

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität-München

**Strukturelle und funktionelle Eigenschaften
neuer *cis*-Platin-Chelatkomplexe und ihrer DNA-Addukte:
Relevanz für die cytotoxische Wirkung**

Stefan Wild

aus
Kempten (Allgäu)

2001

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von PD Dr. H. Zorbas betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 25.6.2001

Stefan Wild

Dissertation eingereicht am 25.6.2001

1. Gutachter

PD Dr. H. Zorbas

2. Gutachter

Prof. Dr. W. Beck

Mündliche Prüfung am 20.7.2001

Danksagung

Herrn PD Dr. H. Zorbas danke ich für die interessante Themenstellung, die Betreuung der Arbeit und für viele spannende wissenschaftliche Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt seinem Engagement als Doktorvater, dem ich sowohl wissenschaftliche als auch persönliche Weiterentwicklungen verdanke.

Herrn Prof. Dr. W. Beck danke ich für sein stetes Interesse an dieser Arbeit und für die Übernahme der Zweitkorrektur. Außerdem danke ich ihm und seinen Mitarbeitern Dr. E. Schumann, Dr. J. Altmann und Dr. B. Miller für die zur Verfügung gestellten Verbindungen und die Zusammenarbeit an diesem Projekt.

Herrn Prof. W. Steglich und Herrn Dr. F. von Nußbaum danke ich für Ligandensynthesen und die befruchtende Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Schrammel und Dr. S. Lustig danke ich für ihr Interesse an dieser Arbeit und die Platinbestimmungen.

Herrn Prof. R. Großschedel und Herrn Prof. M. Biel danke ich für die Möglichkeit, in ihren Labors zu arbeiten und für die zur Verfügung gestellte Ausstattung.

Birgit, Kerstin, Kerstin, Melinda und Rajamohan, danke ich für die gute Zusammenarbeit in unserem Arbeitskreis, die auch über wissenschaftlichen Gedankenaustausch und praktische Hilfestellungen hinausging. Bei Birgit und Melinda möchte ich mich zusätzlich für ihre aktive Mitarbeit an einigen Versuchen dieser Arbeit bedanken.

Hildegard danke ich für ihre, dieser Arbeit zum Teil zugrundeliegende, Forschung und ihre hilfreichen Ratschläge.

Martin danke ich für die zur Verfügung gestellten Plasmide und seine stete Hilfsbereitschaft.

Bei Christoph möchte ich mich für seine Hilfestellungen im Umgang mit Bakterienkulturen und für viele Gelegenheiten zu wissenschaftlichem Gedankenaustausch bedanken.

Die Wissenschaft, das kann nicht oft genug wiederholt werden, hat es mit handgreiflichen Problemen zu tun. Der Mann der Wissenschaft muß wie der Mann der Straße harten Tatsachen ins Gesicht sehen, an denen nicht vorübergegangen werden kann, und sie erklären, so gut er es vermag. Wohl mag es, das ist wahr, gewisse Fragen geben, welche die Wissenschaft – zum gegenwärtigen Zeitpunkt – nicht beantworten kann...

James Joyce

Ulysses

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen	6
Veröffentlichungen	8
Einleitung	9
1 Klinische Aspekte von Cisplatin (1)	9
2 Reaktionen und Wirkungen von Cisplatin (1) in Zellen	11
2.1 Reaktion von Cisplatin (1) mit DNA	14
2.2 Konsequenzen der Cisplatin-DNA-Addukte	18
3 Aktuelle Entwicklungen	24
4 Strukturen der untersuchten Cisplatinanaloge	29
4.1 Bisplatin(II)-komplex von N^4, N^4 -Adipolybis(1,2,4-triaminbutan): Bisamid-bisplatin(II) (8)	30
4.2 Bisplatin(IV)-komplex von N^4, N^4 -Adipolybis(1,2,4-triaminbutan): Bisamid-bisplatin(IV) (9)	31
4.3 Dichloro-dihydroxy- N^1, N^2 -[N^4 -Trifluoracetyl(1,2,4-triamino-butan)]- platin(IV): Monoamid-monoplatin(IV) (10)	32
4.4 α, ω - N, N' -Alkyl-bis-[(dichloro)-ethylendiamin-platin(II)]-Komplexe: Alkyl-bis-ethylendiamin-platin(II)-Verbindungen (11) – (14).....	33
4.5 Dichloro-(N -nonyl)-ethylendiaminplatin(II); Nonylethylendiaminplatin(II) (15) ⁷⁵	34
4.6 [1-(2-Aminophenyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin]- dichloroplatin(II): Anilin-4H-Isochinolinplatin(II) (16).	35
5 Aufgabenstellung	36
Methoden	38
1 Häufig verwendete Puffer	38
2 Zellkultur	38
2.1 Auftauen der Zellen	38
2.2 Zellvermehrung.....	39
2.3 Lagerung der Zellen.....	39
2.4 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	39

3	Cytotoxizitätstests und Untersuchung der DNA-Syntheserate	40
3.1	Vitalitätstest	40
3.2	MTT Farbttest	41
3.3	Untersuchung der DNA-Syntheserate	41
4	Bestimmung des Platingehalts in Zellen und an DNA	42
4.1	Vorbereitung der Zellen für die Platinbestimmung	42
4.2	Vorbereitung der zellulären DNA für die Platinbestimmung	43
4.3	Die ICP-MS-Methode zur Platinbestimmung	45
5	Untersuchung der Kinetik der DNA-Sekundärstruktur- veränderungen	48
5.1	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	48
6	Bestimmung der Interstrangverknüpfungen	49
7	<i>In vitro</i> DNA-Reparatursynthesetest	50
7.1	Präparation des Ganzzellextrakts nach Manley.....	50
7.2	Präparation des Kernextrakts nach Dignam	52
7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
7.4	DNA-Reparatursynthesetest	54
8	DNA-Proteinquervernetzungen	55
8.1	Herstellung und Isolierung des DNA-Fragments	55
8.2	Bestimmung der DNA-Proteinquervernetzungen.....	55
	Ergebnisse	57
1	Veränderungen der Liganden haben großen Einfluß auf die Cytotoxizität	57
1.1	Die Cytotoxizität der Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (11), (12), (13) und (14) ist indirekt proportional zur Länge der verbind- enden Alkylkette.	58
1.2	Die Cytotoxizität von Nonylethylendiaminplatin(II) (15) ist mit der wirksamsten Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindung vergleich- bar.	59
1.3	Die stärkste cytotoxische Wirkung weist Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) auf.	60
2	Die Platinkonzentration in den Zellen nimmt mit steigender Konzentration der Komplexe im Medium zu	64
2.1	Eine längere Alkylkette verbessert die Zellaufnahme der Alkyl-bis- ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (11), (12), (13) und (14).....	64
2.2	Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) dringt mindestens genauso gut in Zellen ein wie die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen	66
2.3	Die Aufnahme von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) in die Zellen ist vergleichbar mit Cisplatin [H ₂ O] (1).....	67

3	Eine zunehmende Konzentration der Komplexe im Medium führt zu mehr Platinaddukten an zellulärer DNA.....	69
3.1	Die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (11) , (12) , (13) und (14) bilden bei geringen Konzentrationen die wenigsten DNA-Addukte aus.....	69
3.2	Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) bildet mindestens soviele DNA-Addukte aus wie die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen.....	71
3.3	Die Anzahl der zellulären DNA-Addukte von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) und von Cisplatin [H ₂ O] (1) gleichen sich	72
4	Platinkomplexe führen zu einer Reihe unterschiedlicher DNA-Sekundärstrukturveränderungen.....	75
4.1	Exkurs: DNA-Topologie	75
4.2	Die Solvolyse von Cisplatin in DMSO führt zu verlangsamten Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur	80
4.3	Bisamid-bisplatin(II) (8) biegt die DNA nicht	82
4.4	Für die Retardation Bisamid-bisplatin(II) (8) behandelter, offener Zirkel in der Agarosegelelektrophorese sind positive Ladungen verantwortlich	83
4.5	Die Platin(IV)-Verbindungen (9) , (10) verursachen Einzelstrangbrüche.....	89
4.6	Der Grad des Aufdrillens ist direkt proportional zur Länge der verbindenden Alkylkette in den Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexen (11) , (12) , (13) und (14)	90
4.7	Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) weist ein geringeres Aufwindungspotential auf als die analogen Bisplatinverbindungen (11) , (12) , (13) und (14)	93
4.8	Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) führt zu den geringsten DNA Sekundärstrukturveränderungen.	94
5	Die intermolekulare Verknüpfung der DNA-Stränge einer Helix durch Platinaddukte korreliert nicht mit der Cytotoxizität der Komplexe.	96
5.1	Die Solvolyse von Cisplatin in DMSO reduziert die Zahl der Interstrangverknüpfungen.....	97
5.2	Bisamid-bisplatin(II) (8) erzeugt mehr Interstrangverknüpfungen als Cisplatin [H ₂ O] (1)	100
5.3	Bisamid-bisplatin(IV) (9) bildet mehr Interstrangverknüpfungen aus als die analoge mononukleare Verbindung (10)	101
5.4	Die Fähigkeit Interstrangverknüpfungen auszubilden nimmt mit der Länge der verbindenden Alkylkette in den Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (11) , (12) , (13) und (14) zu.	102
5.5	Die Fähigkeit Interstrangverknüpfungen auszubilden ist bei Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) weit weniger ausgeprägt als für die analogen Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe (11) , (12) , (13) und (14)	104
5.6	Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) bildet die wenigsten Interstrangverknüpfungen aus.	105

6	Unterschiede in der Reparatureffizienz der verschiedenen Platin-komplexe sind geringer als die Sensitivität des <i>in vitro</i>-DNA-Reparatur-Tests	107
6.1	An einem UV-strahlengeschädigten Plasmid kann DNA-Reparatur-synthese nachgewiesen werden.....	108
6.2	Es gibt eine optimale Proteinkonzentration für den DNA-Reparatur-synthesetest.	112
6.3	Die Aktivität der DNA-Reparaturenzyme ist <i>in vitro</i> bis zu sechs Stunden gleichbleibend	116
6.4	Cisplatin Addukte an DNA werden <i>in vitro</i> ineffizient repariert.....	118
6.5	Eventuelle Unterschiede in der DNA-Reparatursynthese bei Addukten von Cisplatin [H ₂ O] (1) bzw. [DMSO] (1a), Bisamid-bis-platin(II) (8) und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) liegen unterhalb der Nachweisgrenze des <i>in vitro</i> DNA-Reparatur-synthesetests	123
7	Mit Ausnahme von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) können DNA-Addukte aller untersuchten Platinkomplexe Proteine koordinativ binden.	128
7.1	Die DMSO-Solvolyse führt zu mehr Cisplatin vermittelter DNA-Proteinquervernetzungen.	129
7.2	Bisamid-bisplatin(II) (8) führt zu mehr DNA-Proteinverknüpfungen als Cisplatin [H ₂ O] (1) oder Cisplatin [DMSO] (1a).	134
7.3	Die Bisplatin(IV)-Verbindung (9) vernetzt mehr Proteine mit DNA als die Monoplatin(IV)-Verbindung (10).	140
7.4	Die Fähigkeit, DNA mit Proteinen zu vernetzen, ist bei den Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (11), (12), (13) und (14) direkt proportional zur Länge der verbindenden Alkylkette.....	142
7.5	Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) bildet weniger DNA-Protein-komplexe aus als die analogen Bisplatinverbindungen (11), (12), (13) und (14)	145
7.6	Es konnten keine DNA-Proteinquervernetzungen durch Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) nachgewiesen werden	147
8	Zusammenfassung der Ergebnisse	150
	Diskussion der Ergebnisse	153
1	Cytotoxizitätstest und Untersuchung der DNA-Synthese	153
2	Platinmenge in den Zellen	157
3	Platinaddukte an DNA	160
4	DNA-Sekundärstrukturveränderungen	161
5	DNA-Interstrangverknüpfungen	166
6	DNA Reparatur	168
7	DNA-Proteinquervernetzungen	172

Modell zur Erklärung der unterschiedlichen cytotoxischen Wirkung von Cisplatinanaloga	176
Ausblick	178
Zusammenfassung	181
Literaturverzeichnis	185
Lebenslauf	199

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL	certified cell lines
CD	Circulardichroismus
CdK	<i>cyclin dependent kinase</i>
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetracetat-Dinatriumsalz
en	Ethylendiamin
ERCC1 (XPF)	<i>excisions repair cross complementing group 1</i>
FKS	fötale Kälberserum
Gadd	<i>growth arrest and DNA damage</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HMG	<i>High Mobility Group</i>
Hrsg	Herausgeber
hUBF	<i>human upstream binding factor</i>
IC ₅₀	Konzentration einer Substanz, bei der die Zellzahl auf 50 % einer Vergleichsprobe ohne diese Verbindung absinkt (<i>inhibition concentration</i>)
LEF-1	<i>lymphoid enhancer factor-1</i>
lxr1	<i>intrastrand cross-link recognition protein</i>
m	milli-
M	Molar = Mol/Liter
Min	Minute(n)

MMR	Fehlpaarungsreparatur (<i>Mismatch Repair</i>)
MT	Metallothionein
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inneres Salz
mtTFA	<i>mitochondrial transcription factor</i>
n. d.	nicht detektierbar
NER	Nukleotid-Excisions-Reparatur (<i>Nucleotide Excision Repair</i>)
p21/CIP1/WAF1/SDI1	Protein mit einem Molekulargewicht von 21
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i> Natrium Dodecylsulfat
SRY	<i>sex-determining factor</i>
TBP	TATA <i>Box Binding</i> Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UvrA / B	<i>UV-repair protein A / B</i>
V	Volt
vgl.	vergleiche
XPA / E / ...	Xeroderma Pigmentosum Komplementationsgruppe A / E / ...
z.B.	zum Beispiel

Veröffentlichungen

Miller, B., Wild, S., Zorbas, H., Beck, W., Syntheses and Biological Activity of *cis*-Dichloro Mono- and Bis(platinum) Complexes With *N*-Alkyl-ethylenediamine Ligands, *Inorganica Chimica Acta*, **1999**, 290, 237 - 246.

von Nussbaum, F., Miller, B., Wild, S., Hilger, S., Schumann, S., Zorbas, H., Beck, W., Steglich, W., Synthesis of 1-(2-Aminophenyl)isoquinolines and the Biological Activity of Their *cis*-Dichloro Platinum(II) Complexes, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42 (18), 3478 – 3485.

Wild, S., Lustig, S., Dannhauser-Riedl, S., Steglich, W., Beck, W., Schramel, P., Zorbas, H., Structure-Function Relationship of Active and Inactive Platinum Based Compounds, *Biochemistry*, **2001**, eingereicht

Einleitung

1 Klinische Aspekte von Cisplatin (1).

Der Metallkomplex *cis*-Diammindichloroplatin(II) oder Cisplatin (1) wird seit 1979 klinisch eingesetzt und ist zur Zeit eines der drei am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika.¹

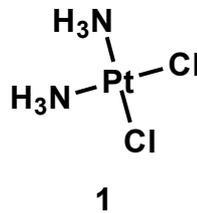


Abb. 1: Strukturformel von *cis*-Diammindichloroplatin(II), Cisplatin (1).

Die Erfolgsaussichten auf Cisplatin (1) basierender Krebstherapien werden durch die Anwendung von Kombinationstherapien gesteigert. Eine Übersicht über die Therapiekombinationen und die Ansprechraten der wichtigsten Tumore, die routinemäßig mit Cisplatin (1) behandelt werden, zeigt Tabelle 1.²

Art des Tumors (fortgeschrittenes Stadium)	Behandlung	Ansprechrate [%]
kleinzelliger Lungenkrebs	Cisplatin / Etoposid + Brustbestrahlung	80 – 95
Eierstockkrebs	Cisplatin / Paclitaxel oder Carboplatin / Paclitaxel	70 – 80
Hodenkrebs	Cisplatin / Etoposid / Bleomycin	80 – 99
Kopf- und Halstumore	Cisplatin / Fluorouracil	80 – 90
nicht kleinzelliger Lungenkrebs	Cisplatin / Etoposid	≈ 20

Tabelle 1: Sensitivität verschiedener Tumore gegenüber Cisplatin (1) basierenden Kombinationstherapien.

Diese Angaben beziehen sich allerdings nur auf eine Erstbehandlung. Ein hoher Anteil der Patienten wird dabei vollständig geheilt. Dennoch erleiden die meisten Patienten letztendlich ein Rezidiv. Bei Eierstockkrebs im dritten Stadium sind dies beispielsweise 56 % der behandelten Patienten, bei kleinzelligen Lungentumoren sogar 95 %.² In vielen Fällen erweisen sich diese wiederauflebenden Tumore als resistent. Die Ansprechraten von Eierstocktumoren, die nach der ersten Chemotherapie nicht angesprochen haben oder ein Rezidiv bildeten, liegen bei einer zweiten Behandlung mit Cisplatin **(1)** bei ungefähr zehn Prozent.³ Dabei ist die auftretende Resistenz nur teilweise spezifisch für Cisplatin. Tumore, die nach einer Cisplatin **(1)** oder Carboplatin **(2)** basierenden Therapie resistent gegenüber diesen Platinverbindungen waren, sprachen nur in 32 % der Fälle auf eine weitere Behandlung mit Etoposid an.⁴ Als grobe Faustregel gilt, dass je geringer die Wirkung einer ersten Chemotherapie und je kürzer die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs war, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten von Resistenzen.

Ein grundsätzliches Problem stellen die Nebenwirkungen der Chemotherapien dar. Nachdem in den anfänglichen klinischen Studien mit Cisplatin **(1)** schwere Übelkeiten mit Erbrechen und Nierenversagen auftraten, wurden die klinischen Tests beinahe eingestellt.⁵ Weitere Forschungen zeigten jedoch, dass durch intensive Diurese die schweren Nierenschäden verhindert werden können,⁶ und dies ermöglichte eine Fortsetzung der Untersuchungen. Die auftretende Übelkeit kann durch den Einsatz von 5-Hydroxytryptamin-3-Rezeptor-Antagonisten vermindert werden.⁷

Dieser Behandlung liegt ein grobes Modell der Entstehung der Übelkeit zugrunde, nachdem Übelkeit durch Serotonin (5-Hydroxytryptamin) hervorgerufen wird, das von den enterochromaffinen Zellen in der Wand des Darmkanals freigesetzt wird. Die Bindung von Serotonin an die 5-Hydroxytryptamin-3-Rezeptoren (5HT₃-Rezeptoren) der visceralen (zu den Eingeweiden gehörenden) afferenten (zum Gehirn führenden) Nervenbahnen erhöht die Anregung einer Region im Gehirn, die das Erbrechen kontrolliert.⁸⁹

Weiterhin wurden Gehörschäden in Form von Gehörlosigkeit im hohen Frequenzbereich beobachtet.¹⁰ Seltener tritt auch Neurotoxizität auf, hauptsächlich in Form von vorübergehendem Verlust der Sensitivität in den

Gliedmaßen. Diese Schädigung der Nervenzellen beruht auf Demyelinisierung¹¹ der Axonen, mit der Folge, dass wahrscheinlich die Impulsweiterleitung verlangsamt wird.¹² Außerdem kann Cisplatin (**1**) zu Mutationen und damit zu individuellen Langzeitschäden führen.¹⁰

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Cisplatin ein sehr wirkungsvolles Chemotherapeutikum ist, dessen Einsatzspektrum allerdings nicht universell ist und durch Resistenzen und Nebenwirkungen weiter eingeschränkt wird.

2 Reaktionen und Wirkungen von Cisplatin (1) in Zellen.

Trotz des umfangreichen Einsatzes und intensiver Forschung ist das Verständnis der Wirkungen von Cisplatin noch lückenhaft. Die wichtigsten der bisher gewonnenen Erkenntnisse werden im folgenden zusammengefasst.

Nach intravenöser Verabreichung von Cisplatin (**1**) bleibt dieser neutrale und wenig reaktive Komplex im Serum. Die verhältnismäßig hohe Chloridionenkonzentration von ca. 100 mM im Blut verhindert weitestgehend einen Ligandenaustausch. Durch passive Diffusion gelangt Cisplatin (**1**) dann in die Zellen. Eine schematische Übersicht über die Reaktionen von Cisplatin (**1**) in Zellen gibt Abb. 2 auf Seite 12.

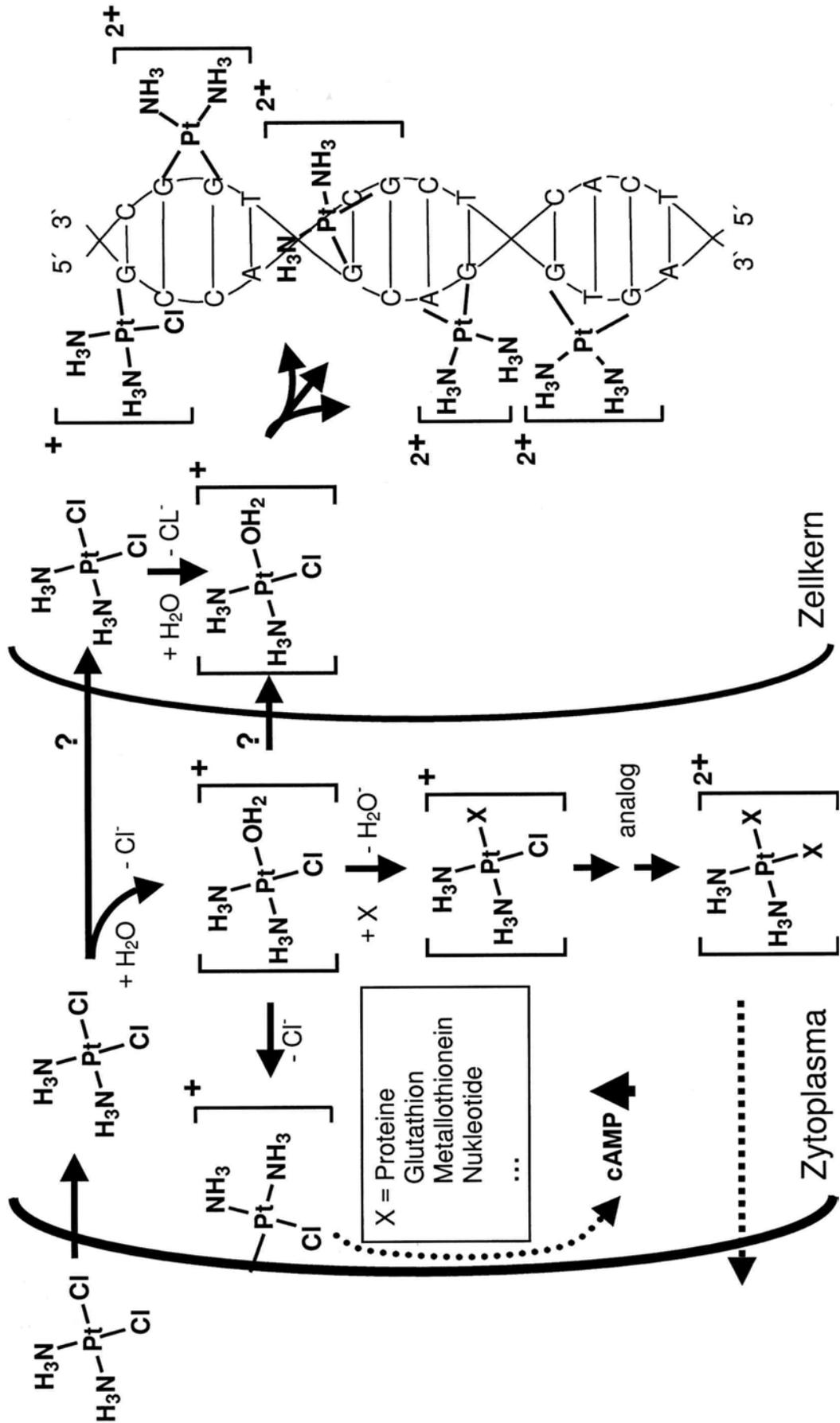


Abb. 2: Schema der möglichen Reaktion von Cisplatin (1) in einer Zelle. Die einzelnen Schritte sind im Text erklärt, Sekundärstrukturveränderungen sind nicht dargestellt.

In Cisplatin-resistenten Zellen findet man *in vitro* häufig, aufgrund reduzierter Aufnahme oder verstärkter Ausscheidung, eine zwei- bis vierfach geringere Platinmenge.¹³ Im Cytoplasma ist die Chloridionenkonzentration mit 4 mM geringer und Cisplatin (**1**) kann hydrolysiert werden. Dabei wird mindestens ein Chloridion gegen ein Wassermolekül ausgetauscht und es entsteht ein positiv geladener reaktiver Komplex.¹⁴ Aufgrund der unterschiedlichen Chloridionenkonzentration ist Cisplatin (**1**) in Zellen schätzungsweise zehnmal reaktiver als im Plasma.¹⁵ Wasser, das eine gute Fluchtgruppe ist, wird nun schnell von einem Nukleophil verdrängt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist dabei die Hydrolyse.¹⁶ Angreifende Nukleophile können dabei z.B. Thiolgruppen von Proteinen oder Stickstoffatome der DNA- bzw. RNA-Basen sein.

Durch Fraktionierung der Zellbestandteile lässt sich die Verteilung der Cisplatin-Addukte abschätzen. Fünf bis zehn Prozent werden an unlöslichen Zellresten wie Membranproteine gebunden, 20 bis 50 % an löslichen, phenolextrahierbaren Bestandteilen, im wesentlichen Proteine, 20 % an ethanolpräzipitierbares Material, zu dem vor allem DNA und RNA gehört, und 20 bis 25 % gehörten keiner der genannten Gruppen an. Diese Anteile von wasserlöslichen Cisplatin-komplexen dürften Reaktionsprodukte mit kleinen Molekülen und ungebundenes Cisplatin sein. An DNA binden schätzungsweise nur ein Prozent des in einer Zelle enthaltenen Cisplatin.¹⁷

Die möglichen Folgen, die sich aus der Bindung von Cisplatin (**1**) an die verschiedenen Zellbestandteile ergeben, sind wahrscheinlich mindestens ebenso vielfältig wie die Bindungspartner. So kann Cisplatin an Membranproteine binden. Eine mögliche Folge davon ist ein mehrfacher Anstieg an cAMP - eines wichtigen sekundären Botenstoffes - in P388 D1 Zellen, die mit Cisplatin (**1**) behandelt wurden.¹⁸ Ob dies Einfluss auf die Cytotoxizität hat und welche weiterführenden Signale daran beteiligt sind, ist jedoch unklar.¹⁷

Die Bindung von Cisplatin (**1**) an Proteine erfolgt vor allem über Cystein, Methionin und Histidin, aber auch über Arginin, Glutaminsäure und Asparaginsäure.¹⁷ Allerdings wird statistisch nur ungefähr jedes fünftausendste Protein angegriffen.¹⁹ Aus diesem Grunde wird der Einfluss der platinieren Proteine auf die

Cytotoxizität gering eingeschätzt.¹⁹ Dabei wird allerdings vernachlässigt, dass bestimmte Proteine präferentiell gebunden werden könnten.¹⁷

So sind z.B. die meisten Thiolgruppen in Zellen in Form des Tripeptids Glutathion (GSH) mit einer Konzentration von 0,5 mM bis zu 10 mM vorhanden.²⁰ Cisplatin (**1**) kann mit zwei GSH-Molekülen reagieren und dieser Komplex wird dann von der ATP-abhängigen Glutathion-S-Konjugatexportpumpe aus der Zelle geschleust.²¹ Dies ist ein weiterer möglicher Resistenzmechanismus, und in einigen Cisplatin resistenten Zelllinien wurden entsprechend erhöhte Glutathionkonzentrationen gefunden.²⁰

Metallothionein (MT) ist ein kleines Protein von 61 bis 62 Aminosäuren, davon 20 Cysteine, das vermutlich bei der Schwermetallentgiftung eine Rolle spielt. Ein Metallothionein kann bis zu zehn Platinatome von Cisplatin (**1**) binden. Der Einfluss von Metallthioneinen bei Cisplatinresistenzen ist allerdings unklar.²⁰

Auch freie Purinnukleotide reagieren mit Cisplatin (**1**) und können dieses abfangen. Der Effekt wird dadurch bedeutsam, dass die Konzentration der Nukleotide in den Zellen im millimolaren Bereich liegt und die Purinnukleotide gute Nukleophile darstellen. Bei einer Konzentration von 10 mM ATP hätte das hydrolysierte Cisplatin (**1**) nur eine Halbwertszeit von 3 Minuten.¹⁷ Ob die Nukleotide nur die effektive Konzentration der aktiven Cisplatin Komplexe verringert oder ob damit weitergehende Effekte verknüpft sind, ist jedoch ungeklärt.

2.1 Reaktion von Cisplatin (**1**) mit DNA

Ein Teil der Cisplatinmoleküle gelangen auch in den Zellkern. Dabei ist nicht klar, ob im Cytoplasma hydrolysierte Komplexe die Kernmembran passieren oder ob nur ungeladenes *cis*-Diammindichloroplatin(II) (**1**) in den Zellkern eindringen kann und dort hydrolysiert wird. Die aktivierten Cisplatin Komplexe im Zellkern reagieren dann mit den Nucleobasen, vorwiegend mit dem Stickstoff an Position 7 des Imidazolringes der Purinbasen. Dabei entstehen zuerst monofunktionale Addukte, die aber dann größtenteils in einer weiteren Ligandenaustauschreaktion mit DNA-Basen in bifunktionale Addukte umgewandelt werden. Nur etwa zwei Prozent der DNA-Addukte bleiben monofunktional.²² Ein geringer Prozentsatz von ca. 0,15 % der Addukte bilden koordinative Verknüpfungen zu Proteinen aus (im Schema nicht gezeigt).²³ Die häufigsten bifunktio-

nenalen Addukte sind Verknüpfungen zweier benachbarter Guanine auf demselben DNA-Strang (d(GpG)-1,2-Intrastrangverknüpfung) mit 60 bis 65 %. Etwas weniger häufig treten mit 20 bis 25 % d(ApG)-1,2-Intrastrangverknüpfungen auf. Daneben gibt es noch bifunktionale Addukte nicht benachbarter DNA-Basen. Dazu zählen die 1,3-Intrastrangaddukte zwischen zwei Guaninen (d(GpXpG)) (~2 %) bzw. einem Guanin und einem Adenin (d(ApXpG)) und d(GC/GC)-Interstrangaddukte (~2 %), die die beiden komplementären DNA-Stränge miteinander verknüpfen.²² Neueren Messungen zufolge liegt der Anteil der Interstrangverknüpfungen mit fünf bis acht Prozent etwas höher.²⁴

Neben der hohen Reaktivität des N7 der Purinbasen muss es jedoch noch andere Effekte geben, die zu dieser Sequenzspezifität beitragen. Nach der Ausbildung eines Monoadduktes an Guanin würde es rein statistisch nur 12,5 % GpG-1,2-Intrastrangverknüpfung geben.¹⁴ Benachbarte Guanine weisen aber das am stärksten negative elektrostatische Potential auf und ziehen damit vermutlich die positiv geladenen, hydrolysierten Komplexe am stärksten an.²⁵ Die zweithäufigsten Addukte sind dann d(ApG)-1,2-Intrastrangverknüpfungen, während d(GpA)-Addukte selten sind, obwohl beide Sequenzen in natürlicher DNA in etwa gleich häufig sind. Der Grund dafür liegt darin, dass der intermediär gebildete, fünffachkoordinierte Übergangszustand bei der Reaktion des hydrolysierten Cisplatin mit DNA von einem in 5'-Richtung vom angreifenden Guanin gelegenen Adenin besser stabilisiert wird als von einem 3'-Adenin.²⁶ In geringerem Ausmaß beeinflussen auch nicht direkt benachbarte Basen die Platinierungsgeschwindigkeiten.²⁷ Bei den Interstrangverknüpfungen findet man praktisch ausschließlich d(GC/GC)-Addukte und keine d(CG/CG)-Verknüpfungen. In diesem Fall könnte der Abstand der beiden Guanine, der in einer normalen B-Form DNA für erstere Sequenz mit 0,71 nm kürzer ist als für letztere mit 0,89 nm, ausschlaggebend sein.²⁷ Die Regioselektivität der Reaktion von Cisplatin (**1**) mit DNA wird also durch viele Parameter beeinflusst. Dazu zählen z.B. das elektrostatische Potential der Basen, die Art der Übergangszustände, Zugänglichkeit der Basen, räumliche Anforderungen und Flexibilität der DNA.²⁷

Die Bindung von Cisplatin (**1**) verändert aber auch die Sekundärstruktur der DNA. Bereits Cisplatin-Monoaddukte erniedrigen die thermische Stabilität der DNA-Helix in der Umgebung des Adduktes und führen zu DNA-Verzerrungen.²⁸ Dieser Effekt ist abhängig von der DNA-Sequenz. Wird das Guanosin, das das

Monoaddukt trägt, von zwei Pyrimidinbasen flankiert, so ist der Effekt am stärksten und es wird sogar die Basenpaarung zum komplementären Cytosin aufgehoben. Solche Monoaddukte können aufgrund der flankierenden Pyrimidinbasen nur 1,3-Intrastrangaddukte oder Interstrangverknüpfungen ausbilden, die ihrerseits ebenso zu transientem oder permanentem lokalem Aufschmelzen der Basenpaarung führen.²⁹ Im Gegensatz dazu führen weder die Monoaddukte noch die 1,2-Intrastrangaddukte an d(GpG) bzw. d(ApG) zu einem Aufbrechen der Basenpaarungen.²⁹

Das Ausbilden von Bisaddukten erfordert oder erzeugt dann zusätzliche Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur. Die beiden 1,2-Intrastrangaddukte an d(GpG) bzw. d(ApG) drillen die DNA um jeweils 13° auf³⁰ und biegen die DNA-Helix um 32 bis 35° in Richtung der großen Furche der DNA.³¹ Die Röntgenstrukturanalyse des *cis*-[Pt(NH₃)₂{d(pGpG)}] Komplexes, also eines d(GpG)-Adduktes an einem einzelsträngigen Dinukleotid,³² bzw. an einem doppelsträngigen Oligonukleotid mit einer Länge von 12 Basenpaaren,³³ ermöglicht detailliertere strukturelle Aussagen. Die Guaninbasen bleiben in *anti*-Konformation und die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen bleiben vollständig erhalten. Die Ebenen der Basen sind in dem Dinukleotidaddukt um 76° bis 87° verdreht,³² während in dem größeren Oligonukleotid die interplanaren Winkel lediglich um 8° bis 37° verdreht sind.³³ Die DNA Helix wird durch das 1,2-Intrastrangaddukte an d(GpG) gebogen.^{14; 33} Darüberhinaus ist die kleine Furche der DNA im Kristall teilweise weiter als in einer B-Form DNA und ähnelt damit stellenweise A-Form DNA.³³ Zwischen den Ammingruppen von Cisplatin (**1**) und den Sauerstoffatomen der Phosphatgruppen der DNA finden sich Wasserstoffbrückenbindungen.³² Dies könnte für die Orientierung des Monoaddukts vor der zweiten Bindung eine Rolle spielen.

Ein 1,3-Intrastrangaddukt zwischen zwei Guaninen (d(GpXpG)) drillt die DNA um 23° auf³⁰ und biegt, ähnlich den 1,2-Intrastrangaddukten, die DNA-Helix um 32 bis 35° in Richtung der großen Furche der DNA.³¹ Die zwischen den beiden platinieren Guaninen gelegene Base wird aus der DNA-Helix verdrängt (*syn*-Konformation). Dadurch wird die DNA an dieser Stelle flexibler.¹⁴

Die Sekundärstrukturveränderungen durch ein d(GC/GC)-Interstrangaddukt unterscheiden sich deutlich von den oben beschriebenen. Die DNA wird um 87°

aufgewunden und die DNA-Helix um 20° in Richtung der kleinen Furche gebogen. Das Interstrangaddukt zwingt die komplementären Cytosine aus der Helix und die Phosphatgruppen der beiden gebundenen Guaninnukleotide gehen elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Platinmetall ein und bilden so einen quasioktaedrischen Komplex. Das in 5'-Richtung gelegene Guaninnukleotid liegt um ca. 180° verdreht, also linksgängig vor.³⁴

Trotz intensiver Forschung ist der Zusammenhang zwischen den spezifischen Addukten, den dadurch hervorgerufenen Sekundärstrukturveränderungen und der cytotoxischen Wirkung nach wie vor unklar.¹³

2.2 Konsequenzen der Cisplatin-DNA-Addukte

In Abb. 3 sind mögliche Effekte von Cisplatin (1) in Zellen schematisch dargestellt.

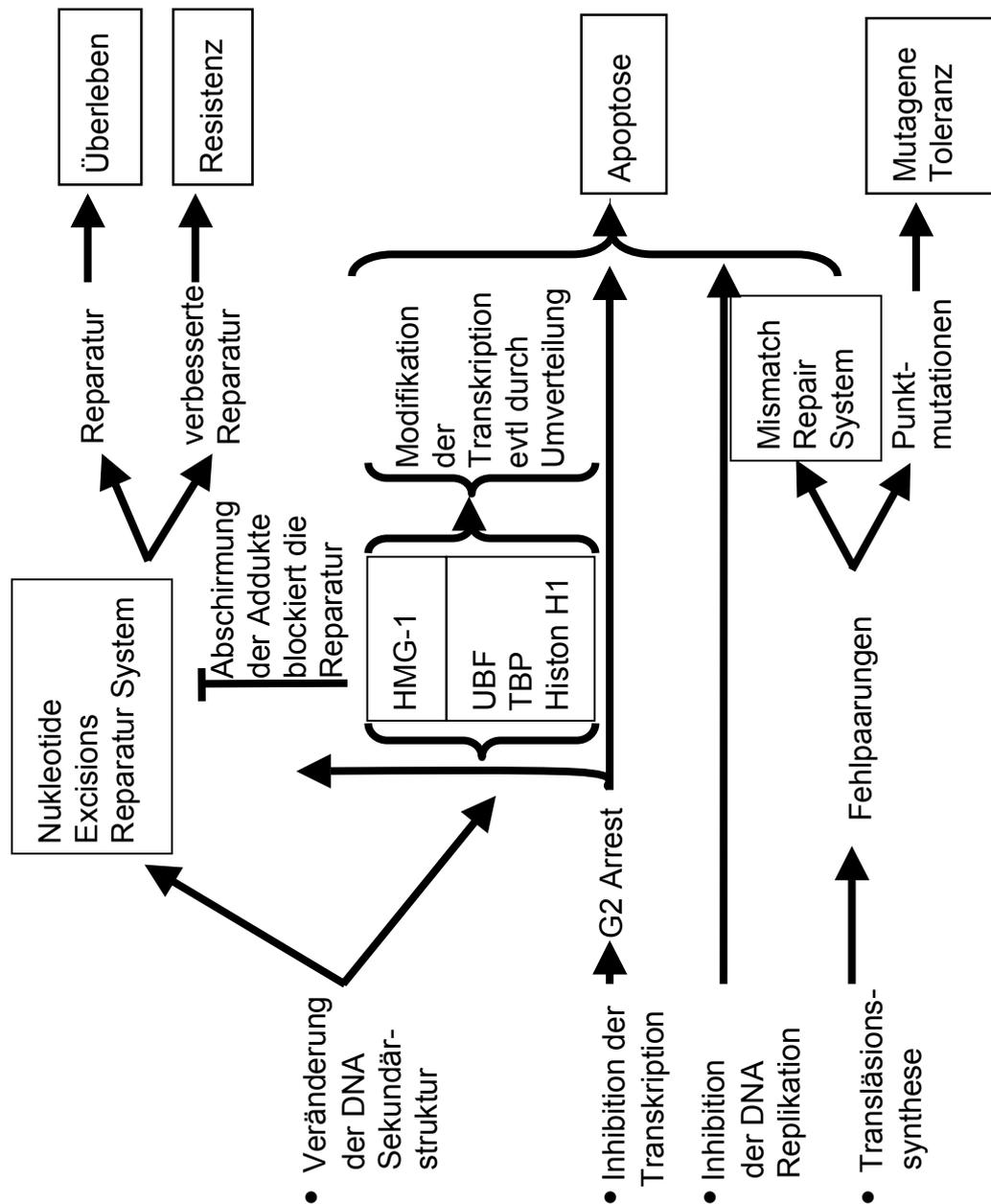


Abb. 3: Schematische Übersicht über mögliche Effekte von Cisplatin (1) in Zellen. Details werden im Text erklärt.

Sowohl bei der DNA-Replikation als auch bei der Transkription wird die DNA als Matrize verwendet und deswegen können beide Prozesse durch Cisplatin-Addukte beeinflusst werden. In einem *in vitro*-System wurde durch bifunktionale Addukte von Cisplatin (1) sowohl die Initiation als auch die Elongation der DNA-

Replikation gestört.³⁵ Allerdings korreliert die Inhibition des Zellwachstums in L1210 Zellen nicht mit der Abnahme der DNA-Synthese.³⁶ Die Fähigkeit, durch Transläsionssynthese bei der Replikation Cisplatin-Addukte zu tolerieren, führt jedoch zu Resistenz.¹³

Eine alternative Erklärung für die cytotoxische Wirkung von Cisplatin (**1**) könnte ein Arrest der Zellen in der G2-Phase sein. Ein Zellzyklusarrest könnte dabei durch eine Störung der Transkription von Genen, die für den Übergang zur Mitose benötigt werden, durch Cisplatin-Addukte, hervorgerufen werden. Nach einer gewissen Zeit konnte die Zelle entweder die Addukte reparieren und den Zellzyklus fortsetzen, oder sie stirbt.³⁶

Tatsächlich führt eine Erhöhung der Reparatureffizienz des Nukleotid-Excisions-Reparatur-Systems (NER), zu einer erhöhten Überlebensrate, das heißt Resistenz.³⁷

Allerdings wurde für das Fehlpaarungs-Reparatur-System (*Mismatch Repair System*, MMR) genau das Gegenteil beobachtet. Der Verlust des MMR-Systems führt zu Toleranz. Als Mechanismus wird vorgeschlagen, dass bei der Transläsionssynthese gegenüber einem 1,2-Intrastrangaddukt an d(GpG) ein Thymin statt eines Cytosins eingebaut wird. Das MMR erkennt eine Fehlpaarung und versucht diese zu reparieren. Da das d(GpG) 1,2-intramolekulare Platinaddukt, das die Ursache der Fehlpaarung war, dabei jedoch nicht beseitigt wird, wird erneut ein Thymin eingebaut. Dies führt zu einer Endlosreparaturschleife und letztendlich zum Zelltod durch letale Strangbrüche. Ein Defekt im MMR verhindert dies und erzeugt somit Toleranz.³⁸ Das Fehlen des *Mismatch Repair* Systems führt allerdings zur Anhäufung von Mutationen, weswegen dieser Resistenzmechanismus auch als mutagene Toleranz bezeichnet wird.

Neben den Reparaturproteinen binden auch andere Proteine Platinaddukte an der DNA. Als mögliche Konsequenzen stellten Pil *et al.*³⁹ drei Wege zur Diskussion:

1. Die Proteinbindung verhindert die Erkennung der Addukte durch das zelluläre Reparatursystem. Dies führt letztendlich zum Zelltod. Tatsächlich konnte in einem *in vitro*-Reparatursystem gezeigt werden, dass hinzugefügtes HMG1 die Reparatur des d(GpG) 1,2-Intrastrangaddukts blockiert.⁴⁰ Einen ähnlichen Effekt könnte auch die Bindung von Histon H1 haben, das

eine etwa zwanzigfach höhere Affinität zu Cisplatin-Addukten aufweist als HMG⁴¹ und zehnmal mehr im Zellkern enthalten ist.⁴² Allerdings wurden unter physiologischen Bedingungen, mit Zellextrakten ohne gereinigtes HMG1, keine Hinweise für eine Abschirmung der Cisplatinaddukte durch HMG1 gefunden.⁴³

2. Platinaddukte zwingen HMG-Box-Proteine an unorthodoxe DNA-Regionen zu binden und verändern so möglicherweise die Transkription wichtiger Gene. HMG1 könnte eine Art nukleares Chaperon sein, das eventuell durch Aufdrillen und Biegen der DNA eine optimierte Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren schafft.⁴⁴
3. Ein Protein, das die veränderte DNA-Sekundärstruktur erkennt und bindet, wird eigentlich zur Transkription in den sich schnell vermehrenden Tumorzellen benötigt. Die Konkurrenz der Platinaddukte mit den natürlichen Bindungsstellen stört das Gleichgewicht und tötet so die Zelle. Zum Beispiel bindet der ribosomale RNA Transkriptionsfaktor hUBF (*human upstream binding factor*), der auch zur Familie der HMG-Box-Proteine gehört, mit fast derselben Affinität ($K_{d(\text{app})} \approx 60 \text{ pM}$) an d(GpG) 1,2-intrastrang Addukte von Cisplatin wie an den rDNA Promotor ($K_{d(\text{app})} \approx 18 \text{ pM}$).⁴⁵ Da die hUBF-Promotorbindung kooperativ ist, führen kleine Änderungen der Menge des freien Proteins zu großen Unterschieden der Promotorbesetzung. Die Autoren⁴⁵ prägen dafür die Beschreibung „*cisplatin-mediated-transcription-factor-hijacking mechanism*“ und schlagen vor, dass dadurch sowohl die DNA-Reparatur als auch die rDNA Transkription negativ beeinflusst werden, was sich in beiden Fällen stärker auf schnell proliferierende Tumorzellen auswirkt. Weniger spezifisch könnte dagegen der Einfluss der Bindung des TATA *Box Binding* Proteins, TBP, an Cisplatin-Addukte sein. Der generelle Transkriptionsfaktor TBP kann von Cisplatin-Addukten abgefangen werden, und dies könnte für die verminderte gesamte RNA-Synthese in Cisplatin behandelten Zellen verantwortlich sein.⁴⁶

Abgesehen von den Proteinen, die Cisplatin-Addukte binden können, ist der weitere Signalweg, der letztendlich zum Zelltod führt, weitgehend unbekannt.

Es gibt Hinweise, dass p53 und p21 an der Signalweiterleitung beteiligt sind (Abb. 4). Verschiedene Signale führen dabei zum Zellzyklusarrest, zur DNA-Reparatur oder zum Zelltod.

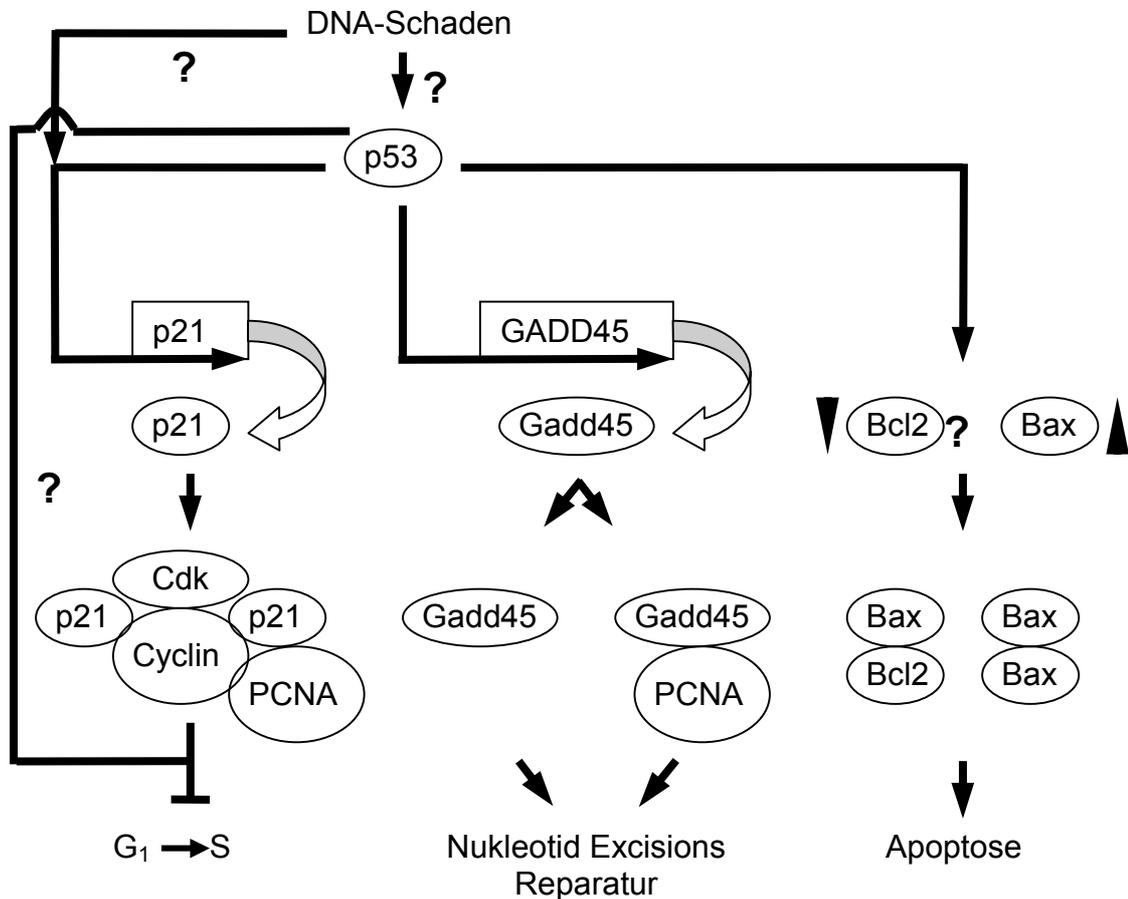


Abb. 4: Schematischer Überblick über mögliche Signalwege, die die Wirkungen von Cisplatin-DNA-Addukten vermitteln

So gibt es Zellen, die ohne das Gen für p53 bzw. p21 sensitiver gegenüber Cisplatin sind. Dieser Effekt korreliert sowohl mit einer verminderten DNA-Reparatur als auch mit einem Verlust der G₁-Zellzykluskontrolle.⁴⁷ Der Signalweg, über welchen die p53-Proteinmenge in Zellen mit dem Gen für p53 nach Schädigung der DNA reguliert wird, ist weitgehend unbekannt.⁴⁸ In jedem Fall führt der Anstieg an p53 zu einer Transkriptionsaktivierung verschiedener Gene, zu denen z.B. auch p21 gehört.

Wegen der Überexpression von p21 werden aktive Komplexe, jeweils bestehend aus einem Cyclin, einer CdK (*cyclin dependent kinase*), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und p21 durch die Bindung zusätzlicher p21-Moleküle inaktiviert. Dadurch wird die Phosphorylierung von Cdk2, Cdk3, Cdk4 und Cdk6

inhibiert und der Übergang von der G1- in die S-Phase verhindert (Zellzyklusarrest).⁴⁹ Außerdem blockiert die erhöhte, nichtstöchiometrische Bindung von p21 an PCNA die Aktivierung der DNA-Polymerase δ .⁴⁹ Allerdings wurden keine Hinweise gefunden, dass p21 zu einem S-Phasenarrest führt.⁵⁰ Die Elongation wird entweder aufgrund einer verminderten Assoziation der Polymerase δ mit PCNA oder aufgrund der Verringerung der Beweglichkeit des Komplexes auf der DNA inhibiert.⁴⁹

Es ist wahrscheinlich, dass es mehrere, zum Teil redundante Signalwege gibt. So wurden sowohl Beispiele von p53-unabhängiger Überexpression von p21 gefunden,⁵¹ als auch Zellzyklusarrest durch p53 ohne Überexpression von p21.⁵²

Auch die Transkription des GADD45-Gens (*growth arrest and DNA damage*) wird durch p53 induziert. Das Protein Gadd45 bindet auch PCNA und kompetitiert dabei mit p21. In einem zellfreien System erhöht die Zugabe von Gadd45 die Nukleotid-Excisions-Reparaturaktivität⁵³ und auch in Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von antisense gadd45-RNA die Reparaturaktivität abschwächt.⁵⁴ Der Einfluss von p21 auf die Excisions Reparatur ist geringer als bei der DNA-Replikation, da die Polymerase δ wenig und die Polymerase ϵ noch weniger in ihrer Fähigkeit, kurze DNA-Lücken aufzufüllen, inhibiert werden. Damit blockiert p21 zwar die Replikation, behindert aber die Reparatur nicht.⁵⁵ Auf welche Weise gadd45 die Excisions Reparatur beeinflusst, ist noch unklar. Fehlt in einer Zelle das Gen für p53 bzw. p21, so wird der Zellzyklus nicht unterbrochen und auch keine erhöhte Reparaturaktivität induziert. Die Zellen teilen sich also trotz der Cisplatinaddukte und sterben z.B. aufgrund von Interstrangverknüpfungen, die eine Teilung der DNA-Stränge verhindern (Mitotische Katastrophe)

Im Gegensatz zu den gerade eben beschriebenen Effekten, die dazu führen, dass Zellen ohne p53 sensitiver gegenüber DNA-Schäden werden, da sowohl die Zellzykluskontrolle als auch die DNA-Reparatur negativ beeinflusst werden, zeigten sich in einer Studie mit 60 Zelllinien des *National Cancer Institute* Zellen mit mutiertem p53 resistenter gegenüber Cisplatin als Zellen mit Wildtyp p53.⁵⁶ Vermutlich kommt hier ein dritter Weg der Wirkung von p53 zum Tragen. Die Expression von p53 verschiebt vermutlich das Gleichgewicht zwischen pro-

apoptotischen und antiapoptotischen Proteinen der Bcl2-Familie und induziert damit Apoptose.¹³ Die Menge an p21, das auch von vielen Wachstumsfaktoren unabhängig von p53 induziert werden kann, könnte die Entscheidung, ob eine Zelle den Zellzyklus arretiert und die DNA-Schäden repariert oder ob sie in die Apoptose geht, beeinflussen.⁴⁹

Dieses Bild der möglichen Signalwege und Reaktionen der Zelle auf DNA-Schäden ist sicherlich unvollständig und lässt die tatsächliche Komplexität der Vorgänge nur erahnen.

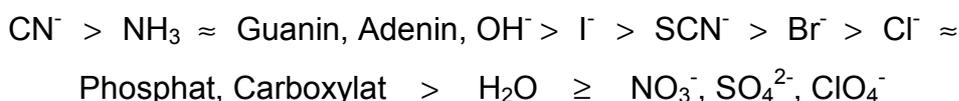
3 Aktuelle Entwicklungen

Neben der Kombination von Cisplatin (**1**) mit verschiedenen Chemotherapeutika zur Erweiterung des Einsatzspektrums und der parallelen Behandlung der Nebenwirkungen begleitet die Forschung schon seit Beginn der Anwendung von Cisplatin die Idee, dass Veränderungen des Komplexes selbst das klinische Einsatzspektrum erweitern könnten. Prinzipiell gibt es dazu vier Ansatzpunkte: Von den Liganden können entweder die Fluchtgruppen, bei Cisplatin (**1**) die Chloride, ausgetauscht oder die Ammine durch andere Nicht-Abgangsgruppen ersetzt werden. Als drittes kann noch die Oxidationsstufe von Platin zwischen plus zwei und plus vier variiert werden. Außerdem kann die räumliche Anordnung der Liganden, cis- oder transständig, variiert werden.

Durch einige systematische Untersuchungen konnten einige Struktur-Wirk-Beziehungen abgeleitet werden. Dabei handelt es sich allerdings nicht um genaue Regeln, sondern eher um empirische Zusammenhänge.

So ist Platin(II) als Zentralatom cytotoxischer als die oxidierte Form Platin(IV).⁵⁷ Außerdem weisen fast alle aktiven Verbindungen eine *cis*-Geometrie auf.⁵⁸ Die umfassende Gültigkeit dieser Regel wurde jedoch durch die Entdeckung von antitumorwirksamen *trans*-Platinkomplexen in der Arbeitsgruppe von Farrell^{59; 60; 61} relativiert. Geladene Komplexe sind in der Regel weniger antitumoraktiv als neutrale. Es ist allerdings nicht klar, ob eine Ladung die Zellaufnahme behindert oder ob die bessere Wasserlöslichkeit zum schnelleren Ausscheiden der Komplexe führt.⁶²

Als Faustregel für die Fluchtgruppenliganden gilt, dass eine zu labile Bindung der Fluchtgruppen an das Zentralmetall zu starker Toxizität führt, während eine zu stabile Bindung zu einem inerten und damit unwirksamen Komplex führt.⁵⁷ Die Affinität der Liganden zu Platin(II) nimmt dabei in folgender Reihenfolge ab:¹⁷



Für die Nicht-Fluchtgruppen können einige Leitstrukturelemente abstrahiert werden. Liganden, die nicht über Stickstoff an das Platinzentralatom gebunden

sind, weisen keine Aktivität auf.¹⁹ Komplexe mit tertiärem Amin sind inaktiv. Liganden sollten also mindestens eine NH-Gruppe⁵⁸ aufweisen, NH₃ und RNH₂-Liganden erhöhen, wahrscheinlich über Wasserstoffbrücken zwischen NH und polaren Gruppen der DNA, die Aktivität.⁵⁷ Liganden mit polaren Substituenten vermindern dagegen die Aktivität.⁵⁷ Chelatbildende Liganden zeigen zumindestens in experimentellen Modellen weniger Kreuzresistenz, d.h., dass sie in Zellen, die gegen Cisplatin resistent sind, wirksam sind.⁵⁷

Für einige einfache Amine wurden anhand systematischer Studien¹⁹ folgende Zusammenhänge zwischen Aminen und cytotoxischer Wirkung der entsprechenden *cis*-Platin(II)-Komplexe gefunden. Für lineare Amine ergibt sich ein Optimum der Wirksamkeit bei N-Butylamin. Tendenziell nimmt die Toxizität mit zunehmender Länge der Alkylkette zu. Die Toxizität der Platinkomplexe primärer Amine mit alicyclischen Substituenten nimmt von Cyclopropan zu Cyclohexan ab. Allerdings schränkt die geringe Wasserlöslichkeit den Einsatz stark ein. Insgesamt zeigen alicyclische Amine und aromatische Heterocyklen jedoch nur geringe Aktivität.

Für eine mögliche klinische Anwendung müssen neue Chemotherapeutika maßgebliche Vorteile gegenüber den etablierten Verbindungen aufweisen. Wünschenswerte Verbesserungen könnten dabei sein:⁶³

- ⊕ Erhöhte Wirksamkeit.
- ⊕ Breiteres Wirkspektrum.
- ⊕ Geringere akute Toxizität
- ⊕ weniger chronische Schäden
- ⊕ Überwindung von Kreuzresistenz
- ⊕ Orale Verabreichung und Aufnahme⁶⁴

Daneben sind noch die drei Verbindungen *cis*-Ammindichloro-(2-methylpyridin)-platin(II) ZD0473 (**5**), Bis-aceto-ammin-dichloro-cyclohexylamin-platin(IV): Satraplatin [JM216] (**6**) und BBR3464 (**7**) in der klinischen Prüfung.⁶⁵

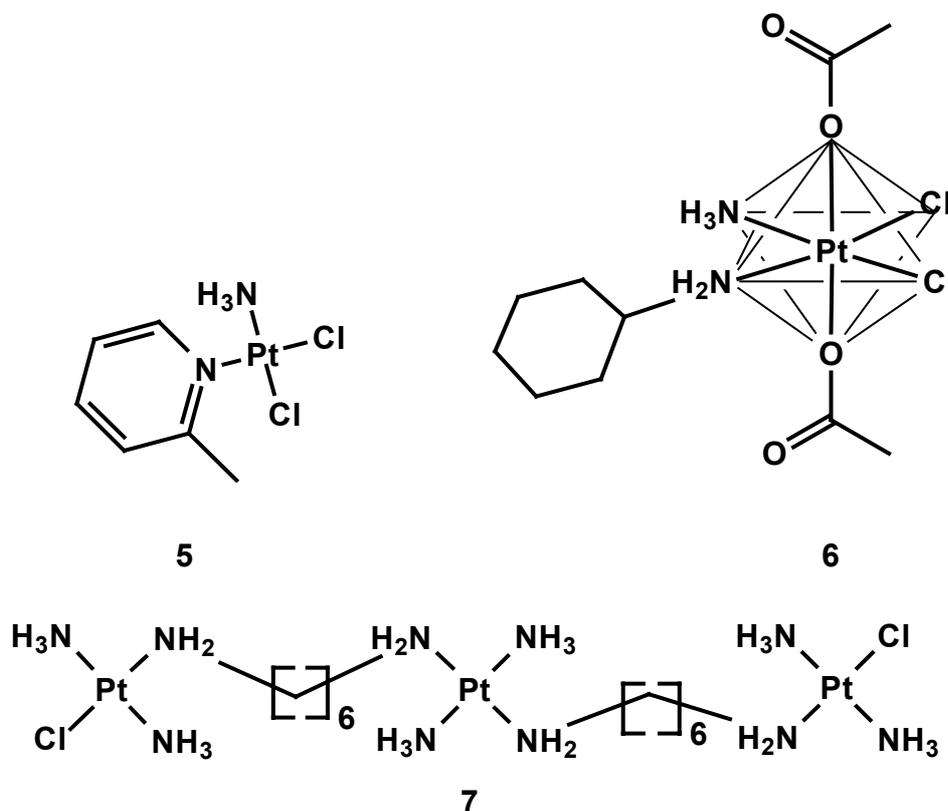


Abb. 7: Strukturformeln von ZD0473 (**5**) (oben, links), Satraplatin [JM216] (**6**) (oben, rechts) und BBR3464 (**7**) (unten).

Anhand dieser Verbindungen (**5**) bis (**7**) und der klinisch zugelassenen Verbindungen (**1**) bis (**4**) werden im Folgenden aktuelle Strukturprinzipien bzw. Strukturelemente und deren möglicher Einfluss auf die Toxizität und Antitumoraktivität besprochen.

Der Cyclobutan-dicarboxylat Ligand in Carboplatin ist, verglichen mit den Chloridliganden in Cisplatin (**1**), weniger reaktiv. Im Gegensatz zu Cisplatin (**1**) bindet es kaum an Plasmaprotein und wird deswegen überwiegend unverändert ausgeschieden.⁶⁶ Die geringe Reaktivität ist wahrscheinlich auch der Grund für die geringere Cytotoxizität. Außerdem erhöht der Cyclobutan-dicarboxylat Ligand die Löslichkeit des Komplexes.⁶³ Ähnliche Effekte werden auch durch die Verwendung von Oxalat als Fluchtgruppe in Oxaliplatin (**3**) bzw. Glykolat in Nedaplatin [254S] (**4**) erzielt. Nedaplatin [254S] (**4**) unterscheidet sich ebenso

wie Carboplatin (**2**) nur durch die Fluchtgruppen von Cisplatin (**1**). Deswegen unterscheiden sich diese drei Komplexe kaum in ihrem Wirkungsspektrum. Der 1,2-Diamincyclohexan-Ligand in Oxaliplatin (**3**) dagegen verringert die Kreuzresistenz gegenüber Cisplatin (**1**).⁶⁷ Des Weiteren weist Oxaliplatin (**3**) ein verändertes Wirkspektrum auf, da es z.B. der einzige bekannte Platinkomplex ist, der gegen fortgeschrittenen Kolorektalkrebs wirksam ist.⁶⁵

Der sterisch anspruchsvolle 2-Methylpyridin-Ligand in ZD0473 (**5**) soll den Angriff von Thiolgruppen, vor allem von Glutathion, erschweren.⁶⁸ Durch die Einschränkung dieser Reaktion, die einen möglichen Resistenzmechanismus darstellt,¹³ soll die Kreuzresistenz zumindestens in einigen Tumoren überwunden werden. In der Tat ist ZD0473 (**5**) gegen einige Zelllinien, die unterschiedliche Resistenzmechanismen gegen Cisplatin (**1**) zeigen, wirksam.⁶⁹

Der gut wasserlösliche und stabile Platin(IV)-Komplex Satraplatin [JM216] (**6**) kann oral verabreicht werden.⁷⁰ Die verbesserte Aufnahme von (**6**) könnte auch der Grund sein, weswegen Satraplatin [JM216] (**6**) in Zelllinien, die aufgrund einer verminderten Aufnahme gegen Cisplatin resistent sind, dennoch wirksam ist.⁷¹ Eine orale Verabreichung ist außerdem für die Patienten angenehmer als eine intravenöse Gabe und auch weniger kostenintensiv.⁶⁴

Die trinukleare Platinverbindung BBR3464 (**7**) reagiert schneller mit DNA und kann über eine größere räumliche Distanz zwei Basen sowohl innerhalb desselben DNA-Stranges als auch zwischen den beiden komplementären Strängen verknüpfen.⁷²

Aus den soeben vorgestellten Cisplatinanaloga lassen sich grundlegende Tendenzen der aktuellen Cisplatinforschung ableiten. Dazu gehören geringere Reaktivität durch fester gebundene Fluchtgruppen [Verbindungen (**2**), (**3**) und (**4**)], Platin in der Oxidationsstufe plus vier [Verbindung (**6**)] oder sterische Hindernisse [Verbindung (**5**)]. Eine verminderte Reaktivität kann die Toxizität der Komplexe mildern. Veränderte Addukte durch neue Nicht-Abgangsgruppen [Verbindungen (**3**) und (**5**)] bzw. Platin in der Oxidationsstufe plus vier [Verbindung (**6**)] können das Wirkspektrum erweitern und Kreuzresistenzen vermeiden. Eine Weiterführung dieses Ansatzes stellt Verbindung (**7**) dar. Die Verknüpfung zweier Platinsphären eröffnet neue Reaktionsmöglichkeiten bzw. die Ausbil-

Das Hauptprodukt stellt Verbindung **(1a)** dar, die Verbindungen **(1b)**, **(1c)**, **(1d)** und **(1e)** treten erst im späteren Reaktionsverlauf und in geringerem Ausmaß auf.

