-9106.
- [159] **Burger, H., K. Nooter, et al.** (1997). "Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines." *Int J Cancer* 73(4): 592-599.
- [160] **Vaisman, A., M. Varchenko, et al.** (1997). "Cell cycle changes associated with formation of Pt-DNA adducts in human ovarian carcinoma cells with different cisplatin sensitivity." *Cytometry* 27(1): 54-64.
- [161] **Alt, A., K. Lammens, et al.** (2007). "Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase eta." *Science* 318(5852): 967-970.
- [162] **Sedletska Y., Giraud-Panis M.-J., et al.** (2005) "Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways." *Current Medicinal Chemistry: Anti-Cancer Agents*, vol. 5, no. 3, pp. 251-265.
- [163] **Jamieson E.R. und Lippard S.J.** (1999) "Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts." *Chemical Reviews*, vol. 99, no. 9, pp. 2467-2498.
- [164] **Zhen W., Link Jr C.J., et al.** (1992) "Increased gene-specific repair of cisplatin interstrand cross-links in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines." *Mol Cell Biol* 12:3689-98.
- [165] **Reed E.** (1998) "Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy." *Cancer Treat Rev*; 24:331-44.
- [166] **Rosell R., Cobo M., et al.** (2005) "Applications of genomics in NSCLC." *Lung Cancer*; 50 Suppl 2:S33-40.
- [167] **Rosell R., Taron M., et al.** (2003) "Nucleotide excision repair pathways involved in Cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer." *Cancer Control*; 10:297-305.
- [168] **Booton R., Ward T., et al.** (2007) "ERCC1 mRNA expression is not associated with response and survival after platinum-based chemotherapy regimens in advanced non-small cell lung cancer." *J Thorac Oncol*; 2(10):902-6.
- [169] **Siddik Z.H.** (2003) "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance." *Oncogene*; 22:7265-79.
- [170] **Arora S., Kothandapani A., et al.** (2010) "Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells." *DNA Repair (Amst)*; 9(7):745-53.

- [171] **Wu X., Fan W., et al.** (2003) "Sensitization to the cytotoxicity of cisplatin by transfection with nucleotide excision repair gene xeroderma pigmentosum group A antisense RNA in human lung adenocarcinoma cells." *Clin Cancer Res.*; 9(16 Pt 1):5874-9.
- [172] **Rosell R., Taron M., et al.** (2004) "Molecular predictors of response to chemotherapy in lung cancer." *Semin Oncol*; 31:20-7.
- [173] **Camps C, Sarries C., et al.** (2003) "Assessment of nucleotide excision repair XPD polymorphisms in the peripheral blood of gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer patients." *Clin Lung Cancer*; 4:237-41.
- [174] **Horgan A.M., Yang B., et al.** "Pharmacogenetic and Germline Prognostic Markers of Lung Cancer." Docstoc online, zugegriffen am 28.07.2012, <http://www.docstoc.com/docs/89793994/Pharmacogenetic-and-Germline-Prognostic-Markers-of-Lung-Cancer>.
- [175] **Trenz K., Lugowski S., et al.** (2003) "Enhanced sensitivity of peripheral blood lymphocytes from women carrying a BRCA1 mutation towards the mutagenic effects of various cytostatics." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 544, Issues 2–3, pp. 279–288.
- [176] **Taron M., Rosell R., et al.** (2004) "BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer." *Hum Mol Genet*; 13:2443-9.
- [177] **Kitagawa R. und Kastan M.B.** (2005) "The ATM-dependent DNA damage signaling pathway." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*; 70:99-109.
- [178] **Bhana S. und Lloyd D.R.** (2008) "The role of p53 in DNA damage-mediated cytotoxicity overrides its ability to regulate nucleotide excision repair in human fibroblasts." *Mutagenesis*; 23(1):43-50.
- [179] **Lomonaco S.L., Xu X.S., et al.** (2009) "The role of Bcl-x(L) protein in nucleotide excision repair-facilitated cell protection against cisplatin-induced apoptosis." *DNA Cell Biol*; 28(6):285-94.
- [180] **Berry S.E. und Kinsella T.J.** (2001) "Targeting DNA mismatch repair for radiosensitization." *Semin Radiat Oncol*; 11(4):300-15.
- [181] **Lin X. und Howell S.B.** (1999) "Effect of loss of DNA mismatch repair on development of topotecan-, gemcitabine-, and paclitaxel-resistant variants after exposure to cisplatin." *Mol Pharmacol*; 56(2):390-5.
- [182] **Lage H., Christmann M., et al.** (1999) "Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance." *Int J Cancer*; 80(5):744-50.
- [183] **Aebi S., Kurdi-Haidar B., et al.** (1996) "Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin." *Cancer Res*; 56(13):3087-90.
- [184] **Olasz J., Mándoky L., et al.** (2005) "Influence of hMLH1 methylation, mismatch repair deficiency and microsatellite instability on chemoresistance of testicular germ-cell tumors." *Anticancer Res.*; 25(6B):4319-24.