4.1 Bisplatin(II)-komplex von N^4,N^4 -Adipolybis(1,2,4-triaminbutan): Bisamid-bisplatin(II) (**8**)⁷⁴

Der Bisamid-bisplatin(II)-Komplex **(8)** verknüpft über einen gemeinsamen N^4,N^4 -Adipolybis(1,2,4-triaminbutan)-Liganden zwei Platin(II)-Sphären mit jeweils zwei *cis*-ständigen Chloridliganden. Die Amidgruppen ermöglichen im Vergleich zu einer reinen Alkylbrücke zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen, erhöhen die Hydrophilie und steigern damit auch die Wasserlöslichkeit.

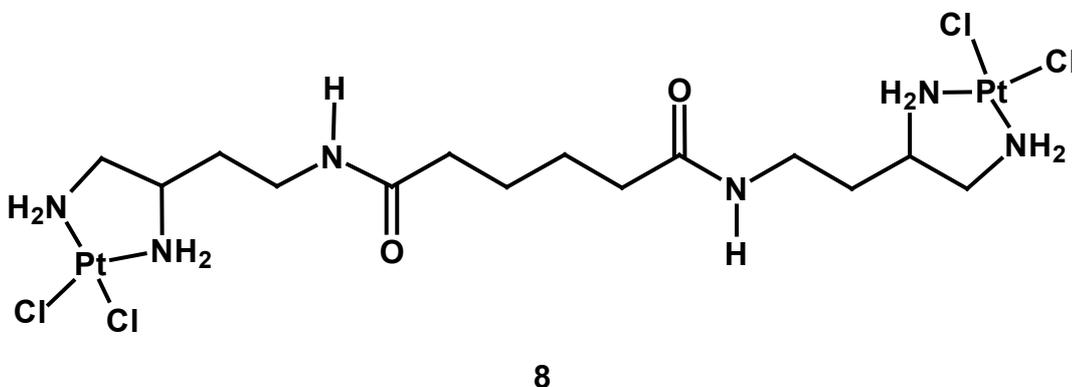
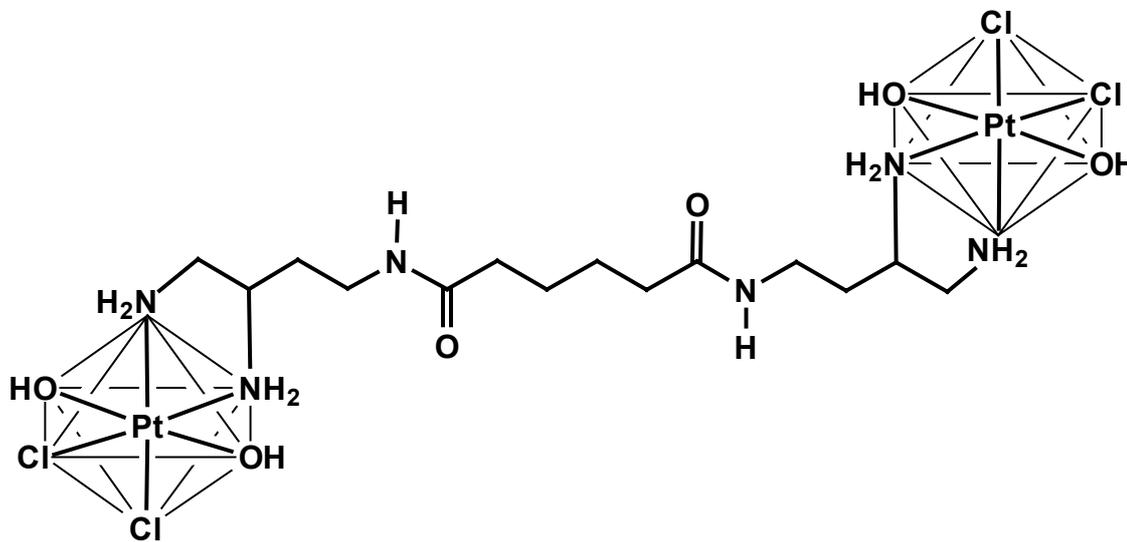


Abb. 9: Strukturformel von Bisamid-bisplatin(II) (**8**).

Die Solvolyse von Bisamid-bisplatin(II) (**8**) führt nur zum Austausch eines Chloridliganden je Platinsphäre gegen ein DMSO Molekül, analog dem Reaktionsschritt, von Cisplatin (**1**) zu Verbindung **(1a)** (Abb. 8, Seite 29).⁷⁴ Aufgrund der beiden Platinsphären und der räumlichen Anordnung ergeben sich daraus sechs Isomere, die als Gemisch eingesetzt wurden.

4.2 Bisplatin(IV)-komplex von N^4,N^4 -Adipolybis(1,2,4-triaminbutan): Bisamid-bisplatin(IV) (9)

Die Oxidation von (8) führt zum Bisplatin(IV)-komplex (9).



9

Abb. 10: Strukturformel von Bisamid-bisplatin(IV) (9).

Aufgrund der zusätzlichen Hydroxyliganden am oktaedrisch koordinierten Platin(IV) ergeben sich Möglichkeiten für weitere Wasserstoffbrückenbindungen und der Komplex wird dabei so hydrophil, dass er gut wasserlöslich ist. Außerdem vermindert die oktaedrische Koordination die Reaktivität.

4.3 Dichloro-dihydroxy- N^1,N^2 -[N^4 -Trifluoracetyl(1,2,4-triamino-butan)]-platin(IV): Monoamid-monoplatin(IV) (**10**)

Monoamid-monoplatin(IV) (**10**) mit nur einer Platinsphäre ist ebenfalls gut wasserlöslich und dient als mononukleare Vergleichsverbindung zu Bisamid-bisplatin(IV) (**9**).

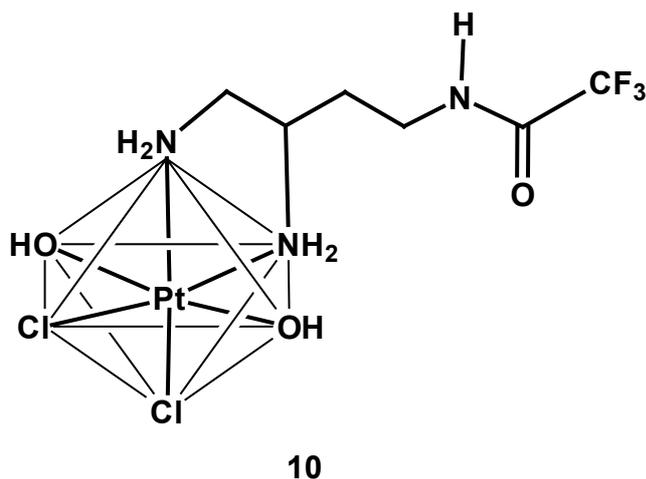
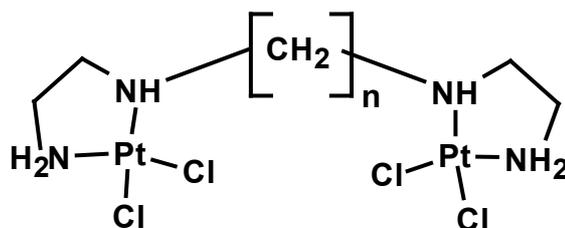


Abb. 11: Strukturformel von Monoamid-monoplatin(IV) (**10**).

Die Analogie der Komplexe soll dazu dienen, möglichst nur den Einfluss der kovalenten Verknüpfung zweier Platinsphären zu untersuchen. Die analoge mononukleare Platin(II)-Verbindung zu Komplex (**8**) war nicht ausreichend in wässrigen Lösungen löslich.

4.4 α,ω -*N,N'*-Alkyl-bis-[(dichloro)-ethylendiamin-platin(II)]-Komplexe: Alkyl-bis-ethylendiamin-platin(II)-Verbindungen (11) – (14).⁷⁵

Die Komplexe vom Alkyl-bis-ethylendiamin-platin(II)-Typ (11) – (14) verknüpfen zwei *cis*-Dichloro-ethylendiaminplatin(II)-Einheiten über eine *N,N'*-verbindende Alkylkette mit sechs bis zwölf Methyleneinheiten.



11 ($n = 6$)

12 ($n = 8$)

13 ($n = 10$)

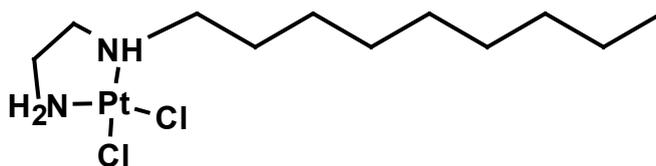
14 ($n = 12$)

Abb. 12: Strukturformeln der Alkyl-bis-ethylendiamin-platin(II)-Komplexe:
($n = 6$) α,ω -*N,N'*-Hexyl-*bis*-[dichloroethylendiaminplatin(II)]:
Hexyl-bis-ethylendiamin-platin(II) (**11**)
($n = 8$) α,ω -*N,N'*-Octyl-*bis*-[dichloroethylendiaminplatin(II)]:
Octyl-bis-ethylendiamin-platin(II) (**12**)
($n = 10$) α,ω -*N,N'*-Decyl-*bis*-[dichloroethylendiaminplatin(II)]:
Decyl-bis-ethylendiamin-platin(II) (**13**)
($n = 12$) α,ω -*N,N'*-Dodecyl-*bis*-[dichloroethylendiaminplatin(II)]:
Dodecyl-bis-ethylendiamin-platin(II) (**14**)

Diese Komplexe sind noch lipophiler als Bisamid-bisplatin(II) (**8**) (Abb. 9, Seite 30). Aber nach Solvolyse in DMSO können sie in H_2O verdünnt werden. Die analogen Platin(IV)-Verbindungen sind jedoch sowohl in Wasser, als auch in DMSO unlöslich. Ein weiterer Unterschied zu Bisamid-bisplatin(II) (**8**) besteht darin, dass die Alkylbrücke statt an einem Kohlenstoff der Ethylenamineinheit direkt an einem Amin bindet. Folglich entsteht ein Ligand aus einem primären und einem sekundären Amin. Die Verlängerung der Alkylkettenlänge erhöht sowohl die Lipophilie als auch die räumlichen Freiheitsgrade der beiden Platinsphären im Verhältnis zueinander.

4.5 Dichloro-(*N*-nonyl)-ethylendiaminplatin(II); Nonylethylendiaminplatin(II) (**15**)⁷⁵

Die Alkylethylendiaminplatin(II)-Verbindung (**15**) ermöglicht eine Unterscheidung zwischen dem Einfluss einer Alkylkette bzw. der Verknüpfung zweier *cis*-Platin(II)-Einheiten in den Alkyl-bis-ethylendiamin-platin(II)-Komplexen (**11**) – (**14**).



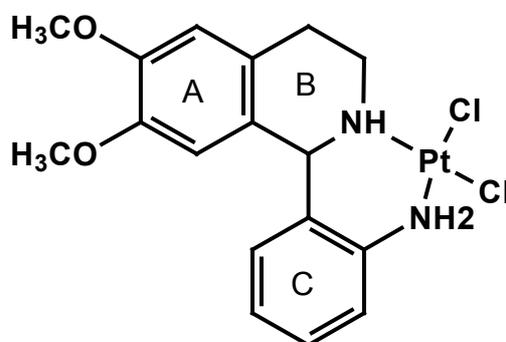
15

Abb. 13: Strukturformel von Nonylethylendiaminplatin(II) (**15**).

Dichloro-(*N*-nonyl)-ethylendiaminplatin(II) (**15**) lässt sich nach Solvolyse in DMSO in H₂O verdünnen, während die Komplexe mit längeren Alkylkette als Folge der zunehmenden Lipophilie trotz des Ligandenaustausches in Wasser unlöslich sind.

4.6 [1-(2-Aminophenyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin]-dichloroplatin(II): Anilin-4H-Isochinolinplatin(II) (**16**).⁷⁶

In den derivatisierten 1-(2-Aminophenyl)isochinolin-Liganden sind zwei Eigenschaften, sterischer Anspruch und Verbrückung über den Liganden, kombiniert, die Kreuzresistenzen mit Cisplatin (**1**) vermindern sollen.^{57; 68} Darüber hinaus kann durch eine geeignete Wahl der Substituenten und des Hydrierungsgrades der aromatischen Ringe die Basizität der Aminliganden variiert werden. In einer Serie mit cyclischen Aminen wurde festgestellt, dass je stärker basisch ein Aminligand ist, desto stabiler ist die Bindung am Zentralatom und desto aktiver ist der Komplex.⁷⁷



16

Abb. 14: Strukturformel von [1-(2-Aminophenyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin]-dichloroplatin(II): Anilin-4H-Isochinolinplatin(II) (**16**).

Durch die Hydrierung der beiden Doppelbindungen zwischen C1 und N2 bzw. C3 und C4 des Isochinolinringes B wird das starre Isochinolinringssystem etwas flexibler. Gleichzeitig wird durch die Reduktion einer tertiären Amingruppe eine sekundäre Amingruppe im Liganden des Komplexes, 4H-Isochinolinplatin(II) (**16**), die gleichzeitig auch stärker basisch ist.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Komplexe wurden wichtige Merkmale klinisch angewandeter Cisplatinanaloga (vgl. Kapitel 3, Seite 24) aufgegriffen, modifiziert und zum Teil weitergeführt. Zum einen wurden zwei Platinsphären zu den Bisplatinverbindungen (**8**), (**9**), (**11**), (**12**), (**13**) und (**14**) verknüpft. Zum anderen wurde durch die zusätzliche Oxidation der Platinatome in Verbindung (**9**) gegenüber dem Komplex (**8**) die Löslichkeit erhöht und gleichzeitig die Reaktivität erniedrigt. Außerdem wurden durch die Verwendung eines

1-(2-Aminophenyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolinliganden im Komplex **(16)** zwei weitere aktuelle Strukturprinzipien, sterisch anspruchsvoll und chelatbildend, kombiniert.

5 Aufgabenstellung

Als erstes sollte die cytotoxische Wirkung der vorgestellten Verbindungen auf eine Referenzzelllinie untersucht werden. Damit sollte ein erster Zusammenhang zwischen den oben (Kapitel 4, Seite 29) diskutierten Strukturprinzipien und der biologischen Wirkung festgestellt werden.

Anschließend sollte verfolgt werden, ob Unterschiede in der Cytotoxizität mit grundlegenden quantitativen Effekten, wie der Aufnahme der Komplexe in die Zellen und ihre Bindung an zelluläre DNA, zusammenhängen.

Neben diesen rein quantitativen Aspekten sollten auch die Sekundärstrukturveränderungen der DNA, die durch Addukte der verschiedenen Komplexe hervorgerufen werden könnten, *in vitro* analysiert werden. Dabei sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Art der Sekundärstrukturveränderungen bzw. die Kinetik ihrer Entstehung in einem Zusammenhang zur Wirkung der Verbindungen auf die Zellen stehen. Dabei kann allerdings nicht differenziert werden, welche Addukte jeweils zu den Sekundärstrukturveränderungen beitragen und ob bestimmte Addukte für die Cytotoxizität eine herausragende Rolle spielen. Deswegen sollten zusätzlich die Verknüpfung der beiden komplementären DNA-Stränge über Platinaddukte untersucht werden. Solche Interstrangverknüpfungen sind von besonderem Interesse, da sie eine Trennung der Stränge, wie sie bei der Transkription und insbesondere bei der Replikation erforderlich ist, verhindern. Es sollte herausgefunden werden, ob sich die Komplexe in ihrer Fähigkeit, solche Interstrangverknüpfungen auszubilden, unterscheiden. Das Ziel dabei war, herauszufinden, ob Komplexe, die schneller oder mehr derartige Addukte ausbilden, auch stärker cytotoxisch sind. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass die Verknüpfung der beiden DNA-Stränge die cytotoxische Wirkung zumindestens mitverursacht.

Neben der Reaktion der Komplexe mit DNA hängt die Adduktmenge und evtl. die damit verbundene Wirksamkeit auch von dem Verbleib der Addukte an der DNA ab. Ein wesentlicher Prozess bei der Entfernung von DNA-Schäden ist

neben Umlagerungen oder einer Verdrängung der DNA-Basen durch andere Liganden die DNA-Reparatur. Aus diesem Grund sollte auch die Reparatur für die verschiedenen Komplexe untersucht werden. Dazu sollte ein *in vitro*-DNA-Reparaturtest etabliert und angewendet werden.

Zusätzlich zur DNA-Reparatur sollte auch die Proteinbindung an Platin-DNA-Addukte untersucht werden. Reaktive Fluchtgruppen der Platinaddukte könnten dazu führen, dass Proteine, die an diese DNA-Platinkomplexe binden, die Fluchtgruppen nukleophil verdrängen und so koordinativ mit der DNA vernetzt werden. Derartige platinvermittelte Protein-DNA-Komplexe könnten die Cytotoxizität steigern oder aber auch zur Detoxifizierung, zum Beispiel durch erleichterte Reparatur, beitragen. Es sollte deswegen zuerst geklärt werden, ob die einzelnen Komplexe nach der Reaktion mit DNA überhaupt in der Lage sind, noch Proteine zu binden. Gegebenenfalls sollte die sich daran anschließende Frage geklärt werden, ob derartige platinvermittelte Protein-DNA-Komplexe positiv mit der Cytotoxizität korrelieren, also eher bei aktiven Verbindungen auftreten oder aber ein indirekter Zusammenhang besteht.

Aus den so erzielten Erkenntnissen sollte abgeleitet werden, welche der untersuchten Eigenschaften für Antitumorstoffe auf Platinbasis eine Rolle spielen, um daraus Hinweise auf mögliche mechanistische Zusammenhänge zu gewinnen und nach Möglichkeit auch Modellvorstellungen zu entwickeln, die die unterschiedliche Wirkung der Komplexe erklären könnten.

Methoden

1 Häufig verwendete Puffer

Bluejuice-Auftragspuffer:

5	%	Glycerin
0,5	%	SDS
10	mM	EDTA
0,025	%	BPB (Bromphenolblau)
0,025	%	XC (Xylencyanol)

Klenowpuffer:

50	mM	Tris/HCl pH 7,8
5	mM	MgCl ₂
10	mM	β-Mercaptoethanol

PBS (Phosphate Buffered Saline): (pH 7,0)

137	mM	NaCl
3	mM	KCl
8	mM	Na ₂ HPO ₄
1	mM	KH ₂ PO ₄

TBE-Puffer: (pH 8,3)

90	mM	Tris
90	mM	Borsäure
1	mM	EDTA

TE-Puffer: (pH 7,5)

10	mM	Tris/HCl
1	mM	EDTA

Alle Konzentrationen sind, soweit nicht anders angegeben, Endkonzentrationen.

2 Zellkultur

2.1 Auftauen der Zellen

Zur Reaktivierung der eingefrorenen Zellen wurden die Kryo-Ampullen im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein

50 ml-Falconröhrchen gegossen und die Zellen für 5 Min bei 1500 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert. Als Nährmedium diente Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) für die L1210 Maus Leukämie Zellen bzw. RPMI 1640 Medium für die HeLa Zellen. Die Medien wurden mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin und je 100 µg/ml Streptomycin und Penicillin versetzt. Die Zellsuspension wurde in eine 10 ml-Kulturflasche pipetiert und dann vermehrt.

2.2 Zellvermehrung

Die Suspensionskultur wurde in Zellkulturflaschen in einem CO₂-Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen hatten eine Generationszeit von knapp einem Tag. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde ein Teil der Kultur mit frischem Medium 1:10 bis 1:100 verdünnt.

2.3 Lagerung der Zellen

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei –196 °C gelagert. Zum Einfrieren wurde die Suspensionskultur mit ungefähr 10⁷ Zellen für 10 Min bei 1500 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in 8 ml Medium aus DMEM bzw. RPMI mit 20 % FKS, das auf 0° C gekühlt war, resuspendiert. Davon wurden in 8 Kryo-Ampullen auf Eis jeweils 0,9 ml eingefüllt. Zuletzt wurden dazu 0,9 ml einer eisgekühlten Lösung aus DMEM bzw. RPMI mit 20 % FKS und 20 % DMSO gegeben. Die so befüllten Ampullen wurden gut verschlossen und zuerst für 1 h auf Eis gehalten, dann in einer Isolierbox auf 20 °C abgekühlt. Dann wurden sie in flüssigem Stickstoff eingelagert. Die Zellen wurden also in Medium mit insgesamt 20% FKS und 10 % DMSO bei –196 °C eingefroren.

2.4 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit 10 – 50 % Trypanblaulösung verdünnt. Die Zellzahl in dieser Lösung wurde in einer Neubauer-Kammer mikroskopisch bestimmt. Die Zelldichte wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Quadrantenzahl}} \cdot 10^4$$

Mortale Zellen sind daran zu erkennen, daß sie durch den Trypanblaufarbstoff, der die Membran intakter Zellen nicht durchdringen kann, blau gefärbt sind. Diese Zellen wurden Separat gezählt und aus der Zahl der lebenden sowie der toten Zellen die Vitalität berechnet:

$$\text{Vitalität [\%]} = 100 - \frac{\text{Zahl der toten Zellen}}{\text{Zahl der toten Zellen} + \text{Zahl der lebenden Zellen}} \cdot 100$$

3 Cytotoxizitätstests und Untersuchung der DNA-Syntheserate

Für die Cytotoxizitätstests wurde in 96-Wellplatten zuerst 10 - 20 µl Lösung mit den zu testenden Substanzen pipetiert. Dabei wurden die Konzentrationen so gewählt, daß durch Zugabe von Zellsuspension auf 200 µl die gewünschte Endkonzentration eingestellt wurde. Für die Zellsuspension wurde die gleiche Medienzusammensetzung gewählt, wie für die Zellvermehrung (Kapitel 2.2, S. 39). Als Ausgangszell-dichte wurde 5×10^4 Zellen/ml gewählt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen entweder nach einer Vitalitätsfärbung unter dem Mikroskop in einem Neubauer Hämocytometer gezählt (Kapitel 3.1) oder anhand der Umsetzung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inneres Salz, (MTS) zu einem Fomazanfarbstoff photometrisch bestimmt (Kapitel 3.2). Außerdem wurde die DNA Syntheserate mittels ^3H -Thymidineinbau ermittelt (Kapitel 3.3).

3.1 Vitalitätstest

Jede Konzentration wurde als Duplett angesetzt. Die Zellen wurden 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 90 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblaulösung verdünnt (Verdünnungsfaktor = 1,11). Dann wurde wie unter 2.4, S. 39 beschrieben die Zellzahl und die Vitalität bestimmt. Aus mehreren Versuchsansätzen wurde mit Hilfe von Microsoft Excel die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Die IC₅₀-Werte wurden graphisch aus den Diagrammen bestimmt. Sie repräsentieren die Konzentration der jeweiligen Verbindung, bei der die Zellproliferation auf 50 % einer unbehandelten Vergleichsprobe (= 100 %) absinkt.

3.2 MTT Farbttest

Für die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe (11 - 14) bzw. Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) wurden die IC_{50} -Werte mit dem CellTiter 96[®] *AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* von Promega bestimmt. Dabei wird die Tetrazolium Verbindung 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium, inneres Salz, (MTS) durch das Enzym Dehydrogenase in den Mitochondrien lebender Zellen zu einem Formazanfarbstoff reduziert. Die Konzentration des Farbstoffes, die proportional zu der Zahl der lebenden Zellen sein sollte, wird dann photometrisch bestimmt. Für jede Konzentration der verschiedenen Verbindungen wurden drei Parallelansätze verwendet. 100 μ l Zellsuspension inklusive der Platinkomplexe wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Nach 44 h wurden 15 μ l der Farbstofflösung zugegeben und die Zellen für weitere 4 h im Brutschrank gehalten. Die Umsetzung des Farbstoffes wurde durch Zugabe von 100 μ l einer Lösungsflüssigkeit gestoppt. Nach einer weiteren Stunde wurden die Ansätze kurz geschüttelt und die Absorption des Formazanfarbstoffes bei 570 nm gemessen. Aus mehreren Versuchsansätzen wurde mit Hilfe von Microsoft Excel die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Die IC_{50} -Werte wurden graphisch aus den Diagrammen bestimmt. Sie repräsentieren die Konzentration der jeweiligen Verbindung, bei der die Absorption, die direkt proportional zu dem gebildeten Formazanfarbstoff und damit auch zur Zellzahl ist, auf 50 % einer unbehandelten Vergleichsprobe (= 100 %) absinkt.

3.3 Untersuchung der DNA-Syntheserate

Jede Konzentration wurde als Triplet angelegt. Die Zellen wurden 42 h bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Zu jeweils zwei der drei Ansätze wurde für die letzten 6 h, also nach 42 h, 20 μ l einer Lösung von ³H-Thymidin in DMEM [0,5 μ Ci] pipetiert. Diese Ansätze dienen der Bestimmung der DNA-Syntheserate. Aus dem Ansatz ohne ³H-Thymidin wurden nach Ablauf der Inkubationszeit 90 μ l entnommen und mit 10 μ l Trypanblaulösung verdünnt (Verdünnungsfaktor = 1,11). Dann wurde zur Kontrolle wie unter 2.4, S. 39 beschrieben die Zellzahl und die Vitalität bestimmt. Die Proben zur Bestimmung der DNA-Synthese wurden währenddessen bei -20 °C eingefroren. Zur Be-

stimmung der ^3H -Aktivität wurden diese wieder aufgetaut und automatisch abgeerntet. Dazu wurde in einem Harvester für 96-Wellplatten die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung durch eine befeuchtete Nylonmembran gesaugt. Die Platte wurde auf dieselbe Weise noch sechsmal mit deionisiertem Wasser gespült. Alle niedermolekularen Zellbestandteile und insbesondere nicht eingebautes ^3H -Thymidin werden auf diese Weise abgetrennt. Die Membran wird bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ für mindestens 30 Min. getrocknet. Anschließend wird darauf in einer Plastikhülle eine Szintilationswachsplatte verschmolzen. Das Szintilationswachs dient dazu, die sehr schwache β -Strahlung des Tritiums in meßbare Lichtblitze umzuwandeln. Diese werden dann in einem Szintilationszähler erfaßt. Die Daten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel verarbeitet und aus mehreren Versuchsansätzen die Standardabweichungen berechnet. Die IC_{50} -Werte wurden graphisch aus den Diagrammen bestimmt. Sie repräsentieren die Konzentration der jeweiligen Verbindung, bei der die DNA-Syntheserate 50 % der unbehandelten Vergleichsprobe (= 100 %) entspricht.

4 Bestimmung des Platingehalts in Zellen und an DNA

4.1 Vorbereitung der Zellen für die Platinbestimmung

Die Zellen (5×10^4 /ml) wurden analog der Cytotoxizitätstests für 48 h bei 5 % CO_2 mit 0,1; 1,0 und $10\text{ }\mu\text{M}$ der verschiedenen Platinverbindungen inkubiert. Im Unterschied zu den Cytotoxizitätstests wurden die Ansätze lediglich auf 50 ml vergrößert und in 150 ml-Gewebekulturflaschen gefüllt. Die Testansätze wurden nach 48 h in 50 ml-Falconröhrchen überführt und davon je ein $90\text{ }\mu\text{l}$ -Aliquot entnommen. Damit wurde die Zellzahl und die Vitalität durch Doppelbestimmungen in einer Neubauer-Kammer (vgl. Kapitel 2.4, S. 39) ermittelt. Die übrigen Zellen wurden für 10 min. bei 1100 Upm und $4\text{ }^\circ\text{C}$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und die Zellen auf Eis zum Waschen in 10 ml PBS gründlich resuspendiert. Dann wurden sie erneut für 10 min. bei 1100 Upm und $4\text{ }^\circ\text{C}$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und die Zellen in 15 ml PBS resuspendiert. Davon wurden 5 ml für die Platinbestimmung in Zellen entnommen. Die verbleibenden 10 ml wurden für die Bestimmung des Platinierungsgrades der DNA verwendet (Kapitel 4.2). Für die

Platinbestimmung muß das vorhandene organische Material mit HNO_3 hydrolysiert und oxidiert werden. Dafür wurde zu 8,35 ml H_2O 1,0 ml Zellsuspension in PBS und 650 μl rauchende Salpetersäure gegeben. Das heißt, der Gehalt an Salpetersäure für die Platinbestimmung war 6,5 %, die Proben wurden 1 : 10 verdünnt. Die Konzentration an Platin in diesen Proben wurde mit ICP-MS gemessen (Kapitel 4.3, S. 45).

4.2 Vorbereitung der zellulären DNA für die Platinbestimmung

Die nach der Inkubationszeit isolierten und vom Medium gewaschenen Zellen waren in 15 ml PBS aufgenommen und daraus waren 5 ml für die Platinbestimmung in den Zellen entnommen worden (Kapitel 4.1, S. 42).

Zu den verbliebenen 10 ml Zellsuspension kamen 10 ml Lysepuffer und 10 μl 20 mg/ml Proteinase K in Proteinase K-Puffer (Endkonzentration 10 $\mu\text{g/ml}$). Die Proteinase K wirkte über Nacht bei 50 °C.

Lysepuffer:

1	%	Sacrosyl
75	mM	Tris/HCl pH 8,0
25	mM	EDTA
1	mM	EGTA

Proteinase K Puffer:

100	mM	Tris/HCl pH 7,5
5	mM	EDTA
5	mM	EGTA

Zu den 20 ml der lysierten Zellen wurden das gleiche Volumen Phenol (mit TE auf pH 7,5 bis 8,0 äquilibriert) gegeben. Die zwei Phasen wurden auf einem REAX vorsichtig und gründlich durch zehninütiges Umschwenken vermischt. Danach wurden die Phasen durch Zentrifugation für 10 Min. bei 4500 Upm und Raumtemperatur getrennt. Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Falconröhrchen überführt. Die weißliche Interphase wurde dabei zurückgelassen. Diese Phenolisierungsprozedur wurde mit 10 ml Phenol und zusätzlich 10 ml eines Gemisches aus Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24 zu 1 wiederholt. Die wäßrige Phase wurde noch zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24 zu 1) extrahiert. Anschließend wurden 10 ml Diethylether zu der wäßrigen Phase gegeben. Erneut wurden die

Phasen gemischt und durch Zentrifugation getrennt. Die obere Etherphase wurde abgenommen und verworfen. Der restliche Ether dampfte über 6 h - 24 h bis zum Verschwinden des Ethergeruchs bei Raumtemperatur ab.

Zur Entfernung kontaminierender RNA wurden die 20 ml der DNA-Präparationen jeweils mit 20 µl [10 mg/ml] RNase A Lösung von Quiagen bei 37 °C über Nacht inkubiert. Davon wurde ein Aliquot in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und der Abbau der RNA kontrolliert. Anschließend wurden niedermolekulare Stoffe, vor allem ungebundener Platinkomplexe und der RNA-Abbauprodukte, die evtl. auch platiniiert worden waren, durch Dialyse entfernt. Dazu wurde ein Dialyseschlauch in ca. 50 cm lange Stücke geschnitten und in 10 mM EDTA (pH 7,5) 30 Min. gekocht. Danach wurden die Schläuche zweimal gründlich mit deionisiertem Wasser gewaschen. Diese Prozedur war nötig, da kommerzielle Dialyseschläuche meist mit Schwermetallen, Proteasen und Nukleasen kontaminiert sind.⁷⁸ Die so gereinigten Dialyseschläuche wurden in deionisiertem Wasser bei 4 °C aufbewahrt. Von diesen Dialyseschläuchen wurden etwa 5 cm abgeschnitten und vorsichtig auf einen geöffneten Falcon mit der DNA-Präparation gelegt. Dieses Stück Dialyseschlauch wurde vorsichtig mit einem Deckel fixiert, in dessen Oberseite ein großes Loch geschnitten worden war. Der Falcon wurde vorsichtig auf den Kopf gestellt, um die Dichtigkeit zu prüfen. Nachdem alle Falcons so präpariert worden waren, wurden sie in ein Stück Styropor gesteckt, das Löcher aufweist die genau den Außendurchmesser eines 50 ml-Falconröhrchen haben. Mit dem Deckel und der Dialysemembran nach unten wurden die Falcons in dem Styropor in ein Becherglas mit 0,1 x TE vorsichtig in die Flüssigkeit eingetaucht. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich zwischen der Membran und der Flüssigkeit im Becherglas keine Luftblasen bilden, da diese die Dialyse beeinträchtigen. Die Flüssigkeit im Becherglas wurde vorsichtig gerührt und die Proben so über Nacht dialysiert. Am nächsten Tag wurde die Dialyseflüssigkeit ausgetauscht und noch einmal für 6 h dialysiert. Von diesen DNA-Proben wurden je 100 µl entnommen und in einem Photometer über die optische Dichte automatisch die DNA-Konzentration bestimmt. Für die Platinbestimmung wurden zu 4,5 ml der DNA-Präparation 175 µl H₂O und 325 µl rauchende Salpetersäure zugegeben. Das heißt, der Gehalt an Salpetersäure für die Platinbestimmung war 6,5 %. Die Konzentration an Platin in diesen Proben wurde mit ICP-MS gemessen (Kapitel 4.3, S. 45).

Als Vergleichsparameter für den Platinierungsgrad von DNA dient der r_B -Wert. Dieser gibt das Verhältnis von Platinatomen zu Nukleotiden an. Aus den ermittelten Konzentrationen kann der r_B -Wert folgendermaßen berechnet werden:

$$r_B = \frac{\frac{\text{Platinmassenkonzentration [g/l]}}{M(\text{Pt}) [\text{g/mol}]}}{\frac{\text{DNA - Massenkonzentration [g/l]}}{\varnothing M(\text{Nukleotide}) [\text{g/mol}]}}$$

Die Platinkonzentration berechnet sich aus dem Quotienten der Massenkonzentration und der Molmasse von Platin [195,08 g/mol]. Analog ergibt sich die Konzentration der Nukleotide aus dem Quotienten aus der Massenkonzentration der DNA und der durchschnittlichen Molmasse der vier Nukleotide von 330 g/mol. Das Verhältnis der Konzentrationen entspricht dem molaren Verhältnis und ist somit der r_B -Wert.

4.3 Die ICP-MS-Methode zur Platinbestimmung

Das Prinzip dieser Methode^[79] besteht darin, daß die Probe in einem Plasma atomisiert und ionisiert wird und diese Ionen dann in einem Massenspektrometer quantitativ erfaßt werden. In Abb. 15 ist die Vorbereitung der Probe für die Auftrennung im Massenspektrometer schematisch dargestellt. Die platinhaltige Lösung wird in einem Argon/Wasserstoffgemisch fein zerstäubt und in einem Argonstrom in das Plasma geleitet, wo die Teilchen bei 10000 K atomisiert und ionisiert werden.

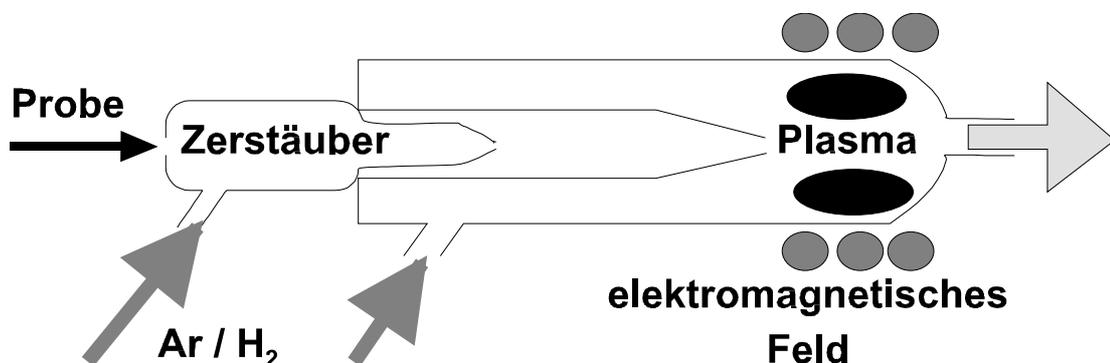


Abb. 15: Schematisch vereinfachte Darstellung der Ionisation der Probe. Die Lösung wird zuerst mit einem Argon/Wasserstoffgemisch zerstäubt. Im Argonplasma, das durch ein elektromagnetische Feld induziert wird, werden die Teilchen bei 10000 K atomisiert und ionisiert.

Die Ionen werden dann in einem Massenspektrometer (Abb. 16) aufgetrennt.

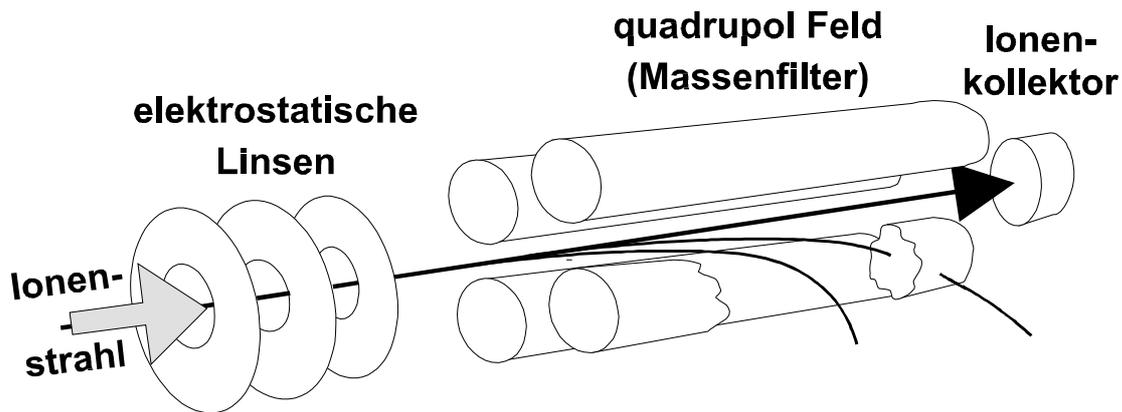


Abb. 16: Schematische Darstellung der Auftrennung der Ionen im Quadrupol Massenspektrometer. Der Ionenstrahl wird zuerst über eine Reihe von elektrostativen Linsen fokussiert. Im Quadrupolfeld werden die Ionen nach ihrer Masse und ihrer Ladung aufgetrennt. Dabei gelangt nur eine Ionenspezies zum Ionenkollektor, wo sie quantitativ erfaßt wird.

Dabei wird der Ionenstrahl zuerst über eine Reihe von elektrostativen Linsen fokussiert und Photonen, die vom Ionendetektor auch erfaßt würden, herausgefiltert. Daran schließt sich ein Quadrupol-Feld an. Es besteht aus zwei Paaren von Stabelektroden, die quadratisch angeordnet sind. Ein elektromagnetisches Feld mit entgegengesetzter Phase und eine feste Spannung mit unterschiedlicher Polarität wird an jedes Elektrodenpaar angelegt. Diese Anordnung erzeugt ein elektrisches Feld senkrecht zu den Elektroden, also senkrecht zur Bewegungsrichtung der Ionen. Durch eine geringe Spannung werden die Ionen in dieses Feld hinein beschleunigt. Dabei unterscheidet sich die kinetische Energie der Ionen aufgrund verschiedener Ladung bzw. Masse. Nur eine Ionensorte mit entsprechender Masse und Ladung gelangt auf einer stabilen Flugbahn bis zum Ionendetektor. Alle anderen Ionen werden abgelenkt, über die Stabelektroden entladen und somit herausselektiert. Die eine Ionensorte kann so quantitativ erfaßt werden und über die eingesetzte Lösungsmenge die Konzentration berechnet werden. Um Schwankungen während der Messung detektieren zu können, wird Iridium als interner Standard zugesetzt und nach jeweils zehn Messungen eine Probe mit bekanntem Platingehalt gemessen. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dr. S. Lustig an zwei verschiedenen Geräten am GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in der Abteilung von Prof. P. Schramel durchgeführt. Dabei handelte es sich zum einen um einen ICP-mass spectrometer ELAN 5000 (PERKIN-ELMER-SCIEX) und zum anderen um ein ICP-double-focusing-magnetic-sector-MS (ELEMENT;

FINNIGAN MAT; Bremen). Letzteres unterscheidet sich von Quadrupol-Geräten darin, daß die Ionen anstatt ein elektromagnetisches Feld mit vier Elektroden nacheinander ein magnetisches und dann ein elektrisches Feld, oder umgekehrt passieren. Die Ionen gelangen dabei durch einen Spalt in ein magnetisches Feld, werden dann im elektrischen Feld abgelenkt und müssen anschließend einen zweiten Spalt passieren. Dadurch werden neben der Masse und der Ladung auch die Bewegungsrichtung der Ionen, also der Winkel mit dem sie eintreffen, selektiert. Diese Anordnung hat den Vorteil, daß polyatomare Interferenzen vom Analysensignal separiert werden.

5 Untersuchung der Kinetik der DNA-Sekundärstrukturveränderungen

Für die Untersuchungen von DNA-Sekundärstrukturveränderungen wurden je 15 pmol pBluescript®II KS Plasmid (2961 bp) in 480 µl TE-Pufferlösung mit 60 µM der jeweiligen Platinverbindung bei 37 °C inkubiert. Für jeden Zeitpunkt (10 Min. bis 72 h) wurden 40 µl des Reaktionsgemisches entnommen und die Platinierungsreaktion durch Zugabe desselben Volumens einer 0.5 M NaCl Lösung gestoppt. Salz und nicht gebundene Platinkomplexe wurden anschließend über eine Gelfiltrationssäule (Nick-Column, Pharmacia), die mit 0,1 x TE äquilibriert worden war, abgetrennt. Die platinierter DNA befand sich darauf hin in 400 µl 0,1 x TE. Davon wurden 160 µl [\approx 1 µg] in einem Vakuumrotationsverdampfer bis auf 10 µl eingengt und mit 3 µl 5 x Bluejuice-Auftragspuffer versetzt. Die Proben wurden in einem 1 %igen Agarosegel ohne Ethidiumbromid mit 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer bei einer Spannung von 3 - 4 V/cm über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde in einer Lösung von 0,02 % Ethidiumbromid in 1 x TBE-Puffer für 15 Min. eingefärbt. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Bestrahlung ($\lambda = 360$ nm) in einem Transilluminator mit dem Eagle-Eye-System der Firma Amersham fotografiert.

5.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese.

Ein Aliquot von 2,5 pmol des pBluescript®II KS Plasmids (2961 bp), das, wie oben beschrieben, mit 60 µM Bisamid-bisplatin(II) (8) für eine Stunde behandelt und anschließend gereinigt worden ist, wurde durch das Restriktionsenzym Hind III linearisiert. Davon wurden 0,35 pmol einmal als Kontrolle allein und zusätzlich für die zweidimensionale Elektrophorese mit 0,7 µg eines 1 kB-Markerversetzt auf ein 0,4 %iges Agarosegel aufgetragen, mit 1 x TBE überschichtet und bei Raumtemperatur mit einer Spannung von 0,45 V/cm über Nacht aufgetrennt. Als weitere Referenzen diente der Längenmarker allein, 0,35 pmol des Plasmids ohne Platinierung und ohne bzw. nach einem Restriktionsverdau mit Hind III. Das Gel wurde in einer Lösung von 0,3 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TBE-Puffer für 15 Min. eingefärbt. Zur Dokumentation wurde

das Gel unter UV-Bestrahlung ($\lambda = 360 \text{ nm}$) in einem Transilluminator mit dem Eagle-Eye-System der Firma Amersham fotografiert. Die Spur in der die platierte DNA zusammen mit dem Längenmarker aufgetrennt worden ist wurde ausgeschnitten und in ein 1,2 %iges Agarosegel mit $0,3 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid eingegossen. Senkrecht zur Auftrennung in der ersten Dimension wurde dann eine Spannung von 5 V/cm angelegt und die DNA für ungefähr zwei Stunden bei 4°C aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Bestrahlung ($\lambda = 360 \text{ nm}$) in einem Transilluminator mit dem Eagle-Eye-System der Firma Amersham fotografiert.

6 Bestimmung der Interstrangverknüpfungen

Ein pBluescript[®]II KS plasmid (2961 bp) wurde mit dem Restriktionsenzym Hind III verdaut und das linearisierte Plasmid durch Auffüllen mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP durch Klenow Polymerase markiert. Dabei wurden $0,9 \text{ pmol}$ des linearisierten Plasmids in Klenow Puffer und $40 \mu\text{M}$ dCTP, dGTP, dTTP und $15 \mu\text{Ci}$ ($0,33 \mu\text{M}$) $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP mit $1,5 \text{ U}$ Klenow Polymerase in einem Gesamtvolumen von $15 \mu\text{l}$ für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15 mM EDTA und Erhitzen auf 75°C für 10 Min. gestoppt. Anschließend wurde die markierte DNA über eine Gelfiltrationssäule (Nick-Column, Pharmacia), die mit $0,1 \times \text{TE}$ äquilibriert worden war, gereinigt. Von dieser markierten DNA wurden $67,5 \text{ fmol}$ in $240 \mu\text{l}$ $0,1 \times \text{TE}$ Puffer mit $1 \mu\text{M}$ bzw. $10 \mu\text{M}$ der jeweiligen Platinverbindung bei 37°C behandelt. Für jeden Zeitpunkt (1 Min. bis 72 h) wurden $30 \mu\text{l}$ des Reaktionsgemisches entnommen und die Platinierungsreaktion durch Zugabe desselben Volumens einer $0,5 \text{ M}$ NaCl Lösung gestoppt. Salz und nicht gebundene Platinkomplexe wurden anschließend über eine Gelfiltrationssäule (Nick-Column, Pharmacia), die mit $0,1 \times \text{TE}$ äquilibriert worden war, abgetrennt. Die Hälfte der platinieren DNA wurden in einem Vakuumrotationsverdampfer eingengt und in $10 \mu\text{l}$ $1 \times \text{Bromcresolgrün-Auftragspuffer}$ aufgenommen.

Bromcresolgrün-Auftragspuffer:

2,5	%	Ficoll 400
50	mM	NaCl
2	mM	EDTA
0,025	%	Bromcresolgrün

Die Proben wurden in einem 0,7 %igen alkalischen Agarosegel mit 30 mM NaOH und 2 mM EDTA als Laufpuffer bei einer Spannung von 1 V/cm über Nacht aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in einem Tris/Borat/EDTA Puffer, in dem 0.2 mg/l Ethidiumbromid enthalten waren, mit HCl neutralisiert. Das gefärbte Gel wurde unter UV-Bestrahlung ($\lambda = 360$ nm) in einem Transilluminator mit dem Eagle-Eye-System der Firma Amersham fotografiert. Das Gel wurde dann in einer Lösung aus 7 % Essigsäure und 4 % Glycerin fixiert und auf einem Vakuumtrockner getrocknet. Die radioaktiv markierte DNA wurde durch Autoradiographie detektiert.

7 *In vitro* DNA-Reparatursynthesetest

7.1 Präparation des Ganzzellextrakts nach Manley⁸⁰

Hela-S3-Suspensionszellen wurden bis zu einer Zelldichte von ca 10^6 Zellen pro ml herangezogen und die Zellzahl, wie oben (Kapitel 2.4, Seite 39) beschrieben, bestimmt. Ein Liter der Zellsuspension wurde für 10 Min. bei 1100 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen auf Eis in je 50 ml PBS mit $MgCl_2$ resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde wieder für 10 Min. bei 1100 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen auf Eis in je 20 ml PBS mit $MgCl_2$ resuspendiert und in einem 50-ml-Falkonröhrchen vereinigt. Die Zellen wurden nochmals für 10 Min. bei 1100 Upm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellvolumen von ~ 3 ml abgelesen. Dazu wurde das vierfache Zellvolumen, also 12 ml, eiskalter hypotonischer Puffer zugegeben.

hypotonischer Puffer:

10 mM	Tris-HCl pH 7,8
1 mM	EDTA
5 mM	Dithiothreitol
1 Tablette	<i>complete</i> TM , <i>Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> für 10 ml (Boehringer Mannheim)
0,73 μ M	Pepstatin

Nach 20 Min. wurde die Zelllösung in einen Dounce Homogenisator umgefüllt und mit ca. 10 Stößen eines B-Pistill die Zellen lysiert. Die Vollständigkeit der Lyse wurde in einem Hämocytometer unter dem Mikroskop kontrolliert. Zu den

lysierten Zellen wurde das vierfache Zellvolumen an Glycerin/Saccharose-lösung zugegeben und solange vorsichtig gerührt, bis sich eine Suspension gebildet hat.

Glycerin/Saccharoselösung:

50 mM	Tris-HCl pH 7,8
10 mM	MgCl ₂
2 mM	Dithiothreitol
25 %	Saccharose (<i>Sucrose</i>)
50 % (Vol/Vol)	Glycerin
1 Tablette	<i>complete</i> ™, <i>Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> für 10 ml (Boehringer Mannheim)
0,73 µM	Pepstatin

Dannach wurde auf Eis und unter ständigem Rühren ein Zellvolumen, 3 ml, gesättigter, neutralisierter (NH₄)₂SO₄-Lösung zugetropft, wodurch das Gemisch extrem viskos wurde, und weitere 20 Min. vorsichtig gerührt. Anschließend wurde das Zelllysate in einer Beckmann LZ Ultrazentrifuge, Rotor SW 50.1, bei 45000 Upm und 4 °C für 3 h zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Zu dem Überstand wurden 0,33 g festes (NH₄)₂SO₄ pro ml Überstand gegeben und bis zum Lösen des Salzes gerührt. Nach Zugabe von 10 µl 1 M NaOH pro 1 g (NH₄)₂SO₄ wurde weitere 30 Min. auf Eis gerührt und die Proben anschließend in einer Sorvall RC50 Zentrifuge, Rotor SS34, bei 15000 Upm (25000 · g) und 2 °C für 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in einem Zehntel des Überstandsvolumens, 2 ml, eiskaltem Dialysepuffer aufgenommen.

Dialysepuffer:

25 mM	HEPPES/KOH pH 7.9
0,1 M	KCl
12 mM	MgCl ₂
2 mM	Dithiothreitol
17 % (Vol/Vol)	Glycerin
1 Tablette	<i>complete</i> ™, <i>Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> für 10 ml (Boehringer Mannheim)
0,73 µM	Pepstatin

Anschließend wurde diese Lösung über Nacht bei 4° C gegen 10 Volumen, 30 ml des gleichen Puffers dialysiert. Die Lösung wurde bei 10000 · g und 4 °C

für 10 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Mutipette (einstellbare Kolbenhubpipette für Seriendosierungen) abgenommen und die Proteinlösung schnell in 25 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff eingetroppt. Die gefrorenen Portionen der Proteinlösung wurden mit einem Plastiksieb herausgefischt, sofort in Eppendorftubes auf Trockeneis gefüllt und dann bei -80 °C aufbewahrt.

7.2 Präparation des Kernextrakts nach Dignam⁸¹

HeLa-S3-Zellen wurden in 800 ml Medium bis zu einer Zelldichte von ca. 10⁵ Zellen/ml herangezogen und die Zellsuspension bei 1100 Upm und 4 °C für 10 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und verworfen. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem PBS mit MgCl₂ resuspendiert und die Zellen bei 1100 Upm und 4 °C für 10 Min abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet in 20 ml eiskaltem PBS mit MgCl₂ resuspendiert und die Zellen nochmals bei 1100 Upm und 4 °C für 10 Min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und verworfen und das Zellvolumen von ~ 1 ml abgelesen.

Für die Zelllyse wurden die Zellen in 5 ml (5-faches Zellvolumen) Puffer FA1.0 mit 0,5 % Nonidet P40 resuspendiert und 10 Min. auf Eis gestellt.

Puffer FA1.0 mit 0,5 % Nonidet P40:

25 mM	HEPPES/KOH pH 7.9
0,1 M	NaCl
1 mM	Dithiothreit
0,5 %	Nonidet P40
1 Tablette	<i>complete</i> TM , <i>Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> für 10 ml (Boehringer Mannheim)
0,73 µM	Pepstatin

Anschließend wurde die Vollständigkeit der Lyse in einem Hämocytometer unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Zellkerne wurden dann in einer Rottanta Zentrifuge bei 3000 Upm und 4 °C für 10 Min. abzentrifugiert. Der Überstand, der aus der Cytoplasmafraktion bestand, wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Zellkerne wurden in 4,5 ml Puffer FA1.0 ohne Nonidet P40 resuspendiert und erneut abzentrifugiert (3000 Upm, 4 °C, 10 Min.). Dieser Waschschrift mit Puffer FA1.0 wurde noch zweimal wiederholt und der Überstand jeweils verworfen.

Die Zellkerne wurden dann in 2 ml Puffer FA4.0 (analog FA1.0 aber mit 0,4 M NaCl) resuspendiert, die löslichen Kernbestandteile für 2 h auf dem Überkopfschüttler extrahiert und anschließend in einer Rottanta Zentrifuge bei 3000 Upm und 4 °C für 10 Min. abzentrifugiert. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt und die abgenommenen Überstände vereinigt. Der Kernextrakt wurden über Nacht gegen 60 ml Dialysepuffer (10-faches Volumen des Rohextrakts) dialysiert wobei der Puffer einmal gewechselt wurde.

Dialysepuffer:

25 mM	HEPPES/KOH pH 7.9
0,1 M	KCl
12 mM	MgCl ₂
2 mM	Dithiothreit
17 % (Vol/Vol)	Glycerin
1 Tablette	<i>complete</i> TM , <i>Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> für 10 ml (Boehringer Mannheim)
0,73 µM	Pepstatin

Die Lösung wurde nochmals bei 15000 Upm und 4 °C für 10 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Mutipette (einstellbare Kolbenhubpipette für Seriendosierungen) abgenommen und die Proteinlösung schnell in 25 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff eingetropt. Die gefrorenen Portionen der Proteinlösung wurden mit einem Plastiksieb abgeschöpft, sofort in Eppendorftubes auf Trockeneis gefüllt und dann bei - 80 °C aufbewahrt.

7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde nach der Methode von Bradford⁸² mit dem *Protein Assay* von Bio-Rad bestimmt. Für die Eichgerade wurde ein BSA-Standard mit einer Konzentration von 1 µg/µl bis zu 50 ng/µl verdünnt. Von diesen Standardlösungen wurden jeweils 20 µl mit 1 ml Coomassie-Brillant-Blau gemischt und nach 5 Min. die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Absorption wurde gegen die bekannte Proteinkonzentration aufgetragen und so eine Eichgerade erstellt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Extrakte in Zehnerschritten bis zu einer Verdünnung von 1:1000 verdünnt. Zu 20 µl des Dialysepuffers bzw. der verschiedenen Verdünnungen der Extrakte wurden 1 ml Coomassie-Brillant-Blau gegeben, die Lösungen gut gemischt und

nach 5 Min. die Absorption bei 595 nm bestimmt. Anhand der BSA-Eichgerade wurden die Proteinkonzentration bestimmt.

7.4 DNA-Reparatursynthesetest

Für die DNA-Reparatursynthesetests wurden pro Ansatz 1 µg pBluescript®II KS Plasmid (2961 bp), Plasmid II, entweder durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) oder durch Inkubation mit Platinkomplexen, geschädigt. Überschüssige Platinkomplexe wurden über eine Gelfiltrationssäule (Nick-Column, Pharmacia), die mit 0,1 x TE äquibriert worden war, abgetrennt und die platinierter DNA in einem Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Zusammen mit dem ungeschädigten Kontrollplasmid pBCRIII, Plasmid I (4 kB), wurde das geschädigte Plasmid mit den angegebenen Mengen, in der Regel 10 µg, an Ganzzellextrakt in einem Volumen von 50 µl unter Reparaturbedingungen bei 30 °C für 8 h, oder bei kinetischen Untersuchungen für die angegebenen Zeiten, inkubiert.

Reparaturbedingungen:

45 mM	HEPPES/KOH pH 7.9
60 mM	KCl
7,4 mM	MgCl ₂
0,9 mM	Dithiothreitol
je 20 µM	dCTP, dGTP, dTTP
5 µCi	α ³² P-dATP (33 nM)
2 mM	ATP
40 mM	Phosphocreatin
50 fg/l	Kreatine Phosphokinase Typ I
3,4% (Vol/Vol)	Glycerin
36 fg/l	Rinderserumalbumin

Die Reaktion wurde durch 20 mM EDTA gestoppt. Die im Zellextrakt evtl. vorhandene RNA wurde durch eine zehnmündige Behandlung mit 80 fg/l RNase A bei 37 °C abgebaut, anschließend die Proteine durch 0,4 % Natriumdodecylsulfat denaturiert und für 30 Min. bei 37 °C mit 0,2 pg/l Proteinase K proteolytisiert. Die platinbehandelten Proben wurden, wenn es nötig war, noch über Nacht bei 45 °C mit 250 mM NaCN deplatiniert. Die DNA wurde über *QiaquickTM Spin Columns* (Quiagen) gereinigt, in einem Vakuumrotationsverdampfer eingengt und in Bluejuice-Auftragspuffer aufgenommen. Die Proben wurden in einem 1 %igen Agarosegel ohne bzw. mit 40 µg/l Ethidiumbromid mit 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer bei einer Spannung von 2 - 3 V/cm über Nacht

elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde in einer Lösung von 0,02 % Ethidiumbromid in 1 x TBE-Puffer für 15 Min. eingefärbt. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Bestrahlung ($\lambda = 360 \text{ nm}$) in einem Transilluminator mit dem Eagle-Eye-System der Firma Amersham fotografiert. Das Gel wurde dann in einer Lösung aus 7 % Essigsäure und 4 % Glycerin fixiert und auf einem Vakuumtrockner getrocknet. Die radioaktiv markierte DNA wurde anschließend durch Autoradiographie detektiert.

8 DNA-Proteinquervernetzungen

8.1 Herstellung und Isolierung des DNA-Fragments

Das Plasmid P5 wurde unter Standardbedingungen in EcoPol-Puffer von NEB gleichzeitig mit den Restriktionsenzymen EcoR I und Pvu II bei 37 °C über Nacht geschnitten. Dabei entstehen drei Fragmente der Länge 2514 Bp, 352Bp und 177 Bp die in einer 2 %igen Agarosegelelektrophorese mit 1 x TBE als Laufpuffer über Nacht bei 3 – 4 V/cm aufgetrennt wurden. Das Gel wurde in einer Lösung von 0,02 % Ethidiumbromid in 1 x TBE-Puffer für 15 Min. eingefärbt und unter UV-Bestrahlung ($\lambda = 360 \text{ nm}$) das 177 Bp große Fragment ausgeschnitten. Das isolierte Gelstück wurde gewogen und in dem dreifachen Volumen (100 μl je 100 mg Gel) an Puffer QG (Quiagen) aufgenommen. Durch zehnmütiges Erwärmen auf 50 °C wurde das Gel aufgelöst und ein Gelvolumen Isopropanol zugegeben. Die DNA wurde dann nach den Herstellerangaben über *QIAquickTM Spin Columns* (Quiagen) gereinigt. Die DNA wurde mit 0,1 x TE eluiert und die DNA-Konzentration über die optische Dichte bei 260 nm bestimmt.

8.2 Bestimmung der DNA-Proteinquervernetzungen

Das isolierte Plasmidfragment wurde durch Auffüllen mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP durch Klenow Polymerase markiert. Dabei wurde 1 pmol des 177 Bp langen Fragments in Klenow Puffer und 30 μM dCTP, dGTP, dTTP und 30 μCi (0,33 μM) $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP mit 0,6 U Klenow Polymerase in einem Gesamtvolumen von 29 μl für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch 20 mM EDTA und Erhitzen auf 75°C für 10 Min. gestoppt. Anschließend wurde die

markierte DNA über eine Gelfiltrationssäule (*G25-Spin Column*, Pharmacia) gereinigt. Von dieser markierten DNA wurden 0,13 pmol in 21 μ l 0,1 x TE Puffer mit 1 μ M, 5 μ M bzw. 25 μ M der jeweiligen Platinverbindung bei 37 °C behandelt. Nach zehn Minuten bzw. für 100 μ M Cisplatin [H₂O] (**1**) und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) nach zehn Minuten, einer Stunde und 20 h wurden die Platinierungsreaktion durch 0,4 M NaCl gestoppt. Salz und nicht gebundene Platinkomplexe wurden anschließend über eine Gelfiltrationssäule (*Nick-Column*, Pharmacia), die mit 0,1 x TE äquilibriert worden war, abgetrennt. Von dem platinieren DNA-Fragment bzw. dem unbehandelten Kontrollfragment wurden jeweils 0,05 pmol mit 10 μ g Ganzzellextrakt in einem Volumen von 50 μ l unter Reparaturbedingungen (vgl. Kapitel 7.4, Seite 54) bei 30 °C für 1 h inkubiert. Je 1,5 fmol der Proben wurden mit einem fünftel des Volumens fünffach konzentrierten Auftragspuffers versetzt und entweder direkt auf das Acrylamidgel aufgetragen oder bei -20 °C eingefroren. Für die native Gelelektrophorese wurde ein nativer Auftragspuffer verwendet, für das denaturierende Acrylamidgel wurden die Proben in Bluejuice-Auftragspuffer aufgenommen und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert.

Nativer Auftragspuffer:

5	%	Glycerin
0,1	%	BPB (Bromphenolblau)

Das 4 %-ige Acrylamidgel hatte einen Quervernetzungsgrad von 30 : 0,8 (Acrylamid : Bisacrylamid) und TBE-Puffer, dem für die denaturierende Gelelektrophorese zusätzlich 0,1 % SDS zugegeben wurden. Die Proben wurden für 2 h bei 10 bis 15 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend in einer Lösung aus 7 % Essigsäure und 4 % Glycerin fixiert und auf einem Vakuumtrockner getrocknet. Die radioaktiv markierte DNA wurde nach dem Trocknen durch Autoradiographie detektiert.

Ergebnisse

1 **Veränderungen der Liganden haben großen Einfluß auf die Cytotoxizität.**

Um die Wirkung der verschiedenen Platinkomplexe auf Krebszellen zu vergleichen, wurden Maus-Leukämie-Lymphozyten der Linie L1210 mit steigenden Konzentrationen der zu untersuchenden Verbindungen inkubiert und die induzierte Abnahme des Zellwachstums bestimmt. Anfangs wurde die Zellzahl in einem Neubauer Hämocytometer bestimmt. Da dies für Routineuntersuchungen allerdings zu aufwändig ist, verwendeten wir für einige Verbindungen einen colorimeterischen Test. Als zweiter Indikator für die Wirkung einiger Verbindungen auf Zellen diente die Messung der DNA-Syntheseaktivität (DNA-Replikation). Dazu wurden die Zellen während eines Cytotoxizitätstests zusätzlich mit ^3H -Thymidin inkubiert und die Einbaurrate durch Messung der Radioaktivität der genomischen DNA bestimmt. Als ein Maß für die cytotoxische Wirkung wird die Konzentration der Platin-Verbindung angegeben, bei der die Zellzahl bzw. die DNA-Syntheserate auf 50 % einer Vergleichsprobe ohne diese Verbindung absinkt (IC_{50}). Zur Ermittlung der IC_{50} -Werte wurden mindestens zwei unabhängige Doppelbestimmungen durchgeführt.

1.1 Die Cytotoxizität der Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (11), (12), (13) und (14) ist indirekt proportional zur Länge der verbindenden Alkylkette.

Da sich die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe [(11), (12), (13) und (14)] nur in der Länge der verbindenden Alkylkette unterscheiden, konnte der Einfluß des Abstands der beiden Platinsphären auf die Cytotoxizität untersucht werden. Abb. 17 zeigt die Zellzahl in Abhängigkeit von der Konzentration der Platinkomplexe.

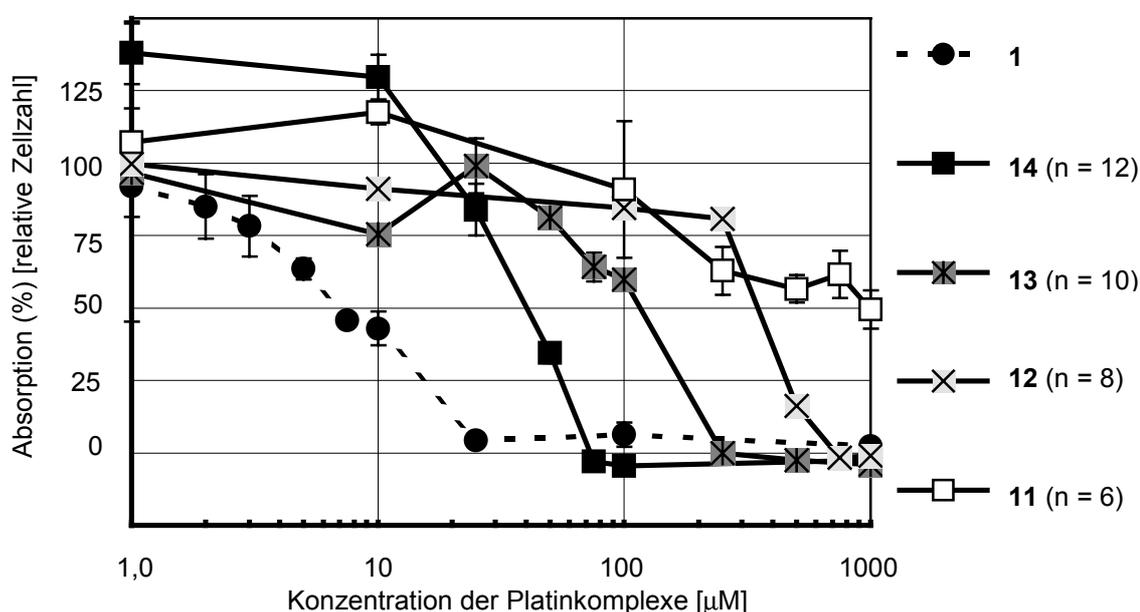


Abb. 17: Graphische Darstellung der relativen Zellzahl, bezogen auf unbehandelte Zellen, in Abhängigkeit von der Konzentration der Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen [(11), (12), (13), (14)] mit Längen der Alkylkette von $n = 6, 8, 10$ und 12 . Die cytotoxische Wirkung dieser Verbindungsklasse wurde kolorimetrisch bestimmt. Die x-Achse ist logarithmisch skaliert.

Es ist deutlich zu sehen, dass die Zellzahl bei einer Kettenlänge von $n = 6$ praktisch konstant bleibt, Hexyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (11) also keine cytotoxische Wirkung zeigt ($IC_{50} > 1000 \mu\text{M}$). Mit zunehmender Länge [(12), (13) und (14)] nimmt die Zellzahl jedoch bei immer geringer werdenden Konzentrationen ab ($IC_{50} = 369 \mu\text{M}$, $124 \mu\text{M}$ bzw. $42 \mu\text{M}$). Keine dieser Verbindungen erreicht allerdings das cytotoxische Potential von in Wasser gelöstem Cisplatin (1) ($IC_{50} = 6,9 \mu\text{M}$).

1.2 Die Cytotoxizität von Nonylethylendiaminplatin(II) (15) ist mit der wirksamsten Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindung vergleichbar.

Eine wichtige Frage für die Alkylethylendiaminkomplexe ist, inwieweit die Verknüpfung zweier Platinsphären zur Cytotoxizität beiträgt. Nonylethylendiaminplatin(II) (15) ist strukturell analog zu den Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen [(11), (12), (13) und (14)], hat aber nur an einem Ende der Alkylkette eine *cis*-Dichloroethylendiaminplatin(II)-Gruppe. Damit besteht die Möglichkeit, den Einfluß der zweiten Platinsphäre auf die cytotoxische Wirkung abzuschätzen. Die Entwicklung der Zellzahl mit zunehmender Nonylethylendiaminplatin(II)-Konzentration zeigt der Graph in Abb. 18.

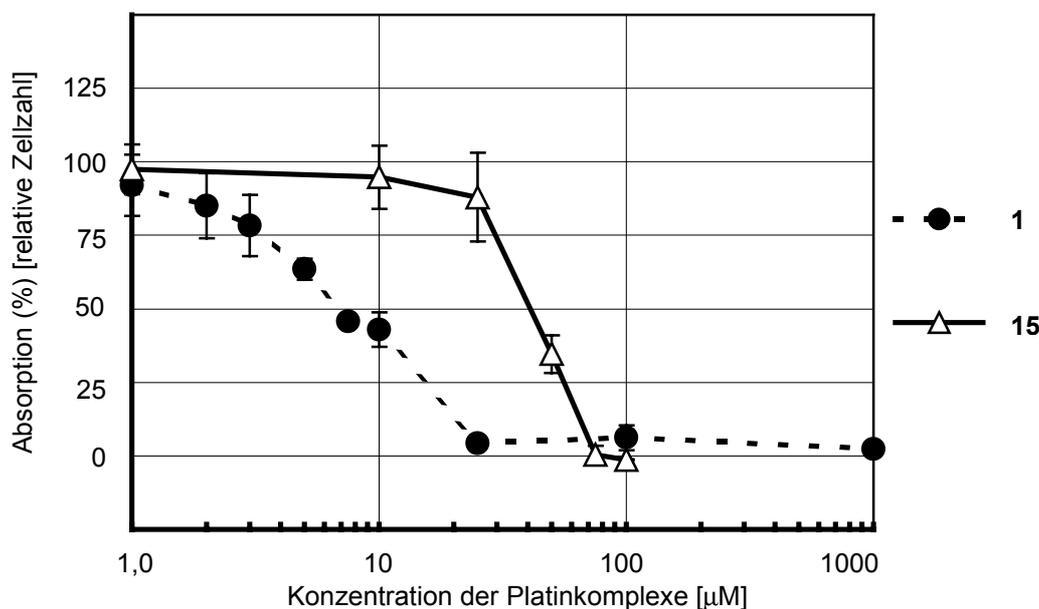


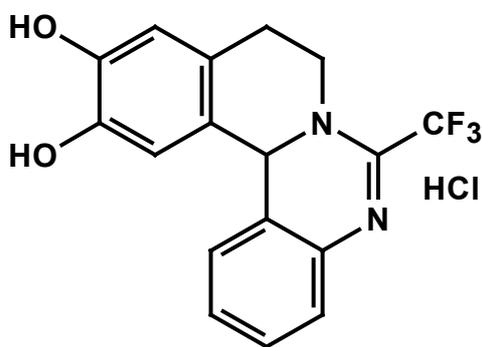
Abb. 18: Graphische Darstellung der relativen Zellzahl, bezogen auf unbehandelte Zellen, in Abhängigkeit von der Konzentration von Nonylethylendiaminplatin(II) (15). Die cytotoxische Wirkung dieser Verbindung wurde kolorimetrisch bestimmt. Die x-Achse ist logarithmisch skaliert.

Der daraus bestimmte IC_{50} -Wert von 43 μ M ist vergleichbar mit dem IC_{50} -Wert für die wirksamste der Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe, Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (14). Dies legt den Schluß nahe, dass eine zweite Platinsphäre die cytotoxische Wirkung nicht erhöht.

1.3 Die stärkste cytotoxische Wirkung weist Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) auf.

Für die Verbindungsklasse der 1-(2-Aminophenyl)isochinolin-komplexe stellt sich die Frage, ob das Ligandensystem allein eine pharmakologische Wirkung besitzt. Dewegen wurden auch der Ligand von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) getestet.

Da der Ligand aufgrund des fehlenden Ringschlusses jedoch flexibler als die Platinverbindungen sind wurde auch ein Struktur-analogon (**17**) getestet.



17

Abb. 19: Struktur-analogon (**17**) von Anilin-4H-isochinolinplatin(II)

Abb. 20 zeigt die Zellzahl in Abhängigkeit von der Konzentration des Anilin-4H-isochinolinliganden, dem Strukturanalogon (**17**), und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**).

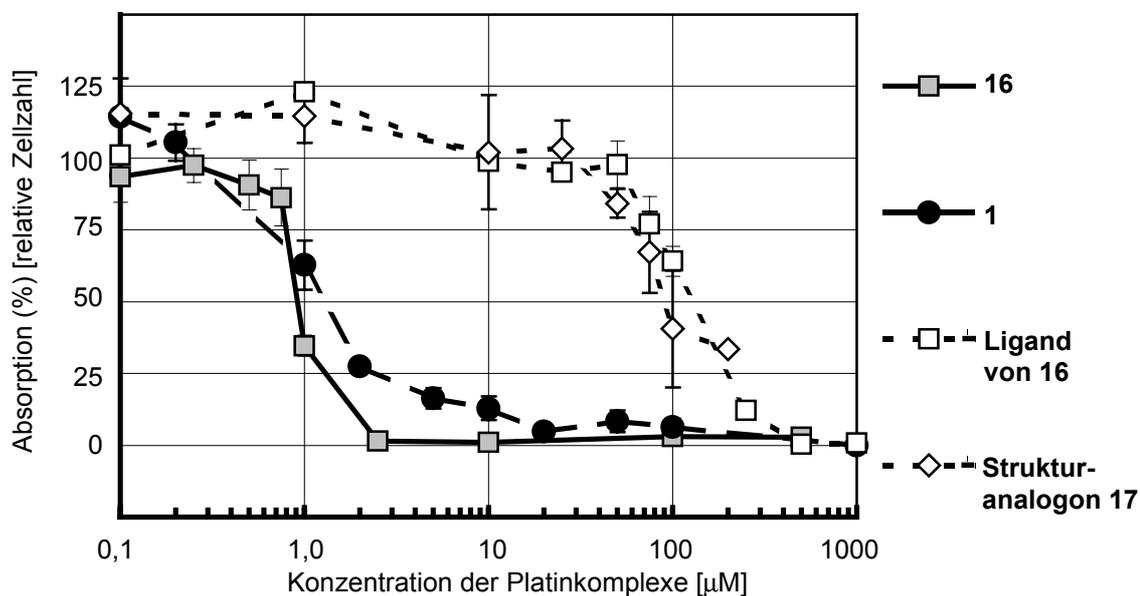


Abb. 20: Graphische Darstellung der relativen Zellzahl, bezogen auf unbehandelte Zellen, in Abhängigkeit von der Konzentrationen des Anilin-4H-isochinolinliganden, dem Strukturanalogon (**17**) und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**). Für diese Verbindungen wurde die Zellzahl mit Hilfe eines Neubauer Hämocytometers bestimmt. Die x-Achse ist logarithmisch skaliert.

Die beiden Verbindungen ohne Platinmetall sind mit IC_{50} -Werten von ca. 100 µM praktisch inaktiv. Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) dagegen ist mit einem IC_{50} -Wert von 0,88 µM sogar cytotoxischer als Cisplatin [H_2O] (**1**).

Für den Liganden, das Strukturanalogon (**17**), und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) wurde auch die DNA-Syntheserate bestimmt (Abb. 21).

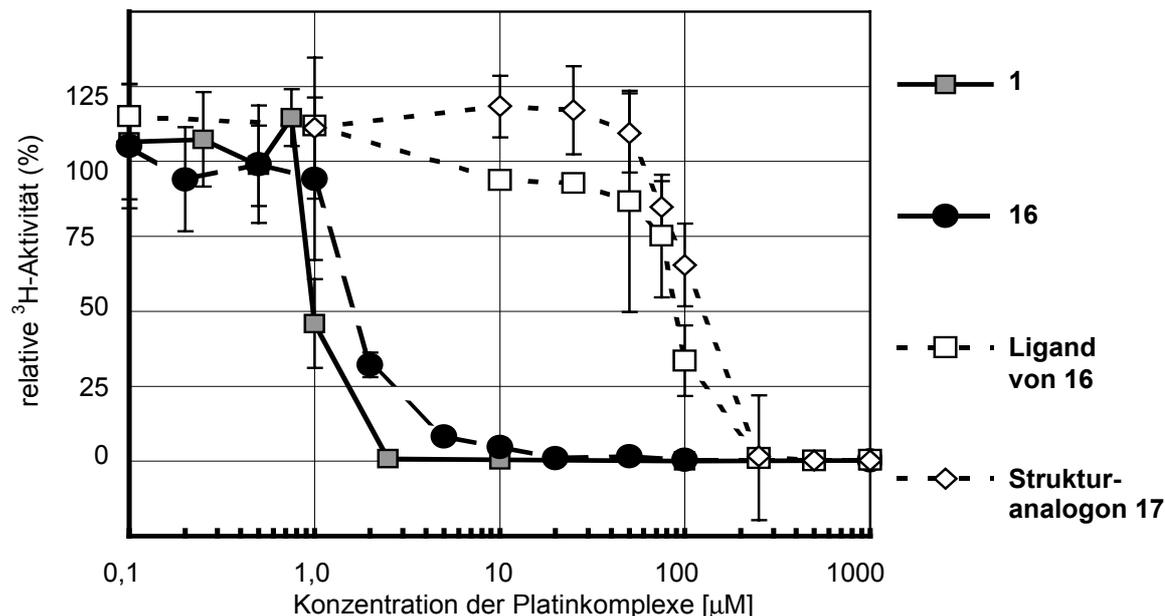


Abb. 21: Graphische Darstellung der relativen DNA Syntheserate, bezogen auf unbehandelte Zellen, in Abhängigkeit von der Konzentrationen des Anilin-4H-isochinolinliganden, dem Strukturanalogon (**17**) und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**). Die x-Achse ist logarithmisch skaliert.

Der Vergleich von Abb. 20 auf Seite 61 mit Abb. 21 zeigt, dass die Graphen der DNA-Synthese und der Zellzählung sich jeweils entsprechen.

Alle IC₅₀-Werte sind in Tabelle 2, Seite 63, nach zunehmender Wirksamkeit zusammengefasst. Die Originaldaten für Cisplatin [H₂O] (**1**), Cisplatin [DMSO] (**1a**), Bisamid-bisplatin(II) (**8**), Monoamid-monoplatin(IV) (**10**) und Bisamid-bisplatin(IV) (**9**) wurden bereits während der Diplomarbeit⁸³ bestimmt und werden hier für umfangreichere Vergleichsmöglichkeiten in die Tabelle mitaufgenommen.

Verbindung [Lösungsmittel]	Zellzahl IC ₅₀ ± SD [μM]	DNA Syntheserate IC ₅₀ ± SD [μM]
Hexyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (11) ♦ (n=6) [DMSO]	> 1000	—
Cisplatin (1a) ♦ [DMSO]	389 ± 22	—
Cisplatin (1a) [DMSO]	> 100	> 100
Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (12) ♦ (n=8) [DMSO]	369 ± 31	—
Decyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (13) ♦ (n=10) [DMSO]	124 ± 12	—
Bisamid-bisplatin(II) (8) [DMSO]	105 ± 6	109 ± 15
Nonylethylendiaminplatin(II) (15) ♦ (n=9) [DMSO]	43 ± 4	—
Nonylethylendiaminplatin(II) (15) (n=9) [DMSO]	39 ± 6	—
Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (14) ♦ (n=12) [DMSO]	42 ± 3	—
Bisamid-bisplatin(IV) (9) [H ₂ O]	36 ± 4	67 ± 12
Monoamid-monoplatin(IV) (10) [H ₂ O]	24 ± 2	31 ± 4
Cisplatin (1) ♦ [H ₂ O]	6,9 ± 0,3	—
Cisplatin (1) [H ₂ O]	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) [DMSO]	0,88 ± 0,08	1,4 ± 0,6

Tabelle 2: Übersicht über die IC₅₀-Werte der Platinkomplexe. Die IC₅₀-Werte in der linken Spalte wurde durch Zellzählung oder mittels eines kolorimetrischen Tests♦ bestimmt. In der rechten Spalte sind IC₅₀-Werte angegeben, die durch ³H-Thymidineinbau ermittelt wurden.

Die Tabelle macht nochmals deutlich, dass die Ligandenstruktur großen Einfluß auf die Cytotoxizität hat. Für die in dieser Arbeit getesteten Verbindungen wurde gefunden, dass eine Verlängerung der Alkylkette in den Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexen [(**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] die Cytotoxizität erhöht,

wohingegen die zweite Platinsphäre offenbar die Wirksamkeit im Vergleich zu Nonylethyldiaminplatin(II) (**15**) senkt. Die in dieser Arbeit am stärksten cytotoxische Verbindung ist Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**).

2 Die Platinkonzentration in den Zellen nimmt mit steigender Konzentration der Komplexe im Medium zu

Für die Entfaltung der cytotoxischen Aktivität der Platinverbindungen müssen die Komplexe in die Zellen gelangen. Um die Effizienz der Zellaufnahme zu untersuchen, wurde nach der Behandlung mit den unterschiedlichen Verbindungen der Platingehalt in den Zellen bestimmt. Dazu wurden Zellen zuerst unter den gleichen Bedingungen wie für die Cytotoxizitätstest mit 0,1 μM , 1 μM bzw. 10 μM der jeweiligen Platinverbindung behandelt. Anschließend wurden die Zellen gezählt, das Medium von den Zellen abgetrennt und die Zellen gewaschen. In dieser Zellsuspension wurde dann der Platingehalt bestimmt und aus den gewonnenen Daten die Menge der Platinatome pro Zelle bestimmt.

2.1 Eine längere Alkylkette verbessert die Zellaufnahme der Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (11), (12), (13) und (14)

Nachdem die Länge der Alkylkette der Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe einen großen Einfluß auf die Cytotoxizität hat, war die Frage, ob eine längere, unpolare Alkylkette, evtl. aufgrund einer erhöhten Lipophilie, die Zellaufnahme erleichtert.

Die Graphik in Abb. 22, Seite 65, zeigt die gemessene Platinmenge in den Zellen in Abhängigkeit der Konzentration der Verbindungen im Medium.

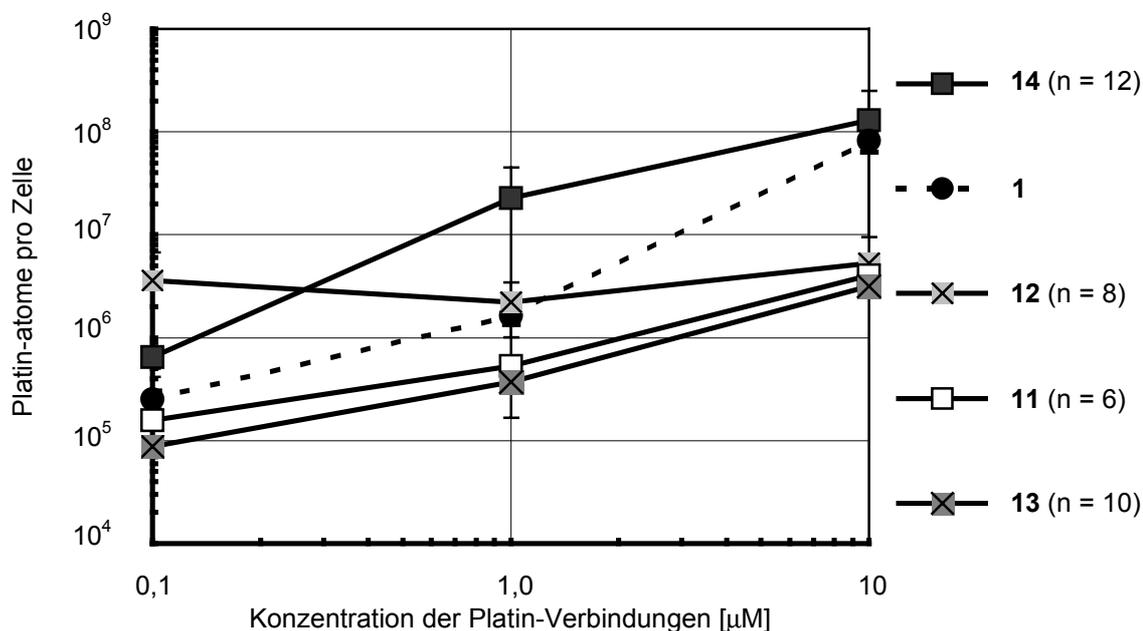


Abb. 22: Aufnahme der Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen [(**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] in Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration im Medium. Cisplatin [H₂O] (**1**) wurde als Vergleich mitaufgetragen. Beide Achsen sind logarithmisch skaliert.

Für alle Komplexe gilt, dass sie mit zunehmender Konzentration im Medium auch verstärkt in die Zellen gelangen. Der Komplex Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**12**) scheint bei einer Ausgangskonzentration von 0,1 μM stärker als alle anderen Verbindungen in die Zellen einzudringen. Dieser Effekt ist allerdings nicht signifikant und eher auf einen stark abweichenden Meßpunkt zurückzuführen. Demzufolge täuscht auch die scheinbare Abnahme der Platinmenge in den Zellen zwischen 0,1 μM und 1 μM Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Konzentration im Medium. Neben Cisplatin [H₂O] (**1**) wurden von der cytotoxischten Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (**14**) die größten Mengen in den Zellen gefunden. Die Unterschiede zu den weniger wirksamen Verbindungen Hexyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**11**), Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**12**) und Decyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**13**), sind mit Ausnahme von 1 μM Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**12**) signifikant. Innerhalb der nur schwach aufgenommenen Verbindungen (**11**), (**12**) und (**13**) gibt es dagegen nur geringfügige, aber dennoch überwiegend signifikante Unterschiede.

Für die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen [(**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] gibt es eine leichte Korrelation zwischen Cytotoxizität und Zellaufnahme. Offen-

bar erhöht eine längere Alkylkette sowohl die Zellaufnahme als auch die Cytotoxizität. Ein Grund für die erhöhte Zellaufnahme mit zunehmender Länge der Alkylkette könnte sein, dass die größere Lipophilie die Diffusion durch die lipophile Zellmembran erleichtert.

2.2 Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) dringt mindestens genauso gut in Zellen ein wie die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen

Mit der mononuklearen Verbindung Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) kann festgestellt werden, ob die Alkylkette allein die Zellaufnahme positiv beeinflusst oder ob der Abstand der beiden Platinsphären der entscheidende Parameter ist. Abb. 23 zeigt die Menge der Platinatome pro Zelle mit steigenden Konzentrationen von Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) im Medium.

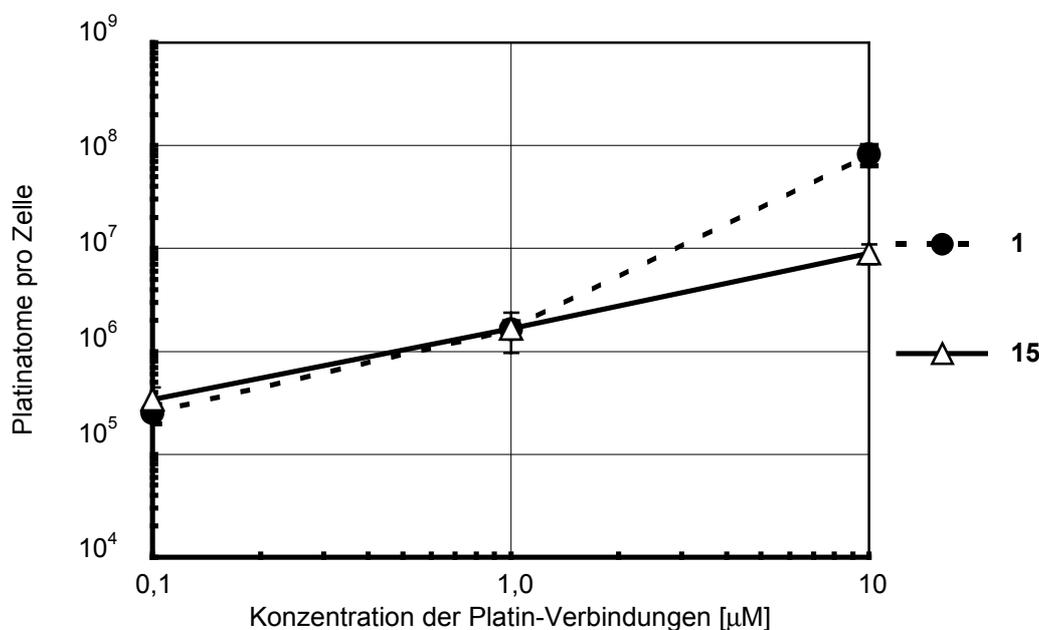


Abb. 23: Aufnahme von Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) in Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration im Medium. Cisplatin [H₂O] (1) wurde als Vergleich mitaufgetragen. Beide Achsen sind logarithmisch skaliert.

Bei den entsprechenden Konzentrationen wurde mehr Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) in den Zellen gefunden als Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe [(11), (12) und (13)]. Die Mengen von (15) und von Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (14) sind dagegen vergleichbar. Das heißt, dass Komplexe mit langen Alkylketten, unabhängig ob es sich um mono- oder dinukleare Komplexe handelt, besser in Zellen eindringen können.

2.3 Die Aufnahme von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) in die Zellen ist vergleichbar mit Cisplatin [H₂O] (**1**).

Die Graphik in Abb. 24 zeigt, dass der Gehalt von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) in den Zellen mit steigenden Konzentrationen im Medium deutlich zunimmt.

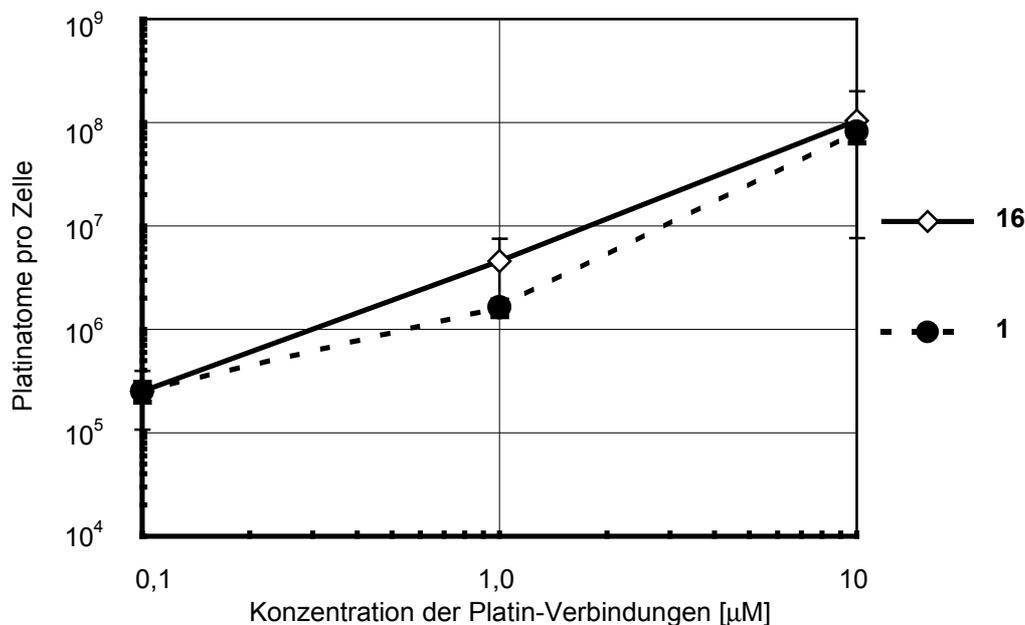


Abb. 24: Aufnahme von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) in Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration im Medium. Cisplatin [H₂O] (**1**) wurde als Vergleich mitaufgetragen. Beide Achsen sind logarithmisch skaliert.

Die gefundenen Unterschiede zu Cisplatin [H₂O] (**1**) liegen innerhalb der Fehlergrenze. In jedem Fall führt für beide Komplexe eine Erhöhung der Konzentration im Medium um das hundertfache zu einem Anstieg der Platinmenge innerhalb der Zellen um mehr als zwei Zehnerpotenzen. Offenbar bewirkt eine Erhöhung der Außenkonzentration ein größeres Konzentrationsgefälle und damit eine vermehrte Aufnahme dieser aktiven Platinkomplexe in die Zellen.

Für eine bessere Übersicht sind die genauen Werte der Zellaufnahme in Tabelle 3, Seite 68, zusammengefasst.

Die Originaldaten für Cisplatin [H₂O] (**1**), Cisplatin [DMSO] (**1a**), Bisamid-bisplatin(II) (**8**), Monoamid-monoplatin(IV) (**10**) und Bisamid-bisplatin(IV) (**9**) wurden bereits während der Diplomarbeit⁸³ bestimmt und werden hier für eine umfangreichere Vergleichsbasis in die Tabelle mitaufgenommen.

Verbindung [Lösungsmittel]	Platinkomplexe ($\times 10^6$) pro Zelle bei folgenden Ausgangskonzentrationen		
	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) [DMSO]	0,25 \pm 0,14	4,6 \pm 2,9	104 \pm 96*
Cisplatin (1) [H ₂ O]	0,25 \pm 0,05	1,6 \pm 0,3	82 \pm 18
Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (14) [DMSO]	0,32 \pm 0,08	11,4 \pm 11,2	65 \pm 60
Monoamid-monoplatin(IV) (10) [H ₂ O]	0,56 \pm 0,00	3,1 \pm 0,5	34 \pm 2
Bisamid-bisplatin(IV) (9) [H ₂ O]	0,32 \pm 0,16	2,0 \pm 0,4	27 \pm 8
Bisamid-bisplatin(II) (8) [DMSO]	0,16 \pm 0,02	0,83 \pm 0,31	10 \pm 2
Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) [DMSO]	0,34 \pm 0,11	1,7 \pm 0,7	9,0 \pm 2,0
Cisplatin (1a) [DMSO]	0,24 \pm 0,02	0,43 \pm 0,21	8,0 \pm 1,8
Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (12) [DMSO]	1,8 \pm 1,6	1,1 \pm 0,6	2,6 \pm 0,5
Hexyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (11) [DMSO]	0,079 \pm 0,003	0,27 \pm 0,04	2,0 \pm 0,6
Decyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (13) [DMSO]	0,044 \pm 0,002	0,18 \pm 0,10	1,6 \pm 0,2

Tabelle 3: Platinkomplexe ($\times 10^6$) pro Zelle bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen der Verbindungen \pm Standardabweichung. Die Verbindungen sind nach abnehmender Molekülzahl pro Zelle bei einer Konzentration von 10 μ M geordnet.

Wie schon für die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen [(**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] und Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (**15**), so lässt sich auch insgesamt eine gewisse Korrelation zwischen Zellaufnahme und Cytotoxizität der Verbindungen feststellen. So wurden von den stark cytotoxisch wirkenden Verbindungen, Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) und Cisplatin [H₂O] (**1**),

* Leider konnte der Wert für 10 μ M Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) nur ungenau bestimmt werden. Die drei Meßpunkte von 35, 37 und 240 Platinatomen pro Zellen veranschaulichen die Streuung, die nur eine unbefriedigenden Standardabweichung ergeben.

deutlich mehr Moleküle in den Zellen gefunden als z.B. von den schwach cytotoxischen Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexen [(**11**), (**12**) und (**13**)].

Allerdings kann nicht von der Aufnahmeeffizienz einer Verbindung in Zellen auf die Wirksamkeit, oder umgekehrt, von der cytotoxischen Wirkung auf die Zellaufnahme, geschlossen werden. Cisplatin [DMSO] (**1a**) wird z.B. in etwa gleich gut aufgenommen wie Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (**15**), hat aber einen fast zehnfach höheren IC_{50} -Wert. Die Zellaufnahme spielt also für die cytotoxische Wirkung möglicherweise eine Rolle, reicht aber als alleinige Erklärung für die unterschiedlichen Wirksamkeiten nicht aus.

3 Eine zunehmende Konzentration der Komplexe im Medium führt zu mehr Platinaddukten an zellulärer DNA.

Platinkomplexe können in der Zelle mit einer Vielzahl von Partnern reagieren. Dazu zählen unter anderem Proteine, insbesondere solche mit Thiolgruppen, RNA und DNA. Wenn die DNA-Addukte für die cytotoxische Wirkung der Komplexe verantwortlich sind, so sollte neben der Aufnahme in die Zellen vor allem der DNA gebundene Anteil wesentlich sein. Aus diesem Grund wurde von einem Teil der Zellen, die für die Platingehaltsbestimmung präpariert wurden (Kapitel 2, Seite 64) DNA isoliert. Von diesen Proben wurde sowohl die Konzentration an DNA als auch an Platin bestimmt und daraus die Anzahl der Platinaddukte pro Nukleotid (r_B -Wert) berechnet.

3.1 Die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (11**), (**12**), (**13**) und (**14**) bilden bei geringen Konzentrationen die wenigsten DNA-Addukte aus.**

Die Zahl der Platinaddukte pro Nukleotid (r_B -Wert) mit zunehmender Konzentration der Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (**11**), (**12**), (**13**) und (**14**) ist in Abb. 25, Seite 70, dargestellt.

Nach der Behandlung der Zellen mit 0,1 μ M Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (**11**), (**12**), (**13**) und (**14**) finden sich auf der zellulären DNA im Vergleich mit Cisplatin [H_2O] (**1**) signifikant weniger Addukte. Aufgrund von

Meßungenauigkeiten der geringen Werte kann der Unterschied allerdings noch kleiner sein als in Abb. 25, Seite 70, dargestellt.

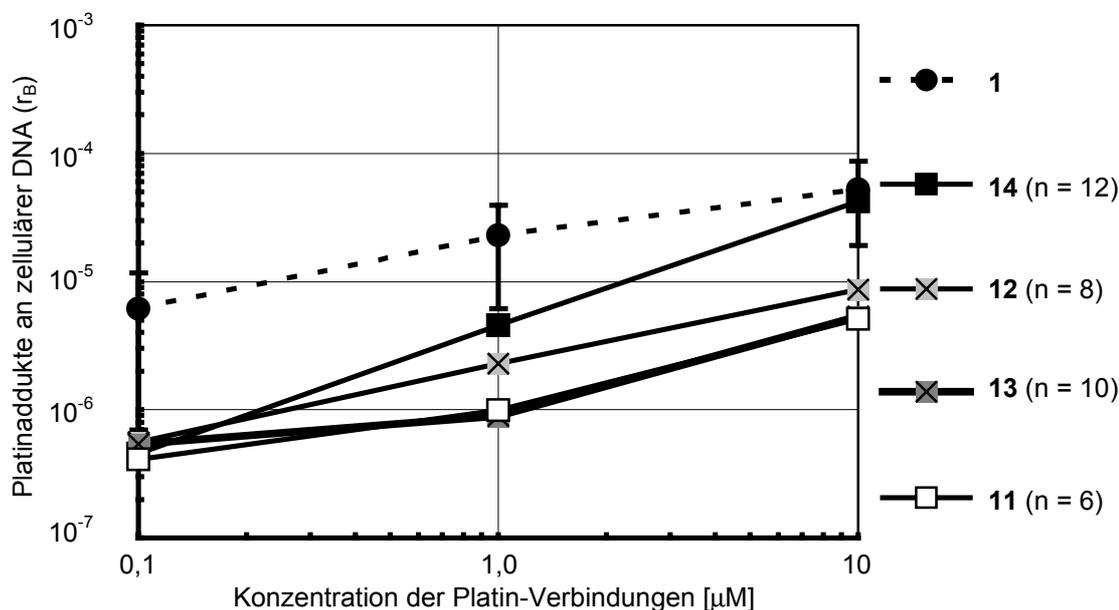


Abb. 25: Platinaddukte der Alkyl-bis-ethylenediaminplatin(II)-Verbindungen **(11)**, **(12)**, **(13)** und **(14)** an zellulärer DNA (r_B) in Abhängigkeit von der Konzentration im Medium. Cisplatin [H₂O] **(1)** wurde als Vergleich mitaufgetragen. Beide Achsen sind logarithmisch skaliert.

Eine Steigerung der Konzentration im Medium um das Hundertfache erhöht die Zahl der Platinaddukte für Cisplatin [H₂O] **(1)** nur um einen Faktor von zehn. Die übrigen Alkyl-bis-ethylenediaminplatin(II)-Komplexe [**(11)**, **(12)** und **(13)**], die weniger cytotoxisch wirken, zeigen ebenfalls nur eine zehnfache Steigerung. Damit bleibt die Zahl der DNA-Addukte um circa eine Größenordnung hinter den DNA-Addukte von Cisplatin [H₂O] **(1)** zurück. Innerhalb dieser, weniger stark modifizierenden Alkyl-bis-ethylenediaminplatin(II)-Verbindungen [**(11)**, **(12)** und **(13)**] konnten allerdings keine quantitativen Unterschiede der DNA-Addukte gemessen werden, obwohl sie sich in ihrer Cytotoxizität deutlich unterscheiden. Dagegen steigt der Platinierungsgrad für die wirksamste Alkyl-bis-ethylenediaminplatin(II)-Verbindung **(14)** mit zunehmender Konzentration im Medium stärker an als für Cisplatin [H₂O] **(1)**. Eine Erhöhung der Konzentration des Komplexes **(14)** im Medium um einen Faktor 100 führt auch zu einer in etwa hundertfach stärkeren DNA-Modifikation und nähert sich damit dem Effekt von Cisplatin [H₂O] **(1)**.

Wie schon bei der Zellaufnahme in Kapitel 2.1 auf Seite 64 konnte also eine schwache Korrelation zwischen Anzahl der DNA-Addukte der Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe [(11), (12), (13) und (14)] und deren cytotoxischen Wirkung ausgemacht werden.

3.2 Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) bildet mindestens soviele DNA-Addukte aus wie die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen.

Wie schon bei den Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen [(11), (12), (13) und (14)] (Abb. 25, Seite 70) findet man für 0,1 μM Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) auch signifikant weniger DNA-Addukte als für Cisplatin [H_2O] (1) (Abb. 26).

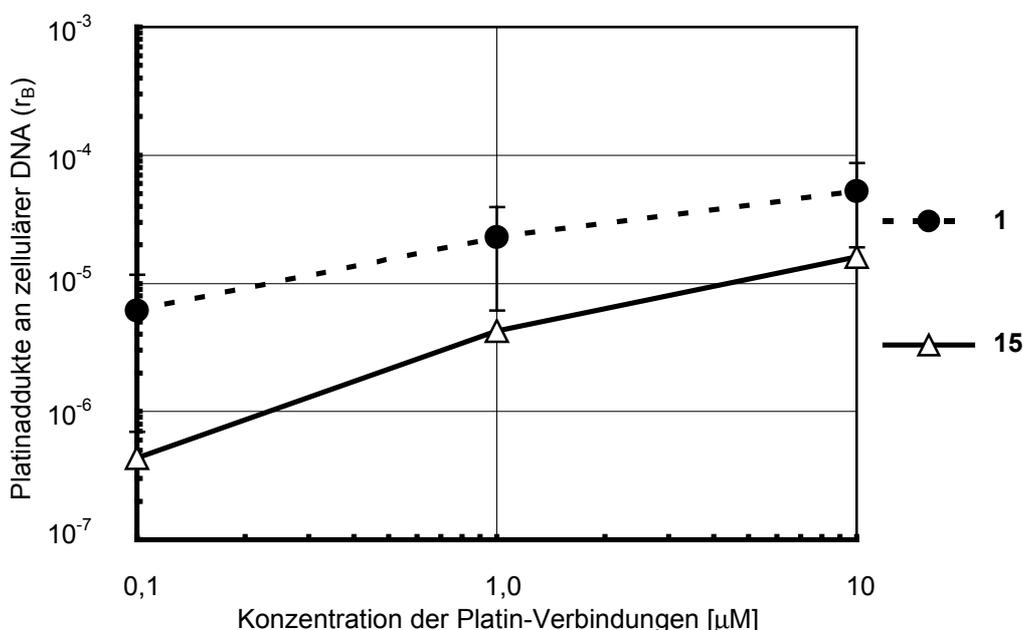


Abb. 26: Platinaddukte von Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) an zellulärer DNA (r_B) in Abhängigkeit von der Konzentration im Medium. Cisplatin [H_2O] (1) wurde als Vergleich mitaufgetragen. Beide Achsen sind logarithmisch skaliert.

Allerdings steigt die Adduktzahl mit zunehmender Konzentration von (15) stärker an, so dass bei einer Konzentration von 100 μM keine signifikanten Unterschiede mehr zu Cisplatin [H_2O] (1) auftreten.

Damit erzeugt Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) mehr DNA-Addukte als die weniger effektiven Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen [(11), (12) und (13)] und ist mit Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (14) vergleichbar. Ähnlich der Zellaufnahme (Kapitel 2.2, Seite 66) wurde auch an zellulärer DNA für die

cytotoxischen der Alkyl-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (**14**) und (**15**) die meisten Addukte gefunden.

3.3 Die Anzahl der zellulären DNA-Addukte von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) und von Cisplatin [H₂O] (**1**) gleichen sich

Abb. 27, Seite 72, zeigt die Zahl die Platinaddukte an zellulärer DNA bei steigenden Konzentrationen von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) im Medium.

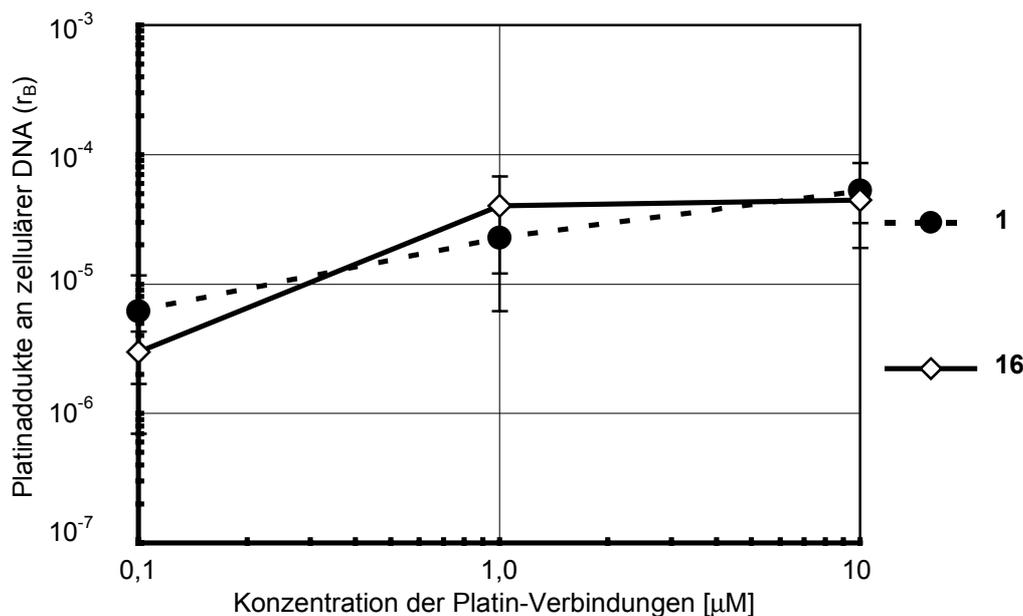


Abb. 27: Platinaddukte von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) an zellulärer DNA (r_B) in Abhängigkeit von der Konzentration im Medium. Cisplatin [H₂O] (**1**) wurde als Vergleich mitaufgetragen. Beide Achsen sind logarithmisch skaliert.

Eine hundertfache Steigerung der Konzentration im Medium führt zu einer in etwa zehnfachen Erhöhung der Zahl der Platinaddukte an der DNA. Das heißt, dass trotz einer starken Zunahme der Komplexe innerhalb der Zellen (Kapitel 2.3, Seite 67) die Addukte an der DNA nur wenig zunehmen.

Da jedoch schon bei den geringen Konzentrationen deutlich mehr Addukte gebildet werden als zum Beispiel mit den Alkyl-ethylendiaminplatin(II)-Komplexen (**11**) – (**15**), wurden im untersuchten Konzentrationsbereich dennoch für Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) und Cisplatin [H₂O] (**1**), zusammen mit den Verbindungen (**14**) und (**15**), die meisten DNA-Addukte gefunden.

Die genauen Daten der gemessenen Platinaddukte an zellulärer DNA aller untersuchten Komplexe sind in Tabelle 4, Seite 74, zusammengefasst. Dabei sind für alle Verbindungen die Menge der DNA-gebundenen Platinatome angege-

ben. Für die Bisplatinkomplexe ist anhand der Platinbestimmung nicht zu unterscheiden, ob nur eine Platinsphäre direkt an die DNA gebunden hat und das zweite Platinatom nur über den gemeinsamen Liganden gebunden ist, oder ob jede Platinsphären direkt an die DNA gebunden ist. Anhand der Untersuchungen der Reaktion der Komplexe mit DNA *in vitro*, die in Kapitel 4, Seite 75ff und Kapitel 5, Seite 96ff, vorgestellt werden, konnten einige Hinweise gewonnen werden, die dafür sprechen, dass beide Platinsphären mit der DNA reagieren. Allerdings bleibt die Frage, ob die beiden über einen gemeinsamen Liganden verbundenen Platinaddukte mit zwei unabhängigen Addukten zu vergleichen sind oder als ein einziges Addukt anzusehen sind. Aus diesem Grund wird in der Tabelle für die Bisplatinverbindungen in der ersten Zeile die Anzahl der Platinatome pro Nukleotid angegeben und darunter jeweils die Zahl der Moleküle pro Nukleotid.

Die Originaldaten für Cisplatin [H₂O] (**1**), Cisplatin [DMSO] (**1a**), Bisamid-bisplatin(II) (**8**), Monoamid-monoplatin(IV) (**10**) und Bisamid-bisplatin(IV) (**9**) wurden bereits während der Diplomarbeit⁸³ bestimmt und werden deswegen hier wieder für eine umfangreichere Vergleichsbasis in die Tabelle 4, Seite 74ff, mitaufgenommen.

Verbindung [Lösungsmittel]	Platinaddukte ($\times 10^{-5}$) an zellulärer DNA (r_B) bei folgenden Ausgangskonzentrationen		
	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
Cisplatin (1) [H ₂ O]	0,62 \pm 0,55	2,3 \pm 1,7	5,3 \pm 3,4
Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) [DMSO]	0,30 \pm 0,13	4,0 \pm 2,8	4,5 \pm 1,5
Monoamid-monoplatin(IV) (10) [H ₂ O]	1,0 \pm 0,2	1,8 \pm 1,1	2,5 \pm 0,4
Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (14) [DMSO]	0,045 \pm 0,009 0,023 \pm 0,005	0,56 \pm 0,34 0,23 \pm 0,17	4,2 \pm 3,6 2,1 \pm 1,8
Cisplatin (1a) [DMSO]	1,4 \pm 0,6	2,2 \pm 1,2	1,8 \pm 0,3
Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) [DMSO]	0,043 \pm 0,008	0,43 \pm 0,18	1,6 \pm 1,0
Bisamid-bisplatin(IV) (9) [H ₂ O]	1,0 \pm 0,2 0,52 \pm 0,10	2,4 \pm 1,2 1,2 \pm 0,6	2,6 \pm 0,0 1,3 \pm 0,0
Bisamid-bisplatin(II) (8) [DMSO]	1,1 \pm 0,5 0,57 \pm 0,26	1,2 \pm 0,3 0,58 \pm 0,14	1,5 \pm 0,7 0,74 \pm 0,33
Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (12) [DMSO]	0,056 \pm 0,004 0,028 \pm 0,002	0,23 \pm 0,09 0,12 \pm 0,04	0,87 \pm 0,52 0,43 \pm 0,26
Decyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (13) [DMSO]	0,054 \pm 0,012 0,027 \pm 0,006	0,090 \pm 0,050 0,045 \pm 0,025	0,53 \pm 0,22 0,27 \pm 0,11
Hexyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (11) DMSO	0,040 \pm 0,032 0,020 \pm 0,016	0,100 \pm 0,05 0,050 \pm 0,026	0,51 \pm 0,3 0,26 \pm 0,12

Tabelle 4: Platinaddukte ($\times 10^{-5}$) an zellulärer DNA (r_B) bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen der Komplexe im Medium \pm Standardabweichung. Die Werte in der zweiten Zeile geben die Zahl der DNA-gebundenen Moleküle der Bisplatin Komplexe an. Die Verbindungen sind nach abnehmender Zahl der Moleküladdukte bei einer Konzentration von 10 μ M geordnet.

Die Verbindungen sind nach abnehmender Zahl der Moleküladdukte bei einer Konzentration von 10 μ M geordnet. Tendenziell finden sich dabei die cytotoxischeren Verbindungen im oberen Teil der Tabelle. Diese bilden also mehr DNA-Addukte aus als die weniger cytotoxischen Verbindungen im unteren Teil der Tabelle. Allerdings nimmt die Cytotoxizität nicht stetig von oben nach unten ab. So steht Cisplatin [DMSO] (**1a**) z.B. vor den cytotoxischeren Verbindungen Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (**15**) und Bisamid-bisplatin(IV) (**9**). Es gibt also

keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Addukte auf der DNA und der cytotoxischen Wirkung der Verbindungen. Dies soll durch einen weiteren Vergleich verdeutlicht werden. Sowohl für Cisplatin [H₂O] (**1**) als auch für Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) entstehen bei einer Konzentration von 1 µM circa alle 50000 Basen ein Addukt. Das Zellwachstum wird unter diesen Bedingungen bereits beeinflusst. Sollte allein die Zahl der Platinaddukte auf der DNA für die cytotoxische Wirkung verantwortlich sein, so müßten z.B. Cisplatin [DMSO] (**1a**) oder Bisamid-bisplatin(IV) (**9**), die bei einer Konzentration von 10 µM ebenfalls in etwa alle 50000 Basen ein Addukt bilden, bei 10 µM eine ähnlich starke Wirkung zeigen wie Cisplatin [H₂O] (**1**) oder Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) bei einer Konzentration von 1 µM. Da dies jedoch nicht der Fall ist, kann die Zahl der Addukte nicht allein für die cytotoxische Wirkung verantwortlich sein. Neben den rein quantitativen Unterschieden beeinflussen also auch qualitative Differenzen, das heißt Unterschiede in der „Art“ der DNA-Addukte, die Wirksamkeit in den Zellen. Dieser Frage wird in den kommenden Kapiteln nachgegangen.

4 Platinkomplexe führen zu einer Reihe unterschiedlicher DNA-Sekundärstrukturveränderungen

4.1 Exkurs: DNA-Topologie⁸⁴

Dieser kurze Exkurs in die DNA-Topologie soll das Verständnis der DNA-Sekundärstrukturveränderungen und anderer topologischer Effekte, die zum Beispiel bei den DNA-Reparatursynthesetests (Kapitel 6, Seite 107) auftreten, erleichtern.

Die Topologie einer geschlossenen, ringförmigen DNA, z.B. eines Plasmids, kann durch folgende mathematische Gleichung beschrieben werden:

$$L = T + W$$

Die Verflechtungszahl L (L vom englischen Begriff *linking number*) gibt die Zahl der Windungen des einen Stranges um den komplementären zweiten Strang an. Damit kann L in einer geschlossenen, ringförmigen DNA nicht verändert werden, ohne dass ein Strangbruch eingeführt wird. Abb. 28 veranschaulicht die Verflechtungszahl anhand dreier Beispiele.

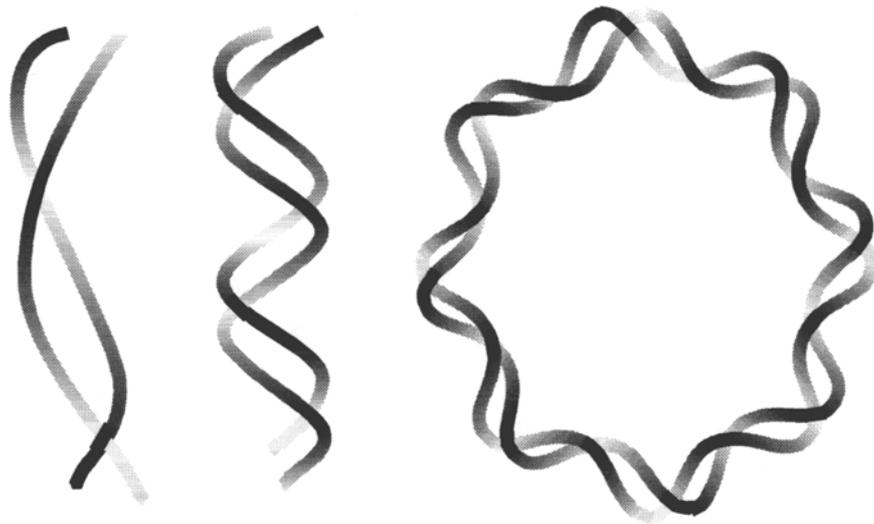


Abb. 28: Beispiele für die Verflechtungszahl L : Links ist der eine Strang einmal um den anderen gewunden ($L = 1$), in der Mitte zweimal ($L = 2$) und in dem geschlossenen Zirkel achtmal ($L = 8$).

Die Verdrillungszahl T (T vom englischen *twisting number*) drückt die Zahl der Windungen eines Stranges um die Achse der Doppelhelix aus. Einer Konvention zufolge wurde das Vorzeichen für rechtsgängige Helices positiv festgelegt. Damit weist B-DNA eine positive Windungszahl auf.

Nimmt man von obigen Beispielen (Abb. 28, Seite 76) jeweils einen Strang heraus und zeichnet die Helixachse ein (Abb. 29), so ist die Verdrillungszahl leicht zu bestimmen.

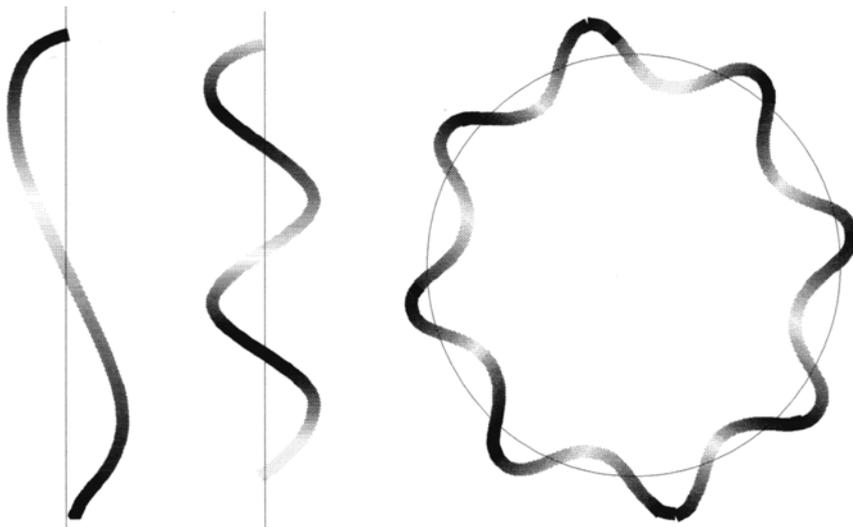


Abb. 29: Beispiele für die Verdrillungszahl T : Links ist der eine Strang einmal um die Achse der Doppelhelix gewunden ($T = 1$), in der Mitte zweimal ($T = 2$) und im geschlossenen Zirkel achtmal ($T = 8$).

Die Krümmungszahl W (Englisch *writhing number*) ist ein Maß für die Anzahl der Windungen der Doppelhelix um die Achse einer Superhelix. Diese Superhelix ist eine weitere Helix, deren Band die eigentliche DNA-Helix ist. In Abb. 30 ist eine solche Superhelix mit ihrer Achse schematisch dargestellt.

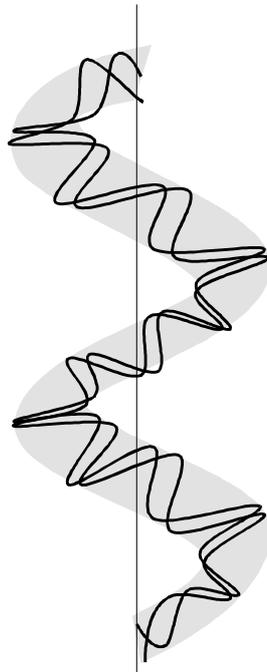


Abb. 30: Schematische Darstellung einer Helix, die zu einer Superhelix gewunden ist.

In einem planaren, doppelsträngigen DNA-Molekül, das also keine Superhelizität aufweist, ist $W = 0$ und damit muss, wie in den Beispielen in Abb. 28 auf Seite 76 $L = T$ sein. Um in ein planares DNA-Molekül Superhelizität einzuführen, ist Energie nötig, die aber zum Teil als Spannung im DNA-Molekül gespeichert wird. Mechanistisch gibt es zwei Möglichkeiten, um Superhelizität einzuführen: Es kann ein Strang nach einem Strangbruch schwächer oder stärker um den zweiten Strang gewunden werden, als es bei einer entspannten, sozusagen chemisch idealen Konformation der Fall wäre. Damit verändert man in obiger Gleichung die Verflechtungszahl L und dementsprechend auch die Verdrillungszahl T . Um in einen Zustand idealer Helizität T_{ideal} zurückzukehren, können sich die beiden Stränge nach der Ligation durch Einführung von Superhelizität wieder stärker oder schwächer um die Helixachse winden. Verkleinert man also durch Verminderung der Windungen des einen Stranges um den zweiten Strang um eine Windung die Verflechtungszahl L um eins, so verkleinert sich damit zunächst auch die Verdrillungszahl T um eins (vgl. Abb. 31, Seite 78). Bildet das DNA-Molekül aber eine Superhelix aus, so müsste sich in

unserem Beispiel die Krümmungszahl von Null auf minus eins ändern (negative Superspiralisierung) und damit würde sich T nach obiger Gleichung wieder um eins erhöhen und damit die ideale Helix mit T_{ideal} wiederhergestellt werden. Natürlich könnte der ideale Zustand auch durch eine Veränderung von L wiederhergestellt werden. Dazu müsste aber ein erneuter Strangbruch erfolgen und es würde schlicht erneut der Ausgangszustand mit $L = T = 8$ erreicht.

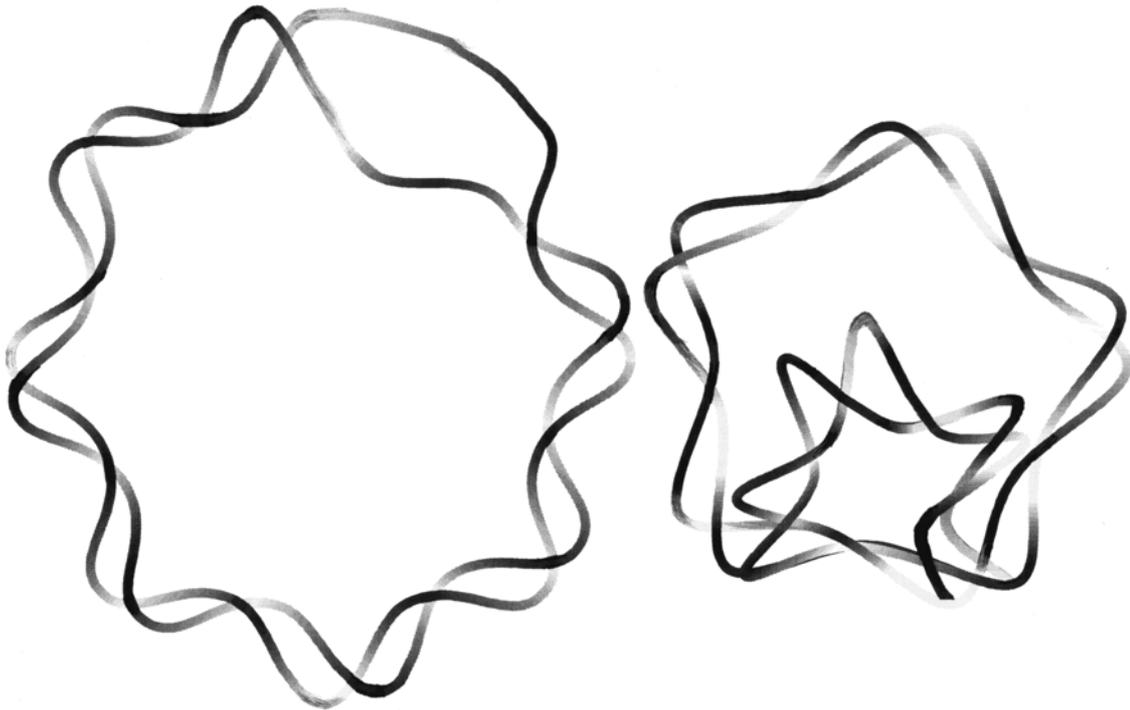


Abb. 31: Beispiel für die Entstehung einer superhelicalen Windung. Das Ausgangsplasmid aus Abb. 28, Seite 76, mit $L = T = 8$ wurde im Plasmid links um eine Windung aufgewunden. Die Beseitigung einer Windung, wobei ein Strangbruch eingeführt und wieder geschlossen werden muss, führt zu $L = T = 7$. Durch eine superhelicale Windung (rechte Seite) mit $W = -1$ wird T wieder 8. L bleibt in einem geschlossenen Molekül dagegen unverändert ($L = 7$).

Die zweite Möglichkeit um Superspiralisierung einzuführen besteht darin, nach einem Strangbruch in das geöffnete Molekül direkt eine superhelicale Windung einzuführen. Dabei ändert sich W wiederum von Null zu minus eins, L wird um eins verringert und T bleibt unverändert.

Für beide Mechanismen gibt es physiologische Beispiele. Das prokaryontische Enzym Topoisomerase II oder Gyrase, führt unter ATP-Verbrauch Doppelstrangbrüche in DNA ein, führt dann den Doppelstrang durch diese Öffnung und verschließt die Strangbrüche wieder. Damit wird die Verflechtungszahl L um

zwei erniedrigt wodurch bei gleichbleibender helicaler Windungszahl T zwei superhelicale Windungen eingeführt werden.

Histone dagegen besitzen die Fähigkeit superspiralisierte DNA-Windungen zu stabilisieren.⁸⁵ Binden Histone DNA, so windet sich die um den Histonkernkomplex, wobei toroidale superhelicale Windungen entstehen.⁸⁵ Geht man dabei von einer DNA mit einem Strangbruch aus, so verringert sich L für jede negativ superhelicale Windung um eins. Nach der Ligation des Strangbruchs kann sich L nicht mehr verändern. Entfernt man nun die Proteine, verbleibt die DNA superspiralisiert, geht allerdings von den Tori um die Histone leicht in eine zopfartige Struktur über.

Für die *in vitro* Untersuchungen der DNA-Sekundärstrukturveränderungen und die DNA-Reparatursynthesetests wurde Plasmid DNA aus Bakterien verwendet, die negativ superspiralisiert ist. Anders ausgedrückt bedeutet diese negative Superspiralisierung, dass die beiden Stränge weniger stark umeinander gewunden sind als es idealer B-DNA entsprechen würde.

In diesem Zusammenhang bedeutet ein Aufdrillen der DNA, dass die Zahl der Windungen um die Helixachse, also die Verdrillungszahl T verringert wird. In einem geschlossenen Molekül kann dies durch eine Verringerung der negativen Superspiralisierung ausgeglichen werden. Die DNA kann sogar soweit aufgedrillt werden, dass die Verdrillungszahl T kleiner wird als die Verflechtungszahl L . Um dem entgegenzuwirken, können in der DNA auch *positive* superhelicale Windungen entstehen. Ein planares Plasmid wird dagegen durch $L = T$ und $W = 0$ definiert. Solche planaren Plasmide entstehen durch Strangbrüche, die dazu führen, dass die Energie, die in einem gespannten, superhelicalen Plasmid enthalten ist, durch Angleichung von L an T frei wird.

Die Untersuchung der DNA-Sekundärstrukturveränderungen bezieht sich im Folgenden auf die Veränderung der geometrischen Eigenschaften [Verdrillung (T), Krümmung (W)] einer ganzen topologischen DNA-Domäne. Eine topologische DNA-Domäne ist eine doppelsträngige DNA-Struktur mit einer konstanten Verflechtungszahl (L). Lokale Veränderungen der DNA-Struktur durch Addukte der Platinkomplexe führen in ihrer Summe zu einer veränderten Geometrie der gesamten Domäne, die beobachtet werden kann.