- [185] **Lin X. und Howell S.B.** (2006) "DNA mismatch repair and p53 function are major determinants of the rate of development of cisplatin resistance." *Mol Cancer Ther*; 5(5):1239-47.
- [186] **Akaboshi M., Kawai K., et al.** (1992) "The number of platinum atoms binding to DNA, RNA and protein molecules of HeLa cells treated with cisplatin at its mean lethal concentration." *Jpn J Cancer Res*; 83(5):522-6.
- [187] **Fuertes M.A., Alonso C., et al.** (2003) "Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance." *Chem Rev*; 103(3):645-62.
- [188] **Harington C.R. und Mead T.H.** (1935) "Synthesis of glutathione." *Biochem J.*; 29(7):1602-11.
- [189] **Ishikawa T. und Ali-Osman F.** (1993) "Glutathion-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance." *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 27, pp 20116-20125.
- [190] **Godwin A.K., Meister A., et al.** (1992) "High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 7, pp 3070-3074.
- [191] **Boubakari, Bracht K., et al.** (2004) "No correlation between GSH levels in human cancer cell lines and the cell growth inhibitory activities of platinum diamine complexes." *Arch Pharm (Weinheim)*; 337(12):668-71.
- [192] **Brouwers E.E., Huitema A.D. et al.** (2008) "The effects of sulfur-containing compounds and gemcitabine on the binding of cisplatin to plasma proteins and DNA determined by inductively coupled plasma mass spectrometry and high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry." *Anticancer Drugs*, 19 (6) 621– 630.
- [193] **Chen H.H., Song I.S., et al.** (2008) "Elevated glutathione levels confer cellular sensitization to cisplatin toxicity by up-regulation of copper transporter hCtr1." *Mol. Pharmacol.*, 74 (3) 697– 704.
- [194] **Basu A. und Krishnamurthy S.** (2010) "Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage." *J Nucleic Acids*; 2010: 201367.
- [195] **Tew K.D., Monks A., et al.** (1996) "Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program." *Mol Pharmacol*; 50:149–59.
- [196] **Goto S., Iida T., et al.** (1999) "Overexpression of glutathione S-transferase {pi} enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells." *Free Radic Res*; 31:549–58.
- [197] **Pasello M, Michelacci F., et al.** (2008) "Overcoming Glutathione S-Transferase P1–Related Cisplatin Resistance in Osteosarcoma." *Cancer Research*; doi: 10.1158/0008-5472.