4.2 Die Solvolyse von Cisplatin in DMSO führt zu verlangsamten Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur

Es ist bekannt, dass die Behandlung von DNA mit Cisplatin [H₂O] (**1**) zu einer DNA-Verkürzung und zu einem Aufdrillen der DNA führt.⁸⁶ Die Verkürzung der DNA kommt dadurch zustande, dass Addukte von Cisplatin (**1**) die DNA-Helix biegen.^{31; 33; 34; 86} Aufgrund der nicht periodischen Anordnung der Addukte ergibt sich keine globale Biegung der DNA, sondern eine statistische Verteilung der Biegungen (Zick-Zack-Muster) und damit eine kompaktere bzw. verkürzte DNA.

Löst man Cisplatin allerdings zuerst in DMSO, so bewirkt die Solvolyse durch den Austausch eines Chlorids mit DMSO,⁸⁷ dass nach einer dreistündigen Behandlung von Plasmid-DNA mit bis zu 100 µM Cisplatin [DMSO] (**1a**), im Gegensatz zu Cisplatin [H₂O] (**1**), fast keine Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur zu beobachten sind.⁸³ Die Solvolyse in DMSO verändert möglicherweise die Reaktivität der Verbindungen. Für die ähnliche Verbindung [Pt(en)Cl₂] zeigt sich, dass die DMSO-Platin-Bindung gegen eine Solvolyse durch Wasser inerte ist als die zu vergleichende Chlorid-Platin-Bindung. Man nimmt an, dass die Solvolysereaktion den Initiationsschritt der DNA-Platinierung darstellt. Bei der Reaktion eines Guanosinmonophosphats bzw. eines dGG-Dinukleotids mit [Pt(en)Cl₂] nach der Solvolyse in DMSO bzw. H₂O wurde für den DMSO-Komplex bei 55 °C eine Verlangsamung der ersten Platinierung um den Faktor 1,5 festgestellt, die Gesamtreaktivität ist sogar um einen Faktor 4 - 5 erniedrigt.⁸⁸ Demnach sollten die DNA-Sekundärstrukturveränderungen bei verlängerter Reaktionszeit für Cisplatin [DMSO] (**1a**) mit denen von Cisplatin [H₂O] (**1**) vergleichbar werden. Um dies zu überprüfen, wurde Plasmid DNA mit Cisplatin gelöst in DMSO (**1a**) bzw. H₂O (**1**) behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Reaktion gestoppt.

Nach Aufreinigung der DNA wurde diese in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 32).

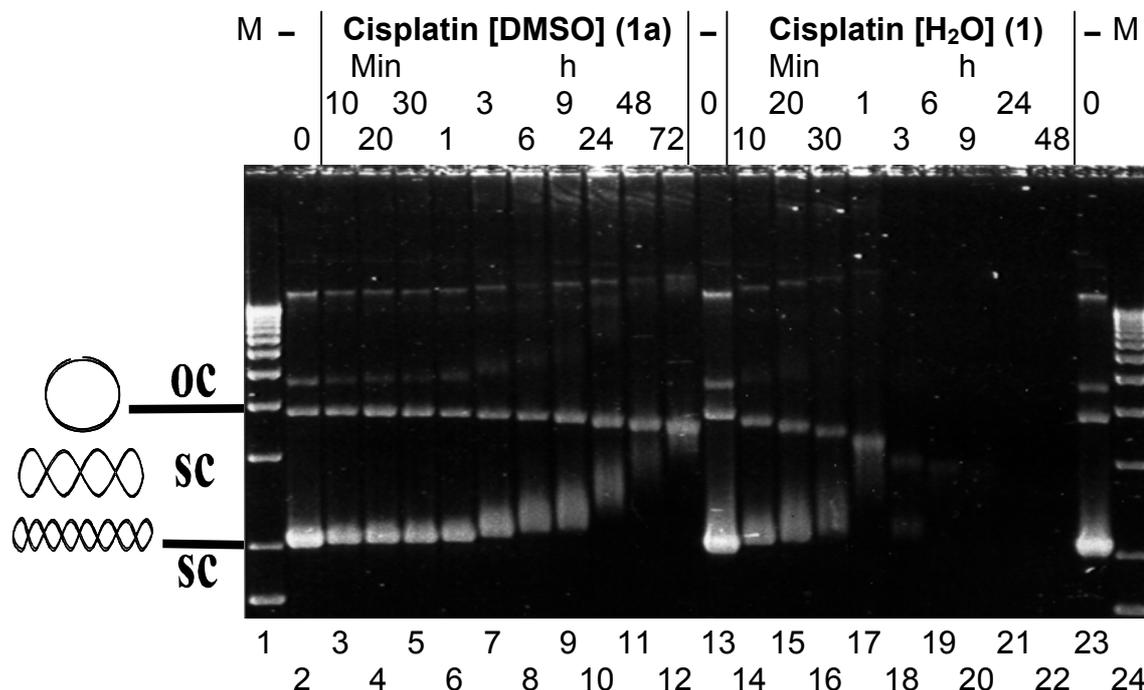


Abb. 32: Agarosegelbild der elektrophoretischen Auftrennung von Plasmid DNA nach einer Platinierungskinetik mit 60 μ M Cisplatin gelöst in DMSO (**1a**) bzw. H₂O (**1**). In den Spuren 1 und 24 ist jeweils ein Längenmarker aufgetragen. Zur Orientierung dient außerdem unbehandeltes Plasmid (Spuren 2, 13 und 23).

Das mit Cisplatin [DMSO] (**1a**) behandelte Plasmid (Spuren 3 - 12) zeigt dieselben DNA-Sekundärstrukturveränderungen wie die Vergleichsprobe mit Cisplatin [H₂O] (**1**) (Spuren 14 - 22). Die Abnahme der Intensität der Banden mit zunehmendem Platinierungsgrad beruht darauf, dass Cisplatin-Addukte Intercalationsstellen blockieren, so dass dort kein Ethidiumbromidmolekül mehr binden kann.⁸⁹

Das entspannte Plasmid mit einem Einzelstrangbruch (oc) wandert durch die Verkürzung schneller. Die Bande des Supercoils (sc) nähert sich dagegen durch die Abnahme der negativen Superspiralisierung als Folge des Aufdrillens zuerst der entspannten Form an, um dann durch Annahme einer *positiven* Superspiralisierung wieder schneller zu laufen. Für Cisplatin [DMSO] (**1a**) ist erst nach ein bis drei Stunden ein verändertes Laufverhalten erkennbar, wohingegen für Cisplatin [H₂O] (**1**) schon nach zehn Minuten eindeutige Unterschiede zum unbehandelten Plasmid auftreten. Der Koaleszenzpunkt, bei dem das ursprünglich superspiralisierte Plasmid soweit aufgewunden ist, dass es zusammen mit den entspannten, offenen Zirkeln läuft, wird bei Cisplatin [H₂O] (**1**)

Cisplatin [H₂O] (**1**). Bereits nach einer einminütigen Reaktion mit Bisamid-bisplatin(II) (**8**) wandert die superhelicale DNA langsamer als nach zehnminütiger Behandlung mit Cisplatin [H₂O] (**1**) (Abb. 32, Seite 81). Interessanterweise wird der Koaleszenzpunkt aber erst nach drei Stunden erreicht, im Gegensatz zu einer Stunde bei Cisplatin [H₂O] (**1**). Dies könnte sich aus dem abweichenden Laufverhalten der offenen Zirkel ergeben. Die Bande des entspannten Plasmids (oc) wandert zunehmend *langsamer* als die Kontrolle. Damit bewegen sich die beiden Populationen (sc und oc) nicht mehr aufeinander zu, sondern sie werden beide durch die Bindung von Bisamid-bisplatin(II) (**8**) verlangsamt. im Vergleich zu den offenen Zirkeln des unplatinierten Kontrollplasmids, dessen Wanderungstrecke einem linearen Längenstandard von ca. 3,5 kB Länge entspricht, verschiebt sich die Wanderungstrecke der offenen Zirkel am Koaleszenzpunkt, an dem die ursprünglich superspiralisierte DNA zusammen mit den offenen Zirkeln wandert, zu einem linearen Längenstandard von ca. 5 kB. Die Verlangsamung der offenen Zirkel nach der Reaktion mit (**8**) könnte also der Grund dafür sein, dass der Koaleszenzpunkt, trotz des starken Aufdrillens der Bisamid-bisplatin(II)-Addukte, später erreicht wird als bei Cisplatin (**1**).

Bisamid-bisplatin(II) (**8**) drillt die DNA stärker auf als Cisplatin [H₂O] (**1**), erzeugt aber keine nicht-periodischen Biegungen, die die DNA verkürzen würden.

4.4 Für die Retardation Bisamid-bisplatin(II) (8**) behandelter, offener Zirkel in der Agarosegelelektrophorese sind positive Ladungen verantwortlich**

Es wurde bisher noch nicht beschrieben, dass Platinaddukte an der DNA eine retardierende Wirkung in der Agarosegelelektrophorese von offenen Zirkeln haben, wie es für Bisamid-bisplatin(II) (**8**) beobachtet wurde (Abb. 33, Seite 82). Für diesen Effekt sind mehrere Erklärungen denkbar. Zum einen führt die Platinierung von DNA durch den Austausch eines Chloridions durch eine neutrale DNA Base zu positiv geladenen Addukten an der DNA. Das heißt, dass die negative Nettoladung der DNA verringert wird. Wenn dieser Effekt stark genug ist und nicht durch andere Effekte wie z.B. eine Verkürzung durch nicht-periodische lokale Biegungen kompensiert wird, so müsste das zu einer Verlangsamung der DNA in der Agarosegelelektrophorese führen. Andererseits ist es auch denkbar, dass die lokalen Biegungen eine gewisse Periodizität aufweisen

und damit zu einer insgesamt gebogenen DNA führen, die in der Agarosegelelektrophorese langsamer wandert als eine entsprechende ungekrümmte DNA.⁹⁰ Weiterhin könnten die Platinaddukte die DNA-Sekundärstruktur so verändern, dass auch eine spannungsfreie DNA weniger kompakt wird und damit im Gel stärker zurückgehalten wird. Dies könnte z.B. der Fall sein, wenn die Platinaddukte die DNA lokal aufschmelzen. In einer zweidimensionalen Gelelektrophorese kann zwischen Ladungseffekten und Veränderungen der DNA-Struktur unterschieden werden.⁹¹ Dabei macht man sich zu Nutze, dass nicht-lineare DNA im Agarosegel nicht nur seiner Länge entsprechend wandert. Die Abweichung nichtlinearer DNA von der Wanderung linearer DNA wird z.B. durch erhöhte Spannung oder Agarosekonzentration verstärkt.⁹² Verwendet man für die zweite Dimension ein Gel mit höherer Agarosekonzentration und legt eine höhere Spannung an als für die erste Dimension, so sollte sich eine Abweichung von der linearen Form der DNA, z.B. in Form von lokal ausgiebig aufgeschmolzenen, aufgewundenen DNA-Bereichen, stärker bemerkbar machen und zu einer Retardation führen. Ladungseffekte dagegen sind von den jeweiligen Laufbedingungen unabhängig. Sie wirken sich in beiden Dimensionen gleich aus und es entsteht kein stärker abweichendes Laufverhalten in der zweiten Laufdimension.

In Abb. 34 ist das Agarosegel nach dem Lauf in der ersten Dimension zu sehen.

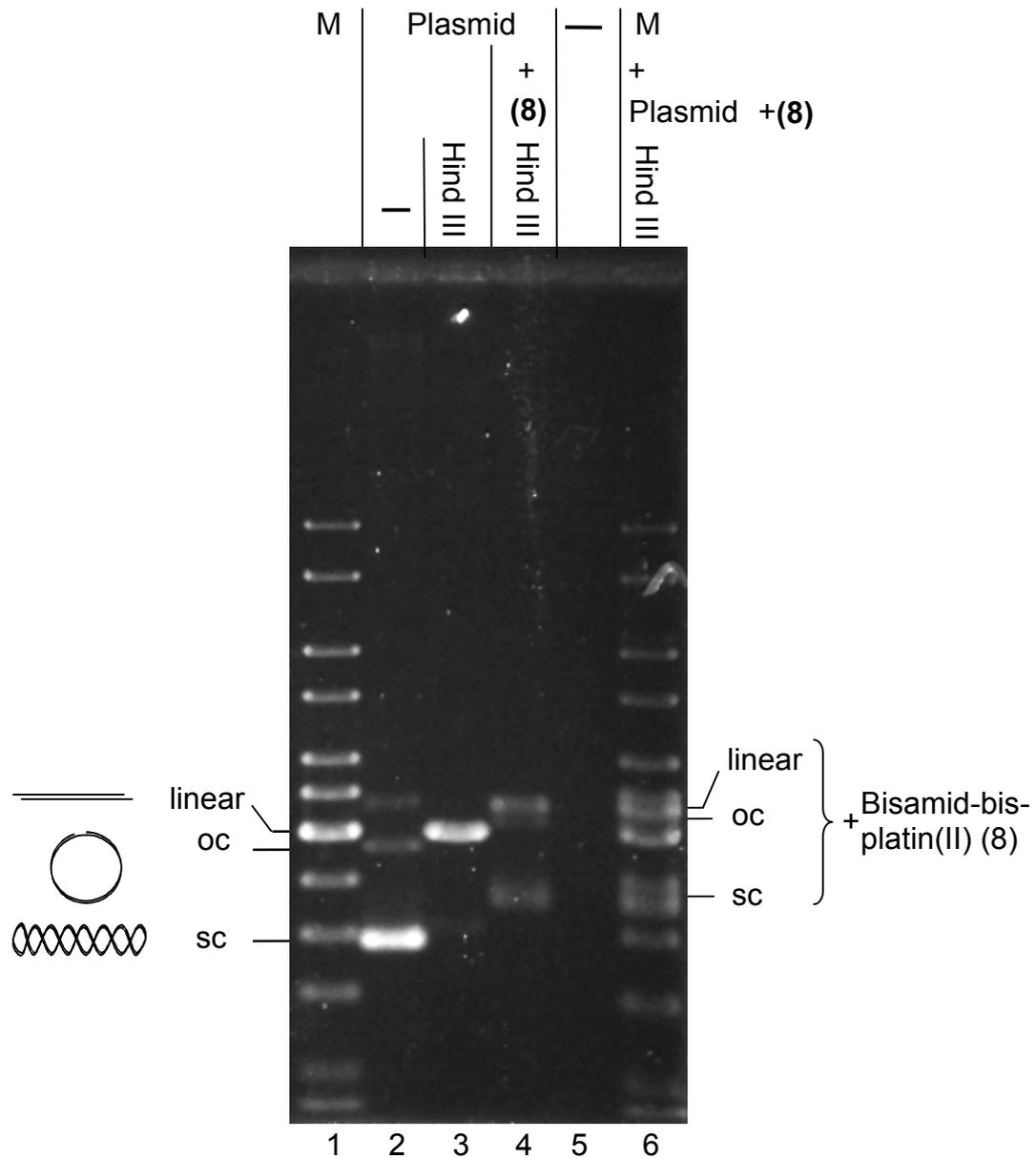


Abb. 34: Agarosegelbild nach dem Lauf in der 1. Dimension: 0,4 % Agarose, $U = 0,45 \text{ V/cm}$, Raumtemperatur. In Spur 1 wurde ein Längenmarker aufgetragen, in Spur 2 ungeschnittenes Plasmid, in Spur 3 dasselbe Plasmid, das mit dem Restriktions-enzym Hind III linearisiert worden ist, in Spur 4 das Plasmid, das für eine Stunde mit $60 \mu\text{M}$ Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelt und dann mit Hind III linearisiert worden ist. Das mit Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelte Plasmid lässt sich nicht mehr vollständig mit dem Restriktionsenzym spalten, da die Schnittstelle teilweise durch Platinaddukte abgeschirmt wird. Deswegen sind neben dem linearen Plasmid, das am weitesten zurückgeblieben ist und den größten Teil der Plasmidmenge ausmacht, noch eine kleine Menge offener Zirkel, die etwas weiter gewandert sind, und noch superspiralisiertes Plasmid zu sehen. Spur 5 blieb frei und in Spur 6 wurde nochmals der Längenmarker zusammen mit dem Plasmid, das für eine Stunde mit $60 \mu\text{M}$ Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelt und dann mit Hind III linearisiert worden ist, aufgetragen.

Es fällt auf, dass die offenen Zirkel des unbehandelten Plasmids sogar etwas weiter gelaufen sind (Spur 2) als das lineare Plasmid (Spur 3). Sowohl die offe-

nen Zirkel, als auch das linearisierte Plasmid wandern in etwa auf der Höhe der 3 kB-Bande des Markers, die überrepräsentiert und aufgrund ihrer größeren Breite gut zu erkennen ist. Das mit Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelte Plasmid lässt sich nicht mehr vollständig mit dem Restriktionsenzym spalten, da die Schnittstelle teilweise durch Platinaddukte abgeschirmt wird. Deswegen sind in Spur 4, neben dem linearen Plasmid, das am weitesten zurückgeblieben ist und den größten Teil der Plasmidmenge ausmacht, noch eine kleine Menge offener Zirkel, die etwas weiter gewandert sind, und noch superspiralisiertes Plasmid zu sehen. Die Banden der mit (**8**) behandelten DNA bleiben allerdings hinter den jeweiligen Banden der Kontroll-DNA in den Spuren 2 und 3 deutlich zurück. Die superhelicale DNA (sc) ist aufgrund des Aufdrillens durch die Platinaddukte weniger kompakt und wandert deswegen langsamer als die unplatinierte Vergleichsbande. Über die Ursache der verringerten Wanderungsgeschwindigkeit der linearen DNA sollte die Gelelektrophorese in der zweiten Dimension Aufschluß geben. Spur 5 ist leer und in der ganz linken Spur (6) wurde der Längenmarker mit dem Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelten, linearisierten Plasmid zusammen aufgetragen. Diese Spur (6) wurde dann ausgeschnitten und in ein neues Gel für die zweite Dimension eingegossen (Abb. 35, Seite 87).

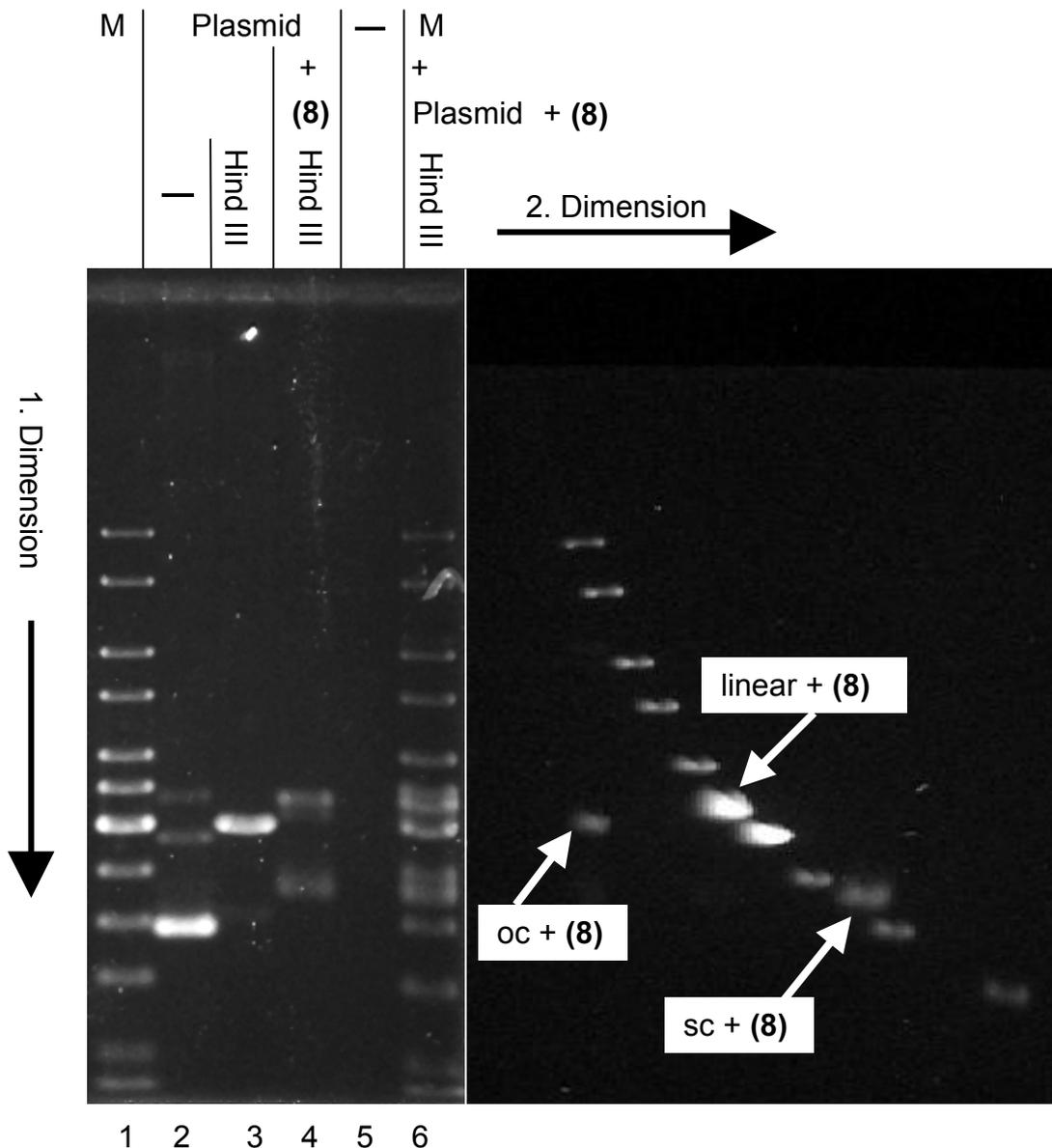


Abb. 35: Links: Agarosegelbild nach dem Lauf in der 1. Dimension: 0,4 % Agarose, $U = 0,45$ v/cm, Raumtemperatur. Rechts: Agarosegelbild nach dem Lauf der Spur 6 in beide Dimensionen (2. Dimension: 1,2 % Agarose, $U = 5$ V/cm, 4°C , $0,3 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid).

Der Längenmarker, der aus linearen DNA-Fragmenten besteht, dient in der zweiten Dimension als Maßstab für das Laufverhalten linearer DNA. Idealerweise bilden die Markerbanden nach beiden Läufen eine Diagonale. Die offenen Zirkel [oc + (8)], die in der ersten Dimension ihrer Masse und Form entsprechend gelaufen sind, wurden in der zweiten Dimension aufgrund der veränderten Laufbedingungen stärker zurückgehalten und weichen damit deutlich von der Diagonallinie ab. Aufgrund des starken Einflusses der zirkulären Struktur kann allerdings keine Aussage über eventuelle weitere Sekundärstrukturveränderungen, wie aufgeschmolzene, aufgewundene DNA-Bereiche, abgeleitet wer-

den. Die Population der linearen Plasmide ist nach wie vor deutlich als helle Bande bei ca. 3,5 kB auf der gedachten Linie durch die Markerbanden zu sehen [linear + **(8)**]. Für die Retardation des platiniierten linearen Plasmids in der ersten Dimension der Agarosegelelektrophorese können also keine sterischen Effekte verantwortlich sein, da die sterischen Effekte sich in der zweiten Dimension ausgewirkt hätten. In Analogie dazu läßt sich schließen, dass für die Retardation der mit **(8)** behandelten offenen Zirkel [oc + **(8)**], die ebenfalls torsionsspannungsfrei wie die lineare DNA sind, auch keine sterischen Effekte verantwortlich sind. Die superspiralisierten Plasmide weichen nur leicht von der Diagonalen ab. Sie sind in der zweiten Dimension etwas schneller. Die hohe Konzentration von Ethidiumbromid während des Laufs in der zweiten Dimension führt dazu, dass die Plasmide durch Ethidiumbromidinterkalation positiv superspiralisiert sind und etwas schneller wandern als die entsprechenden negativ superspiralisierten Plasmide während des Laufs in der ersten Dimension.

In der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurde durch Analogie gezeigt, dass das langsamere Laufverhalten der DNA nach Behandlung mit Bisamid-bisplatin(II) **(8)** nicht aufgrund sterischer Effekte, sondern wegen der zusätzlichen positiven Ladungen auftritt.

Selbstverständlich führt die Reaktion mit allen Platinkomplexen zu *positiv* geladenen Komplexen an der DNA. Der Einfluß dieser positiven Ladungen auf das Laufverhalten in der Agarosegelelektrophorese wird allerdings durch die Verkürzung der DNA anscheinend überkompensiert. Die viel entscheidendere Aussage ist also, dass die Addukte der Verbindung Bisamid-bisplatin(II) **(8)** weder die DNA biegen und damit auch keine Verkürzung erzeugen, noch *ausgedehnte* Einzelstrangbereiche durch lokales Aufschmelzen der DNA erzwingen.

4.5 Die Platin(IV)-Verbindungen (9), (10) verursachen Einzelstrangbrüche

Um herauszufinden, ob die Oxidationszahl des zentralen Platinatoms die Reaktion mit DNA beeinflusst und damit zu anderen Veränderungen der Sekundärstruktur führt, wurde Plasmid DNA mit der oxidierten Form von (8), Bisamid-bisplatin(IV) (9), bzw. der analogen Verbindung (10) mit nur einer Platinsphäre behandelt, gereinigt und in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

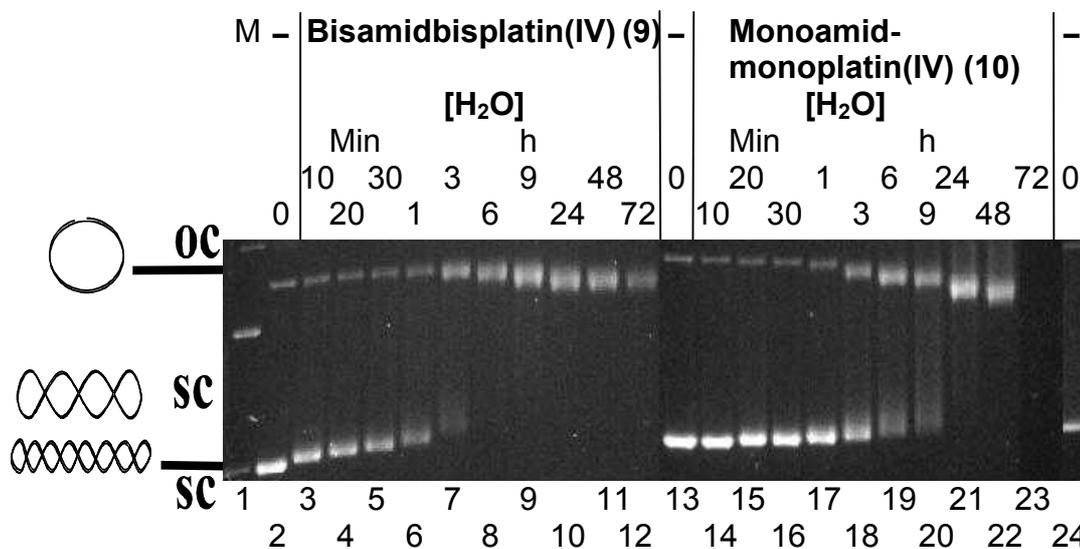


Abb. 36: Agarosegelbild der elektrophoretischen Auftrennung von Plasmid DNA nach einer Platinierungskinetik mit 60 μ M Bisamid-bisplatin(IV) (9) (links) bzw. Monoamid-monoplatin(IV) (10) (rechts) gelöst in H₂O.

Man sieht in Abb. 36, dass beide Verbindungen (9), (10) die superspiralisierte DNA aufdrillen und deswegen diese Banden langsamer wandern als in der Kontrolle. Daneben tritt auch wieder eine Beschleunigung der offenen Zirkel durch Biegungen in der DNA, die die DNA verkürzen, auf. Diese Sekundärstrukturveränderungen sind allerdings wesentlich schwächer ausgeprägt als bei Cisplatin [H₂O] (1). Zusätzlich nimmt die Population der geschlossenen, superspiralisierten Zirkel (sc) ab und die der offenen (oc) dafür zu. Dies ist bei Bisamid-bisplatin(IV) (9) deutlich in den Spuren 6 - 9 zu sehen und noch klarer für Monoamid-monoplatin(IV) (10) in den Spuren 17 - 21. Bei beiden Verbindungen wird kein Koaleszenzpunkt erreicht. Der sprunghafte Übergang kann nicht durch Aufdrillen erklärt werden. Dieses Phänomen kann damit erklärt werden, dass die Platin(IV)-Verbindungen (9), (10) DNA-

Einzelstrangbrüche verursachen, so dass aus den geschlossenen Zirkeln entspannte Moleküle (oc) mit mindestens einem Strangbruch entstehen. Unter anderen Bedingungen wurde sogar linearisierte DNA beobachtet, die vermutlich durch zwei in unmittelbarer Nähe liegende Einzelstrangbrüche in beiden DNA Strängen, die zu einem Doppelstrangbruch führen, entsteht (Daten nicht gezeigt).

Sowohl das Aufdrillen der DNA als auch die Einführung von Biegungen durch Bisamid-bisplatin(IV) (**9**) und Monoamid-monoplatin(IV) (**10**) ist schwächer als durch Cisplatin [H₂O] (**1**), aber die Platin(IV)-Verbindungen erzeugen zusätzlich DNA-Einzelstrangbrüche.

4.6 Der Grad des Aufdrillens ist direkt proportional zur Länge der verbindenden Alkylkette in den Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexen (11), (12), (13) und (14).

Bei den Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexen [(**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] sollte untersucht werden, welchen Einfluß der maximale Abstand der beiden Platinsphäre auf die Veränderung der DNA-Sekundärstruktur hat. Dieser maximale Abstand wird für diese Komplexe durch die Länge der verbindenden Alkylkette festgelegt. Der tatsächliche Abstand kann aufgrund der Flexibilität dieser Alkylkette jedoch auch kleiner sein. Es wurde Plasmid DNA mit Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexen [(**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] behandelt, gereinigt und in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 37, Seite 91).

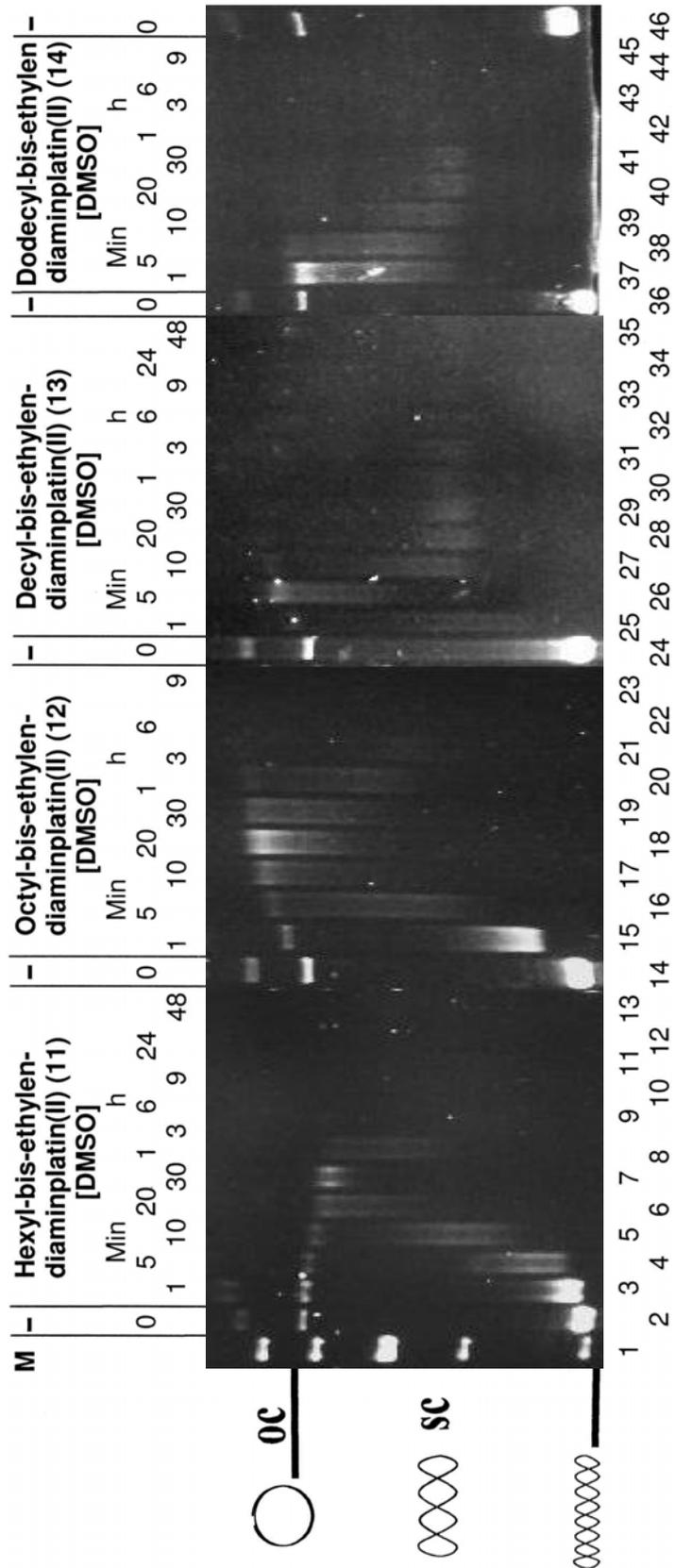


Abb. 37: Agarosegelbild der elektrophoretischen Auftrennung von Plasmid DNA nach einer Platinierungskinetik mit 60 μ M der Alkyl-bis-ethylen-diaminplatin(II)-Komplexe [(11), (12), (13) und (14)] (von links nach rechts) gelöst in DMSO. In Spur 1 ganz links wurde ein Längenmarker aufgetragen und in den Spuren 2, 14, 24 und 36 jeweils unbehandeltes Kontrollplasmid.

Für die Verbindung Hexyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**11**), die mit sechs Kohlenstoffatomen den kürzesten Abstand aufweist, wird in dem Agarosegel in Abb. 37 auf Seite 91 sowohl Aufdrillen als auch Verkürzung der DNA beobachtet. Dabei wird die DNA stärker aufgewunden als von Cisplatin [H₂O] (**1**), aber weniger stark gebogen. Der Koaleszenzpunkt wird schon nach einer halben Stunde erreicht im Gegensatz zu einer Stunde bei Cisplatin [H₂O] (**1**). Mit zunehmender Länge der Alkylkette wird die DNA stärker aufgewunden. So verkürzt sich die Zeit bis zum Erreichen des Koaleszenzpunktes von 30 Minuten bei Hexyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**11**) über zehn bis 20 Minuten bei Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**12**) und fünf Minuten bei Decyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**13**) bis zu einer Minute bei Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**14**). Eine Verkürzung der DNA durch Biegungen lässt sich nur bei der kürzesten Alkylkette in (**11**) feststellen. Schon eine Verlängerung um zwei Kohlenstoffatome in Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**12**) führt zu keiner Verkürzung mehr. Hier ist wie bei Bisamid-bisplatin(II) (**8**) in Kapitel 4.3, Seite 82, eine Retardation durch positive Ladungen zu beobachten. Dasselbe gilt für Decyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**13**), wohingegen für Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**14**) keine Aussage möglich ist, da der höchste Punkt bereits nach einer Minute erreicht ist. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Bande bereits *positiv* superspiralisiert ist, also nicht der langsamsten Form der offenen Zirkel entspricht. Letztere könnten also durchaus langsamer sein, als das unbehandelte Plasmid. Dafür spricht auch, dass bei den DNA-Proteinquervernetzungsversuchen in Kapitel 7.4, Seite 142, ein *lineares* DNA-Fragment durch die positiv geladenen Addukte umso stärker abgebremst wird, je länger die verbindende Alkylkette ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verstärkte Retardation auch ein kombinierter Effekt von Aufdrillen und positiv geladenen Addukten ist, die auch superspiralisierte DNA verlangsamen sollten. Da jedoch jede *cis*-Platinsphäre, die an DNA bindet, gleichermaßen eine positive Ladung an der DNA erzeugt, sollte der Einfluß der positiven Ladungen auf die superhelicalen Plasmide für alle Verbindungen gleich und damit vernachlässigbar sein.

Insgesamt führt also ein zunehmender Abstand der beiden Platinsphäre zu stärkerem Aufdrillen und zu weniger Biegungen in der DNA, wodurch sich die positiven Ladungen der Addukte in der Gelelektrophorese bemerkbar machen.

4.7 Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) weist ein geringeres Aufwindungspotential auf als die analogen Bisplatinverbindungen (11), (12), (13) und (14).

Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) dient hier wieder als Vergleichssubstanz. Sie weist zwar eine ähnliche Struktur auf wie die analogen Bisplatinverbindungen [(11), (12), (13) und (14)], hat aber keine zweite Platinsphäre. Durch den Vergleich soll abgeschätzt werden, welchen Einfluß die Alkylkette allein und welchen die Kopplung zweier Platinsphären auf die DNA-Sekundärstrukturveränderungen hat (Abb. 38).

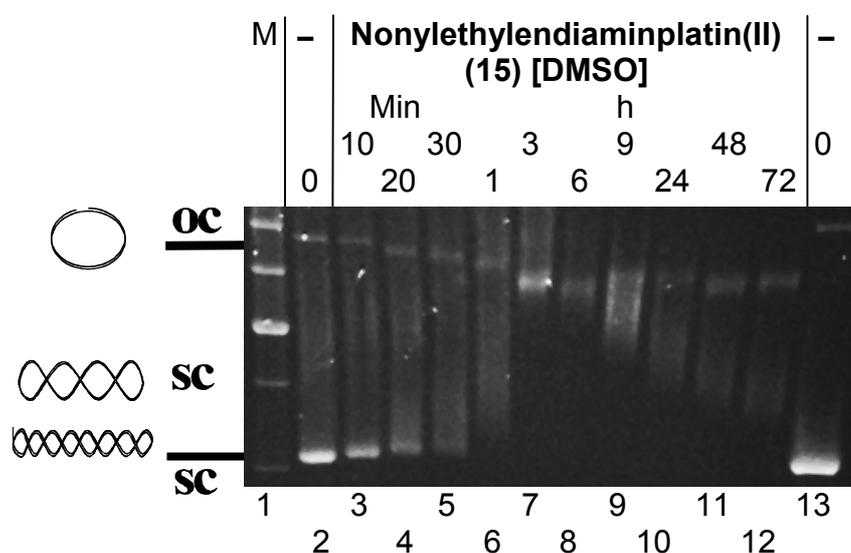


Abb. 38: Agarosegelbild der elektrophoretischen Auftrennung von Plasmid DNA nach einer Platinierungskinetik mit 60 µM Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) gelöst in DMSO. Zur Orientierung wurde in Spur 1 wurde ein Längenmarker und in den Spuren 2 und 13 unbehandeltes Plasmid aufgetragen.

Im Vergleich zu den Bisplatinverbindungen [(11), (12), (13) und (14)] drillt Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) die DNA weniger auf. Der Koaleszenzpunkt wird erst nach drei Stunden erreicht. Andererseits erzeugt (15) eine deutlichere Verkürzung als die Verbindung Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (12), die ja als einzige der Alkyl-bis-ethylendiaminplatinverbindungen überhaupt diesen Effekt zeigte. Damit drillt Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) die DNA weniger auf, führt aber zu mehr Biegungen und damit zu einer stärkeren Verkürzung, als die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen [(11), (12), (13) und (14)]. Das heißt, dass das Aufdrillen durch die Kopplung der Platinsphären verstärkt wird, wohingegen Biegungen durch Addukte innerhalb einer Platinsphäre verursacht werden.

4.8 Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) führt zu den geringsten DNA Sekundärstrukturveränderungen.

Die am stärksten cytotoxischen Verbindungen Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) sollte sich gut dafür eignen, festzustellen, ob es Korrelationen zwischen Cytotoxizität und DNA-Sekundärstrukturveränderungen gibt (Abb. 39).

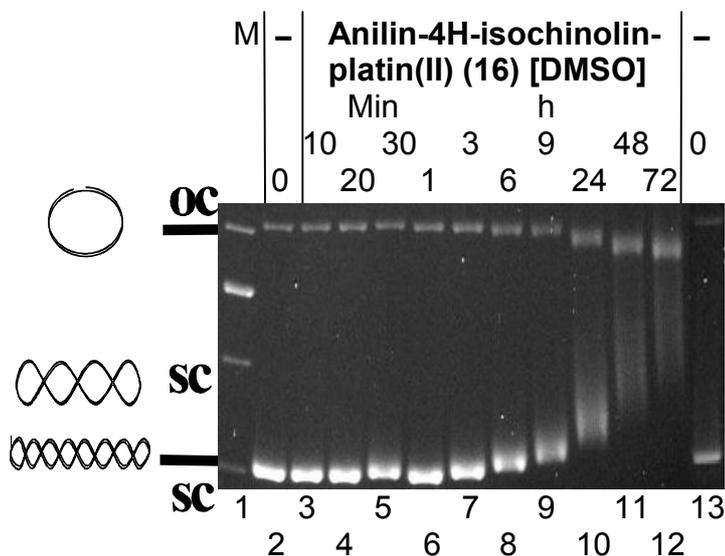


Abb. 39: Agarosegelbild der elektrophoretischen Auftrennung von Plasmid DNA nach einer Platinierungskinetik mit 60 μ M Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) gelöst in DMSO. Zum Vergleich ist in Spur 1 ein Längenmarker und in Spuren 2 und 13 ein unbehandeltes Kontrollplasmid aufgetragen.

Unverkennbar weist Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) die langsamste Kinetik von allen hier untersuchten Verbindungen auf. Erst nach sechs Stunden sind leichte Veränderungen zu beobachten. Allerdings tritt sowohl Aufdrillen als auch Verkürzung durch Biegungen auf. Der Koaleszenzpunkt wird selbst nach 72 Stunden nicht erreicht. Die Kinetik der DNA-Sekundärstrukturveränderungen weist hier Ähnlichkeit mit den Kinetik der von Cisplatin [DMSO] (**1a**) hervorgerufenen DNA-Sekundärstrukturveränderungen auf (Kapitel 4.2, Seite 80, Abb. 32). Möglicherweise beeinflussen die Aminliganden die Kinetik der DNA-Sekundärstrukturveränderungen weniger als der Austausch eines Chlorids durch DMSO bei der Solvolyse oder die Oxidation des zentralen Platinatoms zu Platin(IV). Demzufolge würden die Nichtabgangsgruppen nur einen geringen Einfluß auf die Kinetik der DNA-Sekundärstrukturveränderungen ausüben. Für die untersuchten Bisplatinverbindungen gilt dies jedoch sicherlich nicht, da bei diesen sowohl eine Verstärkung des Aufdrillens als auch eine geringer

werdende Verkürzung durch Biegung der DNA mit zunehmender Länge der verknüpfenden Alkylkette festgestellt wurden.

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen der DNA-Strukturveränderungen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Verbindung [Lösungsmittel]	DNA-Strukturveränderungen			
	Aufdrillen	Biegung	Strangbrüche	Koaleszenzpunkt
Dodecyl-bis-ethylendi-amin-platin(II) (14) [DMSO]	++++	-	-	< 1 Min
Decyl-bis-ethylendi-amin-platin(II) (13) [DMSO]	++++	-	-	5 Min
Octyl-bis-ethylendi-amin-platin(II) (12) [DMSO]	+++	-	-	10 Min
Hexyl-bis-ethylendi-amin-platin(II) (11) [DMSO]	+++	+++	-	30 Min
Cisplatin (1) [H ₂ O]	+++	+++	-	1 h
Bisamid-bisplatin(II) (8) [DMSO]	++	-	-	3 h
Nonylethyl-endiamin-platin(II) (15) [DMSO]	++	+++	-	3 h
Bisamid-bisplatin(IV) (9) [H ₂ O]	+	+	++	n. d.
Monoamid-mono-platin(IV) (10) [H ₂ O]	+	++	+	n. d.
Cisplatin (1a) [DMSO]	+	+	-	72 h
Anilin-4H-isochinolin-platin(II) (16) [DMSO]	+	+	-	>72 h

Tabelle 5: Übersicht über die Änderungen der DNA-Struktur durch die Reaktion mit den Platin-Komplexen. Die Komplexe wurden in etwa nach abnehmender Geschwindigkeit des Aufdrillens geordnet.

Insgesamt konnten wir vier verschiedene Effekte beobachten, die das Laufverhalten der DNA in der Agarosegelelektrophorese beeinflussen: Das Aufdrillen der DNA vermindert die Superhelizität und verringert damit die Kompaktheit der DNA. Dies führt bei der Elektrophorese zu einer Retardation. Als Zweites können bestimmte Platinaddukte die DNA biegen. Die Summe mehrerer, nicht-periodischer Biegungen führt zu einer scheinbaren Verkürzung der DNA, die damit kompakter wird und schneller durch das Gel wandert. Tritt dieser Effekt nicht auf, so führen die positiven Ladungen der Platinaddukte, die die negative Nettoladung der DNA vermindern, zu einer geringeren Beschleunigung im elekt-

rischen Feld. Als Folge davon wandert eine entspannte DNA langsamer. Als Letztes verursachen Platin(IV)-Verbindungen DNA-Einzelstrangbrüche. Wenngleich keine der beobachteten Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur eindeutig für die Cytotoxizität verantwortlich gemacht werden kann, so konnte ein geringeres Potential, die DNA aufzudrillen, am besten mit der Cytotoxizität der entsprechenden Komplexe in Verbindung gebracht werden.

5 Die intermolekulare Verknüpfung der DNA-Stränge einer Helix durch Platinaddukte korreliert nicht mit der Cytotoxizität der Komplexe.

Es liegt nahe, anzunehmen, dass eine Quervernetzung der beiden komplementären DNA Stränge über koordinative Bindungen der Platinaddukte zelluläre Prozesse wie die Transkription und insbesondere die Replikation stört, da eine Trennung der beiden Stränge nicht mehr möglich ist. Da es zudem Arbeiten von anderen Autoren gibt, die Interstrangverknüpfungen für die Cytotoxizität der Komplexe verantwortlich machen,⁹³ wurde untersucht, inwieweit die uns zur Verfügung stehenden Komplexe die Fähigkeit besitzen, solche DNA-Interstrangverknüpfungen auszubilden. Die Interstrangverknüpfungen der verschiedenen Komplexe wurden folgendermaßen bestimmt: Linearisierte Plasmid DNA wurde radioaktiv endmarkiert und mit verschiedenen Konzentrationen der Komplexe behandelt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde die DNA gereinigt und in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die DNA mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Unbehandelte DNA bzw. DNA, deren Stränge nicht koordinativ miteinander verknüpft sind, wandert im denaturierenden Gel als Einzelstränge. Interstrangverknüpfungen führen dazu, dass die DNA-Stränge sich nicht trennen können, und die vernetzte DNA deswegen stärker retardiert wird. Somit müssen die langsameren DNA-Moleküle mindestens eine Interstrangverknüpfung tragen. DNA-Moleküle mit Mono- oder Intrastrangaddukten werden unter diesen Bedingungen dagegen nicht von DNA ohne Platinaddukte getrennt. DNA ohne Interstrangverknüpfungen wird im Folgenden mit „freie“ DNA bezeichnet.

5.1 Die Solvolyse von Cisplatin in DMSO reduziert die Zahl der Interstrangverknüpfungen.

Zuerst wurde untersucht, wie die Solvolyse in DMSO die Fähigkeit von Cisplatin, zwei komplementäre DNA-Stränge koordinativ zu verknüpfen verändert (Abb. 40).

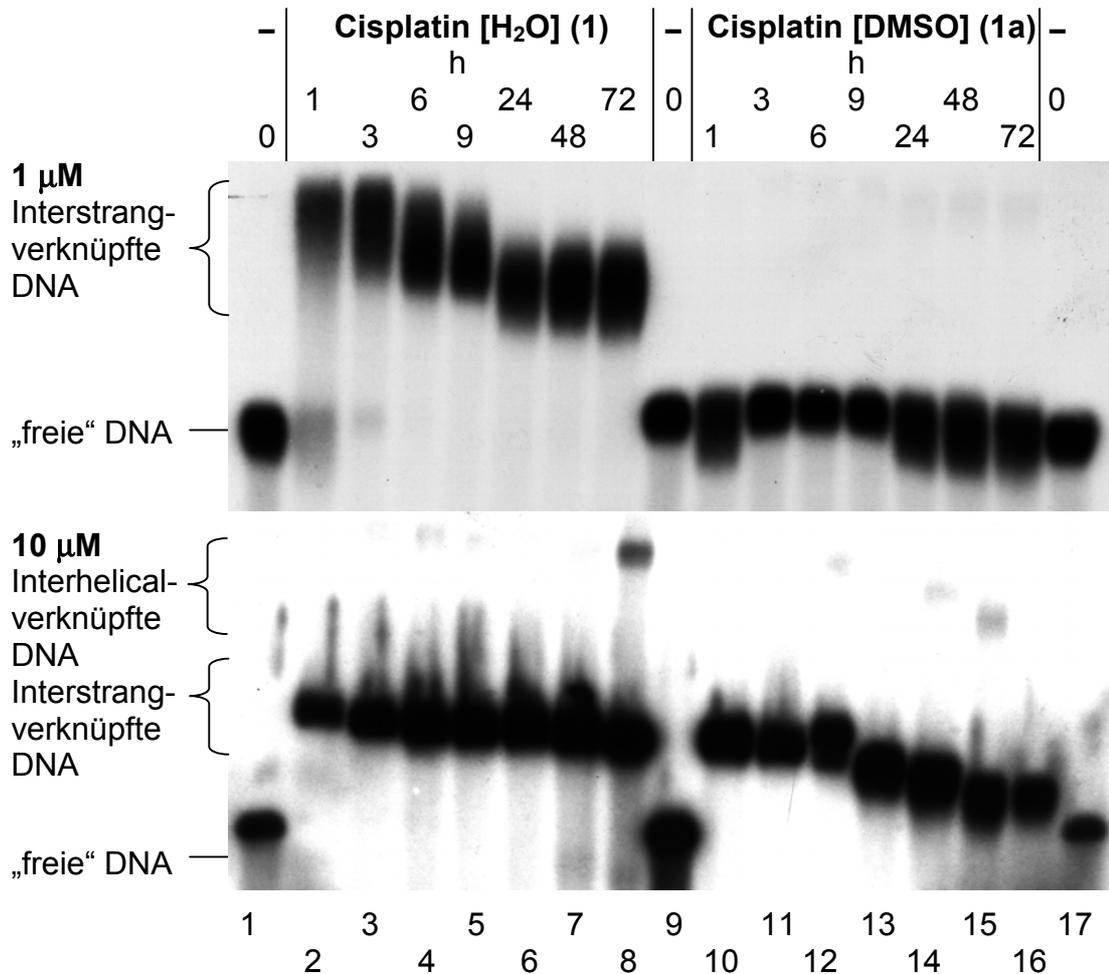


Abb. 40: Autoradiographie des denaturierenden Agarosegels im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung von linearisierter, radioaktiv markierter Plasmid DNA nach einer Platinierungskinetik zwischen 1 h und 72 h mit 1 µM (oben) bzw. 10 µM (unten) Cisplatin gelöst in H₂O (1) (links) bzw. DMSO (1a) (rechts).

Cisplatin [H₂O] (1) verknüpft bei einer Konzentration von 1 µM bereits nach einer Stunde einen Großteil der DNA-Stränge (Spur 2), nach sechs Stunden (Spur 4) sind keine DNA-Moleküle mehr vorhanden, die nicht mindestens eine Interstrangverknüpfung aufweisen. Nach der Solvolyse in DMSO hingegen sind bei derselben Konzentration auch nach längerer Inkubationszeit kaum Interstrangverknüpfungen erkennbar.

Erhöht man die Konzentration auf 10 μM , so weist sowohl bei der Behandlung mit Cisplatin [H_2O] (**1**) als auch mit Cisplatin [DMSO] (**1a**), jedes DNA Molekül bereits nach einer Stunde mindestens eine Interstrangverknüpfung auf. Man beobachtet hier auch noch eine weitere, noch langsamere Bande. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um interhelical verknüpfte doppelsträngige DNA Helices. Verkürzt man jedoch die Reaktionszeit, so wird der Unterschied der beiden Cisplatinpräparationen wieder sichtbar (Abb. 41). Während für Cisplatin [H_2O] (**1**) bereits nach fünf Minuten keine „freie“ DNA mehr vorhanden ist, dauert dies für Cisplatin [DMSO] (**1a**) 30 Minuten.

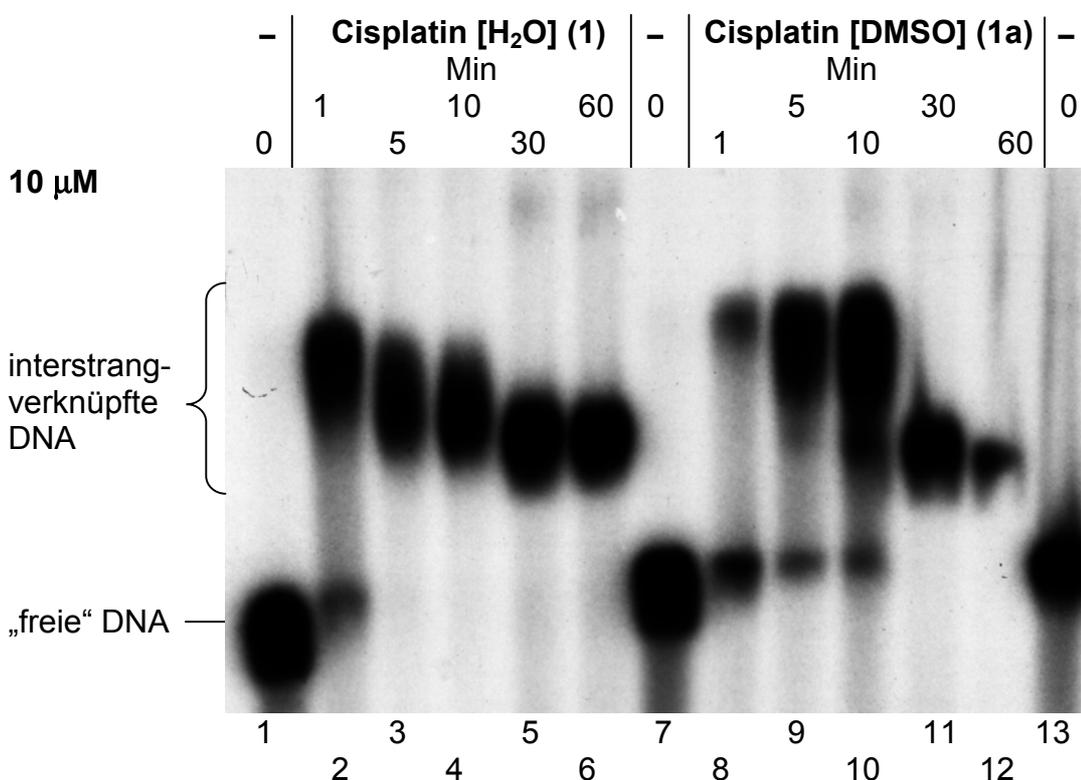


Abb. 41: Autoradiographie des denaturierenden Agarosegels im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung von linearisierter, radioaktiv markierter Plasmid DNA nach einer Platinierungskinetik zwischen einer Minute und 60 Minuten mit 10 μM Cisplatin gelöst in H_2O (**1**) (links) bzw. DMSO (**1a**) (rechts).

Bei allen hier gezeigten Experimenten wird bei einer Erhöhung des Platinierungsgrades eine beschleunigte Wanderung der interstrangverknüpften DNA-Moleküle beobachtet. Dies ist konsistent mit der Annahme von mehreren Interstrangverknüpfungen. Wird die DNA an mehreren Stellen zusammengehalten, entstehen Quasidoppelstrangbereiche und die DNA ist kompakter als eine DNA die nur an einer Stelle zusammengehalten wird. Damit wandern DNA-Moleküle mit mehreren Interstrangverknüpfungen in der Agarosegelelektrophorese

schneller, erreichen jedoch unter den verwendeten Bedingungen nie die Mobilität der „freien“ DNA.

Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass die Solvolyse in DMSO die Ausbildung von koordinativen Interstrangverknüpfungen durch Cisplatin **(1)** verlangsamt.

5.2 Bisamid-bisplatin(II) (8) erzeugt mehr Interstrangverknüpfungen als Cisplatin [H₂O] (1).

Bisplatinverbindungen weisen ein breiteres Spektrum an möglichen DNA-Addukten auf, und es sollte untersucht werden, ob dies die Zahl der Interstrangverknüpfungen erhöht. Die Autoradiographie des Agarosegels ist in Abb. 42 abgebildet. Schon bei einer Konzentration von 1 μ M wurde bereits nach einer Minute keine DNA mehr ohne mindestens eine Strangverknüpfung gefunden. Bei 10 μ M waren die DNA-Moleküle so stark quervernetzt, dass sie nicht mehr in das Agarosegel gelangen konnte und in den Auftragstaschen blieben.

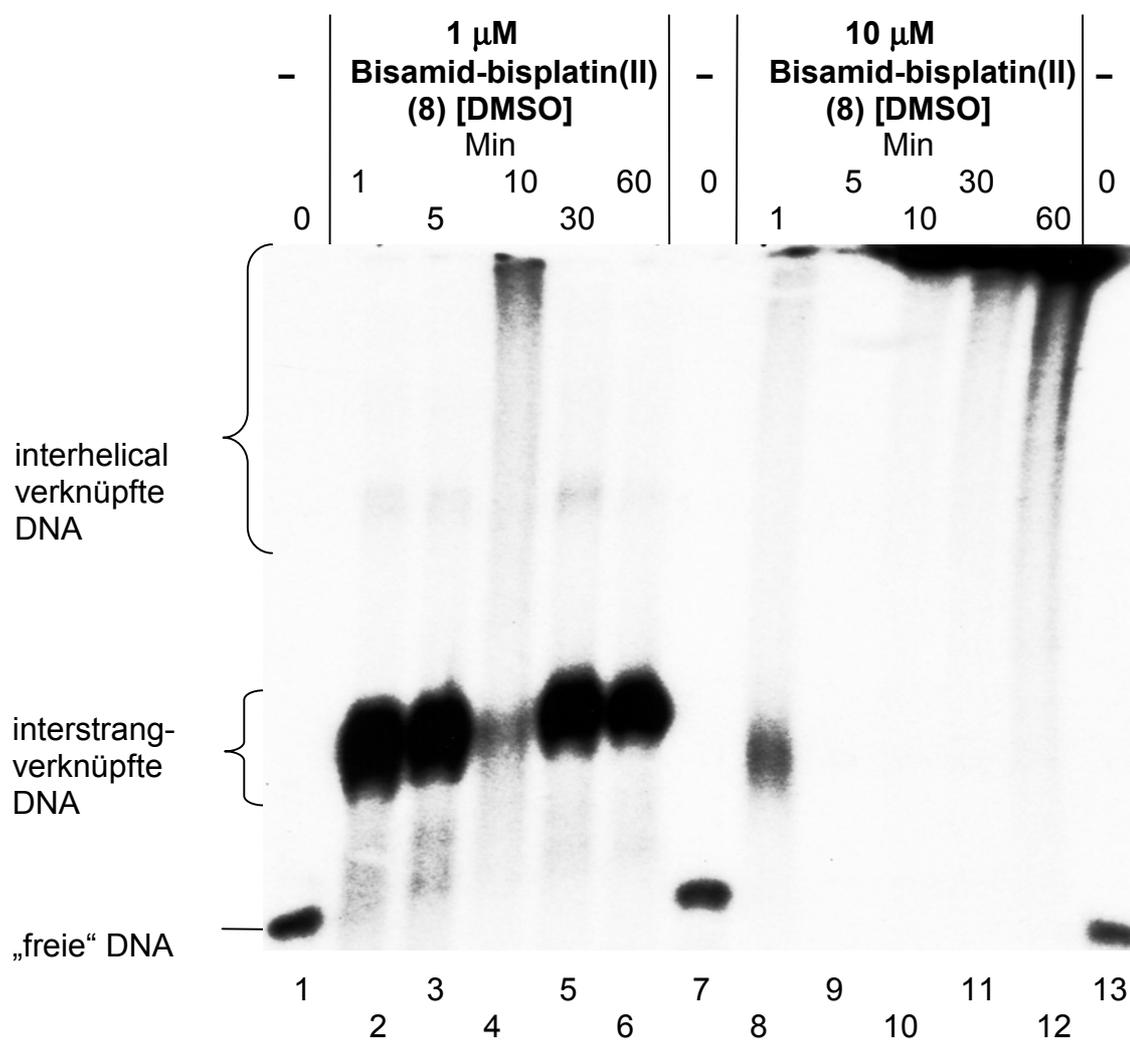


Abb. 42: Autoradiographie des denaturierenden Agarosegels im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung von linearisierter, radioaktiv markierter Plasmid DNA nach einer Platinierungskinetik zwischen 1 Min. und 1 h mit 1 μ M (links) bzw. 10 μ M (rechts) Bisamid-bisplatin(II) (8) gelöst in DMSO.

Damit wurde gezeigt, dass trotz der Solvolyse in DMSO Bisamid-bisplatin(II) (**8**) mehr Interstrangverknüpfungen und mehr interhelicale Vernetzungen erzeugt als Cisplatin [H₂O] (**1**).

5.3 Bisamid-bisplatin(IV) (**9**) bildet mehr Interstrangverknüpfungen aus als die analoge mononukleare Verbindung (**10**).

Mit den analogen Platin(IV)-Verbindungen (**9**) (zweikernig) und (**10**) (einkernig) sollte zuerst untersucht werden, ob die wegen ihrer oktaedrischen Koordination sterisch anspruchsvolleren Platin(IV)-Komplexe in der Lage sind, zwei DNA-Stränge einer Helix miteinander zu verknüpfen. Gegebenenfalls kann für diese Komplexe (**9**) und (**10**) der Einfluß der Koppelung zweier Platinsphären über einen gemeinsamen Liganden auf die Ausbildung von Interstrangverknüpfungen verfolgt werden. Die Autoradiographie des Agarosegels in Abb. 43 zeigt, dass die mononukleare Verbindung Monoamid-monoplatin(IV) (**10**) bereits nach einer Stunde erste Interstrangverknüpfungen ausbildet (Spur 2).

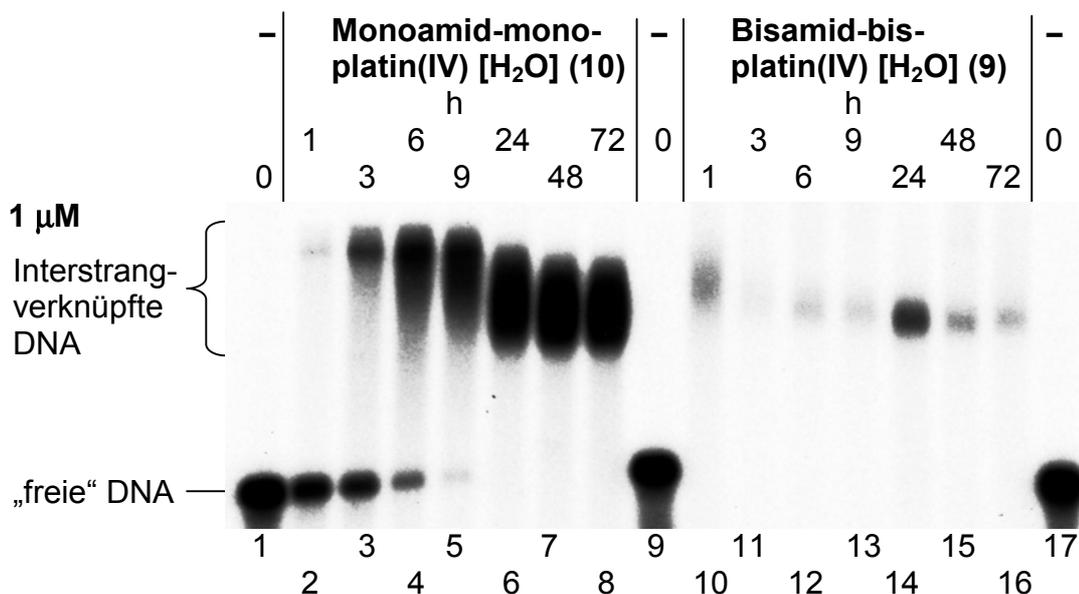


Abb. 43: Autoradiographie des denaturierenden Agarosegels im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung von linearisierter, radioaktiv markierter Plasmid DNA nach einer Platinierungskinetik zwischen 1 h. und 72 h mit 1 µM der Platin(IV)-Verbindungen Monoamid-monoplatin(IV) (**10**) (links) bzw. Bisamid-bisplatin(IV) (**9**) (rechts) gelöst in H₂O.

Je länger die Reaktion andauert, umso mehr solcher Verknüpfungen entstehen und die Menge der „freien“ DNA nimmt ab. Nach 24 Stunden gibt es keine DNA-Moleküle mehr, die nicht wenigstens eine Interstrangverknüpfung tragen (Spur 6). Dies ist für die Bisplatinverbindung (**9**) bereits nach einer Stunde der

Fall. Demzufolge führt die Koppelung zweier Platinsphären über einen gemeinsamen Liganden auch für Platin(IV)-Verbindungen zu einer vermehrten Ausbildung von Interstrangverknüpfungen.

Monoamid-monoplatin(IV) **(10)** bildet Interstrangverknüpfungen nur unwesentlich langsamer als Cisplatin [H₂O] **(1)**. Wie in Kapitel 4.5 auf Seite 89 beschrieben, veränderte Cisplatin [H₂O] **(1)** hingegen die DNA-Sekundärstruktur wesentlich schneller als Monoamid-monoplatin(IV) **(10)**. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die oktaedrische Anordnung der Liganden bei Komplexen mit Platin(IV) als Zentralatom die Ausbildung von Interstrangverknüpfungen sterisch weniger behindert als die Ausbildung von Addukten innerhalb eines DNA-Stranges. Das heißt, dass die Ausbildung von Intrastrangaddukten der Platin(IV)-Verbindungen, eventuell aufgrund der größeren räumlichen Ausdehnung der Platin(IV)-Komplexe oder sterischer Hinderungen, langsamer ist als bei Cisplatin **(1)** und dadurch sich auch die DNA-Sekundärstruktur langsamer verändert, wohingegen Interstrangverknüpfungen in etwa gleich schnell ausgebildet werden, also hier offenbar keine sterischen Hinderungen auftreten.

5.4 Die Fähigkeit Interstrangverknüpfungen auszubilden nimmt mit der Länge der verbindenden Alkylkette in den Alkyl-bis-ethylen-diaminplatin(II)-Verbindungen (11), (12), (13) und (14) zu.

Je länger die verbindenden Alkylkette in den Alkyl-bis-ethylen-diaminplatin(II)-Komplexen [(11), (12), (13) und (14)] ist, umso größer ist der Aktionsradius der zweiten Platinsphären, nachdem sich ein Monoaddukt an DNA ausgebildet hat. Dadurch könnte auch die Ausbildung von Interstrangverknüpfungen begünstigt werden. In der Tat wurden bei einer Konzentration von 1 µM schon nach einer Minute für alle diese Verbindungen keine DNA mehr ohne Interstrangverknüpfung gefunden (Daten nicht gezeigt). Wie bei Bisamid-bisplatin(II) **(8)** (Kapitel 5.2, Seite 100) war auch hier bei Konzentrationen von 10 µM die DNA so stark quervernetzt, dass sie nicht mehr in das Agarosegel einlief (Daten nicht gezeigt). Um den Einfluß der Spacerlänge untersuchen zu können, wurde der Versuch mit einer zehnfach niedrigeren Konzentration, also 1 µM, wiederholt. Abb. 44, Seite 103) zeigt die Autoradiographie dieses Agarosegels.

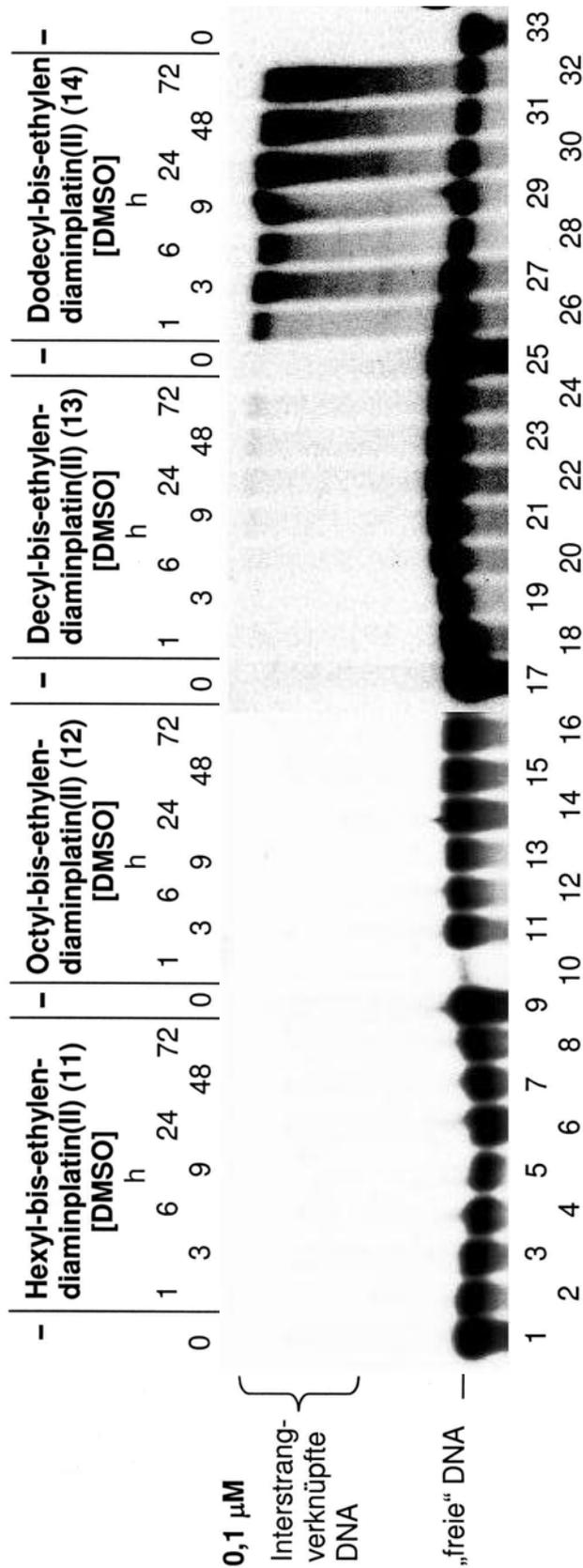


Abb. 44: Autoradiographie des denaturierenden Agarosegels im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung von linearisierter, radioaktiv markierter Plasmid DNA nach einer Platinierungskinetik zwischen 1 h und 72 h mit jeweils 0,1 µM der Alkyl-bis-ethylenediaminplatin(II)-Verbindungen [(11), (12), (13) und (14)] gelöst in DMSO.

Die Verbindungen mit den kürzeren Alkylketten Hexyl-bis-ethylendiaminplatin(II) **(11)** mit $n = 6$ bzw. Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) **(12)** mit $n = 8$ bildeten bei dieser geringen Konzentration keine Interstrangverknüpfungen mehr aus. Eine Verlängerung der Alkylkette um zwei Methylengruppen bewirkt wenige Interstrangverknüpfungen nach ca. neun Stunden (Decyl-bis-ethylendiaminplatin(II) **(13)** mit $n = 10$). Die meisten koordinativen Verbindungen zwischen den zwei komplementären DNA-Strängen bildet Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II) **(14)** ($n = 12$) aus. Nach einer Stunde sind deutlich die ersten, miteinander verknüpften Stränge zu sehen. Diese Population nimmt dann mit zunehmender Reaktionszeit zu.

Je länger also die Alkylkette der Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe ist, desto mehr Interstrangverknüpfungen bilden sich.

5.5 Die Fähigkeit Interstrangverknüpfungen auszubilden ist bei Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15) weit weniger ausgeprägt als für die analogen Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe (11), (12), (13) und (14).

Entsprechend den Platin(IV)-Verbindungen (Kapitel 5.3, Seite 101) sollte auch für die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe [(11), (12), (13) und (14)] untersucht werden, ob eine Kopplung von zwei Platinsphären über eine Alkylkette zu mehr Interstrangaddukten führt als eine analoge mononukleare Verbindung. Bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ der mononuklearen Verbindung Nonyl-ethylendiaminplatin(II) **(15)** wurden nach 72 Stunden noch keine Interstrangverknüpfungen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Da alle analogen Bisplatinverbindungen [(11), (12), (13) und (14)] unter diesen Bedingungen schon nach einer Stunde an jedem DNA-Molekül mindestens eine Interstrangverknüpfung gebildet haben (Kapitel 5.4, Seite 102), führt die Kopplung von zwei Platinsphären in einem Komplex, die natürlich bei gleicher Komplexkonzentration die Konzentration der *cis*-Platinsphären verdoppelt, zur Ausbildung von mehr Interstrangverknüpfungen als es bei einer Verdoppelung der Platinaddukte einer mononuklearen Verbindung der Fall wäre. Das heißt, dass ein Teil der Interstrangverknüpfungen der Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe [(11), (12), (13) und (14)] nicht innerhalb einer Platinsphäre entstehen.

Vielmehr bestehen diese Verknüpfungen aus zwei Platinaddukten, die über eine Alkylkette miteinander verbunden sind.

5.6 Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) bildet die wenigsten Interstrangverknüpfungen aus.

Auch für Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**), mit dem mit sterisch anspruchsvollen Liganden, wurde die Ausbildung von Interstrangverknüpfungen untersucht. In der Autoradiographie in Abb. 45 ist zu sehen, dass nach einer Stunde eine Bande entsteht, die nicht eindeutig identifiziert werden kann. Vermutlich handelt es sich um DNA-Moleküle mit monofunktionalen Platinaddukten, die das Laufverhalten des Einzelstranges durch Veränderungen der DNA-Struktur beeinflussen. Möglicherweise führt das Isochinolinringsystem über zusätzliche Wechselwirkungen mit den DNA-Basen zu einer ungewöhnlichen Basenstapelung. Mit zunehmender Reaktionszeit wird diese Bande schwächer. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Addukte in bifunktionale Addukte übergehen.

Trotz der vergleichsweise hohen Konzentration von 10 μM dauert es für (**16**) sechs Stunden dauert, bis sich die ersten Interstrangverknüpfungen ausbilden (Spur 4).

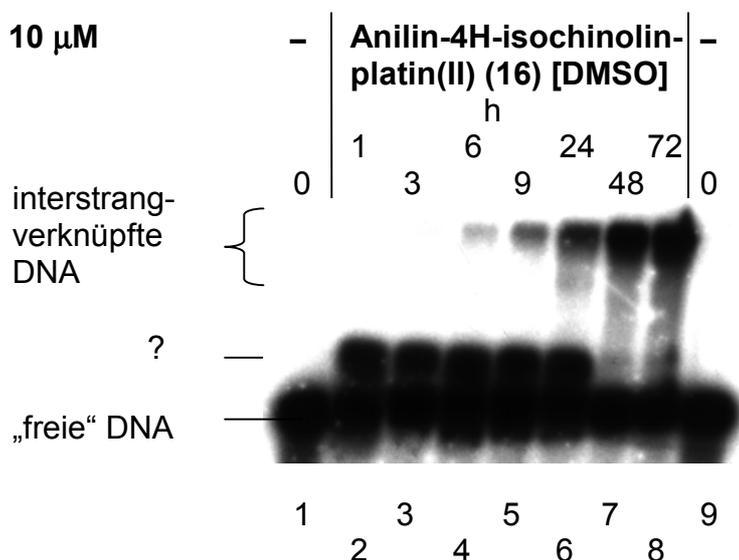


Abb. 45: Autoradiographie des denaturierenden Agarosegels im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung von linearisierter, radioaktiv markierter Plasmid DNA nach einer Platinierungskinetik zwischen 1 h und 72 h mit 10 μM Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) gelöst in DMSO.

Der Anteil der DNA mit verknüpfenden Addukten nimmt im weiteren Verlauf zu. Doch selbst nach 72 Stunden (Spur 8) ist noch ein großer Teil der eingesetzten

DNA als „freie“ DNA vorhanden. Als Vergleich kann zum Beispiel herangezogen werden, dass bei Cisplatin [DMSO] (**1a**) unter diesen Bedingungen bereits nach 30 Minuten jedes DNA Molekül mindesten eine Interstrangverknüpfung aufwies, also keine „freie“ DNA mehr beobachtet wurde (Kapitel 5.1, Seite 97). Bei den DNA-Sekundärstrukturveränderungen (Kapitel 4.8, Seite 94) wurde die ähnliche Kinetik der DNA-Sekundärstrukturveränderungen dieser beiden Verbindungen auf den geringen Einfluß der Aminliganden zurückgeführt. Im Gegensatz dazu scheint der sterisch anspruchsvollere 1-(2-Aminophenyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-Ligand von (**16**) die Ausbildung von Interstrangverknüpfungen stärker zu beeinträchtigen.

Demnach bildet Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) von allen untersuchten Verbindungen die wenigsten Interstrangverknüpfungen aus.

Zusammengefaßt verlangsamt also die DMSO Solvolyse von Cisplatin (**1**) auch die Ausbildung von Interstrangverknüpfungen. Dagegen wurden für alle Bisplatinverbindungen [(**8**), (**9**), (**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] viele Interstrangverknüpfungen beobachtet. Aus dem Vergleich mit den analogen Monoplatinverbindungen (**10**), (**15**) läßt sich schließen, dass viele dieser Verknüpfungen auf Addukte zweier Platinsphären zurückzuführen sein müssen, die über einen Brückenliganden die beiden DNA-Stränge kovalent verbinden. Die Oxidation des Zentralatoms zu Platin(IV) verlängert die Reaktionszeit für die Ausbildung von Interstrangverknüpfungen nur geringfügig. Liganden des 1-(2-Aminophenyl)isochinolin-Typs dagegen beeinträchtigen die Verknüpfung zweier DNA Stränge erheblich, so dass für die Verbindung Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) eine deutlich längere Reaktionszeit als für die übrigen untersuchten Verbindungen beobachtet wird.

Gerade die langsame Ausbildung von Interstrangverknüpfungen von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**), und die schnelle Zunahme an diesen Verknüpfungen bei den Bisplatinverbindungen stehen in klarem Widerspruch zu der starken Cytotoxizität des Anilin-4H-isochinolinplatin(II)komplexes bzw. der um mindestens eine Größenordnung geringeren Cytotoxizität der Bisplatinverbindungen. Es gibt also keine Korrelation zwischen der Zahl der Interstrangverknüpfungen *in vitro* und der Cytotoxizität der Komplexe. Es kann mit diesem rein quantitativen Test allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass spezielle Interstrang-

verknüpfungen dennoch cytotoxisch sind. Soweit Schlüsse von *in vitro* Untersuchungen auf Phänomene in Zellen möglich sind, ist jedoch klar, dass eine kovalente Verbindung der beiden DNA Stränge über Platinaddukte für die Cytotoxizität der Komplexe nicht ausreichend ist.

6 Unterschiede in der Reparatureffizienz der verschiedenen Platinkomplexe sind geringer als die Sensitivität des *in vitro*-DNA-Reparatur-Tests

Neben der Entstehung der Platinaddukte an DNA spielt natürlich auch deren Persistenz eine entscheidende Rolle. Faktoren, die die Persistenz der Addukte beeinflussen, wie Umlagerungen, DNA-Reparatur oder auch Verdrängung der Komplexe von den DNA-Basen durch stärkere Liganden könnten Addukte wieder von der DNA entfernen oder zumindestens unschädlich machen. Komplexe, die nur wenig cytotoxisch sind, könnten z.B. Addukte an der DNA ausbilden, die zwar stark cytotoxisch wirken würden, die jedoch von einem Reparatursystem besser erkannt, repariert und damit unschädlich gemacht werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein *in vitro*-DNA-Reparatur-Test, der von Wood *et al.*⁹⁴ vorgestellt worden ist, in unserem Labor etabliert. Bei diesem Test wird modifizierte Plasmid DNA mit einem zellfreien Extrakt inkubiert, der unter anderem DNA-Reparaturproteine enthält. Sperrige Addukte, wie sie zum Beispiel bei der Reaktion mit Cisplatinanaloga entstehen oder auch Pyrimidin-Dimere, werden dann von dem Nukleotid-Exzisionsreparatursystem erkannt und ein Oligonukleotid, das diesen Schaden trägt, wird ausgeschnitten. Die entstandene Lücke wird durch DNA-Polymerisation aufgefüllt und ligiert.⁹⁴ Diese DNA-Reparatursynthese kann durch Einbau radioaktiv markierter Nukleotide nachgewiesen werden. Um die Hintergrundaktivität an DNA-Synthese bestimmen zu können, wird ein zweites, unmodifiziertes Kontrollplasmid, welches sich durch seine Größe von dem geschädigten Plasmid unterscheidet, hinzugefügt. Nach der Reparaturreaktion wird die DNA gereinigt und die beiden Plasmide in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Anhand der Autoradiographie des Agarosegels kann dann die DNA-Synthese und nach Abzug der Hintergrundaktivität die DNA-Reparatursynthese während der Reaktion abgeschätzt werden.

6.1 An einem UV-strahlengeschädigten Plasmid kann DNA-Reparatursynthese nachgewiesen werden

Zur Etablierung des DNA-Reparatursynthesetest wurde als unabhängige Kontrolle UV-Strahlung eingesetzt, um die DNA *in vitro* zu schädigen. Es wurde ein Plasmid II für verschiedene Zeiten (5 – 60 Min.) mit UV-Licht bestrahlt und dann zusammen mit einem unmodifizierten Kontrollplasmid I mit einem zellfreien Extrakt behandelt. Nach der Aufreinigung wurden die beiden Plasmide in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurde Ethidiumbromid in das Gel miteingeschlossen. Die gewählte Ethidiumbromidkonzentration verändert das Laufverhalten von geschlossenen Plasmiden so, dass superspiralisierte DNA (sc) von entspannten Plasmiden und unter diesen kovalent geschlossene (ccc) von offenen Zirkel (oc) unterschieden werden können. Das Ergebnis einer solchen Agarosegelelektrophorese ist auf Seite 111 in Abb. 46 oben gezeigt. Details sind in der zugehörigen Bildunterschrift erklärt. Auf der linken Seite sind in den Spuren 2 und 3 die unbehandelten Plasmide I bzw. II aufgetrennt. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid wird die superspiralisierte DNA (sc) aufgewunden,⁹⁵ das heißt, dass die negative Superspiralisierung abnimmt bzw. positiver wird. Die superspiralisierte DNA (sc) wandert deswegen nur noch wenig schneller als die offenen Zirkel (oc). Bei entspannten Plasmiden führt dieses Aufdrillen zu positiver Superspiralisierung. Damit wandern die in Lösung ohne Ethidiumbromid entspannten Zirkel im Gel als positiv superspiralisierte DNA schneller, werden aber weiterhin mit ccc bezeichnet. Da das Laufverhalten von offenen, entspannten Zirkeln (oc) durch die Interkalation von Ethidiumbromid kaum verändert wird, können geschlossene (ccc) und offene (oc) entspannte Zirkel also anhand ihres Laufverhaltens in der ethidiumbromidhaltigen Agarosegelelektrophorese unterschieden werden. Als Referenz für das geschlossene, entspannte Plasmid II wurde dieses mit Topoisomerase I aus Weizenkeimen behandelt, die superspiralisierte DNA (sc) entspannt (ccc) (Spur 9).

In den Spuren 4 bis 8 wurden die beiden Plasmide nach der Behandlung mit einem zellfreien Extrakt aufgetrennt. Ein erster Hinweis für die Wirkung von enzymatischer Aktivität ist, dass die beiden Plasmide nicht mehr superspiralisiert (sc) sondern als entspannte, *geschlossene* DNA-Moleküle (ccc) vorliegen.

Diese werden im Agarosegel durch die Interkalation von Ethidiumbromid aufgewunden. Die Umwandlung von superspiralisierter DNA (sc) in geschlossene, entspannte Zirkel (ccc) weist auf Enzyme hin, die Strangbrüche einführen und *diese wieder schließen (Ligation)*. Aufgrund der fehlenden Nukleosomen, die die DNA in Zellen in ihrer superspiralisierten Form halten würden,⁸⁵ führt ein Strangbruch zur Entspannung des Moleküls. Die anschließende Ligation verknüpft lediglich wieder die beiden freien Enden, führt aber keine Superspiralisierung ein, so dass geschlossene, entspannte Zirkel entstehen. In den Spuren 4 - 8 ist darüber hinaus eine deutliche Zunahme der offenen Zirkel (oc) zu sehen. Bei genauere Betrachtung fällt weiter auf, dass in denselben Spuren die Menge an superspiralisierter DNA abnimmt. Das heißt, dass viele Strangbrüche bei zunehmender Schädigung der DNA nicht mehr geschlossen werden.

Um die quantitative Auswertung zu erleichtern, wurden die Plasmide mit einem Restriktionsenzym linearisiert und in den Spuren 10 bis 16 aufgetragen. Lineare DNA-Moleküle werden in der Agarosegelelektrophorese nur entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. In den Spuren 12 bis 14 sind jedoch noch Banden von offenen Zirkeln des Plasmids II zu sehen. Offenbar führen die UV-Schäden an der DNA dazu, dass ein Teil der Plasmide nicht mehr vollständig geschnitten werden kann.

Die Autoradiographie des Gels, die auf Seite 111 in Abb. 46 unten zu sehen ist, dient dazu, den Einbau radioaktiver Nukleotide zu bestimmen. Anhand der linearisierten Plasmide auf der rechten Seite (Spuren 10 - 14) lässt sich der gesamte Einbau radioaktiver Nukleotide in die beiden Plasmide gut quantifizieren. In das Kontrollplasmid I wurden nur wenige radioaktive Nukleotide eingebaut und der Einbau in das ungeschädigte Plasmid II in Spur 10 ist damit vergleichbar. Das heißt, dass die Hintergrundaktivität der DNA-Synthese für beide Plasmide gleich ist. Mit zunehmender Bestrahlungszeit wird die Bande des Plasmids II jedoch immer dunkler. Das heißt, dass die DNA-Syntheseaktivität mit den UV-Schäden zunimmt und folglich, abzüglich des Hintergrundes, DNA-Reparatursyntheseaktivität ist.

Auf der linken Seite (Spuren 4 – 8) beobachtet man für das Kontrollplasmid I sowohl in den offenen Zirkeln (oc), als auch in den geschlossenen Zirkeln (ccc) nur schwachen Einbau. Für das UV-geschädigte Plasmid II dagegen nimmt der

Einbau, sowohl bei den offenen Zirkel (oc) als auch bei den geschlossenen, entspannten Plasmide (ccc), deutlich zu (Spuren 4 - 8). Mit zunehmender Schädigung der DNA steigt, sowohl der Radioaktivitätseinbau, als auch der Anteil der DNA-Moleküle, die noch einen Strangbruch aufweisen (oc), was darauf hindeutet, dass in diesen Plasmiden die Reparaturaktivität zunimmt, aber zumindestens eine Reparaturreaktion noch nicht vollständig abgelaufen ist. Letztendlich ist die Population der geschlossenen Zirkel (ccc) zur Beurteilung der DNA-Reparatur entscheidend, denn nur wenn in das Plasmid radioaktive Nukleotide eingebaut worden sind und das Molekül danach durch Ligation wieder geschlossen wurde, wurde zumindestens ein DNA-Schaden vollständig repariert. Die Zunahme des radioaktiven Einbaus in den geschlossenen Zirkeln (ccc) kann als Beweis angesehen werden, dass Nukleotid-Excisions-Reparatur erfolgt ist.

Fortsetzung der Bildunterschrift zu Abb. 46

Daran anschließend folgen das Kontrollplasmid I und Plasmid II, die beide nicht mit dem Extrakt behandelt worden sind.

Nach einer freien Spur folgt ganz rechts nochmals der Größenmarker.

↓ Unten: Autoradiographie des Agarosegels im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung von Kontrollplasmid I und UV-geschädigtem Plasmid II.

← links: Plasmide in zirkulärer Form:

Von links nach rechts befindet sich in den Spuren 4 - 8 das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 0, 5, 15, 30 und 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, mit dem zell-freien Extrakt behandelt worden ist.

→ rechts: Plasmide, die nach der Behandlung mit dem zellfreien Extrakt durch das Restriktionsenzym EcoR I linearisiert worden sind:

Weiter von links nach rechts folgen nun in den Spuren 10 - 14 wieder das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 0, 5, 15, 30 und 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, mit dem zellfreien Extrakt behandelt worden ist.

6.2 Es gibt eine optimale Proteinkonzentration für den DNA-Reparatursynthesetest.

Die Reparaturenzyme sollten für einen Vergleichstest möglichst nicht limitierend sein. Um den Einfluß der Proteinkonzentration auf die DNA-Syntheserate zu überprüfen, wurde eine definierte Menge an UV-geschädigtem Plasmid II zusammen mit dem Kontrollplasmid mit steigenden Mengen an Extrakt behandelt. Dabei wurde zum Einen ein Ganzzellextrakt,⁸⁰ wie von Wood *et al.*⁹⁴ für den DNA-Reparatursynthesetest vorgeschlagen, verwendet. Zusätzlich wurde ein Kernextrakt eingesetzt, der ursprünglich von Dignam *et al.*⁸¹ für Transkriptionsuntersuchungen entwickelt worden war. Nach der achtstündigen Behandlung mit den Extrakten wurden die Plasmide gereinigt und wieder in einer ethidiumbromidhaltigen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Abb. 47, Seite 114, zeigt oben das Agarosegel. Die Ethidiumbromidkonzentration und damit auch die Änderungen des Laufverhaltens der Plasmide sind wie in Kapitel 6.1, Seite 108, beschrieben. Genaue Angaben zu den Bildern finden sich in der Bildunterschrift auf Seite 114. Zur Orientierung dienen die Plasmide I und II, die in den Spuren 2 und 3 aufgetragen sind, bzw. in den Spuren 13 und 14 nach der Behandlung mit Topoisomerase I. In den Spuren 4 bis 7 wurden das Kontrollplasmid I und das mit UV-Licht bestrahlte Plasmid II mit zunehmenden Mengen des Kernextrakts behandelt, in den folgenden Spuren 8 bis 12 mit zunehmenden Mengen des Ganzzellextrakts. Bei der jeweils geringsten Menge von 0,1 µg Extrakt sind die Plasmide fast unverändert. Der größte Teil liegt superspiralisiert (sc) vor, nur ein geringer Teil weist Strangbrüche auf (oc). Das

heißt aber auch, dass die Zunahme der Population der offenen (oc) bzw. geschlossenen (ccc) Zirkel auf Kosten der superspiralisierten DNA, wie er in den jeweils folgenden Spuren 5 bis 7 bzw. 9 bis 12 zu beobachten ist, auf Enzyme des Extrakts zurückzuführen ist und kein Artefakt durch Erwärmen oder Pufferbestandteile sein kann.

Zur Vereinfachung der Quantifizierung wurden auf der rechten Seite des Gels die gleichen Proben nach Linearisierung mit einem Restriktionsenzym nochmals aufgetragen. Das Kontrollplasmid I scheint etwas mehr zu sein als Plasmid II, aber die Mengen des jeweiligen Plasmids in den einzelnen Spuren sind konstant.

Fortsetzung der Bildunterschrift zu Abb. 47

Im Anschluß daran folgen in den Spuren 4 - 7 das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, mit 0,1; 1; 10 bzw. 36 µg des Kernextrakts behandelt worden ist

In den Spuren 8 - 12 folgen das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, mit 0,1; 1; 10; 100 bzw. 200 µg des Ganzzellextrakts behandelt worden ist.

In Spur 13 und 14 folgen Plasmid II bzw. das Kontrollplasmid I, welche durch Topoisomerase I von der superspiralisierten Form in entspannte, geschlossene Zirkel (CCC) überführt worden sind.

→ rechts: Plasmide, die nach der Behandlung mit den Extrakten durch das Restriktionsenzym EcoR I linearisiert worden sind:

Weiter von links nach rechts folgen nun in den Spuren 15 - 18 wieder das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, mit 0,1; 1; 10 bzw. 36 µg des Kernextrakts behandelt worden ist.

In den Spuren 19 - 23 folgen das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, mit 0,1; 1; 10; 100 bzw. 200 µg des Ganzzellextrakts behandelt worden ist.

Daran anschließend folgen das Plasmid II und das Kontrollplasmid I, die beide nicht mit Extrakt behandelt worden sind.

Ganz rechts ist nochmals der Längenmarker aufgetragen.

↓ Unten: Autoradiographie des Agarosegels im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung von Kontrollplasmid I und UV-geschädigtem Plasmid II.

← links: Plasmide in zirkulärer Form:

Von links nach rechts befindet sich in den Spuren 4 - 7 das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, mit 0,1; 1; 10 bzw. 36 µg des Kernextrakts behandelt worden ist.

In den Spuren 8 - 12 folgen das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, mit 0,1; 1; 10; 100 bzw. 200 µg des Ganzzellextrakts behandelt worden ist.

→ rechts: Plasmide, die nach der Behandlung mit dem zellfreien Extrakt durch das Restriktionsenzym EcoR I linearisiert worden sind:

Weiter von links nach rechts folgen nun in den Spuren 15 - 18 wieder das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, mit 0,1; 1; 10 bzw. 36 µg des Kernextrakts behandelt worden ist.

In den Spuren 19 - 23 folgen das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, mit 0,1; 1; 10; 100 bzw. 200 µg des Ganzzellextrakts behandelt worden ist.

In Abb. 47, Seite 114, folgt unten die Autoradiographie des Gels. In den Spuren 4 und 8 mit den geringsten Proteinmengen ist kein Radioaktivitätseinbau feststellbar. Für das Kontrollplasmid I sind insgesamt nur sehr schwache Signale sichtbar. Eine deutliche Zunahme des Radioaktivitätseinbaus beobachtet man dagegen für beide Extrakte bei dem UV-geschädigten Plasmid II. Allerdings nimmt dieses Signal nach einem Maximum bei 10 µg sowohl für den Kernex-

trakt, als auch für den Ganzzelleextrakt mit weiter steigenden Proteinmengen wieder ab. Noch deutlicher ist das Ergebnis mit den linearisierten Plasmiden auf der rechten Seite der Autoradiographie zu sehen. Hier wird deutlich, dass auch die DNA-Synthese im Kontrollplasmid I dasselbe Maximum aufweist, die Signale jedoch immer deutlich schwächer sind als für das UV-geschädigte Plasmid II.

Eine Proteinmenge von 10 µg sowohl des Kernextrakts, als auch des Ganzzelleextrakts erweist sich für den DNA-Reparatursynthesetest für 1 µg Plasmid-DNA als optimal. Da kein Unterschied zwischen den beiden Extrakten festgestellt wurde, wurde der Test in den folgenden Versuchen in Anlehnung an die Arbeit anderer Autoren mit dem Ganzzelleextrakt durchgeführt.⁹⁴

6.3 Die Aktivität der DNA-Reparaturenzyme ist *in vitro* bis zu sechs Stunden gleichbleibend

Die Proteinmenge allein ist allerdings nur ein begrenzter Hinweis für die Enzymaktivität, die für den DNA-Reparatursynthesetest ausschlaggebend ist. Um festzustellen, ob die Aktivität sich während der Reaktion ändert, wurde die Kinetik der DNA-Reparatursynthese anhand eines UV-geschädigten Plasmids untersucht. Unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie in Kapitel 6.2, Seite 112 wurde das UV-geschädigte Plasmid II zusammen mit dem Kontrollplasmid I mit der optimierten Menge Ganzzelleextrakt behandelt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und die Reaktion gestoppt. Die DNA wurde gereinigt und in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Agarosegelbild, oben in Abb. 48, Seite 117, sieht man rechts vom Marker die beiden unbehandelten Plasmide, das Kontrollplasmid I und daran anschließend Plasmid II. In den Spuren 4 bis 11 folgen dann das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem UV-geschädigten Plasmid II mit Ganzzelleextrakt behandelt worden ist. Die Behandlungsdauer nimmt dabei von links nach rechts von einer Stunde bis zu 24 Stunden zu. Bereits nach einer Stunde sind alle superspiralisierten (sc) Moleküle entspannt, entweder mit einem Strangbruch (oc) oder als geschlossene Zirkel (ccc).

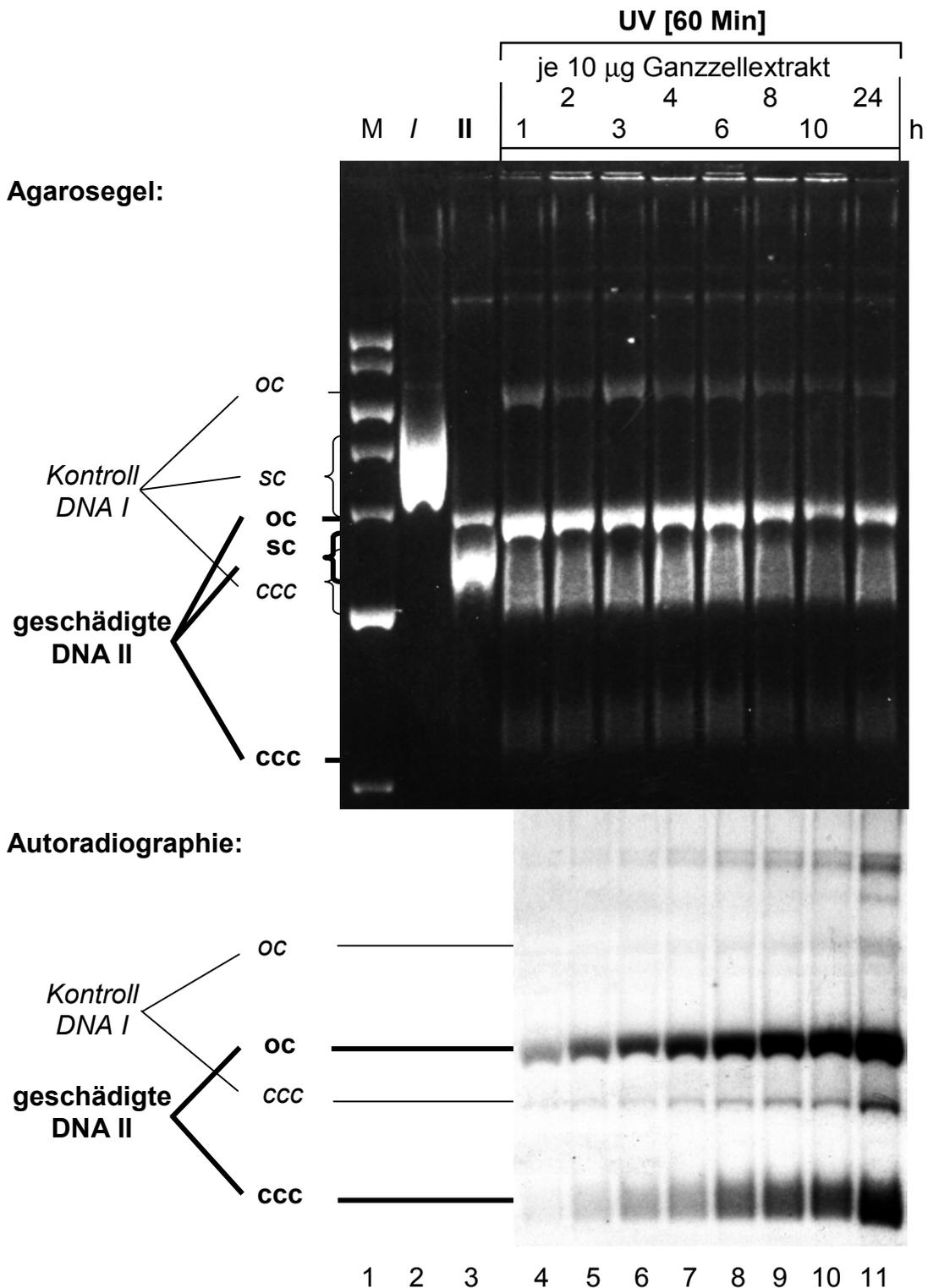


Abb. 48: Kinetik des DNA-Reparatursynthesetest.

↑ Oben: Agarosegelbild der elektrophoretischen Auftrennung von Kontrollplasmid I und UV-geschädigtem Plasmid II mit 40 µg/l Ethidiumbromid. Alle Plasmide sind zirkulär.

Von links nach rechts wurde zuerst ein Längenmarker aufgetragen, dann folgen das superspiralisierte Kontrollplasmid I und das superspiralisierte Plasmid II, die beide nicht mit dem Extrakt behandelt worden sind.

Im Anschluß daran folgen in den Spuren 4 - 11 das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, für 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 bzw. 24 h mit je 10 µg des Ganzzelleextrakts behandelt worden ist.

(Fortsetzung nächste Seite)

Fortsetzung der Bildunterschrift zu Abb. 48

↓ Unten: Autoradiographie des Agarosegels im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung von Kontrollplasmid I und UV-geschädigtem Plasmid II. Von links nach rechts befindet sich in den Spuren 4 - 11 das Kontrollplasmid I, das zusammen mit dem Plasmid II, welches 60 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden war, für 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 bzw. 24 h mit je 10 µg des Ganzzellextrakts behandelt worden ist.

Die Autoradiographie auf Seite 117 (Abb. 48 unten) zeigt für beide Formen des Kontrollplasmids I einen mit der Reaktionszeit schwach zunehmenden Radioaktivitätseinbau. Für das UV-geschädigte Plasmid II ist schon nach einer Stunde ein deutliches Signal an der Stelle der offenen Zirkel (oc) zu sehen. Die Signalintensität nimmt im weiteren Reaktionsverlauf deutlich zu. Diese Zunahme ist zeitlich leicht versetzt auch bei den geschlossenen Molekülen zu beobachten. Nach sechs Stunden wird die Zunahme dann geringer. Doch auch wenn die Intensität nicht mehr linear mit der Zeit zunimmt, so ist dennoch nach 24 Stunden das Signal am stärksten. Das heißt, dass die DNA-Reparaturenzyme, die in dem Ganzzellextrakt enthalten sind, für mehr als zehn Stunden aktiv bleiben. Bis zu sechs Stunden wird dabei keine Abnahme der Aktivität beobachtet.

6.4 Cisplatin Addukte an DNA werden *in vitro* ineffizient repariert.

Nachdem der DNA-Reparatursynthesetest etabliert und die entscheidenden Parameter der des Test analysiert worden sind, wurde die Reparatur von Cisplatin Addukten an DNA untersucht. Dazu wurde das Plasmid II mit steigenden Konzentrationen an Cisplatin [H₂O] (**1**) behandelt. Die DNA wurde dann von überschüssigem Cisplatin (**1**) gereinigt. In Abb. 49, Seite 119, ist im Agarosegel links das zunehmend platiniierte Plasmid II zu sehen. Ebenso wie bei der Kinetik der DNA-Sekundärstrukturveränderungen in Kapitel 4.2, Seite 80, ist auch hier sowohl eine Beschleunigung der offenen Zirkel (oc) aufgrund einer Verkürzung der DNA, als auch eine Verlangsamung der aufgewundenen, superspiralisierten DNA zu beobachten.

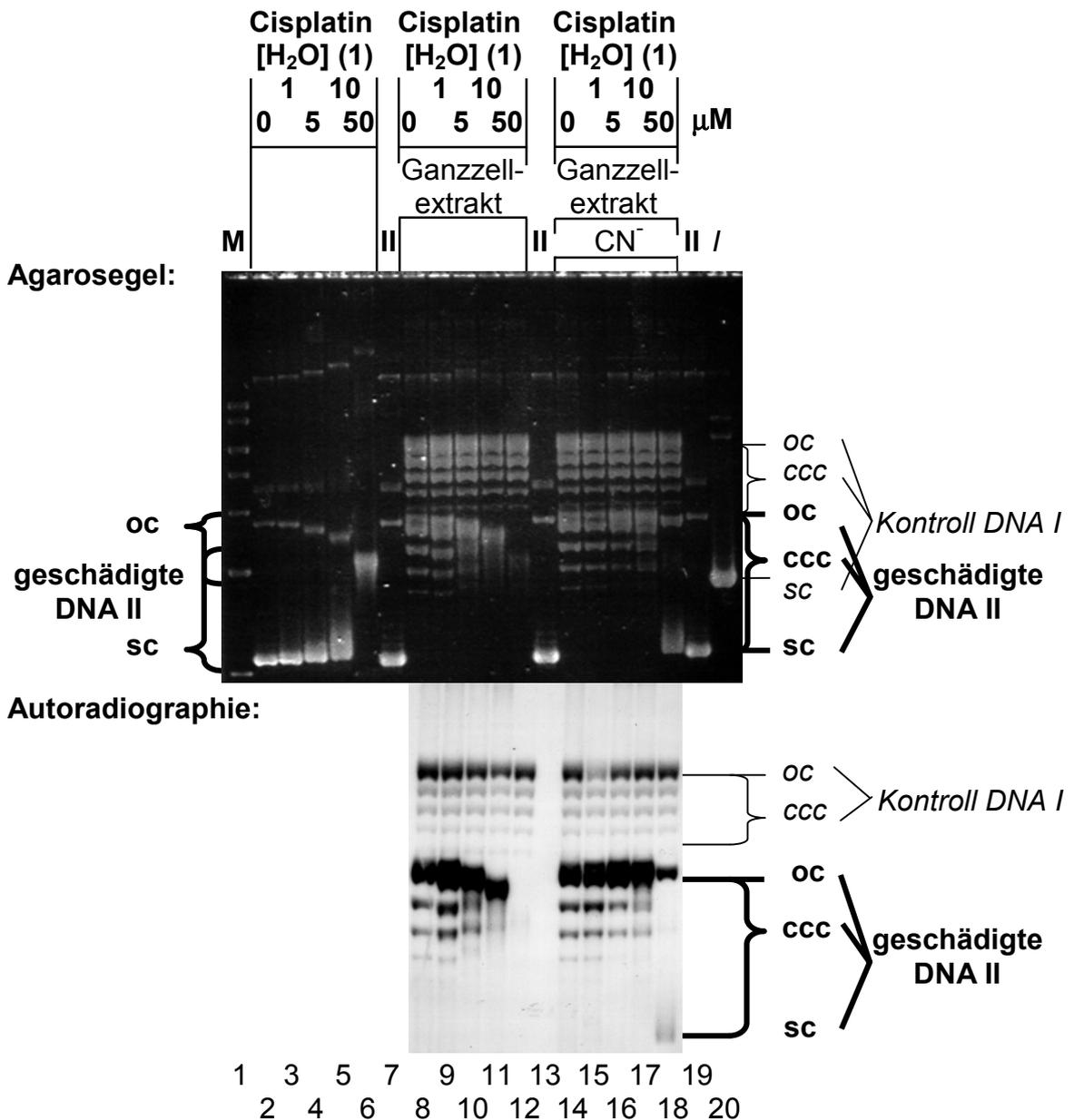


Abb. 49: DNA-Reparatursynthesetest von Cisplatin Addukten.

↑ Oben: Agarosegelbild der elektrophoretischen Auftrennung von Kontrollplasmid I und Cisplatin behandeltem Plasmid II. Das Gel wurde *nach* der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt.

← Links: Zirkuläres Plasmid II nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen an Cisplatin [H₂O] (1):

Ganz links wurde zuerst ein Längenmarker und daran anschließend das unbehandelte superspiralisierte Plasmid II aufgetragen.

Dann folgt das Plasmid II nach dreistündiger Behandlung mit 1, 5, 10 bzw. 50 μM Cisplatin [H₂O] (1).

Zur Verdeutlichung der DNA-Sekundärstrukturveränderungen wurde rechts davon in Spur 7 nochmals das unbehandelte, superspiralisierte Plasmid II aufgetragen.

→ ← Mitte: Cisplatin (1) geschädigtes Plasmid II, das zusammen mit dem Kontrollplasmid I mit Ganzzellextrakt behandelt worden ist:

(Fortsetzung nächste Seite)

Fortsetzung der Bildunterschrift zu Abb. 49

Weiter von links nach rechts folgen nun in den Spuren 8 – 12 das Plasmid II vor der Reaktion mit Cisplatin [H₂O] (1) und nach dreistündiger Behandlung mit 1, 5, 10 bzw. 50 µM Cisplatin [H₂O] (1). Diese Plasmide wurden zudem jeweils zusammen mit dem Kontrollplasmid I mit dem Ganzzellextrakt behandelt.

Daran anschließend folgt wieder das unbehandelte superspiralisierte Plasmid II.

→ rechts: Cisplatin (1) geschädigtes Plasmid II, das zusammen mit dem Kontrollplasmid I mit Ganzzellextrakt behandelt und abschließend wieder deplatiniert worden ist:

In den weiteren Spuren 14 - 18 wurden die gleichen Proben wie in der Mitte des Gels aufgetragen, allerdings nach einer abschließenden Cyanidbehandlung zur Entfernung der Cisplatin-Addukte.

↓ Unten: Autoradiographie des Agarosegels.

→← Mitte: Cisplatin (1) geschädigtes Plasmid II, das zusammen mit dem Kontrollplasmid I mit Ganzzellextrakt behandelt worden ist:

Von links nach rechts sind in den Spuren 8 - 12 das Plasmid II vor der Reaktion mit Cisplatin [H₂O] (1) und nach dreistündiger Behandlung mit 1, 5, 10 bzw. 50 µM Cisplatin [H₂O] (1) jeweils mit ungeschädigtem Kontrollplasmid I aufgetragen, die zudem zusammen mit dem Ganzzellextrakt behandelt worden sind.

→ rechts: Cisplatin (1) geschädigtes Plasmid II, das zusammen mit dem Kontrollplasmid I mit Ganzzellextrakt behandelt und abschließend wieder deplatiniert worden ist.

In den weiteren Spuren 14 - 18 finden sich die gleichen Proben wie in der Mitte des Gels aufgetragen, mit dem Unterschied, dass diese Plasmide abschließend mit Cyanid behandelt worden sind, um Cisplatin-Addukte wieder zu entfernen.

Ein Teil der so geschädigten DNA wurde dann zusammen mit dem Kontrollplasmid I mit Ganzzellextrakt behandelt. Da dieses Gel erst *nach* der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt worden ist, wurde das Laufverhalten der geschlossenen Zirkel nicht wie bei den vorangegangenen Elektrophoresen (Abb. 46, Seite 111, Abb. 47, Seite 114 und Abb. 48, Seite 117) durch Interkalation beeinflusst. Bei der Ligation der Strangbrüche in offenen Zirkeln entstehen nur zum Teil wirklich entspannte Zirkel. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung formen die DNA-Helices zufällige Superhelices. Die Schwankungen führen dazu, dass eine Normalverteilung der Krümmungszahl W entsteht. Das Maximum dieser Verteilung bilden dabei entspannte Zirkel ($|W| < 1$), in denen die beiden Stränge mehr oder weniger einer idealen B-DNA entsprechend umeinander gewunden sind. Wirklich entspannte Zirkel mit $W = 0$ entstehen dabei nur, wenn die jeweiligen Strangenden in der idealen B-DNA direkt aufeinander treffen. Muß dagegen ein DNA-Ende z.B. um eine halbe Drehung gedreht werden, damit die jeweiligen Strangenden aufeinander treffen, so entsteht ein nicht vollständig entspannter DNA-Zirkel.

Daneben entstehen bei der Ligation von entspannten, offenen Zirkeln eine Normalverteilung an superspiralisierten DNA Molekülen um entspannte geschlossene Zirkel ($|W| < 1$). Diese Verteilung ist nach der Agarosegelelektrophorese zu sehen. Allerdings wandern negative Superhelices nur unwesentlich anders als positive mit dem gleichen Betrag der superhelicalen Windungszahl W . Damit wandern die Plasmide mit einer superhelicalen Windung, unabhängig vom Vorzeichen, etwas schneller als entspannte Zirkel ($|W| < 1$) und jede weitere superhelicale Windung führt zu einer weiteren Beschleunigung. Im Agarosegel ohne Ethidiumbromid bilden also die vollständig entspannten Zirkel, ($|W| < 1$) die annähernd zusammen mit den offenen Zirkeln laufen, das Maximum der Normalverteilung und alle Plasmide mit abweichender Superhelicität wandern voraus. Damit ist im Gel „eine halbe“ Normalverteilung vom Maximum bis zu den beiden zusammenfallenden Minima sichtbar. Der Einfachheit halber wird diese normalverteilte Population im Folgenden weiter als entspannte, geschlossene Zirkel (ccc) bezeichnet. Die Normalverteilung ist z.B. bei der Kontroll-DNA I in Spur 8 besonders gut zu sehen. Die platinierter DNA zeigt, zusätzlich zu der Normalverteilung, eine Verkürzung und auch ein schwaches Aufdrillen der DNA wie vor der Behandlung mit Ganzzellextrakt (Spuren 2 - 7). Dabei muss sich die Verdrillungszahl T , im Gegensatz zu Veränderungen der DNA-Topologie durch eine Änderung der Verflechtungszahl L , nicht ganzzahlig ändern. Die Verflechtungszahl L kann sich immer nur um eine ganze Windung oder ein ganzzahliges Vielfaches davon ändern, damit beiden Strangenden wieder verknüpft werden können. Platinaddukte dagegen können die Verdrillungszahl T auch um weniger als eine Windung ändern. In Abb. 49, Seite 119, führt dies dazu, dass aus den diskreten Banden der unterschiedlich superhelicalen Plasmide in Spur 8 mit zunehmender Platinierung ein Schmier entsteht. Darüber hinaus nimmt auch die Signalintensität ab, wobei nicht festzustellen ist, welchen Anteil jeweils höhere DNA-Verluste, z.B. durch Verknüpfung der DNA an den Reaktionsgefäßen, bzw. eine reduzierte Ethidiumbromidintercalation⁸⁹ haben. Die genaue DNA-Menge kann damit nicht mehr verlässlich abgeschätzt oder verglichen werden. Deswegen wurden in den folgenden Spuren 14 bis 18 die gleichen Proben nochmals aufgetragen, allerdings nach einer abschließenden Deplatinierung. Dabei werden die DNA-Basen durch Cyanidionen aus den Cisplatin-Komplexen verdrängt und es entstehen freie

DNA-Basen und Cyano-platin(II)-Komplexe. Auch das ursprünglich mit Cisplatin behandelte Plasmid II tritt nun wieder in diskreten Banden auf. Das Muster der DNA, die am stärksten platiniiert gewesen ist (Spur 18), weicht jedoch deutlich von der Normalverteilung ab. Hier ist neben der Bande der offenen Zirkel (oc) nur eine weitere Bande zu sehen, die fast so stark superspiralisiert zu sein scheint, wie das Vergleichsplasmid II in der Spur 19, rechts daneben. Um dies zu verstehen, ist es hilfreich, sich die Entwicklung dieser DNA vor Augen zu führen. Zuerst wurde die DNA mit 50 μM Cisplatin [H_2O] (**1**) behandelt, was dazu führte, dass die superspiralisierte DNA (sc) im Gel zusammen mit den offenen, entspannten Zirkeln (oc) wanderte (Koaleszenzpunkt, Spur 12). Das heißt aber, dass die DNA soweit aufgewunden worden ist, dass die Krümmungszahl W ungefähr Null geworden ist und die Verdrillungszahl T um den Betrag von W verringert ist. Die Behandlung mit Ganzzellextrakt führt nun zu Strangbrüchen. Da das Plasmid aber schon in einem entspannten Zustand mit $L = T$ vorliegt, ändert sich die DNA Topologie nicht und das Plasmid wird mehr oder weniger unverändert wieder ligiert. Damit verändert die Behandlung mit dem Zellextrakt die geometrische Form der Plasmide praktisch nicht. Dies zeigt sich auch darin, dass sich das Laufverhalten des Plasmids nach der Behandlung mit Zellextrakt (Spur 12) praktisch nicht von platiniiertem, nicht mit Zellextrakt behandeltem Plasmid (Spur 6) unterscheidet. Durch die Entfernung der Platinaddukte auf der DNA wird dann die Ursache des Aufdrillens beseitigt und die DNA geht wieder in ihren ursprünglichen, superhelicalen Zustand zurück.

Die Autoradiographie unten in Abb. 49, Seite 119, zeigt den Einbau radioaktiver Nukleotide durch DNA-Synthese. Allerdings ergeben sowohl das Kontrollplasmid I als auch das geschädigte Plasmid II vergleichbare Signale. Die Zunahme des Signals von ungeschädigtem Plasmid II in Spur 8 zu schwach platiniiertem Plasmid II in Spur 9 ist schwach und eine stärkere Schädigung führt zu keiner weiteren Zunahme. Die Signalintensitäten nehmen eher ab, was aber auf die erhöhten Verluste bei stärkerer Platinierung zurückzuführen sein kann.

Dieses Ergebnis wurde anhand von DNA mit über einen größeren Bereich variiertem Platinierungsgrad mehrmals reproduziert. Auch veränderte Bedingungen des DNA-Reparatursynthesetest wie Reaktionszeit oder Extraktmenge erhöhten das Verhältnis von Signal zu Hintergrund nicht.

Es ist nicht auszuschließen, dass *in vivo* Monoaddukte von Cisplatin repariert werden, bevor sich Bisaddukte ausbilden. Diese Situation konnte aber in unserem *in vitro* DNA-Reparatursynthesetest nur unzureichend simuliert werden, da die Reaktivität der Platinkomplexe unter den Reaktionsbedingungen des DNA-Reparatursynthesetests stark herabgesetzt ist. Die hohen Salzkonzentrationen verschieben das Gleichgewicht der Solvolyse der Platinkomplexe auf die Seite der nicht hydratisierten Komplexe, die praktisch nicht mit DNA Basen reagieren. Reduziert man andererseits die Salzkonzentration, so ist *in vitro* keine DNA-Reparatur mehr beobachtbar. Deswegen konnte die Reaktion der Platinkomplexe nicht gleichzeitig mit einer möglichen Reparaturreaktion durchgeführt werden, die möglicherweise die entstehenden Monoaddukte sofort wieder entfernen würde. Es mußte immer zuerst die DNA mit den Platinkomplexen modifiziert werden und konnte daran anschließend in dem DNA-Reparatursynthesetest eingesetzt werden.

Cisplatin-Addukte werden von unserem Ganzzellextrakt *in vitro* also nur wenig repariert. Da UV-Schäden in dem *in vitro* Reparatursynthesetest gut repariert wurden, scheint die geringe Reparatureffizienz der Cisplatinaddukte also eine Folge der Addukteigenschaften zu sein.

6.5 Eventuelle Unterschiede in der DNA-Reparatursynthese bei Addukten von Cisplatin [H₂O] (1) bzw. [DMSO] (1a), Bisamid-bisplatin(II) (8) und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) liegen unterhalb der Nachweisgrenze des *in vitro* DNA-Reparatursynthesetests

Die geringe *in vitro* Reparatureffizienz von Cisplatin-Addukten könnte auf eine unzureichende Reparatur in der Zelle hindeuten. Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen *in vitro* Reparatureffizienz und Cytotoxizität gibt, wurde der DNA-Reparatursynthesetest für die Verbindungen Cisplatin [H₂O] (1) bzw. [DMSO] (1a), Bisamid-bisplatin(II) (8) und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) durchgeführt. Dazu wurde Plasmid-DNA mit steigenden Konzentrationen der Verbindungen behandelt und die DNA anschließend gereinigt. Dann wurden die geschädigten Plasmide zusammen mit dem Kontrollplasmid I mit Ganzzellextrakt behandelt, gereinigt und die DNA abschließend wieder deplatiniert. Die beiden Plasmide wurden in einer Agarosegelelektrophorese ohne Ethidiumbro-

mid aufgetrennt (Abb. 50, Seite 125). Wie für Cisplatin in Kapitel 6.4, Seite 118, beschrieben, führen die Behandlungen (Platinierung, Einführung von Strangbrüchen, Ligation und Deplatinierung) dazu, dass Plasmid II, welches mit 100 μM Cisplatin [H₂O] (**1**) behandelt worden war, superspiralisiert vorliegt. Das gleiche gilt für Plasmid II nach Behandlung mit 100 μM Bisamid-bisplatin(II) (**8**).

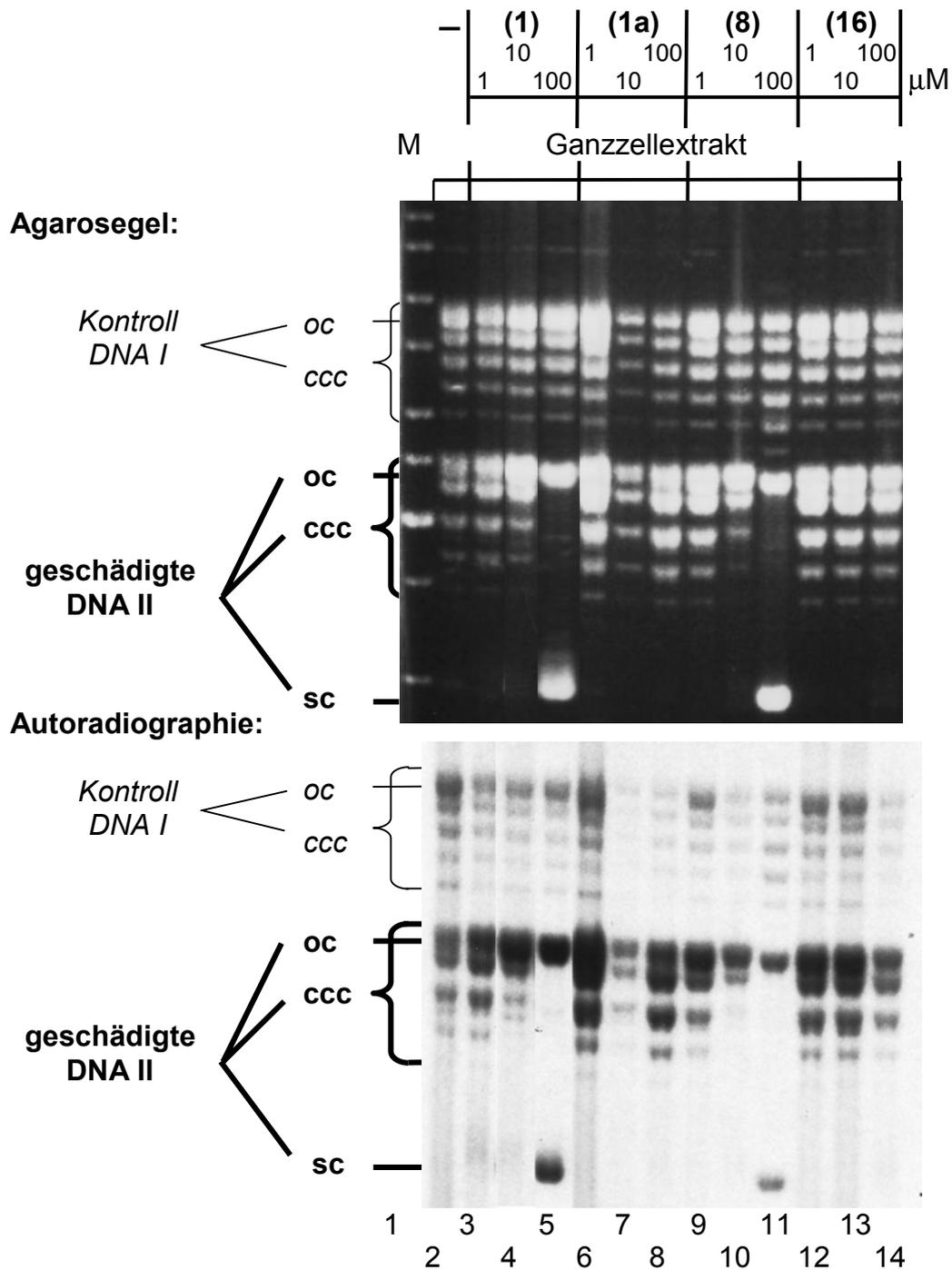


Abb. 50: DNA-Reparatursynthesetest von Addukten von Cisplatin [H₂O] (**1**) bzw. [DMSO] (**1a**), Bisamid-bisplatin(II) (**8**) und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**).

↑ Oben: Agarosegelbild der elektrophoretischen Auftrennung von Kontrollplasmid I und Cisplatin [H₂O] (**1**), Cisplatin [DMSO] (**1a**), Bisamid-bisplatin(II) (**8**) bzw. Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) behandeltem Plasmid II nach der Behandlung mit Ganzzellextrakt und Deplatinierung. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt.

← Links: Ganz links wurde zuerst ein Längenmarker und daran anschließend das unbehandelte Plasmid II zusammen mit dem Kontrollplasmid I, nach der Behandlung mit Ganzzellextrakt, aufgetragen.

(Fortsetzung nächste Seite)

Fortsetzung der Bildunterschrift zu Abb. 50

Dann folgt in den Spuren 3 – 5 das Kontrollplasmid I, das zusammen mit Plasmid II, welches mit 1, 10 bzw. 100 μM Cisplatin [H_2O] (**1**) behandelt worden war, mit dem Ganzzellextrakt behandelt worden ist.

➔⬅ Mitte links: Weiter links folgt in den Spuren 6 – 8 das Kontrollplasmid I, das zusammen mit Plasmid II, welches mit 1, 10 bzw. 100 μM Cisplatin [DMSO] (**1a**) behandelt worden war, mit dem Ganzzellextrakt behandelt worden ist.

➔⬅ Mitte rechts: In den folgenden Spuren 9 – 11 folgt das Kontrollplasmid I, das zusammen mit Plasmid II, welches mit 1, 10 bzw. 100 μM Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelt worden war, mit dem Ganzzellextrakt behandelt worden ist.

➔ Rechts: Ganz rechts folgt in den Spuren 12 – 14 das Kontrollplasmid I, das zusammen mit Plasmid II, welches mit 1, 10 bzw. 100 μM Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) behandelt worden war, mit dem Ganzzellextrakt behandelt worden ist.

↓ Unten: Autoradiographie des Agarosegelbild der elektrophoretischen Auftrennung von Kontrollplasmid I und Cisplatin [H_2O] (**1**), Cisplatin [DMSO] (**1a**), Bisamid-bisplatin(II) (**8**) bzw. Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) behandeltem Plasmid II nach der Behandlung mit Ganzzellextrakt und Deplatinierung. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt.

⬅ Links: Ganz links wurde das unbehandelte Plasmid II zusammen mit dem Kontrollplasmid I, nach der Behandlung mit Ganzzellextrakt, aufgetragen.

Dann folgt in den Spuren 3 – 5 das Kontrollplasmid I, das zusammen mit Plasmid II, welches mit 1, 10 bzw. 100 μM Cisplatin [H_2O] (**1**) behandelt worden war, mit dem Ganzzellextrakt behandelt worden ist.

➔⬅ Mitte links: Weiter links folgt in den Spuren 6 – 8 das Kontrollplasmid I, das zusammen mit Plasmid II, welches mit 1, 10 bzw. 100 μM Cisplatin [DMSO] (**1a**) behandelt worden war, mit dem Ganzzellextrakt behandelt worden ist.

➔⬅ Mitte rechts: In den folgenden Spuren 9 – 11 folgt das Kontrollplasmid I, das zusammen mit Plasmid II, welches mit 1, 10 bzw. 100 μM Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelt worden war, mit dem Ganzzellextrakt behandelt worden ist.

➔ Rechts: Ganz rechts folgt in den Spuren 12 – 14 das Kontrollplasmid I, das zusammen mit Plasmid II, welches mit 1, 10 bzw. 100 μM Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) behandelt worden war, mit dem Ganzzellextrakt behandelt worden ist.

Die Autoradiographie unten in Abb. 50, Seite 125, zeigt in den Spuren 2 bis 4 eine schwache Zunahme des Signals für Plasmid II, wohingegen das Signal des Kontrollplasmids I praktisch unverändert ist. Eine weitere Erhöhung des Platinierungsgrades führt dagegen zu einer schwächeren Schwärzung (Spur 5). Ein ähnliches Ergebnis erhält man auch mit Bisamid-bisplatin(II) (**8**) (Spuren 9 - 11) und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) (Spuren 12 - 14). Die Auswertung für Cisplatin [DMSO] (**1a**) ist aufgrund Verluste an DNA in Spur 7 etwas schwieriger. Aber auch hier ist nach der Behandlung mit 1 μM des Komplexes die Signalintensität größer als mit 100 μM . Insgesamt ist ein klarer Unterschied zwischen Kontrolle und geschädigter DNA zu erkennen. Die Unterschiede der

verschiedenen Verbindungen und auch Konzentrationen sind jedoch innerhalb der statistische Schwankungen.