- [198] **Peklak-Scott C., Smitherman P.K., et al.** (2008) "Role of glutathione S-transferase P1-1 in the cellular detoxification of cisplatin." *Mol Cancer Ther*; 7(10):3247-55.
- [199] **Basu A. und Lazo J.S.** (1990) "A hypothesis regarding the protective role of metallothioneins against the toxicity of DNA interactive anticancer drugs." *Toxicol Lett*; 50(2-3):123-35.
- [200] **Chonghaile, T. N. und A. Letai** (2008). "Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells." *Oncogene* 27 Suppl 1: S149-157.
- [201] **Finnegan, N. M., J. F. Curtin, et al.** (2001). "Induction of apoptosis in prostate carcinoma cells by BH3 peptides which inhibit Bak/Bcl-2 interactions." *Br J Cancer* 85(1): 115-121.
- [202] **Degterev, A., A. Lugovskoy, et al.** (2001). "Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL." *Nat Cell Biol* 3(2): 173-182.
- [203] **Enyedy, I. J., Y. Ling, et al.** (2001). "Discovery of small-molecule inhibitors of Bcl-2 through structure-based computer screening." *J Med Chem* 44(25): 4313-4324.
- [204] **Polster, B. M., G. Basanez, et al.** (2003). "Inhibition of Bax-induced cytochrome c release from neural cell and brain mitochondria by dibucaine and propranolol." *J Neurosci* 23(7): 2735-2743.
- [205] **Vogler, M., D. Dinsdale, et al.** (2009). "Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy." *Cell Death Differ* 16(3): 360-367.
- [206] **Hann, C. L., V. C. Daniel, et al.** (2008). "Therapeutic efficacy of ABT-737, a selective inhibitor of BCL-2, in small cell lung cancer." *Cancer Res* 68(7): 2321-2328.
- [207] **Martin, B., M. Paesmans, et al.** (2003). "Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis." *Br J Cancer* 89(1): 55-64.
- [208] **Ilievska Poposka, B., S. Smickova, et al.** (2008). "Bcl-2 as a prognostic factor for survival in small-cell lung cancer." *Prilozi* 29(2): 281-293.
- [209] **Jeong, S. H., J. H. Jung, et al.** (2010). "Expression of Bcl-2 predicts outcome in locally advanced non-small cell lung cancer patients treated with cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy." *Lung Cancer* 68(2): 288-294.
- [210] **Schelwies, K., I. Sturm, et al.** (2002). "Analysis of p53/BAX in primary colorectal carcinoma: low BAX protein expression is a negative prognostic factor in UICC stage III tumors." *Int J Cancer* 99(4): 589-596.
- [211] **Sturm, I., H. Petrowsky, et al.** (2001). "Analysis of p53/BAX/p16(ink4a/CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16(ink4a/CDKN2) identifies patients with good prognosis." *J Clin Oncol* 19(8): 2272-2281.

8 Danksagung

Beginnen möchte ich mit den Personen, denen meine Promotion gewidmet ist: mit meiner Familie. Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich auf meinem gesamten Lebensweg bei der Verwirklichung meines Traums, Ärztin zu werden, immer unterstützt haben und mir in allen Lebenssituationen Liebe, Rückhalt und Geborgenheit geschenkt haben. Ohne ihre großartige Unterstützung wäre diese Doktorarbeit neben dem Studium nicht möglich gewesen.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn PD Dr. A. Bergner, dem ehemaligen Leiter des pneumologischen Fachlabors der Medizinischen Klinik Innenstadt, für die hervorragende Betreuung und das stets freundschaftliche Verhältnis ganz herzlich bedanken. Obwohl er von meiner großen Vorliebe für die Pädiatrie und Kinderchirurgie wusste, hat er mich als Doktorandin aufgenommen und mich stets beispiellos mit fachlichem Wissen und wertvollen Ratschlägen unterstützt. Darüber hinaus hat er mir ermöglicht, selbstständig und flexibel zu arbeiten, ohne dass ich ein Freisemester nehmen oder Modul 6 vorziehen musste, und war dabei jederzeit für Fragen erreichbar.

Weiterhin möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistenten Rosemarie Kiefl und Hamza Oelmez für ihre äußerst hilfsbereite Unterstützung bei der Einarbeitung in verschiedene Labortechniken und vor allem aber für die stets kollegiale und freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. med. D. Nowak, Leiter der Abteilung für Arbeitsmedizin der Medizinischen Klinik Innenstadt, und Herrn Prof. Dr. S. Endres, Leiter der Abteilung für klinische Pharmakologie der Medizinischen Klinik Innenstadt, sowie deren Mitarbeitern für die Mitbenutzung von Räumlichkeiten und Laborgeräten.

Abschließend möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Mitdoktoranden Fei Tian, Vivian Arias und Julia Sirowei für die gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima bedanken.