Es konnte also für die untersuchten Verbindungen DNA-Reparatursynthese gezeigt werden, die Unterschiede in der Reparatureffizienz sind jedoch geringer als das Auflösungsvermögen des DNA-Reparatursynthesetests. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es dennoch geringe Unterschiede in der Reparatureffizienz der unterschiedlichen Platinkomplexe gibt. Es erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich, dass solch geringe Unterschiede für die großen Unterschiede in der Cytotoxizität der Verbindungen verantwortlich sind.

7 Mit Ausnahme von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (16) können DNA-Addukte aller untersuchten Platin-komplexe Proteine koordinativ binden.

Eine Ursache für die geringere Reparatureffizienz von Platinaddukten im Vergleich zu UV-Schäden kann darin liegen, dass die Addukte durch das verwendete Reparatursystem schlechter erkannt werden. Eine zweite Ursache könnte sein, dass ein durchaus erkanntes Addukt aber nicht repariert werden kann. Ersteres bedeutet, dass das Addukt keine wichtigen zellulären Prozesse stört und deswegen nicht erkannt oder einfach toleriert wird. Die zweite Erklärungsmöglichkeit bedeutet, dass der DNA-Schaden erkannt wird und auch repariert werden soll, aber keiner der möglichen Reparaturprozesse erfolgreich ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass freie Bindungsstellen der Komplexe, die noch nicht mit DNA-Basen reagiert haben, Proteinen mit der DNA quervernetzen. Eine koordinative Verknüpfung eines Proteins an DNA kann die Schadenserkenkung aufgrund des massiven Schadens erleichtern und damit die Reparatur beschleunigen. Andererseits könnte die Quervernetzung mit Proteinen auch die nachfolgenden Reparaturprozesse blockieren und so ein irreparables Addukt erzeugen, etwa wenn ein Reparaturenzym selbst durch die koordinative Bindung inaktiviert wird. Cisplatin (**1**) kann Proteine an DNA quervernetzen,⁹⁶ es ist aber nicht klar, ob dies durch eine gleichzeitige Reaktion von Cisplatin (**1**) mit Proteinen, die an DNA gebunden sind, und mit DNA geschieht, oder ob nach der ersten Reaktion von Cisplatin (**1**) mit DNA ein Protein an dieses monofunktionale Addukt bindet und dann quervernetzt wird. Der hohe Salzgehalt während der Proteinbindung unter DNA-Reparatursynthesebedingungen verschiebt das Gleichgewicht der Hydratation der Platinkomplexe zu den Edukten und setzt damit die Reaktivität der Komplexe gegenüber Proteinen oder DNA soweit herab, dass bei einer gleichzeitigen Behandlung der DNA mit Ganzzellextrakt und Platinkomplexen keine koordinativen Verknüpfungen zwischen DNA und Proteinen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Nachfolgend wurde deswegen nur der Prozeß der nachfolgenden Bindung von Proteinen an DNA-Addukte von Platinkomplexen untersucht. Dazu wurde ein lineares, radioaktiv markiertes DNA-Fragment mit den verschiedenen Platinverbindungen behan-

delt und ungebundene Komplexe wurden abgetrennt. Anschließend wurde die so modifizierte DNA mit Ganzzellextrakt unter denselben Bedingungen wie für den DNA-Reparatursynthesetest behandelt. Zur Untersuchung der Proteinbindung wurde das Reaktionsgemisch in einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Proteine, die an DNA gebunden sind, bewirken, dass die DNA in der Polyacrylamidgelelektrophorese retardiert wird. Zur Unterscheidung spezifischer Wechselwirkungen von Platinaddukten mit Proteinen von unspezifischen DNA-bindenden Proteinen wurde als Vergleich ungeschädigte DNA verwendet. In einer nativen Elektrophorese kann jedoch nicht unterschieden werden, ob es sich um bei der Protein-DNA-Assoziation um eine nicht-koordinative oder um eine koordinative Bindung handelt. Deswegen wurde ein Teil obiger Proben in einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dabei gehen alle nicht-kovalenten oder nicht-koordinativen Bindungen verloren und nur Proteine, die koordinativ *über die Platinaddukte* mit der DNA quervernetzt sind, bleiben an der DNA gebunden.

7.1 Die DMSO-Solvolyse führt zu mehr Cisplatin vermittelter DNA-Proteinquervernetzungen.

Nachdem die DMSO-Solvolyse die Reaktion von Cisplatin-Monoaddukten zu Bisaddukten verlangsamt,⁸⁸ verlängert dies die Reaktionszeit, in der Proteine koordinativ an ein Monoaddukt binden können. Es sollte festgestellt werden, ob dies auch zu mehr DNA-Protein-Quervernetzungen führt. Um mit allen Verbindungen einen möglichst hohen initialen Anteil an Monoaddukten zu erzielen, wurde die DNA jeweils nur für zehn Minuten mit den Komplexen behandelt.

Abb. 51, Seite 130, zeigt die Autoradiographie einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese eines radioaktiv markierten DNA-Fragments, das nach der Behandlung mit Cisplatin [H₂O] (**1**) mit Ganzzellextrakt inkubiert worden ist. Rechts neben dem Längenmarker ist das radioaktiv markierte DNA-Fragment zu sehen. Es wurde nur mit der gleichen Pufferlösung inkubiert, die auch für die Bindung der Proteine des Ganzzellextrakts verwendet wurde. Es wandert entsprechen seiner Größe von 177 Bp. Daneben ist das gleiche Fragment nach der Behandlung mit Ganzzellextrakt aufgetragen (Spur 3). Es sind verschiedene, diskrete Banden von proteingebundener DNA sichtbar, die alle langsamer wandern als freie DNA, und ein Großteil der DNA ist nicht in das Gel eingelaufen. In

dem Ganzzelextrakt sind also erwartungsgemäß viele DNA-bindende Proteine, oder Proteine, die DNA-Brüche oder Schäden erkennen, enthalten.

In den Spuren 4 bis 9 folgen von rechts nach links Fragmente, die mit steigenden Konzentrationen an Cisplatin [H₂O] (1) behandelt worden waren, bevor sie jeweils in Puffer oder zusätzlich mit Ganzzelextrakt inkubiert worden sind. Die Platinaddukte und der Puffer alleine verändern dabei das Laufverhalten der DNA nicht. Die Bindung von Proteinen des Ganzzelextrakts führt dagegen zu dem gleichen Bandenmuster wie bei der ungeschädigten DNA beobachtet.

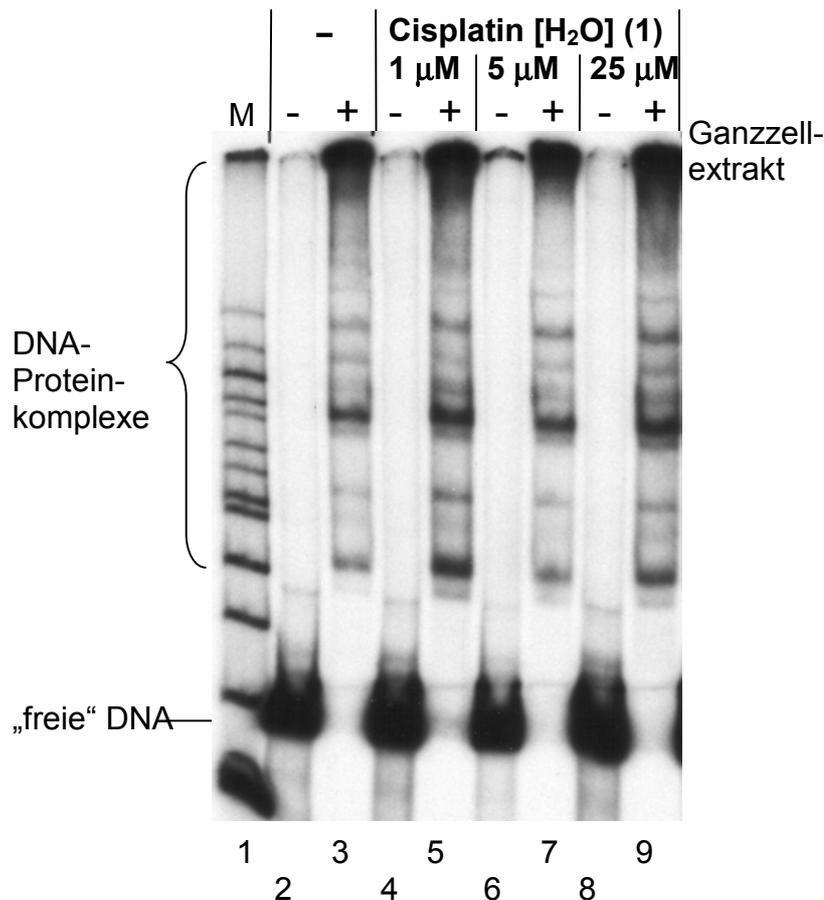


Abb. 51: Autoradiographie eines nativen Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, die mit steigenden Konzentrationen von 1 µM, 5 µM bzw. 25 µM an Cisplatin [H₂O] (1) reagiert hat (Spuren 4 – 9), nach Behandlung mit Puffer bzw. Ganzzelextrakt. Zum Vergleich ist neben dem Längenmarker in Spur 1 unplatinierte DNA, die nur mit Puffer (Spur 2) bzw. zusätzlich mit Ganzzelextrakt behandelt worden ist (Spur 3), aufgetragen.

Die Cisplatin-Addukte an der DNA führen also unter diesen experimentellen Bedingungen zu keiner, in diesem System sichtbaren Veränderung der Proteinbindung an DNA.

Um festzustellen, ob einige der DNA-gebundenen Proteine über Cisplatin (**1**) an die DNA koordinativ gebunden sind, wurde ein Teil der Proben einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese unterworfen.

In Abb. 52 ist die Autoradiographie dieser denaturierenden Polyacrylamidgелеlektrophorese gezeigt.

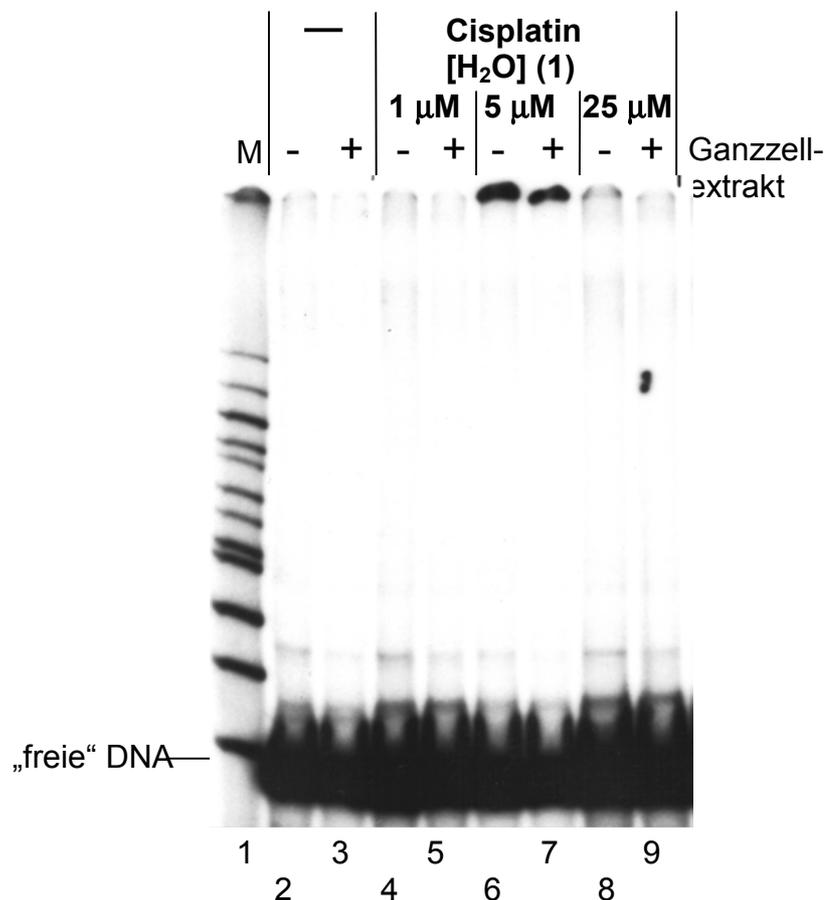


Abb. 52: Autoradiographie eines denaturierenden Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, die mit steigenden Konzentrationen von 1 μM , 5 μM bzw. 25 μM an Cisplatin $[\text{H}_2\text{O}]$ (**1**) reagiert hat (Spuren 4 – 9), nach Behandlung mit Puffer bzw. Ganzzell-extrakt. Zum Vergleich ist neben dem Längenmarker in Spur 1 unplatierte DNA, die nur mit Puffer (Spur 2) bzw. zusätzlich mit Ganzzell-extrakt behandelt worden ist (Spur 3), aufgetragen.

In allen Spuren ist nur freie DNA zu sehen. Keine der in Abb. 51, Seite 130 sichtbaren Banden ist also auf eine koordinative Bindung eines Proteins über Cisplatin (**1**) an die DNA zurückzuführen.

Erhöht man allerdings die Cisplatin-konzentration und verlängert die Reaktionszeit von zehn Minuten auf bis zu 20 Stunden, so treten auch in der denaturierenden Polyacrylamidgелеlektrophorese (Abb. 53, Seite 132) neben der freien DNA zwei zusätzliche Banden auf, die nur bei der Behandlung mit Zellextrakt entstehen (Spuren 7 und 9). Außerdem ist nach einer zwanzigstündigen Plati-

nierung eine Verlangsamung der freien DNA zu beobachten. Wahrscheinlich läuft die DNA aufgrund der positiven Ladungen der Cisplatin-Addukte langsamer (vgl. Kapitel 4.4, Seite 83).

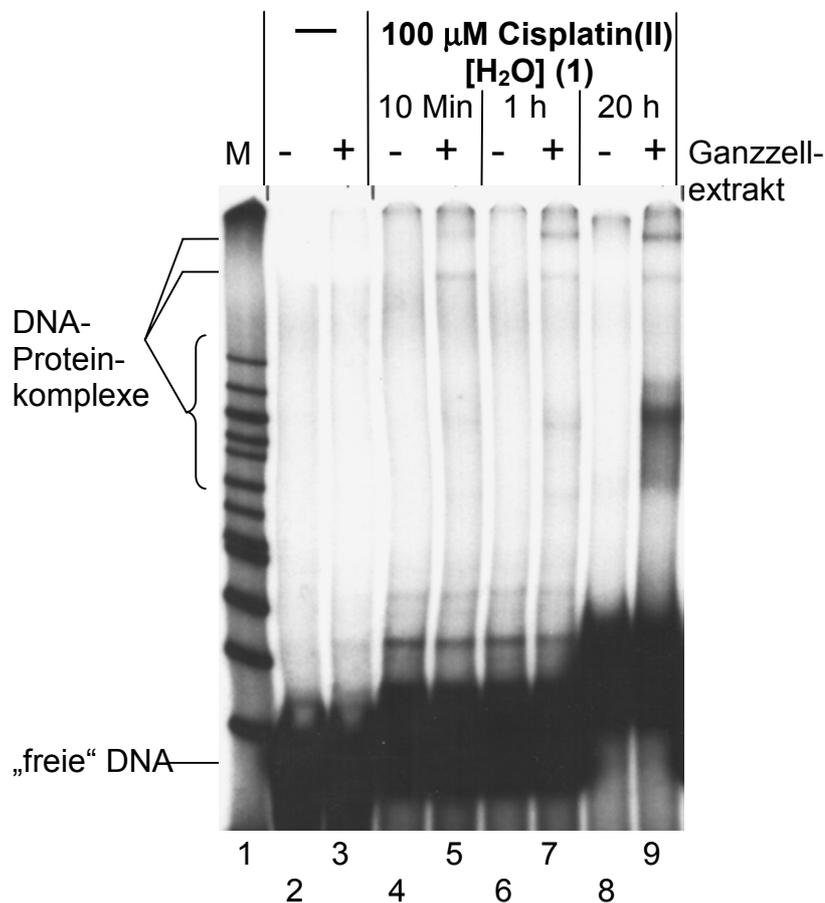


Abb. 53: Autoradiographie eines denaturierenden Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, die für zehn Minuten, eine Stunde bzw. 20 Stunden mit 100 µM Cisplatin [H₂O] (1) reagiert hat, nach Behandlung mit Puffer bzw. Ganzzell-extrakt (Spuren 4 – 9). Zum Vergleich ist neben dem Längenmarker in Spur 1 unplatinierte DNA, die nur mit Puffer (Spur 2) bzw. zusätzlich mit Ganzzell-extrakt behandelt worden ist (Spur 3), aufgetragen.

Cisplatin-Addukte an DNA können Proteine koordinativ quervernetzen, allerdings sind die DNA-Protein-Quervernetzungen nur bei einem hohen Platinierungsgrad zu beobachten.

Das DNA-Fragment wurde unter den gleichen Bedingungen auch mit Cisplatin [DMSO] (1a) und anschließend mit Puffer bzw. Zellextrakt behandelt (Abb. 54, Seite 133). Die Proteinbindung (Spuren 5, 7 und 9) unterscheidet sich in der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese, nicht von ungeschädigter DNA (Spur 3).

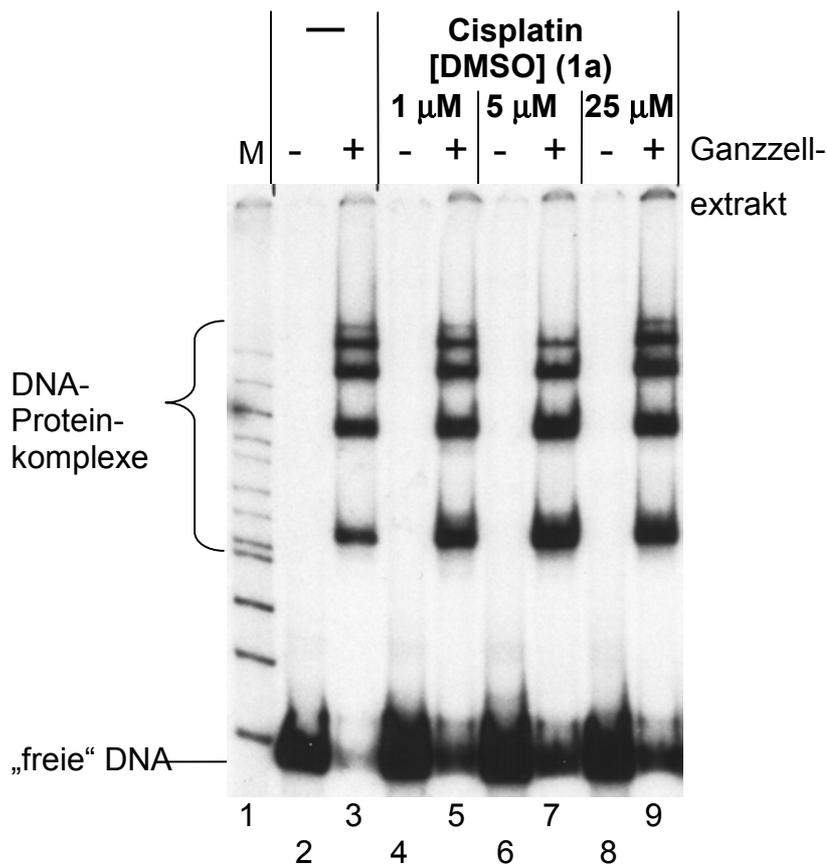


Abb. 54: Autoradiographie eines nativen Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, die mit steigenden Konzentrationen von 1 μM , 5 μM bzw. 25 μM an Cisplatin [DMSO] (**1a**) reagiert hat, nach Behandlung mit Puffer bzw. Ganzzellextrakt (Spuren 4 – 9). Zum Vergleich ist neben dem Längensmarker in Spur 1 unplatinierte DNA, die nur mit Puffer (Spur 2) bzw. zusätzlich mit Ganzzellextrakt behandelt worden ist (Spur 3), aufgetragen.

Nach der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb. 55, Seite 134) tritt für die Cisplatin [DMSO] (**1a**) behandelte DNA schon bei der niedrigsten Cisplatinkonzentration (Spur 5) DNA auf, die mit Protein quervernetzt ist. Diese Bande nimmt mit zunehmender Konzentration von 1 μM (Spur 5) auf 5 μM (Spur 7) zu. Bei 25 μM (Spur 9) wird diese Bande dann wieder etwas schwächer, dafür erscheint aber eine zusätzliche Population von proteinquervernetzter DNA, die allerdings deutlich schneller wandert als der zuerst aufgetretene Komplex. Möglicherweise wurde hier ein anderes Protein gebunden, das entweder deutlich kleiner oder stärker negativ geladen ist.

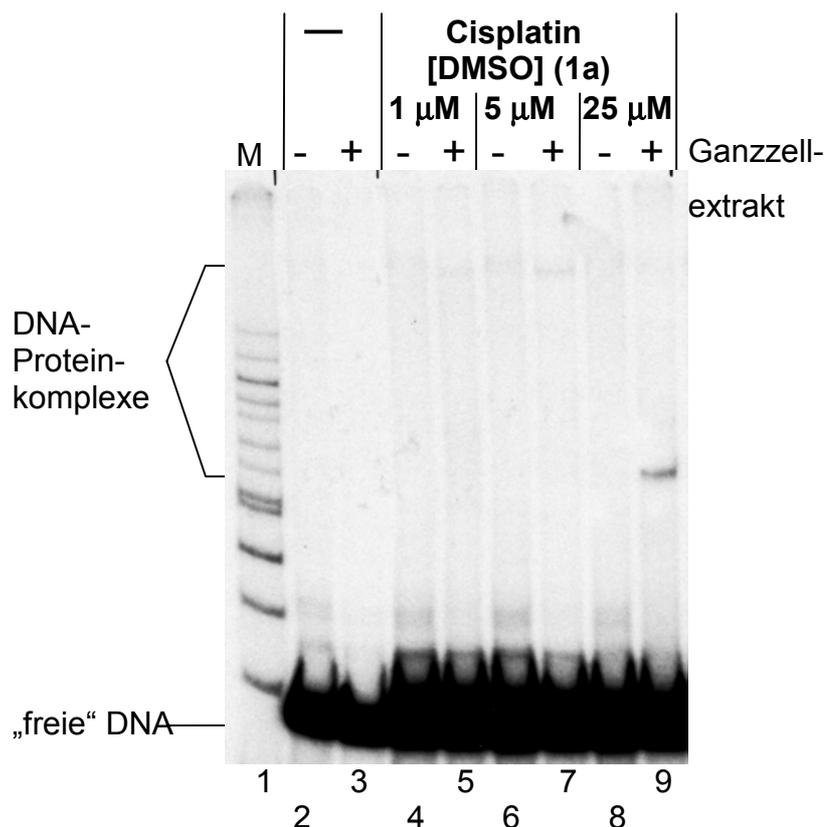


Abb. 55: Autoradiographie eines denaturierenden Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, die mit steigenden Konzentrationen von 1 μM , 5 μM bzw. 25 μM an Cisplatin [DMSO] (**1a**) reagiert hat, nach Behandlung mit Puffer bzw. Ganzzell-extrakt (Spuren 4 - 9). Zum Vergleich ist neben dem Längenmarker in Spur 1 unplatinierte DNA, die nur mit Puffer (Spur 2) bzw. zusätzlich mit Ganzzell-extrakt behandelt worden ist (Spur 3), aufgetragen.

Eine weitere Erhöhung der Cisplatin-Konzentration führte zu einem unlöslichen Präzipitat und die Proben konnten deswegen nicht weiter analysiert werden. Nach der Solvolyse von Cisplatin in DMSO (**1a**) zeigen die Addukte also eine deutliche stärkere Tendenz zur Ausbildung von DNA-Protein-Quervernetzungen als bei Cisplatin [H_2O] (**1**). Dies ist konsistent mit der Vermutung, dass aufgrund der langsameren Reaktionskinetik von Cisplatin [DMSO] (**1a**) mit DNA⁸⁸ mehr Monoaddukte vorhanden sind, die durch den Austausch der zweiten Fluchtgruppe noch ein Protein binden können.

7.2 Bisamid-bisplatin(II) (**8**) führt zu mehr DNA-Proteinverknüpfungen als Cisplatin [H_2O] (**1**) oder Cisplatin [DMSO] (**1a**).

Bisamid-bisplatin(II) (**8**) könnte aufgrund der, im Vergleich zu Cisplatin, doppelten Zahl von Abgangsgruppen auch nach der Bindung an DNA noch eine größere Zahl freier Bindungsstellen aufweisen. Zusätzlich könnte ähnlich wie für

Cisplatin gezeigt, der Austausch eines Chlorids durch DMSO zu stabileren Monoaddukten führen, die später mit Proteinen reagieren könnten. Die Autoradiographie der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb. 56, Seite 135) zeigt für die Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelte DNA (Spuren 5 und 7) ein Bandenmuster, das vergleichbar mit dem der ungeschädigten DNA (Spur 3) ist. Bei der höchsten Konzentration in Spur 9 sind die drei am schnellsten wandernden DNA-Proteinkomplexe nicht mehr zu sehen. Darüber hinaus fällt auf, dass bei der höchsten Konzentration von (**8**) bereits ohne Proteinextrakt zwei zusätzliche, langsamer laufende DNA-Populationen auftreten (Spur 8). Nachdem diese Banden auch nach der Behandlung mit (**8**) ohne Reparaturpuffer beobachtet werden (Daten nicht gezeigt) handelt es sich wahrscheinlich um Veränderungen der DNA-Struktur durch die Platinaddukte an sich.

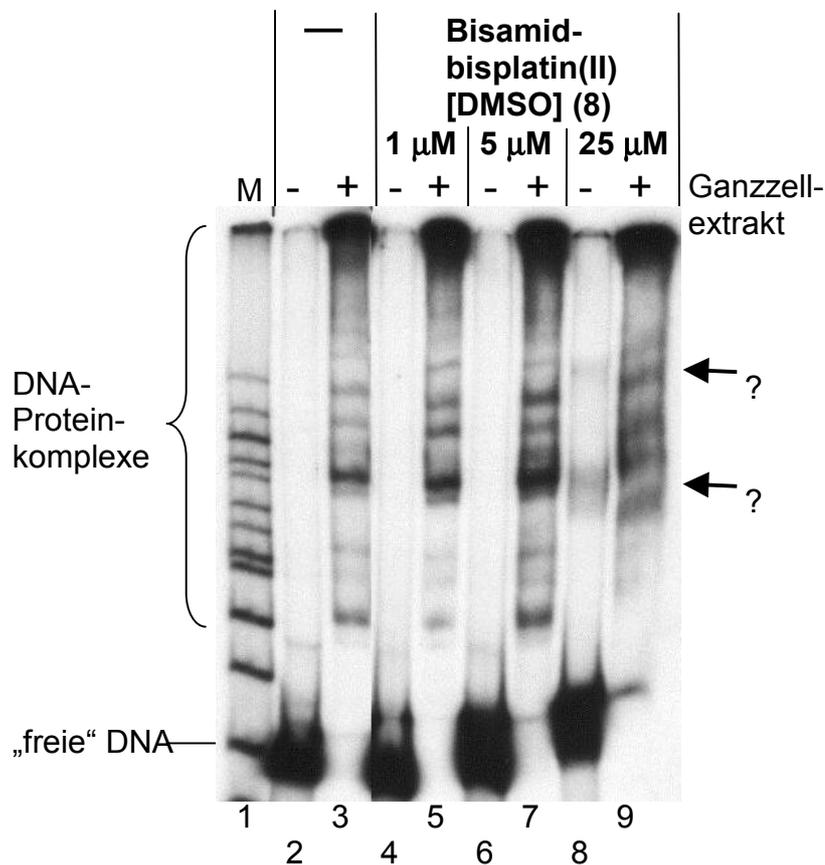


Abb. 56: Autoradiographie eines nativen Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, die mit steigenden Konzentrationen von 1 µM, 5 µM bzw. 25 µM an Bisamid-bisplatin(II) (**8**) reagiert hat, nach Behandlung mit Puffer bzw. Ganzzell-extrakt (Spuren 4 – 9). Zum Vergleich ist neben dem Längenmarker in Spur 1 unplatinierte DNA, die nur mit Puffer (Spur 2) bzw. zusätzlich mit Ganzzell-extrakt behandelt worden ist (Spur 3), aufgetragen.

Die koordinativen DNA-Proteinquervernetzungen werden wieder in der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese sichtbar, deren Autoradiographie in Abb. 57, Seite 136, gezeigt ist.

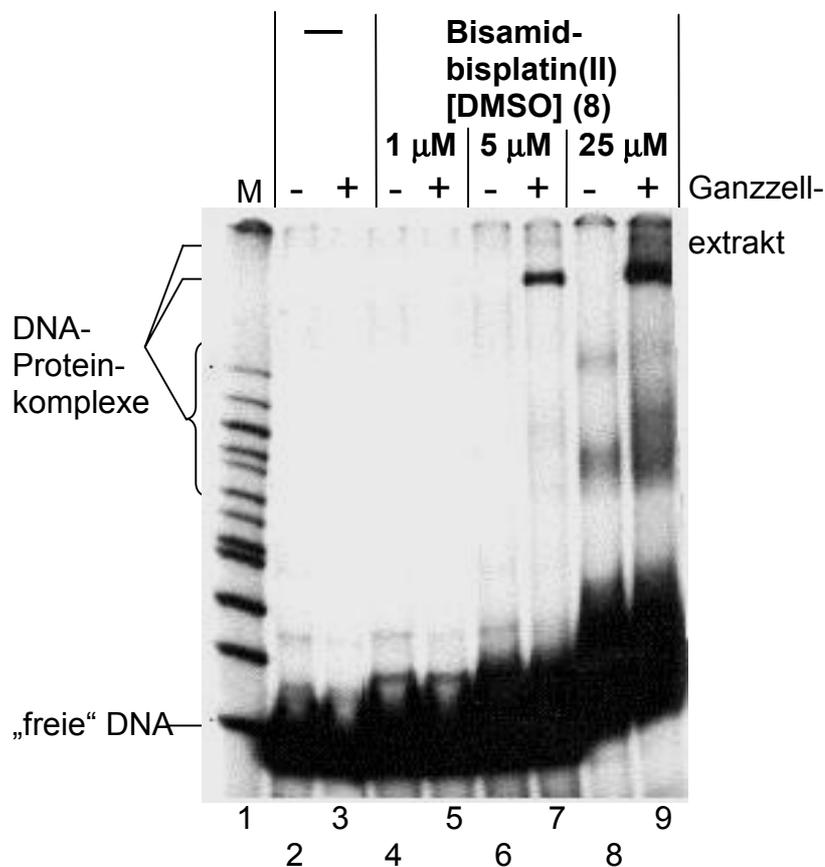


Abb. 57: Autoradiographie eines denaturierenden Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, die mit steigenden Konzentrationen von 1 μM , 5 μM bzw. 25 μM an Bisamid-bisplatin(II) (**8**) reagiert hat, nach Behandlung mit Puffer bzw. Ganzzell-extrakt (Spuren 4 – 9). Zum Vergleich ist neben dem Längenmarker in Spur 1 unplatinierte DNA, die nur mit Puffer (Spur 2) bzw. zusätzlich mit Ganzzell-extrakt behandelt worden ist (Spur 3), aufgetragen.

Für die platinieren Proben ist neben der freien DNA zum Einen wieder eine diskrete Bande zu sehen, die mit zunehmender Platinkonzentration in den Spuren 7 und 9 stark zunimmt. Diese Banden sind stärker als bei Cisplatin [DMSO] (**1a**) und damit auch stärker als bei Cisplatin [H_2O] (**1**). Außerdem bewegt sich die platinierter „freie“ DNA aufgrund der zusätzlichen positiven Ladungen durch die Platinaddukte in der Gelelektrophorese zunehmend langsamer als die ungeschädigte DNA. Daneben treten bei 25 μM sowohl in der Kontrolle, als auch in der Probe, die mit Extrakt behandelt worden ist, wieder zwei, weniger klar einzugrenzende DNA-Populationen auf, die schon im nativen Gel (Abb. 56, Seite 135) aufgetreten sind.

Um den Einfluß der Proteinkonzentration aufzuklären, wurde ungeschädigte und mit 5 μ M Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelte DNA mit steigenden Mengen Ganzzellextrakt behandelt. In der Autoradiographie der nativen Polyacrylamid-gelelektrophorese (Abb. 58, Seite 138) sieht man rechts neben dem Marker das ungeschädigte DNA-Fragment. In den weiter folgenden Spuren 3 bis 7 wurde das gleiche Fragment mit steigenden Proteinmengen behandelt. Dabei tritt zuerst nur eine zusätzlich Bande auf (Spur 3), diese wird stärker und es kommen noch zwei weitere hinzu (Spur 4). Eine weitere Verfünffachung der Proteinmenge führt zu zwei weiteren Banden, die schon vorher vorhandenen Banden werden dafür schwächer. Noch mehr Extrakt führt dazu, dass alle vorhandenen DNA-Moleküle mit Proteinen assoziiert sind, also keine freie DNA mehr vorhanden ist (Spur 6). Außerdem bilden sich immer umfangreichere, langsamere Protein-DNA-Komplexe, bis diese nicht mehr in das Gel einlaufen (Spur 7). Die rechte Seite des Gels zeigt den analogen Versuch, aber mit dem DNA-Fragment, das mit Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelt worden war. Das Bandenmuster, das mit Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelte DNA auftritt, gleicht dem gerade besprochenen Bandenmuster der unplatinierten DNA auf der linken Seite. Aufgrund der Vielzahl DNA-bindender Proteine sind auch hier keine DNA-Proteinkomplexe erkennbar, die spezifisch für die Platinaddukte wären. Deswegen werden für alle folgenden Verbindungen nur die Autoradiographien der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophoresen gezeigt und diskutiert.

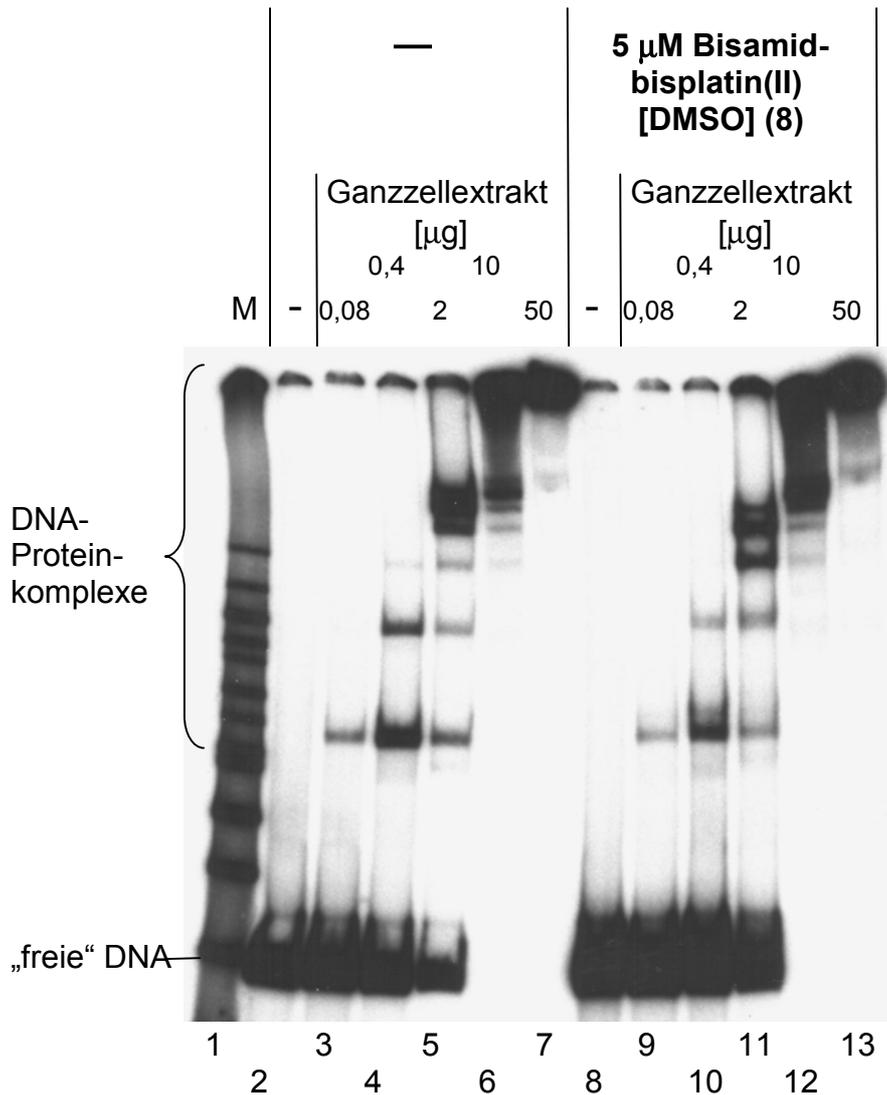


Abb. 58: Autoradiographie eines nativen Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, nach Behandlung mit Puffer (Spur 2) bzw. 0,08 µg, 0,4 µg, 2 µg, 10 µg und 50 µg Proteinmenge des Ganzzellextrakts (Spuren 3 – 7). Auf der rechten Seite wurde die DNA zuerst mit 5 µM Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelt und dann ebenfalls mit Puffer (Spur 8) bzw. steigenden Proteinmengen des Ganzzellextrakts inkubiert (Spuren 9 - 13). Ganz links in Spur 1 ist ein Längenmarker aufgetragen.

In der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb. 59, Seite 139) finden sich für die ungeschädigte DNA keine DNA-Proteinkomplexe mehr (Spuren 2 - 7), wohl aber für die Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelte DNA (Spuren 8 - 13). Dieselbe Bande, die schon im denaturierenden Gel in Abb. 57, Seite 136, zu sehen war, tritt auch hier ab einer Proteinmenge von 2 µg auf, nimmt bei 10 µg zu und bleibt dann bei 50 µg unverändert. Zwischen dieser Bande und der freien DNA ist bei der höchsten Proteinkonzentration wieder eine breite, wenig klare Bande zu erkennen

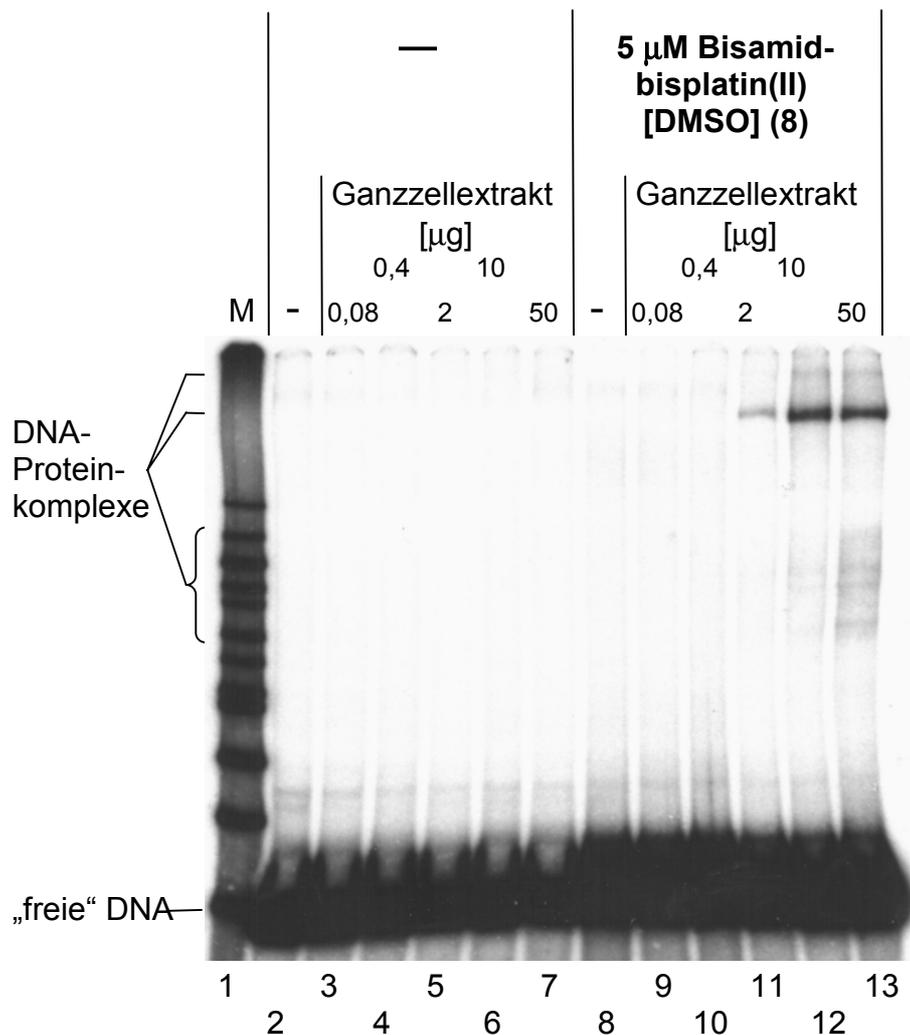


Abb. 59: Autoradiographie eines denaturierenden Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, nach Behandlung mit Puffer (Spur 2) bzw. 0,08 µg, 0,4 µg, 2 µg, 10 µg und 50 µg Proteinmenge des Ganzzelextrakts (Spuren 3 – 7). Auf der rechten Seite wurde die DNA zuerst mit 5 µM Bisamid-bisplatin(II) (**8**) behandelt und dann ebenfalls mit Puffer (Spur 8) bzw. steigenden Proteinmengen des Ganzzelextrakts inkubiert (Spuren 9 - 13). Ganz links in Spur 1 ist ein Längenmarker aufgetragen.

Bisamid-bisplatin(II) (**8**) bildet mehr DNA-Addukte aus, die Proteine quervernetzen können als Cisplatin [H₂O] (**1**) oder Cisplatin [DMSO] (**1a**). Offenbar spielt dabei nicht nur die Ausbildung von stabileren Monoaddukten nach DMSO-Solvolyse eine Rolle, sondern auch die größere Zahl der Abgangsgruppen in Bisamid-bisplatin(II) (**8**).

7.3 Die Bisplatin(IV)-Verbindung (9) vernetzt mehr Proteine mit DNA als die Monoplatin(IV)-Verbindung (10).

Die vermehrte Ausbildung von DNA-Proteinequervernetzungen durch Bisamid-bisplatin(II) (**8**) legt die Vermutung nahe, dass die größere Zahl der Bindungsstellen dafür verantwortlich sein könnte (Kapitel 7.2, Seite 134). Die Platin(IV)-Verbindungen eröffnen die Möglichkeit, diese These durch den direkten Vergleich einer Mono- mit einer Bisplatinverbindung zu überprüfen. Außerdem soll der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluß die oktaedrische Koordination von Platin(IV)-Komplexen auf die Ausbildung von DNA-Protein-Quervernetzungen hat.

Nach der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb. 60) ist kaum ein Unterschied zwischen ungeschädigter DNA (Spur 3) und DNA, die zuvor mit Monoamid-monoplatin(IV) (**10**) reagiert hatte (Spuren 4 – 9), auszumachen. Praktisch alle gebundenen Proteine sind abdissoziiert, lediglich nach der Behandlung des DNA-Fragments mit 25 μM Monoamid-monoplatin(IV) (**10**) ist wenig DNA-Proteinkomplex zu sehen. Die Retardation ist dabei mit der zusätzlichen Bande, die nach Behandlung mit 25 μM Cisplatin [DMSO] (**1a**) auftritt (Abb. 56, Seite 134), vergleichbar.

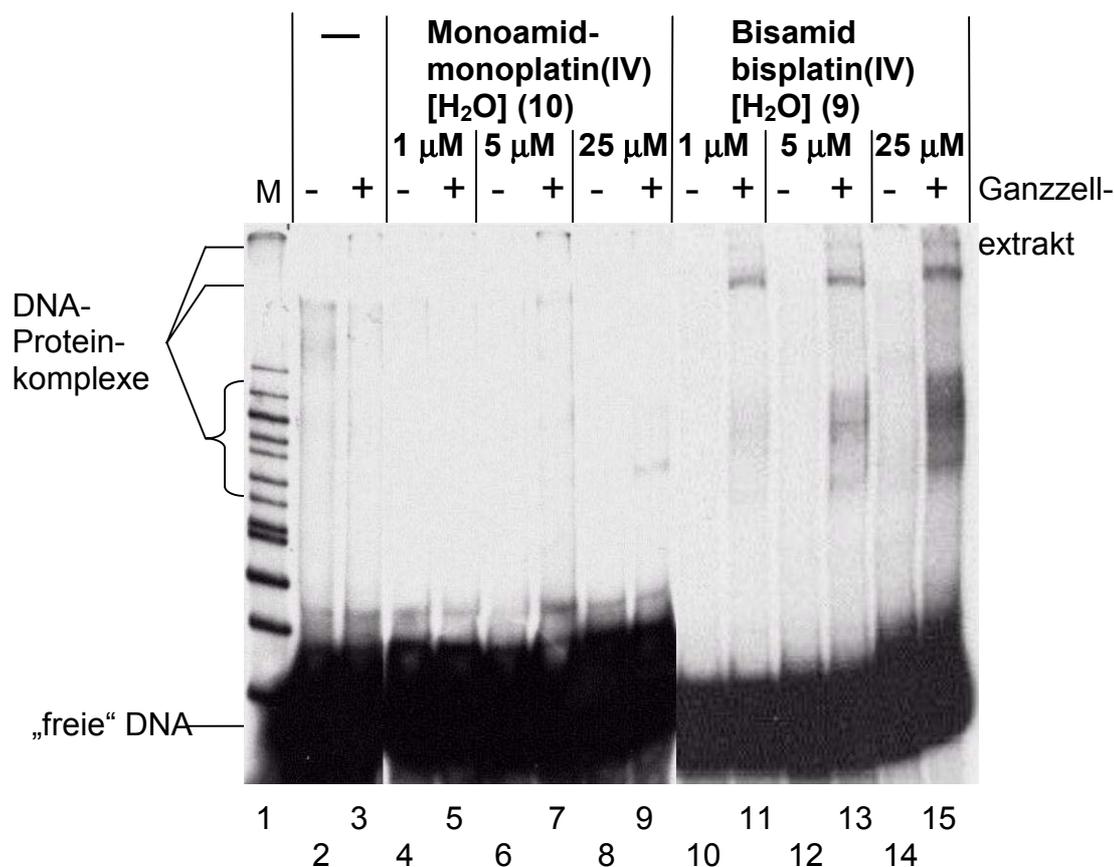


Abb. 60: Autoradiographie eines denaturierenden Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, die mit steigenden Konzentrationen von 1 μM , 5 μM bzw. 25 μM an Monoamid-monoplatin(IV) (**10**) (Spuren 4 – 9) bzw. Bisamid-bisplatin(IV) (**9**) (Spuren 10 – 15) reagiert hat, nach Behandlung mit Puffer bzw. Ganzzellextrakt. Zum Vergleich ist neben dem Längsmarker in Spur 1 unplatinierte DNA, die nur mit Puffer (Spur 2) bzw. zusätzlich mit Ganzzellextrakt behandelt worden ist (Spur 3), aufgetragen.

Dagegen ist für Bisamid-bisplatin(IV) (**9**) schon bei einer Konzentration von 1 μM in der denaturierenden Gelelektrophorese (Abb. 60, Seite 141) eine deutlich Bande des DNA-Fragments zu sehen (Spur 11), welches über Platinaddukte mit Protein verbunden ist. Zwischen dieser Bande und der freien DNA tritt auch wieder die breite, wenig scharfe Bande auf. Dieser Schmier nimmt mit

steigender Platinkonzentration zu, wohingegen die langsamere Bande sich praktisch nicht verändert (Spuren 13 und 15).

Die Bisplatin(IV)-Verbindung (**9**), die über doppelt so viele austauschbare Liganden verfügt wie die analoge Monoplatin(IV)-Verbindung (**10**), führt also zu deutlich mehr DNA-Proteinquervernetzungen. Vergleicht man die mononukleare Platin(IV)-Verbindung (**10**) mit Cisplatin, so liegt die Kapazität, DNA mit Proteinen zu vernetzen, zwischen der von Cisplatin [H_2O] (**1**), das zu weniger DNA-Proteinquervernetzungen führt und der von Cisplatin [DMSO] (**1a**), welches mehr DNA-Proteinkomplexe erzeugt. Das heißt, dass die oktaedrische Koordination in Platin(IV)-Komplexen, im Vergleich zu wasserlöslichen Platin(II)-Komplexen, die koordinative Bindung von Proteinen an DNA begünstigt.

7.4 Die Fähigkeit, DNA mit Proteinen zu vernetzen, ist bei den Alkyl-bis-ethyldiaminplatin(II)-Verbindungen (11**), (**12**), (**13**) und (**14**) direkt proportional zur Länge der verbindenden Alkylkette.**

Wie schon für die Ausbildung von Interstrangverknüpfungen besprochen (Kapitel 5.4, Seite 102) beeinflusst die Länge der verbindenden Alkylkette den Aktionsradius der zweiten Platinsphären, nachdem sich ein Monoaddukt an der DNA ausgebildet hat. Welchen Einfluß die Alkylkettenlänge auf die Quervernetzung von Proteinen an DNA-Addukte der Alkyl-bis-ethyldiaminplatin(II)-Verbindungen [(**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] hat, zeigt folgende Versuchsreihe.

In der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb. 61, Seite 143) finden sich für die niedrigste Konzentration Hexyl-bis-ethyldiamin-platin(II) (**11**) keine koordinativ verknüpften DNA-Proteinkomplexe (Spur 5). Ebenso wie für die ungeschädigte DNA (Spur 3) ist nur die eine Bande der freien DNA zu sehen. Eine Erhöhung der Hexyl-bis-ethyldiamin-platin(II)-Konzentration um den Faktor fünf führt zu einer schwachen DNA-Proteinkomplexbande (Spur 7). Eine weitere Verfünffachung der Konzentration verstärkt diese Bande und ergibt zusätzlich eine breitere, weniger klare Bande, die schon mehrmals beobachtet wurde (Spur 9). Hexyl-bis-ethyldiamin-platin(II) (**11**) bildet also nur geringfügig koordinative DNA-Proteinkomplexe aus.

Die Verlängerung der verbindenden Alkylkette um zwei Methylengruppen verändert die Eigenschaften des Komplexes so, dass schon die Behandlung des DNA-Fragments mit 1 μ M Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**12**) zu einem Bandenmuster führt (Spur 11), welches dem ähnlich ist, das mit 25 μ M (**11**) entsteht (Spur 9). Konzentrationserhöhungen haben eine Intensivierung dieser Banden zur Folge (Spuren 13 und 15). Außerdem kann man eine weitere Bande von noch langsameren DNA-Proteinkomplexen sehen. Dabei könnte es sich um ein DNA-Fragment mit zwei Proteinen handeln, die mit der DNA quervernetzt sind. Darüber hinaus ist der nach oben gezogene Schmier der freien DNA erneut ein Hinweis auf positiv geladenen Addukte, die die DNA in der Elektrophorese abbremsen (vgl. Kapitel 4.4, Seite 83, bzw. Kapitel 4.6, Seite 90).

Decyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**13**) enthält eine, im Vergleich zu (**12**), um zwei weitere Methylengruppen verlängerte Alkylkette. Im Vergleich zu dem DNA Fragment, das mit (**12**) behandelt worden ist (Spuren 10 – 15), ist für Decyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**13**) (Spuren 16 - 21) nur ein geringer Unterschied auszumachen (Abb. 61, Seite 143). Es finden sich für alle Konzentrationen eine scharfe, langsame Bande, eine schwache Bande von noch weiter zurückbleibenden DNA-Proteinkomplexen und zwischen diesen Banden und der freien DNA noch die weniger klar eingrenzbar Bande. Diese Banden werden mit zunehmender Konzentration von (**13**) etwas intensiver. Der einzige deutliche Unterschied zu Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**12**) besteht aber in der noch stärkeren Retardation der freien DNA nach Behandlung mit 25 μ M (**13**) (Spur 9).

Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**14**) mit der längsten Alkylkette weist bei einer Konzentration von 1 μ M (Spur 23), im Vergleich zu gleichen Konzentrationen der anderen Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (**11**), (**12**) und (**13**), die meisten DNA-Proteinquervernetzungen auf (Abb. 61, Seite 143). Die scharfe, langsame Bande und eine schwache Bande von noch weiter zurückbleibenden DNA-Proteinkomplexen sind deutlich zu sehen. Auch eine weniger klare Bande, die zwischen der scharfen DNA-Proteinbande und der freien DNA läuft, ist schwach zu sehen. Eine Erhöhung der Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Konzentration verstärkt vor allem diese Bande, wohingegen die anderen beiden Banden praktisch unverändert bleiben (Spuren 25 und 27). Dodecyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (**14**) führt außerdem zur stärksten Retardation der nicht proteingebundenen DNA durch positive Ladungen.

Die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen [(**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] bilden mehr koordinative DNA-Proteinverbindungen aus als Cisplatin [H₂O] (**1**) und sogar als als Cisplatin [DMSO] (**1a**). Dabei werden mit zunehmender Länge der verbindenden Alkylkette mehr Proteine an die DNA gebunden.

7.5 Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (15**) bildet weniger DNA-Protein-komplexe aus als die analogen Bisplatinverbindungen (**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)**

Die Untersuchung der DNA-Proteinquervernetzungen von Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (**15**) kann zur Unterscheidung des Einflusses der lipophilen Alkylkette bzw. der Verknüpfung zweier Platinsphären über einen gemeinsamen Liganden auf die koordinative Bindung von Proteinen herangezogen werden. Wie schon die Monoplatin(IV)-Verbindung in Kapitel 7.3, Seite 140, führt auch die Monoplatin(II)-verbindung (**15**) bei geringen Konzentrationen zu keinen koordinativen DNA-Proteinvernetzungen (Spuren 2 – 7, Abb. 62, Seite 146). Erst eine Konzentration von 25 µM führt zu DNA-Proteinkomplexen, die sich wieder als eine deutliche Bande und eine breitere, weniger klare Bande manifestieren (Spur 9).

7.6 Es konnten keine DNA-Proteinquervernetzungen durch Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) nachgewiesen werden

Der sterisch anspruchsvolle Ligand in Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) schränkt die Bewegungsfreiheit der Monoaddukte und damit den Zugang möglicher Nukleophile zum zentralen Platinatom ein. Um festzustellen, ob dadurch die Reaktion mit einer weiteren DNA-Base oder mit Proteinen verlangsamt wird, wurde in einer denaturierenden Polyacrylamidgelselektrophorese die koordinative Bindung von Proteinen an DNA-Addukte von (**16**) untersucht (Abb. 63).

Dabei findet sich kein Unterschied zwischen Kontrolle (Spur 3) und mit Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) geschädigter DNA (Spuren 5, 7 und 9). In allen Spuren gibt es nur die Bande der freien DNA. Demzufolge gibt es in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 1 bis 25 μM keine DNA-Proteinquervernetzungen über Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**).

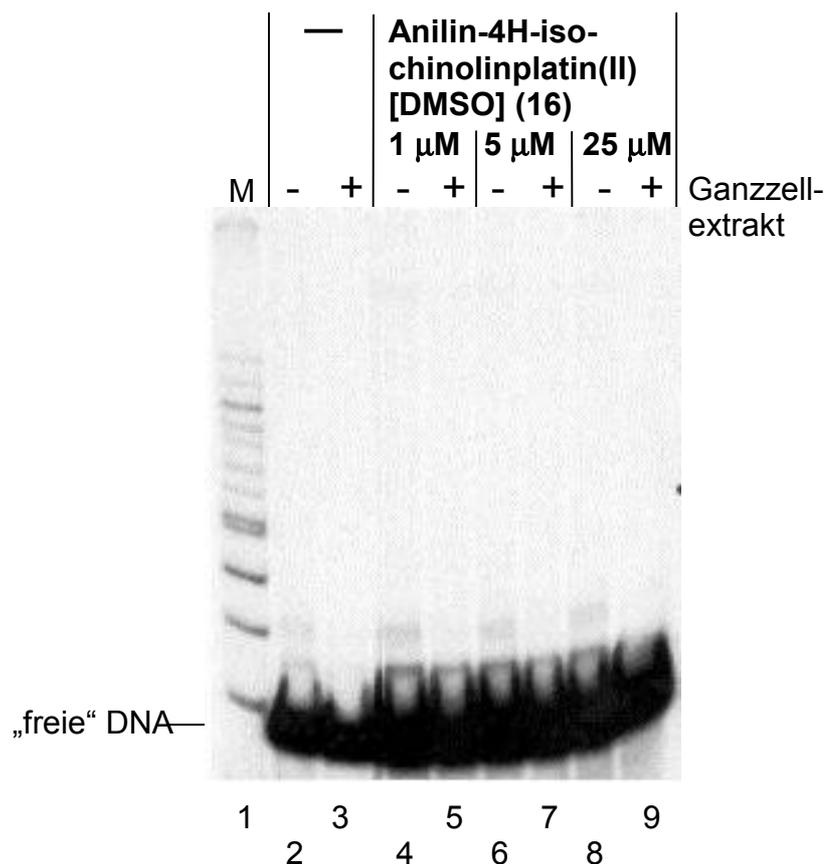


Abb. 63: Autoradiographie eines denaturierenden Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, die mit steigenden Konzentrationen von 1 μM , 5 μM bzw. 25 μM an Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) reagiert hat, nach Behandlung mit Puffer bzw. Ganzzell-extrakt (Spuren 4 – 9). Zum Vergleich ist neben dem Längenmarker in Spur 1 unplatinierte DNA, die nur mit Puffer (Spur 2) bzw. zusätzlich mit Ganzzell-extrakt behandelt worden ist (Spur 3), aufgetragen.

Es ist aber durchaus möglich, dass eine Verlängerung der Reaktion zwischen dem DNA-Fragment und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**), wie schon bei Cisplatin (H_2O) (**1**) (Kapitel 7.1, Seite 129), zu Addukten führt, die Proteine koordinativ binden können. Deswegen wurde das DNA-Fragment für zehn Minuten, eine Stunde und 20 Stunden mit $100\ \mu\text{M}$ (**16**) behandelt. Die denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese nach der Behandlung mit Zellextrakt in Abb. 64 zeigt jedoch, dass trotz der hohen Konzentration an (**16**) und der langen Reaktionszeit keine zusätzlichen Banden von DNA-Proteinkomplexe auftreten.

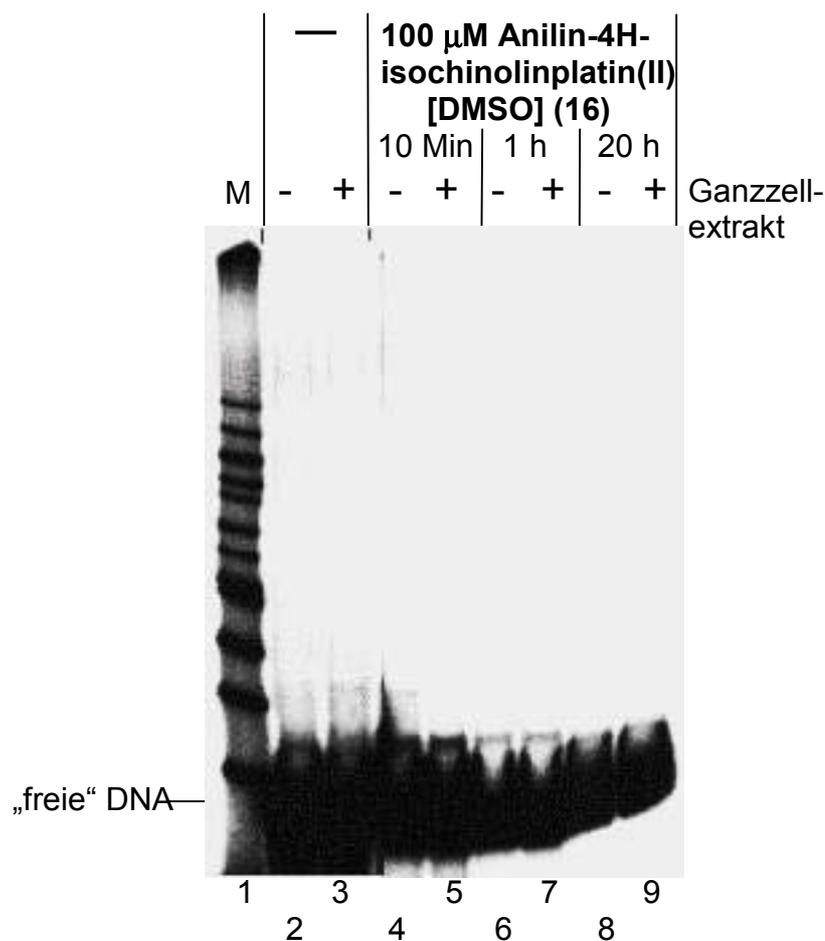


Abb. 64: Autoradiographie eines denaturierenden Polyacrylamidgels nach der Elektrophorese von DNA, die für zehn Minuten, eine Stunde bzw. 20 Stunden mit $100\ \mu\text{M}$ Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) reagiert hat, nach Behandlung mit Puffer bzw. Ganzzell-extrakt (Spuren 4 – 9). Zum Vergleich ist neben dem Längsmarker in Spur 1 unplatinierte DNA, die nur mit Puffer (Spur 2) bzw. zusätzlich mit Ganzzell-extrakt behandelt worden ist (Spur 3), aufgetragen.

Damit ist Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) die einzige der untersuchten Verbindungen, die keine Addukte an DNA ausbildet, die Proteine koordinativ binden können.

Vergleicht man die Laufeigenschaften der koordinativen DNA-Proteinkomplexe, so findet man eine erstaunliche Übereinstimmung. Dies legt den Schluß nahe,

dass es sich bei den gebundenen Proteinen jeweils um die gleichen Proteine handelt. Dies würde weiterhin bedeuten, dass die unterschiedlichen Platinaddukte der verschiedenen Verbindungen von dem gleichen Protein erkannt und gebunden werden. Dabei muß es sich um eine spezifische Wechselwirkung handeln, da denaturierte Protein zu keinen koordinativen DNA-Proteinkomplexe führen (Daten nicht gezeigt).

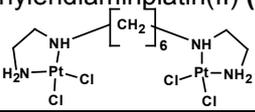
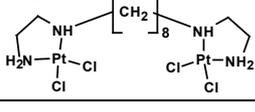
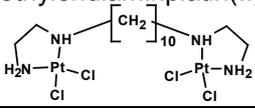
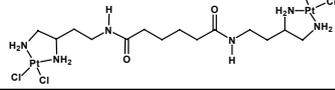
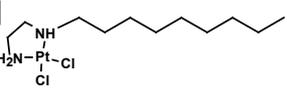
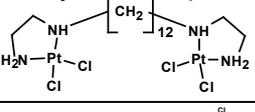
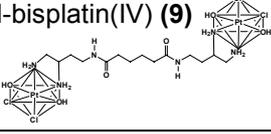
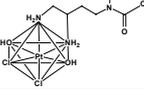
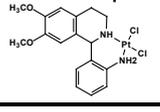
Insgesamt bilden Monoplatinverbindungen weniger Addukte aus, die Proteine koordinativ binden können, als Bisplatinverbindungen. Die Solvolyse in DMSO erhöht die Zahl der DNA-Protein-Quervernetzungen. Die Platin(IV)-Verbindungen **(9)** und **(10)** lassen sich zwischen Cisplatin [H₂O] **(1)** und Cisplatin [DMSO] **(1a)** einordnen. Der sterisch anspruchsvolle Ligand in Anilin-4H-isochinolinplatin(II) **(16)** scheint dagegen die Ausbildung solcher koordinativer DNA-Protein-Bindungen vollständig zu verhindern.

Es fällt dabei weiter auf, dass Komplexe, die viele solche Addukte ausbilden, weniger cytotoxisch zu sein scheinen (vgl. Kaptiel 1, Seite 57). Zu dieser Gruppe gehört Cisplatin [DMSO] **(1a)** und alle untersuchten Bisplatinverbindungen **(8)**, **(9)**, **(11)**, **(12)**, **(13)** und **(14)**. Allerdings nimmt in der Gruppe der Alkylbis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen **(11)**, **(12)**, **(13)** und **(14)** sowohl die Cytotoxizität als auch die Fähigkeit, Addukte auszubilden, die DNA mit Proteinen vernetzen, mit der Länge der verbindenden Alkylkette zu. Falls die Fähigkeit, koordinative DNA-Proteinkomplexe auszubilden umgekehrt proportional zu der Cytotoxizität der Platinverbindung ist, muß also hier eine weitere Eigenschaft der Verbindungen die Konsequenzen dieser DNA-Proteinkomplexe mehr als kompensieren. Es ist z.B. denkbar, dass die Bisplatinverbindungen **(11)**, **(12)**, **(13)** und **(14)** auch andere zelluläre Prozesse wie die Transkription oder die Translation beeinflussen.

Komplexe, die am wenigsten oder überhaupt keine koordinativen DNA-Proteinkomplexe ausbilden (Cisplatin [H₂O] **(1)** bzw. Anilin-4H-isochinolinplatin(II) **(16)**), sind am cytotoxischten. Zu dieser Gruppe lassen sich auch die etwas weniger cytotoxischen Verbindungen Monoamid-monoplatin(IV) **(10)** und Nonylethylen-diaminplatin(II) **(15)** zählen.

8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind schematisch in Tabelle 6, Seite 150f zusammengefasst.

Verbindung [Lösungsmittel]	IC ₅₀ der Cyto- toxizität [μM]	Platinatome pro Zelle bei einer Ausgangs- konzentration von			r _B -Wert bei einer Ausgangs- konzentration von		
		0,1 μM	1 μM	10 μM	0,1 μM	1 μM	10 μM
Hexylbisethylendiaminplatin(II) (11) [DMSO] 	> 1000 [♦]	+	++	+++	+	++	+++
Cisplatin (1a) [DMSO] 	> 100 389 [♦]	++	++	++++	+++	+++	+++
Octyl-bisethylendiaminplatin(II) (12) [DMSO] 	369 [♦]	+++	+++	+++	++	++	+++
Decyl-bisethylendiaminplatin(II) (13) [DMSO] 	124 [♦]	+	++	+++	++	+++	+++
Bisamid-bisplatin(II) (8) [DMSO] 	105	++	+++	++++	+++	+++	+++
Nonylethyl-endiaminplatin(II) (15) [DMSO] 	43 [♦]	++	+++	++++	+	++	+++
Dodecylbisethylendiaminplatin(II) (14) [DMSO] 	42 [♦]	++	++++	+++++	+	+++	+++
Bisamid-bisplatin(IV) (9) [H ₂ O] 	36	++	+++	++++	++	+++	+++
Monoamid-mono-platin(IV) (10) [H ₂ O] 	24	++	+++	++++	++	+++	+++
Cisplatin (1) [H ₂ O] 	1,4 6,9 [♦]	++	+++	+++++	++	+++	+++
Anilin-4H-isochinolin-platin(II) (16) [DMSO] 	0,88	++	+++	+++++	++	+++	+++

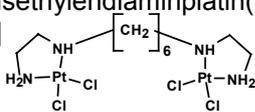
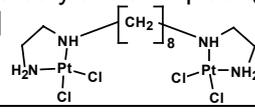
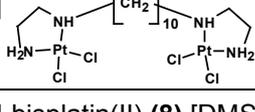
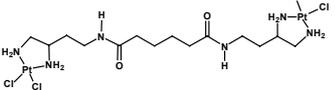
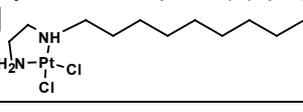
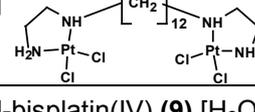
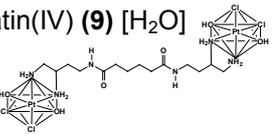
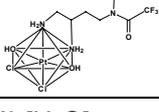
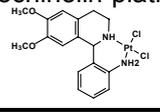
Verbindung [Lösungsmittel]	DNA-Sekundärstrukturveränderungen			Interstrangverknüpfungen	DNA-Proteinquervernetzung
	Aufdrillen	Biegung	Strangbrüche		
Hexyl bisethylendiaminplatin(II) (11) [DMSO] 	+++	+++	-	+++	+++
Cisplatin (1a) [DMSO] 	+	+	-	+	++
Octyl-bis-ethylendiaminplatin(II) (12) [DMSO] 	+++	-	-	+++	++++
Decyl-bisethylendiaminplatin(II) (13) [DMSO] 	++++	-	-	++++	++++
Bisamid-bisplatin(II) (8) [DMSO] 	++	-	-	+++	++++
Nonylethyl-endiamin-platin(II) (15) [DMSO] 	++	+++	-	++	++
Dodecylbisethylendiaminplatin(II) (14) [DMSO] 	++++	-	-	++++	++++
Bisamid-bisplatin(IV) (9) [H2O] 	+	+	++	++	++++
Monoamid-mono-platin(IV) (10) [H2O] 	+	++	+	++	++
Cisplatin (1) [H2O] 	+++	+++	-	++	+
Anilin-4H-isochinolin-platin(II) (16) [DMSO] 	+	+	-	+	-

Tabelle 6: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse. Die Verbindungen sind nach steigender Cytotoxizität geordnet. Mit * markierte IC₅₀-Werte wurden kolorimetrisch bestimmt, die übrigen Werte durch Zellzählung.
(Fortsetzung nächste Seite)

Fortsetzung der Beschriftung zu Tabelle 6

Ein Minuszeichen bedeutet, dass dieser Effekt innerhalb des untersuchten Bereichs nicht beobachtet wurde, wohingegen n. d. (nicht detektierbar) bedeutet, dass die Angaben sich nicht bestimmen ließen, weil andere Effekte die zu beobachtende Größe maskieren. Die Zahl der Pluszeichen symbolisiert die Stärke des Effekts relativ zu den anderen Verbindungen.

Tendenziell werden die cytotoxischeren Verbindungen vermehrt in die Zellen aufgenommen und führen auch zu mehr Addukten an der zellulären DNA aus. Dabei sind bei verschiedenen Konzentrationen im Medium die Unterschiede in der Zellaufnahme größer als in der Zahl der Addukte.

Die Addukte an DNA erzeugen verschiedene DNA-Sekundärstrukturveränderungen. Die Fähigkeit, DNA aufzudrillen ist nur bei den Bisplatin(II)-Verbindungen **(8)**, **(11)**, **(12)**, **(13)** und **(14)** mit Cisplatin [H₂O] **(1)** vergleichbar oder sogar noch stärker ausgeprägt. Der Vergleich mit einer analogen Monoplatin(II)-Verbindung **(15)** zeigt, dass dabei bifunktionale Addukte, die über den Alkyliganden vermittelt sind, eine große Rolle spielen. Dafür führen die Bisplatin-komplexe **(8)**, **(11)**, **(12)**, **(13)** und **(14)** zu weniger Biegungen der DNA, die die DNA verkürzen. Die schwächsten DNA-Sekundärstrukturveränderungen wurden mit Anilin-4H-isochinolinplatin(II) **(16)** beobachtet. Die Platin(IV)-Komplexe müssen als eigenständige Klasse eingeordnet werden, da es die einzigen der untersuchten Verbindungen sind, die DNA-Strangbrüche erzeugen.

Bei den tetrafunktionalen Bisplatin(II)-Verbindungen **(8)**, **(11)**, **(12)**, **(13)** und **(14)** ist auch die Fähigkeit, komplementäre DNA-Stränge einer Helix über ein Platinaddukt zu verknüpfen, besonders stark ausgeprägt. Oxidation zu Platin(IV), DMSO-Solvolyse und sterisch anspruchsvolle Liganden wie in **(16)** verlangsamten dagegen die Ausbildung von Interstrangverknüpfungen.

Ein ähnlicher Zusammenhang ergibt sich für die Ausbildung von DNA-Proteinquervernetzungen. Verbindungen, die nicht vollständig abgesättigte Addukte erzeugen - entweder durch eine verlangsamte Weiterreaktion von Monoaddukte, wie für Cisplatin [DMSO] **(1a)** und **(10)**, oder durch eine größere Zahl von Fluchtgruppen, wie in den Bisplatinverbindungen **(8)**, **(9)**, **(11)**, **(12)**, **(13)** und **(14)** - bilden auch die meisten koordinativen Bindungen zu Proteinen aus.

Diskussion der Ergebnisse

1 Cytotoxizitätstest und Untersuchung der DNA-Synthese

Cytotoxizitätstests dienen als Anhaltspunkt, ob die untersuchten Verbindungen gegen Krebszellen wirksam sind. Die Verwendung von etablierten Zelllinien ermöglicht es, die ermittelten Cytotoxizitätsdaten untereinander und auch mit Literaturwerten zu vergleichen. Cisplatin (**1**) diente für alle Versuche als Referenz- und Vergleichsverbindung. Von einigen Arbeitsgruppen wurden für L1210-Zellen IC_{50} -Werte von $0,22 \mu M^{97}$, $0,23 (\pm 0,05) \mu M^{98}$, oder $0,33 \mu M^{99}$ veröffentlicht. Im Vergleich dazu erscheint der von uns gefundene Wert von $1,4 (\pm 0,2) \mu M$ bzw. auch Literaturwerte von $0,8 \mu M^{100}$ und $1,5 \mu M^{101}$ sehr hoch zu sein. *Vilpo et al.*¹⁰² konnten jedoch zeigen, dass L1210 Sublinien existieren, die aufgrund eines XPG DNA Reparaturdefekts eine erhöhte Sensitivität gegen Mutagenese aufweisen. Für die sensitiven L1210 Sublinien fanden sie einen IC_{50} -Wert von $0,16 \mu M$. Eine L1210 Zelllinie ohne diesen Reparaturdefekt ist mit einem IC_{50} -Wert von $1,1 \mu M$ auch weniger sensitiv gegenüber Cisplatin. Dies legt den Schluß nahe, dass die anfangs zitierten Literaturwerte von hypersensitiven Zelllinien stammen. Die von uns eingesetzte Zelllinie ist dagegen mit der Zelllinie ohne Reparaturdefekt vergleichbar. Berücksichtigt man weiter, dass es für derartige Zelltests keine einheitliche Vorschrift gibt, d.h., dass Versuchsbedingungen, wie Medienzusammensetzung, Ausgangszelldichte oder auch die Zählmethoden variieren und die IC_{50} -Werte mit zunehmender Behandlungsdauer geringer werden,¹⁰³ so fügt sich unser Ergebnis sehr gut in das von der Literatur gezeichnete Bild.

Für die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe (**11**) – (**14**) bzw. Nonyl-ethylendiaminplatin(II) (**15**) wurden die IC_{50} -Werte mit dem *CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* von Promega bestimmt. Zur Kontrolle wurde für alle Proben mindestens ein Doppelansatz durch Zellzählung bestimmt wobei eine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen dem Farbttest und der Zellzählung festgestellt wurde. Eine Ausnahme stellt Cisplatin (**1**) [H₂O] dar,

da hier eine stärkere Abweichung gefunden wurde. Der IC_{50} -Wert der Zellzählung ist mit $1,4 \mu\text{M}$ etwa fünfmal geringer als der mit dem Farbstest bestimmte IC_{50} -Wert von $6,9 \mu\text{M}$. Ein Grund für den Unterschied könnte sein, dass der Test auf der Reduktion einer Tetrazolium Verbindung 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) durch Dehydrogenase in den Mitochondrien lebender Zellen zu einem Formazanfarbstoff beruht. MTS kann allerdings auch von Glutathion-S-Transferase (GST) reduziert werden.¹⁰⁴ Da jedoch Cisplatin (**1**) mit GSH reagieren kann,²¹ könnte dies das Enzym GST anregen, mehr GSH zu produzieren. Diese verstärkte Enzymaktivität würde aber auch zu einem stärkeren Umsatz von MTS führen und damit eine größere Zahl von Zellen vortäuschen. Offensichtlich wirkt sich dieser Effekt bei den weniger aktiven Verbindungen im Gegensatz zu Cisplatin (**1**) [H_2O] nur geringfügig aus.

Die Kurven der DNA-Synthese entsprechen den Graphen, die mittels Zellzählung ermittelt worden sind. Die aus den Kurven bestimmten IC_{50} -Werte sind für die DNA-Synthese etwas höher als für die Zellzählung. Die geringen Unterschiede können darauf zurückgeführt werden, dass die DNA-Syntheserate nicht wie die Zellzahl zu einem Zeitpunkt nach 48 h bestimmt werden kann. Zur Bestimmung der DNA-Synthese wird nach 42 h ^3H -Thymidin zugegeben und die Zellen für weitere sechs Stunden inkubiert. Das heißt, dass die DNA-Synthese nicht zu einem Zeitpunkt z.B. nach 48 h gemessen werden kann, sondern über einen Zeitraum von sechs Stunden am Ende der 48 h gemessen wird. Da die Zellzahl mit zunehmender Behandlungsdauer mit den Platinkomplexen ab- oder zumindestens weniger zunimmt, ist auch die DNA-Synthese nach 42 h noch höher als nach 48 h. Der ermittelte IC_{50} -Wert der DNA-Synthese ist also ein Mittelwert der DNA-Synthese zwischen 42 h und 48 h und damit etwas größer als zum Zeitpunkt nach 48 h, an dem die Zellzahl bestimmt wurde.

Für die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen nimmt die Cytotoxizität mit der Länge der verbindenden Alkylkette zu. In Übereinstimmung damit wurde von anderen Autoren für zwei Bisplatinverbindungen des Typs $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\text{-H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{-NH}_2\}]^{2+}$, ohne Verbrückung der Amine und mit monofunktionalen Platinsphären, für den Komplex mit einer kürzeren Alkylkette ($n = 4$) mit $3,1 \mu\text{M}$ eine geringere Cytotoxizität festgestellt als bei einer Kettenlänge von $n = 6$ ($2,4 \mu\text{M}$).¹⁰¹

Dieser Zusammenhang zwischen Kettenlänge und Cytotoxizität ist jedoch nicht allgemeingültig und lässt sich nicht ohne weiteres auf andere Verbindungsreihen übertragen. So wurde für eine ähnliche Serie von tetrafunktionalen Bisplatincomplexen mit der allgemeinen Formel $\{[\text{PtCl}_2\text{NH}_3]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2\}$, ebenso ohne Verbrückung der Amine an den beiden Platinsphären genau der entgegengesetzte Trend beobachtet.⁹⁸

Verbindung	Zellzahl $\text{IC}_{50} \pm \text{SD} [\mu\text{M}]$
Cisplatin (1)	$0,23 \pm 0,05$
$\{[\text{PtCl}_2\text{NH}_3]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2\}$: n = 4	$0,28 \pm 0,08$
$\{[\text{PtCl}_2\text{NH}_3]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2\}$: n = 5	$0,37 \pm 0,12$
$\{[\text{PtCl}_2\text{NH}_3]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2\}$: n = 6	$0,54 \pm 0,2$

Tabelle 7: Übersicht der IC_{50} -Werte der Bisplatincomplexen $\{[\text{PtCl}_2\text{NH}_3]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2\}$ mit n = 4 - 6.⁹⁸

Aufgrund der insgesamt kürzeren Alkylketten dieser Verbindungen ist ein direkter Vergleich nur eingeschränkt möglich. Im Gegensatz zu den von uns untersuchten Complexen (**11**) – (**14**) ist die Cytotoxizität der $\{[\text{PtCl}_2\text{NH}_3]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2\}$ -Verbindungen nur unwesentlich geringer als die Cytotoxizität von Cisplatin (**1**). Der Unterschied zu den Alkyl-bis-ethyldiaminplatin(II)-Verbindungen (**11**) – (**14**) kann teilweise durch die Verknüpfung der beiden Amingruppen erklärt werden, die die cytotoxische Wirkung vermindern kann. So ist der IC_{50} -Wert des mononuklearen *cis*-Ethyldiamindichloroplatin(II)-Complexes mit $2,2 (\pm 0,3) \mu\text{M}$ etwa dreimal geringer als für Cisplatin (**1**).¹⁰⁰

Ein wesentlicher Unterschied könnte auch sein, dass die Bisplatincomplexen $\{[\text{PtCl}_2\text{NH}_3]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2\}$ in DMF gelöst wurden und für die Cytotoxizitätstests auf 0,5 % DMF verdünnt wurden,^{59; 98} während die Alkyl-bis-ethyldiaminplatin(II)-Verbindungen [(**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] in DMSO gelöst und auf 0,1 % DMSO verdünnt wurden. DMF weist jedoch an sich bereits Antitumoreigenschaften auf. Gegen Hals- und Kopf-Xenograftstumore, die in Nacktmäusen transplantiert worden sind, ist DMF selbst so aktiv wie Cisplatin (**1**), allerdings in 250-fache höherer Dosierung.¹⁰⁵ Ein prozentualer Anteil von 0,5 % entspricht einer Konzentration von 68 mM DMF. In dieser Größenordnung liegt

der IC₅₀-Wert von DMF, der in Fibroblasten z.B. bei 100 mM (0,7 %) liegt und bei Keratinocyten bei 50 mM (0,4 %), wohingegen DMSO zwei- bis dreimal (IC₅₀-Wert = 200 - 140 mM bzw. 1,1 – 1,6 %) weniger cytotoxisch ist.¹⁰⁶

Außerdem senkt eine Konzentration von 103 mM an DMF den zellulären Glutathionspiegel in menschlichen Dickdarmkrebszellen auf unter fünf Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.¹⁰⁷ Es ist daher anzunehmen, dass dies die Wirkung von Cisplatin-analoga steigert, da Glutathion die Platin-komplexe im Cytosol abfangen kann.²¹ Weiterhin hat DMF auch in Dickdarmkrebszellen eine wachstumshemmende Wirkung, die direkt proportional zu dem verminderten Glutathionspiegel ist.¹⁰⁷ Im Gegensatz dazu fanden *Tofilon et al.*¹⁰⁸ dass die Anwesenheit von DMSO während der Drogenbehandlung keinen Einfluß auf die cytotoxische Wirksamkeit hat. Allerdings verstärkt eine Behandlung der Zellen mit 2 % DMSO für mindestens 48 h vor der Cisplatin-Behandlung die cytotoxische Wirkung.¹⁰⁸ Die unterschiedlichen Eigenschaften der Lösungsmittel beeinflussen sicherlich die Cytotoxizitätsdaten. Sowohl die cytotoxische Wirkung von DMF, als auch die Absenkung des Glutathionspiegels könnten die Cytotoxizität der Bisplatin-komplexe $\{[\text{PtCl}_2\text{NH}_3]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2\}$ verstärken und eine Erklärung für die großen Unterschiede zu den DMSO gelösten Alkyl-bis-ethylen-diaminplatin(II)-Verbindungen [(**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] sein.

Die starke cytotoxische Wirkung der mononuklearen Verbindung (**15**), die mit der wirkungsvollsten binuklearen Verbindung (**14**) vergleichbar ist, kann als Hinweis gewertet werden, dass für die verminderte Cytotoxizität der Bisplatin-Verbindungen [(**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] eine Verringerung der Freiheitsgrade der beiden Platinsphären durch eine Verkürzung der Alkylkette eine Rolle spielt. Die Flexibilität wird durch die Ethylenbrücke zwischen den Amingruppen noch weiter eingeschränkt. Im ganzen können auf diese Weise sterische Hindernisse bei der Reaktion mit DNA entstehen, die auch die Cytotoxizität negativ beeinflussen.¹⁰⁹

Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) ist trotz der Solvolyse in DMSO etwa zweimal aktiver als Cisplatin [H₂O] (**1**). Dabei könnte dieser Komplex aufgrund des Chlorid-DMSO-Austausches anders metabolisiert werden als Cisplatin [H₂O] (**1**). Dieser Effekt von DMSO wurde für Cisplatin auch an einigen Tiermodellen ge-

zeigt. Wird Cisplatin z.B. zusammen mit DMSO intravenös in Ratten gespritzt, vermindert sich die Nierentoxizität von Cisplatin (**1**). Eine mögliche Erklärung ist, dass der Austausch von Chlorid gegen DMSO die Reaktion von Cisplatin (**1**) mit empfindlichen Stellen auf dem Bürstensaum der proximalen Tubuli verhindert. Der Zusatz von DMSO zu Cisplatin (**1**) beeinflusst andererseits die *Antitumoraktivität* von Cisplatin (**1**) gegen L1210 Maus Leukämie nicht signifikant.¹¹⁰

In einer anderen Studie wurde Ratten eine Cisplatin-Lösung mit 2,5 % DMSO oral verabreicht. Schon bei der Gabe von niedrigen Dosen in Kombination mit DMSO war eine heftige Toxizitätssteigerung zu beobachten. Durch Zusatz eines Diuretikums (Furosemid) verschwanden die toxischen Effekte und es resultierte eine signifikant stärkere Abnahme des Tumolvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit der gleichen Dosis Cisplatin (**1**) ohne DMSO behandelt worden war.¹¹¹ Diese Beispiele verdeutlichen, dass Cytotoxizitätstests in Zellkulturen nur begrenzt Aussagen über Wirkungen im Organismus zulassen.

Zur Einordnung der cytotoxischen Wirkung der untersuchten Komplexe können das klinisch eingesetzte Carboplatin (**2**) und das als inaktiv geltende Transplatin als zusätzliche Anhaltspunkte dienen. Carboplatin (**2**) muss gegen Eierstockkrebszellen zehn- bis zwölfmal höher dosiert werden als Cisplatin (**1**),¹¹² wohingegen das inaktive Transplatin mit IC₅₀-Werten von 15,7 µM,¹⁰¹ 13,6 µM⁹⁸ bzw. 15,7 µM⁹⁹ in L1210 Zellen etwa zehn-¹⁰¹ bis 50-fach^{98; 99} weniger cytotoxisch ist als das *cis*-Analogon. Legt man diese Größenordnungen als Maßstab zugrunde, so könnten sich von den, nach zunehmender Cytotoxizität geordneten, neu getesteten Komplexen Nonylethylendiaminplatin(II) (**15**), Dodecyl-bisethylendiaminplatin(II) (**14**), Bisamid-bisplatin(IV) (**9**), Monoamid-monoplatin(II) (**10**) und Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) als antitumoraktiv erweisen.

2 Platinmenge in den Zellen

Ein grundsätzliches Problem der Platinbestimmung in Zellen ist, dass eine Unterscheidung von extrazellulär an der Plasmamembran adsorbierten Verbindungen von tatsächlich in die Zellen aufgenommen Komplexen nicht möglich ist. Roberts *et al.*^{113; 114} haben jedoch gezeigt, dass der Anteil extrazellulär gebundener Komplexe bei Experimenten mit Platinverbindungen meistens weniger als zehn Prozent der tatsächlich aufgenommenen Verbindungen ausmacht.

Der Einfluß einer Ungenauigkeit in dieser Größenordnung kann für einen ersten Vergleich der Komplexe vernachlässigt werden.

Für die Platinmenge pro Zelle lässt sich der Trend ablesen, dass für die stärker cytotoxisch wirkenden Verbindung mehr Platinkomplexe in den Zellen sind. Es gibt allerdings keinen direkten Zusammenhang zwischen der Platinmenge in Zellen und der Cytotoxizität des Komplexes. So wurde für alle Platinverbindungen bei einer Aussenkonzentration von 10 μM in den Zellen mehr Platin gemessen, als für Cisplatin (**1**) [H_2O] bei 1 μM Ausgangskonzentration, das hier bereits cytotoxisch wirkt. Das heißt, dass die Konzentration der Platinkomplexe in der Zelle an sich nicht allein ausschlaggebend für die Cytotoxizität sein kann. *Lux et al.*,¹¹⁵ die ähnliche Untersuchungen mit anderen Platinverbindungen durchgeführt haben, fanden ebenfalls keinen generellen Zusammenhang zwischen Cytotoxizität und absoluter Platinanreicherung in den Zellen. Ein direkter Vergleich der Platinmengen in den Zellen gestaltet sich schwierig, da sowohl die Versuchsbedingungen als auch die Angaben sehr unterschiedlich sind. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die im Folgenden angegebenen Werte auf Platinatome pro Zelle nach 48 h Behandlungsdauer mit einer Ausgangskonzentration von 10 μM umgerechnet. Diese Berechnungen setzen voraus, dass die Zellaufnahme sowohl mit steigender Konzentration als auch mit zunehmender Zeit linear zunimmt. Tatsächlich wurde sowohl für die Konzentrationsabhängigkeit,^{59; 100} als auch für die zeitliche Abhängigkeit¹¹⁶ lineare Zusammenhänge gefunden. Die Steigung der Kurven hängt allerdings von den untersuchten Verbindungen ab. Soweit diese Steigung nicht angegeben wurde, wurde für die Berechnung ein linearer Zusammenhang angenommen. Dies bedeutet, dass bei einer Verdoppelung der Konzentration oder Zeit sich die Platinmenge in den Zellen verdoppelt. Diese Annahme führt sicherlich zu ungenauen Berechnungen, aber da die so durchgeführten Extrapolationen geringer als eine Größenordnung waren, sollten die Abweichungen der so erhaltenen Werte keine Größenordnung ausmachen. In jedem Fall werden die Originalbedingungen und Werte in Klammern angegeben. *Lux et al.*¹¹⁵ fanden für Cisplatin eine errechnete Menge von $3 \cdot 10^6$ Platinatomen pro Zelle [Bei einer Behandlungsdauer von 24 h und einer Ausgangskonzentration von 5 μM wurden 1,2 μg Platin pro g Protein gemessen, der Proteingehalt einer Zelle wird mit 0,205 ng angegeben]. Aus einer Untersuchung zur pH-Abhängigkeit¹¹⁶ wurde ein

Platingehalt zwischen $3 \cdot 10^7$ und $5 \cdot 10^7$ Atomen pro Zelle errechnet [Bei einer Behandlungsdauer von 6 h und einer Ausgangskonzentration von $6,7 \mu\text{M}$ ($2 \mu\text{g/ml}$) wurden 2 ng Platin pro 10^6 Zellen bestimmt]. Aus den Ergebnisse der Gruppe von Farrell⁵⁹ wurde die Zahl der Platinatome auf $3 \cdot 10^8$ berechnet [Bei einer Behandlungsdauer von Null bis zwei Stunden und einer Ausgangskonzentration von $28 \mu\text{M}$ wurden $1,2 \text{ pmol}$ Platin pro 10^6 Zellen, μM und Stunde bestimmt]. Der höchste Platingehalt von $4 \cdot 10^8$ ergibt sich aus den Daten von Gibbons et al.¹⁰⁰ [Bei einer Behandlungsdauer von fünf Stunden und einer Ausgangskonzentration von $17 \mu\text{M}$ ($5 \mu\text{g/ml}$) wurden $0,219 \text{ nmol}$ Platin pro mg Protein und Stunde bestimmt, der Proteingehalt von 10^6 Zelle wird mit $0,111 \text{ mg}$ angegeben]. Der in der vorliegenden Arbeit gemessene Vergleichswert von ca. $8 \cdot 10^7$ Platinatomen pro Zelle liegt innerhalb der umgerechneten Literaturwerte. Zur Beurteilung des Einflusses der Platinmenge in den Zellen kann noch herangezogen werden, dass der Platingehalt nach der Behandlung mit dem als inaktiv geltenden Transplatin etwa doppelt so hoch ist wie nach der Behandlung mit Cisplatin.⁵⁹ Der im Vergleich mit Cisplatin weniger cytotoxische *cis*-Ethylendiamindichloro-platin(II)-Komplex wird dagegen etwa viermal schwächer aufgenommen als Cisplatin (**1**).¹⁰⁰ Diese Vergleiche machen, zusammen mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten deutlich, dass es keine eindeutige Korrelation zwischen Zellaufnahme und Cytotoxizität gibt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellaufnahme die Cytotoxizität beeinflusst. Gerade für eine Reihe von Komplexen, in der sich eine Eigenschaft, die die Zellaufnahme beeinflusst, kontinuierlich ändert, können evtl. Auswirkungen der unterschiedlichen Zellaufnahme auf die Cytotoxizität beobachtet werden. So nimmt für die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Verbindungen (**11**) – (**14**) die Länge der verbindenden Alkylkette und damit die Lipophilie zu. Die erhöhte Lipophilie erleichtert wiederum die Zellaufnahme¹¹⁷ und könnte ein Grund für die zunehmende Cytotoxizität sein.

Die Menge der Platinkomplexe in den Zellen ist nicht allein ausschlaggebend für die cytotoxisch Wirkung der Verbindungen, da bei unterschiedlichen Komplexen wie zum Beispiel Cis- und Transplatin keine Korrelation zwischen Zellaufnahme und Cytotoxizität gefunden wurde.⁵⁹ Offenbar beeinflussen auch die verschiedenartigen weiteren Reaktionen in der Zelle die Cytotoxizität und diese Effekte können sich viel stärker auswirken als die Zellaufnahme.

3 Platinaddukte an DNA

Die DNA wird in der Regel als Zielmolekül für die cytotoxische Wirkung der Platinkomplexe angesehen.^{118; 119; 120} Die Akkumulation einer Verbindung auf zellulärer DNA wird durch ein Fließgleichgewicht bestimmt. Dieses Gleichgewicht wird durch die Effizienz der Zellaufnahme, die effektive Konzentration der freien Verbindung im Zell- bzw. Nukleoplasma, die Reaktivität der Verbindung unter intrazellulären Bedingungen und die Effizienz der Wiederentfernung z.B. durch Reparatur der Läsionen bestimmt.

Die Unterschiede in der Menge der DNA-gebundenen Komplexe ist mit etwa zwei Zehnerpotenzen geringer als bei der Zellaufnahme. Der Bereich der gefundenen r_B -Werte zwischen $4 \cdot 10^{-7}$ und $5 \cdot 10^{-5}$ Platinatomen pro Nukleotid deckt sich sehr gut mit den von Lux *et al.*¹¹⁵ gefundenen Werten ($9 \cdot 10^{-7}$ bis $6 \cdot 10^{-5}$ Platinatomen/Nukleotid), wobei für letzere Untersuchung die Zellen für 4, 12 und 24 Stunden mit einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ der verschiedenen Komplexe behandelt worden sind.¹¹⁵ Die Werte für Cisplatin (**1**) lagen dabei zwischen $1,0 \cdot 10^{-5}$ Platinatomen/Nukleotid nach 4 h und $1,6 \cdot 10^{-5}$ Platinatomen/Nukleotid nach 24 h. In einer weiteren Untersuchung wurde nach einer fünfstündigen Behandlung mit $15 \mu\text{M}$ *cis*-Ethyldiamindichloroplatin(II) ein r_B -Wert von $2 \cdot 10^{-5}$ Platinatomen pro Nukleotid bestimmt.¹⁰⁰ Die Vergleichswerte sind ein grober Anhaltspunkt für den Modifikationsgrad der zellulären DNA bei der Behandlung mit Platinkomplexen. Unsere r_B -Werte zeigen eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit den Literaturwerten. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen ist eine Umrechnung auf eine gemeinsame Basis und damit ein direkter Vergleich für die r_B -Werte nicht möglich. Es wurde zwar ein linearer Zusammenhang zwischen Platinmenge in den Zellen, und damit auch der Konzentration im Medium, und dem Platinierungsgrad der DNA gefunden,¹⁰⁰ aber es gibt keine eindeutige Korrelation der DNA-gebundenen Platinmenge mit der Inkubationszeit.¹¹⁵ Deswegen können nur die in dieser Arbeit unter konstanten Bedingungen durchgeführten Messungen untereinander verglichen werden. Die Zahl der Platinaddukte an zellulärer DNA erlaubt keine Aussage über die cytotoxische Wirkung.

Abgesehen von dem starken Anstieg der Addukte der Verbindungen (**14**) und (**15**) führt eine Steigerung der Ausgangskonzentration um zwei Größen-

ordnungen lediglich zu einer Verzehnfachung der DNA-Addukte. Dies deutet darauf hin, dass die Addukte z.B. durch Reparatur wieder von der DNA entfernt werden.

Die Zahl der DNA-Addukte allein ist also für die Cytotoxizität nicht entscheidend, die Wirkung wird offenbar durch weitere Prozesse beeinflusst, die durch die Art der Addukte bestimmt werden. Die Art der Addukte bedeutet dabei sowohl die möglichen Addukte an sich, wie monofunktionale Addukte, intra-, oder intermolekulare Quervernetzungen, oder Proteinquervernetzungen, sowie die von den jeweiligen Addukten hervorgerufenen Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur.

4 DNA-Sekundärstrukturveränderungen

Nachdem die Menge der DNA-Addukte an sich für die Cytotoxizität nicht ausschlaggebend ist, könnten die weiteren Auswirkungen von Platinaddukten auf der DNA vor allem durch die *Art* der Addukte und den damit verbundenen DNA-Sekundärstrukturveränderungen beeinflusst werden. Beispielsweise behindern Addukte von Cisplatin (**1**) an zwei benachbarten Guaninen, und nicht, wie man intuitiv vermuten würde, die Interstrangquervernetzungen, die DNA-Replikation am stärksten.¹²¹ Die Transkription wird dagegen gleichermaßen durch d(GpG)-, d(ApG)-1,2-Intrastrangverknüpfungen,¹²² durch 1,3-Intrastrangaddukte zwischen zwei Guaninen (d(GpXpG) und Interstrangverknüpfungen blockiert.¹²³ Dagegen können monofunktionale Addukte von Cisplatin (**1**) und Addukte von Transplatin übergangen werden.¹²³ Außerdem wurde Unterschiede in der Reparatureffizienz der verschiedenen Addukte festgestellt, die in Kapitel 6, Seite 168, genauer diskutiert werden.

Die lokalen Veränderungen der DNA-Sekundärstrukturveränderungen durch einzelne Addukte von Cisplatin (**1**) wurden in der Einleitung (Kapitel 2.1, Seite 14) besprochen.

Da für die neuartigen Komplexe, insbesondere die Bisplatinkomplexe, die möglichen Addukte sich von denen des Cisplatins unterscheiden können, wurden nicht Addukte an speziellen Sequenzen, sondern statt dessen die DNA-Sekundärstrukturveränderungen, die die Summe der Veränderungen durch die einzelnen Addukte sind, untersucht.

Als Referenz diente Cisplatin $[\text{H}_2\text{O}]$ (**1**), das die DNA aufdrillt und durch nicht-periodische Biegungen scheinbar verkürzt.⁸⁶ Die Solvolyse in DMSO verlangsamt das Aufdrillen und noch stärker die Verkürzung der DNA. Diese Beobachtung ist eine Folge der stärkeren Verlangsamung der Ausbildung bifunktionaler Addukte im Vergleich zum ersten Angriff einer Nukleobase (vgl. Kapitel 4.2, Seite 80). So drillt ein Monoaddukt des Triamminchloroplatinat(II)-Komplexes die DNA halb so stark auf wie Cisplatin (**1**).¹²⁴ Monoaddukte können aber die DNA nicht biegen bzw. verkürzen. Erst die langsamere Bisadduktbildung führt dann zu stärkerem Aufdrillen und auch zur Verkürzung.

Bisamidbisplatin(II) (**8**) drillt die DNA trotz der Solvolyse in DMSO schneller auf als Cisplatin $[\text{H}_2\text{O}]$ (**1**), führt aber zu keiner Verkürzung der DNA. Es ist unwahrscheinlich, dass dieses starke Aufdrillen allein durch Monoaddukte zustande kommt. Zum einen ist die Reaktion mit DNA durch die DMSO-Solvolyse verlangsamt,⁸⁸ so dass weniger Addukte gebildet werden als durch Cisplatin $[\text{H}_2\text{O}]$ (**1**), und zum anderen drillen Monoaddukte die DNA auch geringfügiger auf als Bisaddukte.¹²⁴ Bifunktionale Addukte innerhalb einer Platinsphäre würden, wie für Cisplatin $[\text{H}_2\text{O}]$ (**1**) gezeigt, die DNA biegen und damit verkürzen. Deswegen kann das starke Aufdrillen ohne gleichzeitige Verkürzung nur durch Monoaddukte der Platineinheiten erklärt werden, die aber über *den gemeinsamen Brückenliganden* zu bifunktionalen Addukten verknüpft sind. Dieses Modell wird von Bisplatin-Komplexen mit einzähnigen Koordinationssphären des Typs $[\{\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]^{2+}$ bestätigt.¹²⁴ Diese Komplexe können keine bifunktionalen Addukte innerhalb *einer* Platinsphäre ausbilden. Ebenso wie Bisamidbisplatin(II) drillen diese Komplexe die DNA sowohl in der *cis*- als auch in der *trans*-Konformation vergleichbar mit Cisplatin $[\text{H}_2\text{O}]$ (**1**) auf, zeigen aber praktisch keine Verkürzung.¹²⁴ Erstaunlicherweise wurden für die analoge tetrafunktionale Verbindung $[\{\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)\}_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]$ keine erkennbaren Veränderungen in der elektro-phoretischen Mobilität superhelikaler DNA festgestellt.¹²⁵ In einer späteren Untersuchung wurde jedoch festgestellt, dass das CD-Spektrum von DNA, die mit dieser Bisplatinverbindung behandelt worden war, sehr ähnlich zu Cisplatin (**1**) behandelter DNA ist.⁹⁷ Da anhand des Circular dichroismus durch die Platinierung induzierte Konformationsänderungen der DNA beobachtet werden können, bedeuten vergleichbare Veränderungen im CD-Spektrum, dass sich die DNA-Sekundärstrukturveränderungen der beiden

Komplexe nur wenig unterscheiden. Der Vergleich mit einzähnigen und zwei-zähnigen Platinsphären in Bisplatinverbindungen zeigt also, dass Bisamidbisplatin(II) (**8**) nach der Solvolyse in DMSO offensichtlich nur ligandenvermittelte Bisaddukte ausbildet, die einzelnen Platinsphären also monofunktional sind.

Die entspannten, offenen Plasmidzirkel werden durch die Behandlung mit Bisamidbisplatin(II) (**8**) verlangsamt. Dieser Effekt wurde aufgrund der positiv geladenen Addukte ursprünglich auch für Cisplatin (**1**) erwartet.⁸⁶ Die Verkürzung aufgrund nicht periodischer Biegungen führt bei Cisplatin jedoch dazu, dass der Ladungseffekt überkompensiert wird.⁸⁶

Die untersuchten Platin(IV)komplexe (**9**) und (**10**) drillen die DNA auf und verkürzen diese, allerdings wesentlich schwächer als Cisplatin [H₂O] (**1**). Die zu Cisplatin (**1**) analoge Platin(IV)-Verbindung *cis,cis-trans*-Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂ Oxoplatin reagierte scheinbar nicht mit DNA, da die elektrophoretische Mobilität von DNA nicht verändert wird.¹²⁶ Es wurde vermutet, dass aufgrund der beachtliche Kristallfeldstabilisierungsenergie der d⁶-Elektronenkonfiguration in Platin(IV)-Komplexen und den energetisch wesentlich höher liegenden Übergangszustände mit einer fünf- bzw. siebenfachen Koordination bei einer S_N1- bzw. S_N2-Reaktion keine Ligandenaustauschreaktion mit DNA-Basen eingehen.⁸⁹ Statt dessen wurde eine Aktivierung durch Reduktion zu Platin(II) *in vivo* als Reaktionsmechanismus vorgeschlagen.⁸⁹ Als weiterer Reaktionsmechanismus wurde vorgeschlagen, dass Spuren von Platin(II)-Komplexen die Reaktion von Platin(IV)-Verbindungen mit DNA katalysieren. Dabei würden die Platin(II)-Komplexe mit DNA reagieren und dann durch eine freie Platin(IV)-Verbindung zu Platin(IV) oxidiert. Die auf diese Weise entstehende freie Platin(II)-Verbindung reagiert dann wieder mit DNA und wird anschließend oxidiert. Damit würden zwar nur Platin(II)-Komplexe mit DNA reagieren, aber letztendlich praktisch ausschließlich Platin(IV) an die DNA koordiniert sein. Allerdings konnte keine Oxidation von DNA gebundenem Cisplatin durch Oxoplatin nachgewiesen werden, die ein Hinweis auf einen derartigen katalytischen Effekt wäre.¹²⁷ Weiterhin wurde in dieser Untersuchung durch ELISA, Maxam-Gilbert Footprinting, HPLC-Analyse von enzymatisch verdauter DNA und Transkriptionsuntersuchungen gezeigt, dass Oxoplatin direkt als Platin(IV)-Komplex mit DNA reagieren kann.¹²⁷ Platin(IV)-Verbindungen können also direkt mit DNA reagieren. Neben DNA-Sekundärstrukturveränderungen, die mit den von Cisplatin

(1) induzierten Veränderung vergleichbar sind, erzeugen die Platin(IV)-Verbindungen zusätzlich DNA-Einzelstrangbrüche. Solche Strangbrüche werden auch durch Bis(isopropylamin)-*trans*-dihydroxy-*cis*-dichloroplatin(IV) CHIP hervorgerufen, wobei wahrscheinlich Hydroxylradikale die aktive Spezies sind.¹²⁸ Die letzere Platin(IV)-Verbindung drillt die DNA allerdings nicht auf und führt auch nicht zur Verkürzung der DNA.¹²⁸ Eine Kombination von DNA-Sekundärstrukturveränderungen und DNA-Strangbrüchen wurde bisher noch nicht beschrieben. Möglicherweise induzieren die Platin(IV)-Komplexe (9) und (10) damit zwei unterschiedliche Mechanismen, die unabhängig voneinander zur Cytotoxizität führen. Damit wären die Platin(IV)-Komplexe (9) und (10) in Cisplatin-resistenten Tumoren besonders vielversprechend.

Mit zunehmender Länge der Alkylkette in den Alkyl-bis-ethyldiaminplatin(II)-Komplexen (11) – (14) wird die DNA weniger stark gebogen, aber stärker aufgewunden. Auch in $[\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2]_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2]^{2+}$ beeinflusst die Länge der Alkylkette den Einfluß auf die DNA-Konformation. Anhand der CD-Spektren kann allerdings keine genaue Aussage über die Art der Konformationsänderungen abgeleitet werden.¹²⁹ Nonyl-ethyldiaminplatin(II) (15), die analoge mononukleare Verbindung, drillt die DNA weniger stark auf und führt zu einer stärkeren Verkürzung als die Bisplatinverbindungen (11) – (14). Dies ist eine weitere Bestätigung dafür, dass die Bisplatinverbindungen (8), (11) – (14) überwiegend ligandenvermittelte bifunktionale Addukte ausbilden, wobei die einzelnen Platinsphären überwiegend monofunktional bleiben. Dadurch wird die DNA aufgewunden, aber kaum verkürzt. Die mononukleare Verbindung (15) dagegen kann keine derartigen bifunktionalen Addukte ausbilden und drillt deswegen die DNA auch weniger stark auf. Statt dessen bilden sich mehr direkte Bisaddukte innerhalb der einen Platinsphäre aus, die die DNA verkürzen.

Anilin-4H-Isochinolinplatin(II) (16) erzeugt DNA-Sekundärstrukturveränderungen, die mit den Veränderungen von Cisplatin [DMSO] (1a) behandelte DNA vergleichbar sind. Offensichtlich werden die DNA-Sekundärstrukturveränderungen stärker durch die Solvolyse in DMSO beeinflusst als durch unterschiedliche Aminliganden. Andererseits könnte die räumliche Anordnung des Ringsystems den Angriff von DNA-Basen behindern. Röntgenstrukturen von 1-(2-Aminophenyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin zeigen, dass die beiden aromatischen Ringe gegeneinander verdreht sind.^{76; 130} Sollte diese Konfigura-

tion auch in den entsprechenden Platinkomplexen vorliegen, so könnten diese Ringsysteme das zentrale Platinatom abschirmen. Ein derartige Abschirmung des Platinmetalls wurde für den Komplex *cis*-Amminedichloro-(2-methylpyridin)-platin(II) ZD0473 (**5**) gefunden, in dem der Pyridinring um $102,7^\circ$ gegenüber der durch die quadratisch planare Anordnung um das Platinatom definierten Ebene verdreht ist und damit die 2-Methylgruppe axial zu dieser Ebene steht und das Platinatom abschirmt.¹³¹ Dies führt zu einer insgesamt geringeren Reaktivität und zu einer langsameren Reaktion mit freier DNA.¹³²

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die geringere Reaktivität besteht darin, dass das Ringsystem die Flexibilität der Cisplatineinheit einschränkt und damit der fünffach koordinierte Übergangszustand der S_N2 -Reaktion ungünstiger wird. Die vergleichbaren DNA-Sekundärstrukturveränderungen von Cisplatin [DMSO] (**1a**) und Anilin-4H-Isochinolinplatin(II) (**16**) sind ein Beispiel dafür, dass diese DNA-Sekundärstrukturveränderungen an sich die gravierenden Unterschiede der Cytotoxizität nicht erklären können. Ein Verbindungsglied zwischen DNA-Addukten bzw. den Sekundärstrukturveränderungen und der cytotoxischen Wirkung könnte die Erkennung und Bindung von Proteinen an die Platinaddukte sein. Allerdings ist auch für die Proteinbindung unklar, welche Strukturen für die Erkennung wichtig sind. Untersuchungen der Bindung von HMG1 bzw. der Endonuklease VII des Bakteriophagens T4 - als Beispiele für Struktur-erkennende Proteine - an spezifische Addukte von Cis- und Transplatin erbrachten keine Korrelation zwischen Aufdrillen bzw. Biegungen in der DNA und der Erkennung durch diese Proteine.¹³³ Zusätzliches lokales Aufschmelzen und eine erhöhte Flexibilität der DNA an aufgedrillten bzw. gebogenen DNA-Bereichen erschweren offenbar die Erkennung der Addukte. So könnte der Grund, warum 1,3-Intrastrangverknüpfungen von Cis- und Transplatin nicht von HMG1 erkannt werden, sein, dass die DNA an diesen Addukten flexibel ist.¹³³ Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die untersuchten DNA-Sekundärstrukturveränderungen für die Proteinerkennung allein nicht hinreichend sind. Einen Sonderfall stellen die Einzelstrangbrüche, die die Platin(IV)-Verbindungen hervorrufen, da die zusätzlichen andersartigen Schäden auf einem anderen Weg zur Cytotoxizität führen könnten und damit das Spektrum von *cis*-Platin basierenden Komplexen erweitern könnten.

5 DNA-Interstrangverknüpfungen

Die Verknüpfung zweier DNA-Stränge erzeugt DNA-Sekundärstrukturveränderungen, die nicht mit denen der anderen Addukte zu vergleichen sind (vgl. Kapitel 2.1, Seite 14) und die Trennung der DNA-Stränge z.B. bei der Replikation oder Transkription wird blockiert. Obwohl diese Interstrangverknüpfungen nur einen kleinen Prozentsatz der Addukte ausmachen, wurde in einigen Zellkulturexperimenten eine Korrelation zur cytotoxischen Wirkung gefunden.¹³⁴

Für die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen war die Cytotoxizität jedoch unabhängig von der Fähigkeit Interstrangverknüpfungen auszubilden.

Aufgrund der größeren Freiheitsgrade der Bisplatinverbindungen und der Polyfunktionalität können diese Komplexe eine größere Vielfalt an Addukten und damit auch an Interstrangverknüpfungen ausbilden als Cisplatin (**1**).⁹⁷ Der Abstand der Chloridionen in Cisplatin (**1**) von 0,34 nm^{*}; ¹³⁵ erlaubt nur Interstrangverknüpfungen zwischen direkt benachbarten Basenpaaren, wohingegen der Abstand der Platinsphären in Komplexen des Typs $[\{\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)\}_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2]$ mit vier Methylengruppen 0,95 nm beträgt und für $n = 6$: 1,2 nm ist.¹²⁵ Damit können schätzungsweise vier Basenpaare überbrückt werden.¹²⁵ Eine Verlängerung der Alkylkette kann zu mehr Interstrangverknüpfungen führen, wie für die Alkyl-bis-ethylendiaminplatin(II)-Komplexe auch beobachtet wurde. Auch wenn es intuitiv einleuchtet, dass ein größerer Abstand der Platinsphären eine größere Vielfalt an Addukten zulässt und damit sich mehr Möglichkeiten für intermolekulare Verknüpfungen eröffnen, lässt sich der Zusammenhang von zunehmenden Interstrangverknüpfungen mit größerem Abstand der Platinsphären nicht ohne weiteres auf andere Komplexe übertragen. Z.B. führen die Verbindungen $\text{trans}-[\{\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2]^{2+}$ zwar zu wesentlich mehr Interstrangverknüpfungen als Cisplatin (**1**), aber der Komplex mit der kürzeren Alkylkette ($n = 3$) bildet einen höheren Anteil an Interstrangverknüp-

* Die Originaldaten sind 0,034 nm Abstand der Chloridliganden in Cisplatin (**1**), 0,12 nm für den Platinabstand in $\text{trans}-[\{\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2]^{2+}$ und 0,23 bis 0,25 nm für BBR3464 (**7**). Diese Angaben sind offensichtlich um eine Zehnerpotenz zu klein, da zum einen bereits eine C-C-Einfachbindung 0,154 nm lang ist [Holleman, A. F., Lehrbuch der Anorganischen Chemie / Holleman-Wiberg, deGruyter Verlag Berlin, 1995¹⁰¹, 136.] und zum anderen, wie im Text bereits erwähnt, der Abstand der Platinsphären in $[\{\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)\}_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2]$ mit 1,2 nm angegeben wird.

fungen aus als der analoge Komplex mit $n = 6$.¹²⁹ Ebenso formt die dinukleare, zweifach positiv geladene Verbindung *trans*- $[\{\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2 \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2]^{2+}$, die bei einem Abstand der Platinsphären von $1,2 \text{ nm}^\star$ lediglich bis zu vier Basenpaare überspannen kann (1,4-Addukt), mehr Interstrangverknüpfungen (70 – 90 %) als die trinukleare, vierfach positiv geladene Verbindung BBR3464 (**7**) (20 %), die mit einem Platin-Platin-Abstand von $2,3$ bis $2,5 \text{ nm}^\star$ 6 - 8 Basenpaare überbrücken kann.

Allein eine größere Zahl von Interstrangverknüpfungen führt aber auch nicht unbedingt zu einer erhöhten Cytotoxizität. So bildet beispielsweise *cis*- $[\{\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)\}_2 \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]$ etwa 250 mal mehr Interstrangverknüpfungen aus als Cisplatin (**1**),¹²⁵ aber beide Komplexe haben eine vergleichbare Cytotoxizität.⁹⁷ Des Weiteren haben systematische Studien von Bisplatinverbindungen des Typs $[\{\text{PtCl}_x(\text{NH}_3)_{3-x}\}_2 \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2] \text{Cl}_{4-2x}$ mit $x = 1$ oder 2 und *cis*- oder *trans*-Konfiguration gezeigt, dass Komplexe mit einzähnigen Platinsphären und *trans*-Konfiguration weniger cytotoxisch sind, aber mehr Interstrangverknüpfungen ausbilden als der analoge Komplexe mit jeweils zwei *cis*-ständigen Chloridliganden.⁹⁷ Andererseits wurden die meisten Interstrangverknüpfungen in dieser Gruppe für *cis*- $[\{\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2 \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2] \text{Cl}_2$ gefunden, das auch cytotoxischer als der analoge *trans*-Komplex¹²⁴ und die entsprechende tetrafunktionale *cis*-Verbindung ist.⁹⁷

Auch Platin(IV)-Verbindungen, wie *cis*-Diammindichloro-*trans*-dihydroxyplatin(IV) [Oxoplatin],¹²⁷ Bis(isopropylamin)-*trans*-dihydroxy-*cis*-dichloroplatin(IV) [CHIP]¹²⁸ können Quervernetzungen zwischen zwei DNA Stränge ausbilden. Für Ammin-bisbutyrato-cyclohexylamindichloroplatin(IV) [JM221] wurde darüber hinaus in zwei Zelllinien gezeigt, dass die Interstrangverknüpfungen langsamer ausgebildet werden als bei Cisplatin (**1**).¹³⁶ Dies steht in Übereinstimmung zu unseren *in vitro* Untersuchungen, bei denen die Ausbildung von Interstrangverknüpfungen von Monoamid-monoplatin(IV) (**10**) ebenfalls langsamer war als von Cisplatin (**1**). Für Ammin-bisbutyrato-cyclohexylamindichloroplatin(IV) [JM221] wurde darüber hinaus gezeigt, dass die absolute Menge an solchen Interstrangquervernetzungen nur zehn bis zwanzig Prozent der Interstrangverknüpfungen von Cisplatin (**1**) ausmacht. Trotzdem ist diese Platin(IV)-Verbindung in den untersuchten Zelllinien cytotoxischer als Cisplatin.¹³⁶

Ausgehend von der Effizienz von Platinkomplexen, Interstrangquervernetzungen auszubilden, kann also nicht auf die Cytotoxizität der Verbindungen geschlossen werden. Dies legt den weitergehenden Schluß nahe, dass die Interstrangverknüpfungen als Erklärung für die Cytotoxizität nicht ausreichend sind.^{124; 136} Möglicherweise liegt die geringe biologische Signifikanz der Interstrangverknüpfungen auch darin begründet, dass diese unter physiologischen Bedingungen zu Intrastrangverknüpfungen umlagern können,¹³⁷ oder dass sie sehr effizient repariert werden.¹³⁸

6 DNA Reparatur

In unserem DNA-Reparatursynthesetest haben wir eine optimale Proteinmenge von 10 µg pro 50 µl Reaktionsvolumen gefunden. Wood *et al.*⁹⁴ fanden für Extrakte aus menschlichen Lymphzellen eine Zunahme der Reparaturaktivität bis zu 160 µg Proteinextrakt in 50 µl Reaktionsvolumen. Allerdings erhöhte eine zunehmende Proteinmenge bis zu 150 µg pro 50 µl Reaktionsvolumen den Einbau radioaktiver Nukleotide auch in der ungeschädigten Kontroll-DNA. Übersteigt das Volumen an Zellextrakt jedoch in etwa 20 % des Reaktionsvolumens, so wird die Reaktion inhibiert.¹³⁹

Für menschliche HeLa Zellen, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, fanden Ullah *et al.*¹⁴⁰ eine Zunahme der Reparaturaktivität zwischen 5 µg und 50 µg pro 50 µl Reaktionsvolumen. Nach diesem Maximum nimmt die Reparatureffizienz wieder ab.¹⁴⁰ Es ist bekannt, dass die Parameter wie Pufferbedingungen oder Proteinkonzentrationen für jedes Zellmodell neu optimiert werden müssen.¹⁴¹ Gleichwohl ist die von uns gefundene Abhängigkeit der DNA-Reparatursynthese von der Proteinkonzentration in guter Übereinstimmung mit den publizierten Vergleichsdaten.

Die DNA-Reparatursyntheseaktivität nahm innerhalb der ersten sechs Stunden linear zu. Auch nach zehn Stunden war noch eine Intensitätssteigerung zu beobachten, die allerdings geringer war als zu Beginn der Reaktion. Die von Wood *et al.*⁹⁴ beobachtete Reparatur von UV-geschädigtem Plasmid war ebenso zwischen 30 Minuten und sechs Stunden linear, danach wurde nur noch ein leichter Anstieg beobachtet. In einer weiteren Untersuchung erfolgte die stärkste Reparatursynthese in den ersten drei bis sechs Stunden woraufhin

erneut eine Phase mit einem schwächeren Anstieg der DNA Reparatursynthese folgte.¹³⁹ Insgesamt stimmen die von uns beobachteten Charakteristika der DNA-Reparatursynthese gut mit anderen Untersuchungen überein. Deswegen waren sowohl die Extraktpräparationen, als auch die gewählten Versuchsbedingungen für den DNA-Reparatursynthesetest geeignet.

Für Cisplatin (**1**) behandelte DNA konnte nur wenig DNA-Reparatursynthese beobachtet werden. Prinzipiell könnte dies eine Folge von stärkerem Hintergrund aufgrund unspezifischer DNA-Synthese sein. Legt man publizierte Verhältnisse von Signal zu Hintergrund von fünf bis sechs⁹⁴ zu eins bzw. zehn¹⁴⁰ zu eins zugrunde, so kann eine auch wenig erhöhte Hintergrund-DNA-Synthese die tatsächliche DNA-Reparatur geringer erscheinen lassen. Es ist bekannt, dass Plasmide im Laufe der Zeit, auch bei 4 °C oder durch wiederholtes Auftauen, Strangbrüche erfahren, die zu erhöhtem DNA-Synthesehintergrund führen.¹⁴⁰ Eine weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA über einen neutralen Saccharosegradienten kann den Hintergrundeinbau drei- bis vierfach reduzieren¹³⁹ und damit hätte die Reparatur von Cisplatinaddukten deutlicher sichtbar werden können. Allerdings konnte durch die Verwendung eines frisch präparierten Plasmid keine wesentliche Verbesserung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin kann aufgrund der deutlichen Signale bei der Reparatur von UV-Schäden eine Insuffizienz des *in vitro* Reparatursystems als Ursache für die geringe Reparatursynthese der Cisplatin-geschädigten DNA ausgeschlossen werden. Das heißt, dass Cisplatinaddukte schlechter repariert werden als UV-Schäden. Diese Schlußfolgerung ist konsistent mit DNA-Reparatursynthesetests von Szymkowski *et al.*¹⁴²

Die Reparatureffizienz der untersuchten Cisplatinanaloge war vergleichbar niedrig wie die Reparatureffizienz der Cisplatinaddukte. Geringfügige Unterschiede innerhalb der beobachteten Schwankungen können nicht ausgeschlossen werden, spielen aber gegebenenfalls für die unterschiedlichen cytotoxischen Wirkungen der Komplexe nur eine untergeordnete Rolle. Es wurden auch für sehr unterschiedliche DNA Schäden, wie z.B. Pyrimidindimere, Psoralenaddukte und Cisplatinaddukte, vergleichbare DNA-Reparatursyntheseaktivitäten beobachtet.¹⁴⁰ Darüber hinaus zeigen auch die verschiedenen Cisplatinaddukte in wild-type Fibroblasten ein vergleichbares Reparaturmuster.¹⁴³ Ebenso entspricht die Effizienz der DNA-Reparatursynthese von Transplatinaddukten

der Reparatureffizienz von Cisplatinaddukten.¹³⁹ Auch d(GpG)-1,2-Intrastrangverknüpfung von Cisplatin **(1)**, Oxaliplatin **(3)** und Satraplatin [JM216] **(6)** an einem ca. 140 Bp langen DNA-Fragment - wenige Basen von einem radioaktiv markierten Nukleotid entfernt - wurden in einem Excisions-Reparaturtest mit Zellextrakten von menschlichen Zellen (HeLa) gleich effizient ausgeschnitten.¹⁴⁴ In einer früheren Untersuchung¹⁴² wurde für das d(GpG)-1,2-Intrastrang-Addukt von Cisplatin **(1)** in einem geschlossenen Plasmid dagegen keine DNA-Reparatursynthese beobachtet. In anderen Untersuchungen der *in vitro* Reparatur wurden Unterschiede in der Reparatureffizienz spezifischer Addukte gefunden. So führen Pt(dien)Cl Addukte (Monoaddukte) in einem DNA-Reparatursynthesetest mit Zellextrakten aus menschliche Lymph- oder HeLa-Zellen zu praktisch keiner DNA-Synthese. In einem Excisions-Reparaturtest, bei dem spezifische Cisplatinaddukte an einem ca. 160 Bp langen DNA-Fragment wenige Basen von einem radioaktiv markierten Nukleotid entfernt als Substrat dienten, wurden 1,3-Intrastrangaddukte bei der Inkubation mit Ganzzellextrakten besser ausgeschnitten und als ca. 30 bp langes Excisionsprodukt nachgewiesen als 1,2-Intrastrangaddukte, wohingegen für Interstrangverknüpfungen keine Excision nachgewiesen werden konnte.¹⁴⁵ Letzteres Ergebnis könnte möglicherweise eine Folge der Substratlänge von 160 Bp sein. Es wurde zwar gezeigt, dass die minimale Substratlänge für menschliche (HeLa) Ganzzellextrakte bei Cyclobutan-Thymin-Dimere ungefähr 100 bp ist,¹⁴⁶ aber es ist möglich, dass für die Reparatur von Interstrangverknüpfungen ein größeres Substrat benötigt wird. Diese Überlegung wird gestützt durch eine andere Untersuchung, die gezeigt hat, dass in einem *in vitro* Reparatursynthesetest mit Ganzzellextrakten Interstrangverknüpfungen an Plasmid-DNA besser repariert werden als Intrastrangaddukte.¹³⁸ Ein ähnliches Bild ergibt sich für Psoralen Monoaddukte, die weniger zur *in vitro* DNA-Reparatursynthese beitragen als Interstrangverknüpfungen.¹⁴⁷ Möglicherweise werden die Bifunktionalen Addukte aufgrund der stärkeren DNA-Sekundärstrukturveränderungen besser erkannt als Monoaddukte und deswegen auch effizienter repariert.¹⁴⁷

Im Gegensatz dazu nimmt die Reparatureffizienz von spezifischen Cisplatinaddukten mit ABC Excinuklease, dem Nukleotid-Excisions-Reparatursystem von *E. coli*, von d(GpG)-1,2-Intrastrangverknüpfung mit 7 % über d(ApG)-1,2-Intrastrangverknüpfungen mit 10 – 12 % bis hin zu 20 – 30 % für

1,3-Intrastrangaddukte (d(GpXpG) bzw. Monoaddukte zu.¹⁴⁸ Die Effizienz der Reparatur von Monoaddukten durch ABC-Excinuklease¹⁴⁸ ist dabei in Übereinstimmung mit der geringen Toxizität von Monoaddukten.^{149; 150}

Offensichtlich lassen sich aber die Ergebnisse des prokaryontischen Systems nicht auf Eukaryonten übertragen, bei denen eher Toleranz der Monoaddukte und nicht verstärkte Reparatur für die mangelnde Toxizität von Monoaddukten verantwortlich gemacht wird.¹³⁸

Die oftmals widersprüchlichen Ergebnisse zwischen verschiedenen Untersuchungen hängen sicherlich mit den unterschiedlichen Methoden, wie Substratlänge, Untersuchung der Excisionsprodukte oder der DNA-Reparatursynthese, prokaryontische oder eukaryontische Systeme und nicht zuletzt *in vivo* oder *in vitro* Untersuchungen, zusammen. Aus diesem Grund ist es schwer, verlässliche Schlußfolgerungen zu ziehen.

Es wird vermutet, dass die abweichenden Cytotoxizitäten von Cisplatin (**1**) und Transplatin keine Folge unterschiedlicher Reparatur sind¹³⁹ und dass die Art der Nichtabgangsgruppen von Cisplatinanaloga die Wirkung der Platin-DNA-Addukte offenbar über einen reparaturunabhängigen Weg beeinflusst.¹⁴⁸

Zweifelsohne kann die Reparatur von DNA-Addukten die cytotoxische Wirkung von Cisplatin verändern, da z.B. verstärkte Reparatur als eine Resistenzursache gefunden wurde.¹⁵¹ Eine unterschiedliche Reparatur ist dabei aber nicht unbedingt auf die Art der Addukte zurückzuführen sondern kann auch auf eine insgesamt erhöhte Reparatureffizienz der Zellen zurückgehen. Die Reparatureffizienz könnte dabei, ähnlich wie bei dem SOS-System in *E. coli*,¹⁵² durch Transkriptionsaktivierung der Gene der an der Reparatur beteiligten Proteine erfolgen. Eine solche Aktivierung von Reparaturproteinen kann bei *in vitro* Tests mit Zellextrakten von unbehandelten Zellen nicht auftreten.

Ein anderer Mechanismus für aktivierte Reparatur ist die Transkriptions-gekoppelte Reparatur,¹⁵³ die dafür verantwortlich ist, dass DNA-Schäden an transkribierten Genen effizienter repariert werden als in nicht-transkribierten Bereichen des Genoms.¹⁵⁴ Aus diesem Grund kann es durchaus sein, dass die Reparatureffizienz insgesamt gering erscheint, die Addukte, die die Transkription behindern würden, jedoch sehr effizient repariert werden. Die Transkriptions-ge-

koppelte Reparatur kann durch die bislang eingesetzten *in vitro* Reparaturtests nicht untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt ist das Zusammenspiel von Adduktbildung, Reparatur und Zelltod. Die Monoaddukte von Cisplatin [DMSO] (**1a**) reagieren langsamer zu bifunktionalen Addukten als solche von Cisplatin [H₂O] (**1**) (vgl. Ergebnisse, Kapitel 4.2, Seite 80 und die Diskussion der Ergebnisse, Kapitel 4, Seite 161). Ähnliche monofunktionalen Addukte werden entweder toleriert¹⁴³ oder repariert¹⁴⁷ und töten in jedem Fall die Zelle nicht. Damit ist bei einem vergleichbaren Platinierungsgrad die Zahl der *cytotoxischen* Addukte geringer und die Zelle hat eine größere Chance, die nicht tolerablen Addukte zu reparieren und so zu überleben. Dieses Modell setzt keine verbesserte Reparatur der Cisplatin-[DMSO]-Addukte voraus und ist in guter Übereinstimmung mit der gegenüber Cisplatin [H₂O] (**1**) verminderten Cytotoxizität von Cisplatin [DMSO] (**1a**) (Tabelle 2, Seite 63) und den in dieser Arbeit vorgestellten Unterschieden in der Veränderung der DNA-Sekundärstruktur, die darauf schließen lassen, dass die Ausbildung von bifunktionalen Addukten durch die DMSO-Solvolyse verlangsamt wird (Kapitel 4.2., Seite 80).

Ein ähnlicher Modell wurde als Erklärung für Cisplatinresistenz in einer L1210-Zelllinie vorgeschlagen. In dieser Zelllinie wurden weniger Interstrangverknüpfungen beobachtet und als Erklärung wurde vorgeschlagen, dass Monoaddukte z.B. aufgrund eines erhöhten Thiolgehaltes vermehrt stabilisiert werden. Dadurch verkürzt sich die Zeit in der sich bifunktionale Addukte ausbilden können und gleichzeitig kann die geringere Zahl der Bisaddukte effizienter repariert werden.¹⁵⁵

7 DNA-Proteinquervernetzungen

Der koordinativen Verknüpfung von Proteinen an DNA über Platinkomplexe wurde bisher aufgrund des geringen Anteils wenig Bedeutung beigemessen.²³

Allerdings wurden in L1210 Zellen nach der Behandlung mit Cisplatin (**1**) bzw. Transplatin mehr DNA-Proteinverknüpfungen als DNA-Interstrangverknüpfungen gefunden.¹⁵⁶ Darüberhinaus könnte die Selektivität von gebundenen Proteinen die Relevanz der DNA-Proteinplatinkomplexe erhöhen. Wird z.B. ein wichtiger Transkriptionsfaktor koordinativ an die DNA gebunden, so könnte dies

die Transkription entscheidender Gene verhindern und indirekt zum Zelltod führen.

Ein Beispiel für eine selektive Quervernetzung von Proteinen wurden z.B. bei der Behandlung von Zellkernen mit Cisplatin gefunden. Es wurden nur Nicht-Histon-Proteine an DNA koordinativ gebunden, wohingegen keine Reaktion mit Histonen beobachtet wurde.⁹⁶ Als Reaktionsmechanismus für die koordinative Bindung von Proteinen an DNA ist zum einen denkbar, dass Proteine, die bereits an DNA gebunden sind, durch einen bifunktionalen Platinkomplex koordinativ mit der DNA verknüpft werden, oder dass Platin-DNA-Addukte von Proteinen erkannt und gebunden werden, woraufhin die Proteine koordinativ an die DNA gebunden werden. Es wurden bereits eine Vielzahl von Proteinen beschrieben, die Cisplatinaddukte an DNA erkennen und binden können, dazu gehören neben HMG1-Box-Proteinen, darunter einige Transkriptionsfaktoren (SRY, LEF-1, UBF, mtTFA, Ixr1 u.a.), und Proteine, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (XPE, XPA, ERCC1, MUTS α u.a.).¹⁵⁷ Allerdings wurde für keines dieser Proteine bislang eine koordinative Bindung über Cisplatinaddukte an die DNA beschrieben.

Das Reparaturprotein UvrA von *E. coli* wurde vielfach als Modellsystem eingesetzt. Es bindet an ungeschädigte, zirkuläre Plasmid DNA mit einer ungefähr tausendfach geringeren Effizienz als an Cisplatin behandelte DNA.¹⁵⁸ *In vitro* Untersuchungen mit gereinigten Reparaturproteinen von *E. coli* haben gezeigt, dass ein geringer Anteil von UvrA zusätzlich an Cis- oder Transplatin modifizierte DNA koordinativ gebunden wird.¹⁵⁹ Etwas mehr DNA-Proteinverknüpfungen wurden mit UvrAB und DNA, die mit dem bifunktionalen einzähnigen [*trans*-PtCl(NH₃)₂]-H₂N(CH₂)₄NH₂]Cl₂-Komplex behandelt worden war, festgestellt.¹⁵⁸ Dabei wurden sowohl UvrA als auch UvrB koordinativ gebunden, wobei die Zahl der DNA-Proteinverknüpfungen mit zunehmender Konzentration von UvrA zunahm, bis eine Sättigung erreicht war.¹⁵⁸ Dabei wurden schätzungsweise 50 – 75 % des gebundenen Proteins auch koordinativ mit der DNA vernetzt.¹⁵⁸ Dabei scheint die spezifische Bindung des Schadenserkennungsproteins UvrA eine wesentliche Rolle zu spielen, da BSA oder durch Hitze¹⁵⁸ bzw. SDS¹⁶⁰ denaturierte UvrAB-Proteine nicht koordinativ gebunden werden. Eine weitere Steigerung der koordinativen Verknüpfungen wurde für einen tetrafunktionalen Platinkomplex des Typs [*cis*-PtCl₂(NH₃)₂]-H₂N(CH₂)₄NH₂] beobachtet.

tet.¹⁵⁸ Dies deckt sich mit unseren Untersuchungen, die gezeigt haben, dass die tetrafunktionalen Bisplatinkomplexe **(9)**, **(11)**, **(12)**, **(13)** und **(14)** die meisten DNA-Proteinverknüpfungen ausbilden.

Ein weiterer Aspekt, der die Zahl der Proteinquervernetzungen beeinflussen kann, ist, neben der erhöhten Zahl von potentiellen Bindungsstellen, die Geschwindigkeit der Ausbildung bifunktionaler Addukte an der DNA. Die Halbwertszeit von Cisplatin Monoaddukten beträgt zwei bis drei Stunden und in dieser Zeit können Reparaturenzyme noch koordinativ gebunden werden.¹⁶¹ Monoaddukte des antitumoraktiven¹⁶² *cis*-[*N*-2-Amino-*N*-2-methylamino-2,2,1-bicycloheptan]dichloroplatins(II) haben dagegen, wahrscheinlich aufgrund der sterisch anspruchsvollen Norbornylgruppe, eine Halbwertszeit von etwa acht Stunden.¹⁶⁰ Für *cis*-[*N*-2-Amino-*N*-2-methylamino-2,2,1-bicycloheptan]dichloroplatin(II) konnten dann auch deutlich koordinative Bindungen von UvrB an DNA beobachtet werden, während für Cisplatin praktisch keine DNA-Proteinquervernetzungen gefunden wurden.¹⁶⁰ Die längere Persistenz von Cisplatinmonoaddukten nach der Solvolyse in DMSO ist wahrscheinlich auch die Ursache für die größere Zahl von DNA-Proteinquervernetzungen. Die langsamere Weiterreaktion der DMSO-Komplexe zu bifunktionalen DNA-Addukten erhöht bei den Bisplatinkomplexen **(9)**, **(11)**, **(12)**, **(13)** und **(14)** offenbar zusätzlich zu der größeren Zahl der potentiellen Bindungsstellen die Zahl der koordinativ gebundenen Proteine. So bildet Bisamid-bisplatin(IV) **(9)** deutlich weniger Proteinquervernetzungen aus als Bisamid-bisplatin(II) **(8)**, welches in DMSO gelöst worden war. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Anilin-4*H*-isochinolinplatin(II) **(16)** trotz der DMSO-Solvolyse keine DNA-Proteinquervernetzungen ausbildet. Möglicherweise behindert der Isochinolinligand auch die Reaktion mit Proteinen oder das reaktive Platinzentrum wird durch Interkation des Liganden von Proteinen abgeschirmt.

Im Prinzip können Platin-DNA-Komplexe Proteine, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, abfangen und sind damit potentiell tödliche DNA-Addukte.¹⁵⁸ Auch Monoaddukte könnten damit aufgrund ihrer Fähigkeit, Reparaturproteine koordinativ zu binden, zu tödlichen Läsionen werden.¹⁶⁰ Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit eine entgegengesetzte Korrelation zwischen koordinativer DNA-Proteinbindung und Cytotoxizität gefunden. Ebenso wurde für Cis- und

Transplatin keinerlei Korrelation zwischen DNA-Proteinquervernetzungen und Cytotoxizität gefunden.¹⁵⁶

Es scheint daher eher so zu sein, dass die Platinaddukte durch die Bindung von Proteinen entweder als DNA-Monoaddukte toleriert oder repariert werden. Die Abnahme der DNA-Proteinquervernetzungen in Zellen nach Cis- oder Transplatinbehandlung deutet dabei eher auf Reparatur hin.^{23; 156} Da der Anteil von DNA-Proteinquervernetzungen an den gesamten Platin-DNA-Addukten zwischen Cis- und Transplatin gering und in etwa vergleichbar ist,²³ spielt in diesem Fall eine eventuelle detoxifizierende Wirkung durch koordinativ gebundene Proteine entweder eine eher untergeordnete Rolle oder die Reparatur der koordinativen DNA-Proteinaddukte ist sehr effizient. Anhand der in dieser Arbeit vorgestellten *in vitro* Untersuchungen und den vorliegenden Literaturdaten kann die Hypothese aufgestellt werden, dass entweder die langsamere Ausbildung von bifunktionalen Addukten an sich und / oder die Bindung von Proteinen an monofunktionale Addukte für eine geringere Cytotoxizität verantwortlich ist.

Modell zur Erklärung der unterschiedlichen cytotoxischen Wirkung von Cisplatinanaloga

Aus den gewonnenen Erkenntnissen wird zur Erklärung der unterschiedlichen Cytotoxizität der verschiedenen Komplexe folgendes Modell vorgeschlagen:

Alle untersuchten Cisplatinanaloga gelangen in die Zellen und reagieren im Zellkern in unterschiedlichem Ausmaß mit der DNA. Die Differenzen in der Zahl der Platinaddukte sind aber zu gering, um damit allein die großen Unterschiede der Cytotoxizität zu erklären. Es muß also unterschiedliche Arten von Addukten geben, die sich in ihrem cytotoxischen Potential unterscheiden. Das Verhältnis der verschiedenen Addukte bestimmt dann die Cytotoxizität des Platinkomplexes.

Zuerst bilden Platinkomplexe an der DNA Monoaddukte aus, die die DNA schwach aufdrillen und keine oder nur eine geringe cytotoxische Wirkung aufweisen.

Aus den monofunktionalen Addukten bilden sich nach und nach bifunktionale Addukte von denen zumindestens einige cytotoxisch wirken. Eine Wechselwirkung des Komplexliganden mit den DNA-Basen, z.B. über Interkalation, könnte z.B. für Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) zu pseudobifunktionalen Addukten und damit ebenfalls zu verstärkter Cytotoxizität führen. Welche spezifischen bifunktionalen Addukte bzw. welche DNA-Sekundärstrukturveränderungen für die Cytotoxizität verantwortlich sind und welche Mechanismen dann zum Zelltod führen muß in in detaillierten Untersuchungen noch gezeigt werden. Weder Aufdrillen noch Biegungen der DNA konnten an sich für die cytotoxische Wirkung verantwortlich gemacht werden. Möglicherweise spielen andere Parameter, wie Einzelstrangbereiche oder erhöhte Flexibilität der DNA an Platinaddukten, zusätzlich eine Rolle in der Induktion des Zelltodes.

Parallel zur Ausbildung von bifunktionalen Addukten könnte die Reparatur von Platinaddukten die Zahl der potentiell tödlichen Läsionen verringern. Es bildet sich also ein Fließgleichgewicht zwischen Adduktbildung und Entfernung durch Reparatur oder Umlagerungen. Je geringer die Zahl der cytotoxischen Läsionen

ist, desto größer sind die Überlebenschancen der Zelle. In dieser Arbeit wurden zwei mögliche Mechanismen beschrieben, die das Gleichgewicht zwischen nicht-cytotoxischen monofunktionalen und cytotoxischen bifunktionalen Läsionen beeinflussen. Zum einen könnte eine langsamere Reaktion der Monoaddukte zu bifunktionalen Addukten im gleichen Zeitraum zu weniger cytotoxischen Läsionen führen und damit der Zelle ermöglichen, durch Reparatur der gefährlichen Addukte zu überleben. Eine zweite Möglichkeit die cytotoxische Wirkung eines Platinkomplexes zu verringern wäre, dass die koordinative Bindung von Proteinen an DNA-Addukte die Ausbildung von bifunktionalen DNA-Addukten verhindert und etvl. auch die Reparatur dieser Addukte erleichtert. Sowohl das Abfangen von Monoaddukten durch Proteinbindung, als auch eine erleichterte Reparatur der DNA-Proteinquervernetzungen sollte zur Detoxifizierung beitragen. Cisplatinanaloga, die langlebige monofunktionale Addukte ausbilden oder eine größere Zahl von DNA-Proteinquervernetzungen eingehen, sind also entweder aufgrund von Toleranz oder effizienterer Reparatur weniger cytotoxisch.

Komplexe, die sehr schnell bifunktionale Addukte ausbilden, wie z.B. Cisplatin (**1**), oder solche, die durch sterische Hinderung keine koordinativen Bindungen zu Proteinen eingehen und vielleicht durch zusätzliche Wechselwirkungen, wie Interkalation, pseudobifunktionale Addukte ausbilden, wie z.B. Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**), bilden dagegen in kurzer Zeit viele potentiell cytotoxische Läsionen aus. Cisplatinanaloga, die schnell bifunktionale Addukte ausbilden sind dementsprechend vielversprechende Kandidaten für die Tumorthherapie.

Ausblick

Die Cytotoxizitätsuntersuchungen an L1210 Zellen erlauben eine ungefähre Abschätzung der Wirksamkeit der Verbindungen. Für eine nähere Charakterisierung der Spezifität soll in zukünftigen Experimenten die cytotoxische Wirkung in Zelllinien aus verschiedenen Geweben verglichen werden. Eine starke cytotoxische Wirkung in bestimmten Zelllinien ist ein Hinweis auf eine antitumorale Wirkung des entsprechenden Komplexes in dem Gewebe, dem die Zelllinie entstammt. Sollten sich in den Zellkulturuntersuchungen Präferenzen zeigen, so sollte die Spezifität in einem Tiermodell bestätigt werden. Für diese Untersuchungen konnten bereits Mitglieder der AWO (Arbeitsgemeinschaft Wirkstoffentwicklung in der Onkologie der deutschen Krebsforschungsgesellschaft) gewonnen werden.

Neben der Gewebespezifität soll auch die Wirkung in verschiedenen Cisplatin resistenten Zelllinien verglichen werden, um festzustellen, ob eine Behandlung mit den neuen Platinkomplexen diese Resistenzen überwinden kann.

Darüberhinaus werden die mechanistischen Untersuchungen fortgesetzt. So soll neben den bereits untersuchten DNA-Sekundärstrukturveränderungen festgestellt werden, ob die Addukte der einzelnen Verbindungen Einzelstrangbereiche ausbilden bzw. die Flexibilität der DNA erhöhen und ob es diese Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur sind, die die Cytotoxizität bestimmen.

Eine weitere wichtige Frage, die diese Arbeit aufgeworfen hat, ist, ob und wodurch die verlangsamte Ausbildung von *bifunktionalen* Addukten die cytotoxische Wirkung verringert. Ein Ansatzpunkt dafür ist die Synthese von Analogverbindungen zu den getesteten Komplexen, in denen pro Platinsphäre ein Chlorid gegen Ammoniak ausgetauscht wird und die damit monofunktional werden bzw. nur noch ligandenvermittelte Verknüpfungen ausbilden können. Eine geringere Cytotoxizität dieser Analogverbindungen wäre eine erste Bestätigung dafür, dass Monoaddukte entweder repariert oder toleriert werden und somit die Überlebenschancen der Zellen erhöht wird. Eine größerer Zahl von Addukten der monofunktionalen Verbindungen auf der zellulären DNA würde für einen Toleranzmechanismus sprechen, wohingegen eine geringere oder abnehmen-

de Adduktzahl auf DNA-Reparatur hinweisen würde. Zur Unterscheidung dieser beiden Möglichkeiten soll die Kinetik der Adduktbildung auf zellulärer DNA untersucht werden.

Für den in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* Reparatursynthesetest wurden Zellextrakten von ungeschädigten Zellen verwendet. Eine Induktion von Reparaturproteinen durch DNA-Schäden, z.B. über Transkriptionsaktivierung der entsprechenden Gene, ist in diesem System nicht möglich. Um eine eventuelle Aktivierung von Reparaturproteinen zu untersuchen, sollen Extrakte von mit Cisplatin (**1**) und Cisplatinanaloga behandelten Zellen hergestellt und die Reparaturaktivität mit Extrakten von unbehandelten Zellen verglichen werden

In dieser Arbeit wurde die Fähigkeit der Addukte, Proteine zu binden, verglichen. Um Hinweise auf mögliche Signalwege zur Zellzykluskontrolle, Reparatur oder zum Zelltod zu bekommen, sollen diese gebundenen Proteine identifiziert werden. Eine genaue Identifizierung, z. B. durch Mikrosequenzierung, erfordert zwar größere Proteinmengen wäre aber unter der Voraussetzung, dass es sich bei jeder Bande nur um ein gebundenes Protein handelt, machbar. Parallel dazu sollte in jedem Fall untersucht werden, ob diese koordinativen Protein-DNA-Addukte auch nach der Behandlung von Zellen mit den Platinkomplexen auftreten und ob auch hier eine Korrelation zur Cytotoxizität besteht. Dazu könnte genomische DNA isoliert werden und die koordinativ gebundenen Proteine durch Cyanidbehandlung freigesetzt werden. Die Proteine, oder gegebenenfalls das Protein, könnte(n) entweder über eine Acrylamidgelelektrophorese mit den oder dem *in vitro* isolierte(n/m) Protein(en) verglichen werden oder ebenfalls durch Mikrosequenzierung identifiziert werden.

Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass Komplexe, die langlebige Monoaddukte bzw. nur über Brückenliganden vermittelte bifunktionale Addukte ausbilden, inaktiv sind. Da die Ausbildung von Interstrangverknüpfungen ebenfalls nicht mit der Cytotoxizität korreliert, könnten 1,2- oder 1,3-Intrastrangverknüpfungen für die cytotoxische Wirkung verantwortlich sein. Ein Synthesziel sollten deswegen Verbindungen sein, die möglichst schnell bifunktionale oder pseudobifunktionale Addukte ausbilden. Dazu sollten Komplexe mit bifunktionalen Abgangsgruppen, wie Malonat, die eine Weiterreaktion der Monoaddukte begünstigen, synthetisiert werden. Weiterhin sollte die Anilinisochinolin-

leitstruktur systematisch variiert und auf eine eventuelle zusätzliche Wechselwirkung mit den DNA-Basen optimiert werden.

Mit diesen Komplexen kann dann das vorgeschlagene Modell der unterschiedlichen cytotoxischen Wirkung der Cisplatinanaloga überprüft und entwickelt werden.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Untersuchung verschiedener Cisplatinanaloge zu neuen Substanzen zu finden, die aufgrund ihrer cytotoxischen Wirkung antitumoraktiv sein könnten. Zum anderen sollte durch den Vergleich cytotoxischer und weniger cytotoxischer Verbindungen untersucht werden, ob die Aufnahme in die Zellen, die Bindung an DNA und den damit verbundenen Sekundärstrukturveränderungen, die Reparatur der DNA-Addukte und die koordinative Bindung von Proteinen an DNA über die Platinkomplexe die Cytotoxizität beeinflussen.

Die Cytotoxizitätsuntersuchungen haben gezeigt, dass zwar viele der untersuchten Verbindungen [(**1a**), (**8**), (**11**), (**12**) und (**13**)] als inaktiv einzustufen sind, einige aber zeigten eine leichte [(**9**), (**10**), (**14**) und (**15**)] bis starke cytotoxische Wirkung (**16**). Da alle untersuchten Cisplatinanaloge Chelatliganden aufweisen, führt eine Verbrückung der Aminliganden allein nicht zu einer Erhöhung der Cytotoxizität. Die Verknüpfung zweier *cis*-Platineinheiten führte überwiegend zu geringen Cytotoxizitäten. Für die untersuchten Alkyl-bis-ethylen-diaminplatin(II)-Verbindungen (**11**) – (**14**) nahm die cytotoxische Wirkung mit dem Abstand der Platinsphären zu. Die schwache Wirkung der Bisplatinkomplexe ist wahrscheinlich überwiegend auf die DMSO-Solvolyse zurückzuführen, die auch die Cytotoxizität von Cisplatin stark vermindert. Dementsprechend zeigten der wasserlösliche Platin(IV)-Komplexe (**9**) eine stärkere Cytotoxizität als der analoge Platin(II)-Komplex (**8**). Andererseits war der Chelatkomplex (**16**) des sterisch anspruchsvollen Anilin-4-Hisochinolin-liganden trotz der Solvolyse in DMSO am wirkungsvollsten.

Durch den Vergleich der unterschiedlichen Platinkomplexe konnte gezeigt werden, dass eine eingeschränkte Korrelation zwischen Zellaufnahme, der Bindung an zelluläre DNA und der Cytotoxizität existiert, dass aber beide Prozesse nicht allein ausschlaggebend für die großen Unterschiede in der Wirkung der verschiedenen Komplexe sein können. Eigenschaften, die die Zellaufnahme verbessern, wie z.B. die erhöhte Lipophilie mit zunehmender Länge der Alkylkette in den Alkyl-bis-ethylen-diaminplatin(II)-Verbindungen (**11**) – (**14**), könnten die

Cytotoxizität positiv beeinflussen. Die Vergleiche der Platinkomplexe haben zudem gezeigt, dass sich weder anhand der Platinmenge in den Zellen, noch anhand der Adduktmenge an zellulärer DNA auf die zu erwartende oder resultierende Cytotoxizität der jeweiligen Verbindung schließen läßt. So gibt es z.B. Verbindungen, die zwar vermehrt in die Zellen aufgenommen werden oder mehr DNA-Addukte bilden und dennoch weniger cytotoxisch sind, als Komplexe, die in geringerem Maße in den Zellen bzw. an DNA gebunden sind. Ebenso wenig läßt sich anhand der Cytotoxizität auf die Komplexmenge in den Zellen bzw. an zellulärer DNA schließen.

Die unterschiedlichen Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur und die Kinetiken der Interstrangverknüpfungen ermöglichen Rückschlüsse auf die Art der Addukte der jeweiligen Komplexe. So verlangsamt die Solvolyse in DMSO die Ausbildung bifunktionaler Addukte innerhalb einer Platinsphäre. Die Bisplatinverbindungen [(**8**), (**9**), (**11**), (**12**), (**13**) und (**14**)] drillen aufgrund von ligandenvermittelten bifunktionalen Addukten die DNA dennoch teilweise schneller als Cisplatin (**1**) auf und bilden mehr Interstrangverknüpfungen aus als Cisplatin (**1**). Da die meisten dieser Bisplatinverbindungen [(**8**), (**11**), (**12**) und (**13**)] aber in L1210 Zellen nur wenig cytotoxisch waren, kann daraus die Schlußfolgerung gezogen werden, dass weder das Ausbilden von mehr Interstrangverknüpfungen noch stärkeres Aufdrillen der DNA für die Cytotoxizität der Platinkomplexe verantwortlich ist. Nachdem auch die Verkürzung durch nicht-periodische Biegungen der DNA sowohl bei inaktiven oder wenig cytotoxischen Verbindungen [(**10**), (**11**) und (**15**)] als auch bei dem wirkungsvollen Cisplatin (**1**) beobachtet wurde, sind DNA-Biegungen an sich auch nicht ausreichend als Erklärung für die Cytotoxizität. Eine Möglichkeit wäre, dass lokales Aufschmelzen der DNA-Stränge bzw. eine erhöhte Flexibilität der DNA,¹³³ die mit den angewendeten Methoden nicht detektiert werden können, die Wirkung der Addukte zusätzlich moduliert.

Eine Sonderstellung nehmen die Platin(IV)-Verbindungen (**9**) und (**10**) ein, da sie DNA-Strangbrüche erzeugen. DNA-Strangbrüche stellen einen zusätzlichen Schaden neben dem eigentlichen Platinaddukt dar und könnten evtl. über einen anderen Mechanismus zum Zelltod führen.

Als weitere Ursache für die unterschiedlichen cytotoxischen Wirkungen der Platinkomplexe wurde auch die Reparatur der DNA-Addukte *in vitro* untersucht. Dabei waren die Unterschiede in der Reparatur der Platinaddukte an DNA geringer als das Auflösungsvermögen des DNA-Reparatursynthesetests. Eventuelle Unterschiede in der Reparatur der Platinkomplexe sind auf jeden Fall so gering, dass sie nicht für die deutlichen Cytotoxizitätsunterschiede verantwortlich gemacht werden können. Es muß allerdings eingeschränkt werden, dass zwar prinzipiell die Reparaturenzyme alle untersuchten Addukte gleich effizient reparieren können, aber die tatsächliche Reparatur in Zellen durch Transkriptionsgekoppelte Reparatur oder induzierte Reparaturaktivität dominiert werden könnte.

Während der Behandlung von platinierter DNA mit Zellextrakten wurden ein Teil der an die DNA Addukte gebundenen Proteine über ein Platinatom koordinativ mit der DNA verknüpft. Dabei wurden die meisten DNA-Proteinquervernetzungen für inaktive Komplexe gefunden. Dabei handelt es sich um die tetrafunktionalen Bisplatinkomplexe und Platin(II)-Komplexe nach der Solvolyse in DMSO mit Ausnahme von Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**). Offenbar führt die größere Zahl freier Bindungsstellen zu mehr koordinativen Verknüpfungen von Proteinen an DNA.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen wurde zur Erklärung der unterschiedlichen Cytotoxizität der verschiedenen Komplexe folgendes Modell vorgeschlagen:

Cisplatinanaloga bilden zuerst monofunktionale Addukte aus. Eine koordinative Bindung von Proteinen kann die Weiterreaktion zu bifunktionalen DNA-Addukten verhindern. Die monofunktionalen Addukte werden entweder toleriert oder repariert und sind dementsprechend nicht cytotoxisch. Wenigstens ein Teil der bifunktionalen Addukte wirkt dagegen, wahrscheinlich auch über induzierte Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur, cytotoxisch. Die langsame Ausbildung von bifunktionalen DNA-Addukten bzw. eine größere Zahl von DNA-Proteinquervernetzungen vermindert dementsprechend die Cytotoxizität. Je schneller sich also bifunktionale DNA-Addukte ausbilden bzw. je höher der Anteil an bifunktionalen Addukten ist, umso cytotoxischer ist der entsprechende Platinkomplex.

Das in dieser Arbeit beschriebene Anilin-4H-isochinolinplatin(II) (**16**) ist ein vielversprechender Kandidat für die Tumorthherapie, da es keine DNA-Proteinquervernetzungen ausbildet, deutliche Unterschiede in den induzierten DNA-Sekundärstrukturveränderungen zu Cisplatin (**1**) zeigt und stark cytotoxisch wirkt.

Literaturverzeichnis

- 1 Wong, E., Giandomenico, C. M., Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs, *Chemical reviews*, **1999**, 99, 2451 - 2466.
- 2 Giaccone, G., Clinical Perspectives on Platinum Resistance, *Drugs*, **2000**, 59 Suppl. 4, 9 - 17.
- 3 Mc Guire, W. P., Ozols, R. F., Chemotherapy of Advanced Ovarian Cancer, *Semin. Oncol.*, **1998**, 25, 340 - 348.
- 4 Alberts, D. S., Green, S., Hannigan, E. V., O'Toole, R., Stock-Novack, D., Anderson, P., Surwit, E. A., Malvly, V. K., Nahhas, W. A., Jolles, C. J., Improved Therapeutic Index of Carboplatin plus Cyclophosphamide vs. Cisplatin plus Cyclophosphamide: Final Report by Southwest Oncology Group of Phase III Randomized Trial in Stages 3 and 4 Ovarian Cancer, *J. Clin. Oncol.*, **1992**, 10, 706 - 717.
- 5 Loehrer, P., Einhorn, L., Drugs Five Years Later: Cisplatin, *Ann. Intern. Med.*, **1984**, 100, 704 - 713.
- 6 Hayes, D., Cvitkovic, E., Golbey, R. B., Scheiner, E., Helson, L., Krakoff, I. H., High Dose *cis*-Platinum diammine dichloride: Amelioration of Renal Toxicity by Mannitol Diuresis, *Cancer*, **1977**, 39, 1372 - 1381.
- 7 Gralla, R. J., Osoba, D., Kris, M. G., Kirkbride, P., Hesketh, P. J., Chinery, L. W., Clark-Snow, R., Gill, D. P., Groshen, S., Grunberg, S., Koeller, J. M., Morrow, G. R., Perez, E. A., Silber, J. H., Pfister, D. G., Recommendations for the Use of Antiemetics: Evidence Based, Clinical Practice Guidelines. American Society Clinical Oncology, *J. Clin. Oncol.*, **1999**, 17, 2971 - 2994.
- 8 Kuschnisky, G., Lüllmann, H., *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, **1989**, 12. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 129.
- 9 Cubeddu, L. X., Mechanism by Which Cancer Chemotherapeutic Drugs Induce Emesis, *Seminars in Oncology*, **1992**, 19 No 6, Suppl. 15, 2 - 13.
- 10 Ribaud, P., Gouveia, J., Bonnay, M., Mathe, G., Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics of *cis*-Platinum and Analogs, *Canc. Treat. Rep.*, **1981**, 65 Suppl. 3, 97 - 105.
- 11 von Hoff, D., Reichert, C., Cuneo, R., *et al.*, Demyelination of Peripheral Nerves Associated with *cis*-Diammine dichloro platinum(II) (DDP) Therapy, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **1979**, 20, 91.
- 12 Voet, D., Voet, J. G., *Biochemie*, **1992**, 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 1183 - 1184.
- 13 Kelland, L. R., Preclinical Perspectives on Platinum Resistance, *Drugs*, **2000**, 59 Suppl. 4, 1 - 8.

- 14 Lepre, C. A., Lippard, S. J., *Interaction of Platinum Antitumor Compounds with DNA* in Nucleic Acids and Molecular Biology, **1990**, 4, Hrsg. Eckstein, F., Lilley, D. M. J., Springer Verlag Berlin, 9 - 38.
- 15 Lim., M. C., Martin, R. B., The Nature of cis Ammine Pd(II) and Antitumor cis Ammine Pt(II) Complexes in Aqueous Solutions, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1976**, 38, 1911 - 1914.
- 16 Johnson, N. P., Hoeschle, J. D., Rahn, R. O., Kinetic Analysis of the *in vitro* Binding of Radioactive *cis*- and *trans*-Dichlorodiammineplatinum(II) to DNA, *Chem-Biol. Interact.*, **1980**, 30, 151 - 169.
- 17 Holler, E., *Mechanism of Action of Tumor-Inhibiting Metal Complexes* in Metal Complexes in Cancer Chemotherapy, **1993**, Hrsg. Keppler, B. K., VCH-Verlagsgesellschaft Weinheim, 37 - 83.
- 18 Just, G., Holler, E., Enhanced Levels of Cyclic AMP, Adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine and Nucleoside 5'-triphosphates in Mouse Leukemia P388/D1 After Treatment with *cis*-Diamminedichloroplatinum(II), *Biochem. Pharmacol.*, **1991**, 42, 285 - 294.
- 19 Roberts, J. J., Thomson, A. J., The Mechanism of Action of Antitumor Platinum Compounds, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **1979**, 22, 71 - 133.
- 20 Chu, G., Cellular Responses to DNA: The Role of DNA-Binding Proteins and DNA-Repair, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 2669 (2), 787 - 790.
- 21 Ishikawa, T., Ali-Osman, F., Glutathione-associated *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) Metabolism and ATP-dependent Efflux from Leukemia Cells, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 286, 20116 - 20125.
- 22 Fichtinger-Schepman, A. M., van der Veer, J. L., den Hartog, J. H., Lohman, P. H., Reedijk, J., Adducts of the Antitumor Drug *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation, Identification and Quantification, *Biochemistry*, **1985**, 24, 707 - 713.
- 23 Plooy, A. C. M., van Dijk, M., Lohman, P. H. M., Induction and Repair of DNA Cross-Links in Chinese Hamster Ovary Cells Treated with Various Platinum Coordination Compounds in Relation to Platinum Binding to DNA, Cytotoxicity, Mutagenicity, and Antitumor Activity, *Cancer Res.*, **1984**, 44, 2043 - 2051.
- 24 Jones, J. C., Zhen, W., Reed, E., Parker, R. J., Sancar, A., Bohr, V. A., Gene-Specific Formation and Repair of Cisplatin Intrastrand Adducts and Interstrand Cross-Links in Chinese Hamster Ovary Cells, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 7101 - 7107.
- 25 Pullman, A., Pullman, B., Molecular Electrostatic Potential of the Nucleic Acids, *Q. Rev. Biophys.*, **1981**, 14, 289 - 380.
- 26 Laoui, A., Kozelka, J., Chottard, J. C., *cis*-Diamminediaquaplatinum(II) Selectivity for GpG: Influence of the Adjacent Base of the First Platination Step, *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 2751 - 2753.

- 27 Sip, M., Leng, M., *DNA, cis-Platinum and Intercalators: Catalytic Activity of the DNA Double Helix* in Nucleic Acids and Molecular Biology, **1993**, 7, Hrsg. Eckstein, F., Lilley, D. M. J., Springer Verlag Berlin, 1 - 15.
- 28 Brabec, V., Reedijk, J., Leng, M., Sequence-Dependent Distortions Induced in DNA by Monofunctional Platinum(II) Binding, *Biochemistry*, **1992**, 31, 12397 - 12402.
- 29 Brabec, V., Boudny, V., Balcarova, Z., Monofunctional Adducts of Platinum(II) Produce in DNA a Sequence-Dependent Local Denaturation, *Biochemistry*, **1994**, 33, 1316 - 1322.
- 30 Bellon, S. F., Coleman, J. H., Lippard, S. J., DNA Unwinding Produced by Site-Specific Intrastrand Cross-Links of the Antitumor Drug *cis*-Diamminedichloroplatinum(II), *Biochemistry*, **1991**, 30, 8026 - 8035.
- 31 Rice, J. A., Crothers, D. M., Pinto, A. I., Lippard, S. J., The Major Adduct of the Antitumor Drug *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA Bends the Doublet by $\approx 40^\circ$ Toward the Major Groove, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, 85, 44158 - 44161.
- 32 Sherman, S. E., Gibson, D., Wang, A. H.-J., Lippard, S. J., X-ray Structure of the Major Adduct of the Anticancer Drug Cisplatin with DNA: *cis*-[Pt(NH₃)₂{d(pGpG)}], *Science*, **1985**, 270, 412 - 417.
- 33 Takahara, P. M., Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A., Lippard, S. J., Crystal Structure of Double-Stranded DNA Containing the Major Adduct of the Anticancer Drug Cisplatin, *Nature*, **1995**, 377, 649 - 652.
- 34 Huang, H., Zhu, L., Reid, B. R., Drobny, G. P., Hopkins, P. B., Solution Structure of a Cisplatin-Induced DNA Interstrand Cross-Link, *Science*, **1995**, 270, 1842 - 1845.
- 35 Heiger-Bernays, W. J., Essigmann, J. M., Lippard, S. J., Effect of the Antitumor Drug *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) and Related Complexes on Eukaryotic DNA Replication, *Biochemistry*, **1990**, 29, 8461 - 8466.
- 36 Sorenson, C. M., Eastman, A., Mechanism of *cis*-Diamminedichloroplatinum(II)-induced Cytotoxicity: Role of G₂ Arrest and DNA Double-Strand Breaks, *Cancer Res.*, **1988**, 48, 4484 - 4488.
- 37 Eastman, A., Schulte, N., Enhanced DNA repair as a Mechanism of Resistance to *cis*-Diamminedichloroplatinum(II), *Biochemistry*, **1988**, 27, 4730 - 4734.
- 38 Chaney, S. G., Sancar, A., DNA Repair: Enzymatic Mechanisms and Relevance to Drug Response, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1996**, 88, 1346 - 1360.
- 39 Pil, P. M., Lippard, S. J., Specific Binding of Chromosomal Protein HMG1 to DNA Damaged by the Anticancer Drug Cisplatin, *Science* **1992**, 256, 234 - 237.

- 40 Huang, J-C., Zamble, D. B., Reardon, J. T., Lippard, S. J., Sancar, A., HMG-Domain Proteins Specifically Inhibit the Repair of the Major DNA Adduct of the Anticancer Drug Cisplatin by Human Excision Nuclease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 10394 - 10398.
- 41 Yaneva, J., Leuba, S. H., van Holde, K., Zlatanova, J., The Major Chromatin Protein Histone H1 Binds Preferentially to cis-Platinum-Damaged-DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 13448 - 13451.
- 42 van Holde, K. E., *Chromatin*, **1988**, Springer Verlag New York.
- 43 Moggs, J. G., Szymkowski, D. E., Yamada, M., Karran, P., and Wood, R. D., Differential Human Nucleotide Excision Repair of Paired and Mismatched Cisplatin-DNA Adducts, *Nucleic Acids Res*, **1997**, *25*, 480 - 491.
- 44 Ner, S. S., Travers, A. A., Churchill, M. E. A., Harnessing the Writhe: A Role for DNA Chaperones in Nucleoprotein-Complex Formation, *Trends Biochem. Sci.*, **1994**, *19*, 185 - 187.
- 45 Treiber, D. K., Zhai, X., Jantzen, H-M., Essigmann, J. M., Cisplatin-DNA Adducts Are Molecular Decoys For the Ribosomal RNA Transcription Factor hUBF (Human Upstream Binding Factor), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 5672 - 5676.
- 46 Vichi, P., Coin, F., Renaud, J. P., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., Moras, D., Egly, J. M., Cisplatin- and UV-damaged DNA Lure the Basal Transcription Factor TFIID/TBP, *EMBO J.*, **1997**, *16*, 7444 - 7456.
- 47 Fan, S., Chang, J. K., Smith, M. L., Duba, D., Fornace Jr, A. J., O'Connor, P. M., Cells Lacking CIP1/WAF1 Genes Exhibit Preferential Sensitivity to Cisplatin and Nitrogen Mustard, *Oncogene*, **1997**, *14*, 2127 - 2136.
- 48 Sanchez, Y., Elledge, S. J., Stopped for Repair, *BioEssays*, **1995**, *17 No. 6*, 545 - 548.
- 49 Gartel, A. L., Serfas, M. S., Tyner, A. L., p21-Negative Regulator of the Cell Cycle, *P.S.E.B.M.*, **1996**, *213*, 138 - 149.
- 50 Wyllie, F. S., Haughton, M. F., Bond, J. A., Rowson, J. M., Jones, C. J., Wynford-Thomas, D., S Phase Cell-Cycle Arrest Following DNA Damage is Independent of the p53/p21^{WAF1} Signalling Pathway, *Oncogene*, **1996**, *12*, 1077 - 1082.
- 51 Akashi, M., Hachiya, M., Osawa, W., Spirin, K., Suzuki, G., Koeffler, H., Irradiation Induces WAF1 Expression Through a p53 Independent Pathway in KG-1 Cells, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 19181 - 19187.
- 52 Hirano, Y., Yamato, K., Tsuchida, N., A Temperature Sensitive Mutant of the Human p53, Val138, Arrests Rat Cell Growth Without Induced Expression of cisp1/waf1/sdi1 After Temperature Shift-Down, *Oncogene*, **1995**, *1085*, 1879 - 1885.

-
- 53 Hollander, M. C., Alamo, I., Jackman, J., Wang, M. G., McBride, O. W., Fornace Jr., A. J., Analysis of the Mammalian gadd45 Gene and its Response to DNA Damage, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 24385 - 24393.
- 54 Smith, M. L., Kontny, H. U., Zhan, Q., Sreenath, A., O'Connor, P. M., Fornace Jr., A. J., Antisense GADD45 Expression Results in Decreased DNA Repair and Sensitizes Cells to u.v.-Irradiation or Cisplatin, *Oncogene*, **1996**, 13, 2255 - 2263.
- 55 Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., Stillman, B., Differential Effects by the p21 CDK Inhibitor on PCNA-Dependent DNA Replication and Repair, *Nature*, **1994**, 371, 534 - 537.
- 56 O'Connor, P. M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T. G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D. A., Monks, A., Sausville, E. A., Weinstein, J. N., Friend, S., Fornace, A. J. Jr., Kohn, K. W., Characterization of the p53 Tumor Suppressor Pathway in Cell Lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and Correlation with the Growth Inhibitory Potency of 123 Anticancer Agents, *Cancer Res.*, **1997**, 57, 4285 - 4300.
- 57 Pasini, A., Zunino, F., Neue Cisplatin Analoga – auf dem Weg zu besseren Cancerostatica, *Angew. Chem.*, **1987**, 99, 632 - 641.
- 58 Reedijk, J., Improved Understanding in Platinum Antitumor Chemistry, *Chem. Commun.*, **1996**, 801 - 805.
- 59 Farrell, N., Kelland, L. R., Roberts, J. D., van Beusichem, M., Activation of the *trans* Geometry in Platinum Antitumor Complexes: A Survey of the Cytotoxicity of *trans* Complexes Containing Planar Ligands in Murine L1210 and Human Tumor Panels and Studies on Their Mechanism of Action, *Cancer Res.*, **1992**, 52, 5065 - 5072.
- 60 van Beusichem, M., Farrell, N., Activation of the *trans* Geometry in Platinum Antitumor Complexes. Synthesis, Characterization, and Biological Activity of Complexes with Planar Ligands Pyridine, *N*-Methylimidazole, Thiazole, and Quinoline. Crystal and Molecular Structure of *trans*-Dichloro-(thiazole)platinum(II), *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 634 - 639.
- 61 Farrell, N., Tam, T. B., Souchard, J.-P., Wimmer, F. L., Cros, S., Johnson, N. P., Cytostatic *trans*-Platinum(II) Complexes, *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 2240 - 2254.
- 62 Cleare, M. J., Hoeschele, J. D., *Bioinorg. Chem.*, **1973**, 2, 187.
- 63 Muggia, F. M., Overview of Carboplatin: Replacing, Complementing, and Extending the Therapeutic Horizons of Cisplatin, *Sem. in Oncol.*, **1989**, 16, 7 - 13.
- 64 Weiss, R. B., Christian, M. C., New Cisplatin Analogues in Development, *Drugs*, **1993**, 46 (3), 360 - 377.
- 65 Judson, I., Kelland, L. R., New Developments and Approaches in the Platinum Arena, *Drugs*, **2000**, 59 Suppl. 4, 29 - 36.

- 66 O'Dwyer, P. J., Stevenson, J. P., Johnson, S. W., Clinical Pharmacokinetics and Administration of Established Platinum Drugs, *Drugs*, **2000**, *59 Suppl. 4*, 19 - 27.
- 67 Burchenal, J. H., Irani, G., Kern, K., Lokys, L., Turkevich, J., 1,2-Diamminocyclohexanplatinum(II) Derivatives of Potential Clinical Value, *Recent Results Cancer Res.*, **1980**, *74*, 146 - 155.
- 68 Holford, J., Raynaud, F., Murrer, B. B. A., Grimaldi, K., Hartley, J. A., Abrams, M., Kelland, J. R., Chemical, Biochemical and Pharmacological Activity of Novel Sterically Hindered Platinum Coordination Complex *cis*-[Amminedichloro-(2-methylpyridine)]-platinum(II) (AMD473), *Anticancer Drug Des.*, **1998**, *13*, 1 - 8.
- 69 Holford, J., Sharp, S. Y., Murrer, B. A., Abrams, M., Kelland, L. R., *In vitro* Circumvention of Cisplatin Resistance by the Novel Sterically Hindered Platinum Complex AMD473, *Br. J. Cancer*, **1998**, *77*, 366 - 373.
- 70 Kelland, L. R., Abel, G., McKeage, M. J., Jones, M., Goddard, P. M., Valenti, M., Murrer, B. A., Harrap, K. R., Preclinical Antitumor Evaluation of Bis-aceto-ammine-dichlorocyclohexylamine platinum(IV): An Orally Active Platinum Drug, *Cancer Res.*, **1993**, *53*, 2581 - 2586.
- 71 Kelland, L. R., Mellish, K. J., Abel, G., Loh, S. Y., Mistry, P., *et al.*, Circumvention of Transport-Mediated Acquired Cisplatin Resistance in Human Cancer Cell Lines by the Orally Active Platinum Drug, Bis-acetoammine dichloro(cyclohexylamine) platinum(IV) (JM216), Abstract 2383, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **1993**, *34*, 400.
- 72 Brabec, V., Kasparkova, J., Vrana, O., Novakova, O., Cox, J. W., Qu, Y., Farrell, N., DNA Modifications by a Novel Bifunktional Trinuclear Platinum Phase I Anticancer Agent, *Biochemistry*, **1999**, *36*, 6781 - 6790.
- 73 John, S., Kerrison, S., Sadler, P. J., Solvolysis of *cis*-[Pt(NH₃)₂ Cl₂] in Dimethyl Sulphoxide and Reactions of Glycine with [PtCl₃(Me₂SO)]- as Probed by ¹⁹⁵Pt Nuclear Magnetic Resonance Shifts and ¹⁹⁵Pt-¹⁵N Coupling Constants, *J. C. S. Chem. Comm.*, **1977**, 861 - 863.
- 74 Schumann, E., Altmann, J., Karaghiosoff, K., Beck, W., Bis[platinum(II) and Bis[palladium(II) Complexes of α,ω -Dicarboxylic Acid Bis(1,2,4-triaminobutane-*N*⁴) Amides, *Inorg. Chem.*, **1995**, *34*, 2316 - 2322.
- 75 Miller, B., Wild, S., Zorbas, H., Beck, W., Syntheses and Biological Activity of *cis*-Dichloro Mono- and Bis(platinum) Complexes With *N*-Alkyl-ethylenediamine Ligands, *Inorganica Chimica Acta*, **1999**, *290*, 237 - 246.
- 76 von Nussbaum, F., Miller, B., Wild, S., Hilger, S., Schumann, S., Zorbas, H., Beck, W., Steglich, W., Synthesis of 1-(2-Aminophenyl)isoquinolines and the Biological Activity of Their *cis*-Dichloro Platinum(II) Complexes, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42 (18)*, 3478 - 3485.

-
- 77 Farrel, N., *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents* in *Catalysis by Metal Complexes*, **1989**, 11, Hrsg. Ugo, R., James, B. R., Kluwer Academic Publishers, 1 - 281.
- 78 Cooper, T. G., *Biochemische Arbeitsmethoden*. *Walter de Gruyter Verlag, Berlin 1981*.
- 79 Lustig, S. Platinum in the environment: car catalyst emitted platinum; transformation behavior in soil and platinum accumulation in plants; (specification investigations). *Herbert Utz Verlag Wissenschaft 1997*, 1. Auflage, 13 - 31.
- 80 Manley, J. L., Fire, A., Cano, A., Sharp, P. A., Gefter, M. L., DNA-Dependent Transcription of Adenovirus Genes in a Soluble Whole-Cell Extract, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1980**, 77, 3855 - 3859.
- 81 Dignam, J. D., Martin, P. L., Shastry, B. S., Roeder, R. G., Eucaryotic Gene Transcription With Purified Components, *Methods Enz.*, **1983**, 101, 582 - 598.
- 82 Bradford, M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of microgram quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248 - 254.
- 83 Wild, S., *Studie über Cytotoxizität und Wirkmechanismus neuer Platin-komplexe*, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, **1998**.
- 84 Voet, D., Voet, J. G., *Biochemie*, **1992**, 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 821 - 829.
- 85 Rodriguez-Campos, A., Shimamura, A., Worcel, A., Assembly and Properties of Chromatin Containing Histone H1, *J. Mol. Biol.*, **1989**, 209, 135 - 150.
- 86 Cohen, G. I., Bauer, W. R., Barton, J. K., Lippard, S. J., Binding of *cis*- and *trans*-Dichlorodiammineplatinum(II) to DNA: Evidence for Unwinding and Shortening of the Double Helix, *Science*, 1979, 203, 1014 - 1016.
- 87 Tonew, M., Tonew, E.; Gutsche, W.; Wohlrabe, K.; Stelzner, A. M.; Schröder, H.-P.; Heyn, B. Über biologische Wirkungen von Koordinationsverbindungen der Übergangsmetalle. Zum Einfluß von DMSO auf die zytotoxischen, antiviralen und antitumoralen Eigenschaften von *Cis*-chlorodiammin-platin(II): „Cis-Platin“, *Zbl. Bakt. Hyg.*, **1984**, A 257, 108 - 120.
- 88 Lempers, E. L. M., Bloemink, M. J., Reedijk, J., Reaction Products of [Pt(ethylenediamine)dimethyl sulfoxide]Cl₂ and [Pt(ethylenediamine)Cl₂] with d(GpG) and 5'GMP, Unambiguous Evidence for Stable 1:1 Intermediate N7 Adducts with Coordinated Dimethyl Sulfoxide, *Inorg. Chem.*, **1991**, 30, 201 - 206.
- 89 Peritz, A., Al-Baker, S. Vollano, J. F., Schurig, J. E., Bradner, W. T., Dabrowiak, J. C., Antitumor and DNA-Binding Properties of a Group of Oligomeric Complexes of Pt(II) and Pt(IV), *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 2184 - 2188.

- 90 Crothers, D. M., Drak, J., Global Features of DNA Structure by Comparative Gel Electrophoresis, *Methods in Enzymology*, **1992**, 212, 46 – 71.
- 91 Mahbubani, H. M., Pauli, T., Elder, J. K., Blow, J. J., DNA Replication at Multiple Sites on Plasmid DNA in *Xenopus* Egg Extracts, *Nucl. Acids Res.*, **1992**, 20 No. 7, 1457 - 1462.
- 92 Bell, L. and Byers, B., Occurrence of Crossed Strand-exchange Forms in Yeast DNA During Meiosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1979**, 76, 3445 - 3449.
- 93 Roberts, J. J., Quantitative Estimation of Cisplatin-Induced DNA Interstrand Cross-Links and Their Repair in Mammalian Cells: Relationship to Toxicity, *Pharmacol. Ther.*, **1987**, 34, 215 - 246.
- 94 Wood, R. D., Robins, P., Lindahl, T., Complementation of the Xeroderma Pigmentosum DNA Repair Defect in Cell-Free Extracts, *Cell*, **1988**, 53, 97 - 106.
- 95 Keller, W., Determination of the Number of Superhelical Turns in Simian Virus 40 DNA by Gel Electrophoresis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1975**, 72, 4876 - 4880.
- 96 Filipski, J., Kohn, K. W., Bonner, W. M., Differential Crosslinking of Histones and non-Histones in Nuclei by *cis*-Pt(II), *FEBS Letters*, **1983**, 152 (1), 105 - 108.
- 97 Farrell, N., Qu, Y., Feng, L., van Houten, B., Comparison of Chemical Reactivity, Cytotoxicity, Interstrand Cross-Linking and DNA Sequence Specificity of *Bis*(platinum) Complexes Containing Monodenta or Bidenta Coordination Spheres with their Monomeric Analogues, *Biochemistry*, **1990**, 29, 9522 - 9531.
- 98 Farrell, N., Qu, Y., Hacker, M. P., Cytotoxicity and Antitumor Activity of *Bis*(platinum)Complexes, *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 2179 - 2184.
- 99 Farrell, N., Kelland, L. R., Roberts, J. D., van Beusichem, M., Activation of the *trans* Geometry in Platinum Complexes, *Cancer Research* **1992**, 52, 5065 - 5072.
- 100 Gibbons, G. R., Page, J. D., Mauldin, S. K., Husain, I., Chaney, S. G., Role of Carrier Ligand in Platinum Resistance in L1210 Cells, *Cancer Res.*, **1990**, 50, 6497 - 6501.
- 101 Hansen, B. A. H., van der Zwan, J., den Dulk, H., Brouwer, J., Reedijk, J., Dinuclear Alkyldiamine Platinum Antitumor Compounds: A Structure – Activity Relationship Study, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 245 - 249.
- 102 Vilpo, J. A., Vilpo, L. M., Szymkowski, D. E., O'Donovan, A., Wood, R. D., An XPG Repair Defect Causing Mutagen Hypersensitivity in Mouse Leukemia L1210 Cells, *Molecular and Cellular Biology*, **1995**, 15, 190 - 297.

- 103 Kelland, L. R., Murrer, A., Abel, G., Giandomenico, C. M., Mistry, P., Har-
rap, K. R., Ammine/Amine Platinum(IV) Dicarboxylates: A Novel Class of
Platinum Complex Exhibiting Selective Cytotoxicity to Intrinsically Cis-
platin-resistant Human Ovarian Carcinoma Cell Lines, *Cancer Res.*, **1992**,
52, 822 – 828.
- 104 York, J. L., Maddox, L.C., Zimniak, P., McHugh, T. E., Grant, D. F., Re-
duction of MTT by Glutathione S-Transferase, *BioTechniques*, **1998**, 25,
622 - 628.
- 105 van Dongen, G. A., Braakhuis, B. J., Leyva, A., Hendriks, H. R., Kipp, B.
B., Bagnay, M., Snow, G. B., Anti-Tumor and Differentiation-Inducing Ac-
tivity of *N,N*-Dimethylformamide (DMF) in Head-and-Neck Cancer Xeno-
grafts, *Int. J. Cancer*, **1989**, 43, 285 - 292.
- 106 Ponec, M., Hverkort, M., Soei, Y. L., Kempenaar, J., Bodde, H., Use of
Human Keratinocyte and Fibroblast Cultures for Toxicity Studies of Topi-
cally Applied Compounds, *J. Pharm. Sci.*, **1990**, 79 No. 4, 312 - 316.
- 107 Cordeiro, R. F., Savarese, T. M., Role of Glutathione Depletion in the
Mechanism of Action of *N*-Methylformamide and *N,N*-Dimethylformamide
in a Cultured Human Colon Carcinoma Cell Line, *Cancer Res.*, **1986**, 46,
1297 - 1305.
- 108 Tofilon, P. J., Vines, C. M., Milas, L., Enhancement of *In Vitro* Chemo-
therapeutic Activity by Dimethylsulfoxide, *Clinical & Experimental Metas-
tasis*, **1985**, 3(2), 141 - 150.
- 109 Hambley, T. W., The Influence of Structure on the Activity and Toxicity of
Pt Anti-Cancer Drugs, *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, 166, 181 - 223.
- 110 Jones, M. M., Basinger, M. A., Field, I., Holscher, M. A., Coadministration
of Dimethyl Sulfoxide Reduces Cisplatin Nephrotoxicity, *Anticanc. Res.*,
1991, 11, 1939 - 1942.
- 111 Mickey, D. D., Carvalho, L., Foulkes, K., Conventional Chemotherapeutic
Agents Combined With DMSO or DFMO in Treatment of Rat Prostate
Carcinoma, *Prostate*, **1989**, 15, 221 - 232.
- 112 Moebus, V. J., Stein, R., Kieback, D. G., Runnebaum, I. B., Sass, G.,
Kreienberg, R., Antitumor Activity of New Organometallic Compounds in
Human Ovarian Cancer Cell Lines and Comparison to Platin Derivatives,
Anitcancer Res., **1997**, 17, 815 - 822.
- 113 Roberts, J. D., J. Peroutka, G. Beggiolin, C. Manzotti, L. Piazzoni, and N.
Farrell, Comparison of Cytotoxicity and Cellular Accumulation of Po-
lynuclear Platinum Complexes in L1210 Murine Leukemia Cell Lines, *J In-
org Biochem*, **1999**, 77, 47 - 50.
- 114 Roberts, J. D., Peroutka, J., and Farrell, N., Cellular Pharmacology of Po-
lynuclear Platinum Anti-Cancer Agents, *J Inorg Biochem*, **1999**, 77, 51
- 57.

- 115 Lux, F., Hollstein, M., Reile, H., Bernhardt, G., Schönenberger, H., Discrepancy Between Cytotoxicity, Platinum Accumulation, and DNA Platination in MCF-7 Breast Cancer Cells Treated with Diaqua(1,2-diphenylethylendiamine)platinum(II) Sulfates and Cisplatin, *Biological Trace Element Research*, **1996**, *53*, 113 - 128.
- 116 Atema, A., Buurman, K. J. H., Noteboom, E., Smets, L. A., Potentiation of DNA-Adduct Formation and Cytotoxicity of Platinum-Containing Drugs by Low pH, *Int. J. Cancer*, **1993**, *54*, 166 - 172.
- 117 Yoshida, M., Khokar, A. R., Siddik, Z. H., Axial Ligands and Alicyclic Ring Size Modulate the Activity and Biochemical Pharmacology of Amine/Cycloalkylamine-Platinum(IV) Complexes in Tumor Cells Resistant to *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) or *trans*-1*R*,2*R*-1*S*,2*S*-Diaminocyclohexantetrachloroplatinum(IV), *Cancer Res.*, **1994**, *54*, 4691 - 4697.
- 118 Roberts, J. M., Knox, R. J., Friedlos, F., Lydall, D. A., *DNA as the Target for the Cytotoxic and Anti-Tumor Action of Platinum Coordination Complexes: Comparative in vitro and in vivo Studies of Cisplatin and Carboplatin* in Biochemical Mechanisms of Platinum Antitumor Drugs, **1986**, *29*, Hrsg. McBrien, D. C. H., Slater, T. F., IRL Press Oxford.
- 119 Sadler, P. J., Guo, Z., Metal Complexes in Medicine: Design and Mechanism of Action, *Pure & Appl. Chem.*, **1998**, *70* No. 4, 863 - 871.
- 120 Reedijk, J., Why does Cisplatin Reach Guanine-N7 with Competing S-Donor Ligands Available in the Cell?, *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2499 - 2510.
- 121 Comess, K. M., Burstyn, J. N., Essigmann, J. M., Lippard, S. J., Replication Inhibition and Translesion Synthesis on Templates Containing Site-Specifically Placed *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) DNA Adducts, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 3975 - 3990.
- 122 Corda, Y., Job, C., Anin, M. F., Leng, M., Job, D., Transcription by Eucaryotic and Procaryotic RNA Polymerases of DNA Modified at a d(GG) or a d(AG) Site by the Antitumor Drug *cis*-Diamminedichloroplatinum(II), *Biochemistry*, **1991**, *30*, 222 - 230.
- 123 Corda, Y., Job, C., Anin, M. F., Leng, M., Job, D., Spectrum of DNA-Platinum Adduct Recognition by Prokaryotic and Eukaryotic DNA-Dependent RNA Polymerases, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 8582 - 8588.
- 124 Farrell, N., Appleton, T. G., Qu, Y., Roberts, J. D., Soares Fontes, A. P., Skov, K. A., Wu, P., Zou, Y., Effects of Geometric Isomerism and Ligand Substitution in Bifunctional Dinuclear Platinum Complexes on Binding Properties and Conformational Changes in DNA, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 14580 - 14586.
- 125 Roberts, J. D., van Houten, B., Qu, Y., Farrell, N. P., Interaction of Novel Bis(platinum) Complexes with DNA, *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*, 9719 - 9733.

- 126 Blatter, E. E., Vollano, J. F., Krishnan, B. S., Dabrowiak, J. C., Interaction of the Antitumor Agents *cis,cis,trans*-Pt^{IV}(NH₃)₂Cl₂(OH)₂ and *cis,cis,trans*-Pt^{IV}[(CH₃)₂CHNH₂]₂Cl₂(OH)₂ and Their Reduction Products with PM2 DNA, *Biochemistry*, **1984**, *23*, 4817 - 4820.
- 127 Nováková, O., Vrána, O., Kiselva, V. I., Brabec, V., DNA Interactions of Antitumor Platinum(IV) Complexes, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, *228*, 616 - 624.
- 128 Mong, S., Eubanks, D. C., Prestayko, A. W., Crooke, S. T., Characterization of in Vitro Deoxyribonucleic Acid Breakage and Cross-Linking Induced by Bis(isopropylamine)-*trans*-dihydroxy-*cis*-dichloroplatinum(IV), *Biochemistry*, **1982**, *21*, 3174 - 3180.
- 129 Žaludová, R., Žáková, A., Kašpárovká, J., Blalcarová, Z., Kleinwächter, V., Vrána, O., Farrell, N., Brabec, V., DNA Interactions of Bifunctional Dinuclear Platin(II) Antitumor Agents, *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *246*, 508 - 517.
- 130 von Nussbaum, F., Biosynthese, Synthese und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus den Blätterpilzen *Lactarius necator*, *Hebeloma sacchariolum* und *Cortinarius violaceus*, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, **1998**.
- 131 Chen, Y., Guo, Z., Parsons, S., Sadler, P. J., Stereospecific and Kinetic Control over the Hydrolysis of Sterically Hindered Platinum Picoline Anticancer Complex, *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4*, 672 - 676.
- 132 Raynaud, F. I., Boxall, F. E., Goddard, P. M., Valenti, M., Jones, M., Murrer, B. A., Abrams, M. J., Kelland, L. R., *cis*-Amminedichloro(2-methylpyridine) platinum(II) (AMD473), a novel sterically hindered platinum complex: in vivo activity, toxicology, and pharmacokinetics in mice, *Clin. Cancer Res.*, **1997**, *3*, 2063 - 2074,
- 133 Kašpárovká, J., Brabec, V., Recognition of DNA Interstrand Cross-Links of *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) and Its *trans* Isomer by DNA-Binding Proteins, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 12379 - 12387.
- 134 Roberts, J. J., Knox, R. J., Pera, M. F., Friedlos, F., Lydall, P. A., *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer*, **1988**, Hrsg. Nicolini, M., Nijhoff Verlag Boston, 16 – 31.
- 135 Brabec, V., Kašpárovká, J., Vrána, O., Nováková, O., Cox, W. J., Qu, Y., Farrell, N., DNA Modifications by Novel Bifunctional Trinuclear Platinum Phase I Anticancer Agent, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 6781 – 6790.
- 136 McKeage, M. J., Abel, G., Kelland, L. R., Harrap, K. R., Mechanism of Action of an Orally Administered Platinum Complex [Ammine bis butyrato cyclohexylamine dichloroplatinum(IV) (JM221) in Intrinsically Cisplatin-Resistant Human Ovarian Carcinoma *in vitro*, *Br. J. Cancer*, **1994**, *69*, 1 - 7.

- 137 Pérez, C., Leng, M., Malinge, J.-M., Rearrangement of Interstrand Cross-Links into Intrastrand Cross-Links in *cis*-Diamminedichloroplatinum(II)-Modified DNA, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 896 – 903.
- 138 Calsou, P., Frit, P., Salles, B., Repair Synthesis by Human Cell Extracts in Cisplatin Damaged DNA is Preferentially Determined by Minor Adducts, *Nucleic Acids Res.*, **1992**, *20*, 6363 – 6368.
- 139 Hansson, J., Wood, R. D., Repair Synthesis by Human Cell Extracts in DNA Damaged by *cis*- and *trans*-Diamminedichloroplatinum(II), *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*, 8073 – 8091.
- 140 Ullah, S., Husain, I., Carlton W., Sancar A., Human Nucleotide Excision Repair *in vitro*: Repair of Pyrimidine Dimers, Psoralen and Cisplatin Adducts by HeLa Cell-Free Extract, *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*, 4471 - 4484.
- 141 Calsou, P., Barret, J.-M., Cros, S., Salles, B., DNA Excision-Repair Synthesis is Enhanced in a Murine Leukemia L1210 Cell Line Resistant to Cisplatin, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *211*, 403 – 409.
- 142 Szymkowski, D. E., Yarema, K., Essigmann, J. M., Lippard, S. J., Wood, R. D., An Intrastrand d(GpG) Platinum Crosslink in Duplex M13 DNA is refractory to Repair by Human Cell Extracts, *Proc., Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 10772 – 10776.
- 143 Dijt, F. J., Fichtinger-Schepman, A. M. J., Berends, F., Reedijk, J., Formation and Repair of Cisplatin-induced Adducts to DNA in Cultured Normal and Repair-deficient Human Fibroblasts, *Cancer Res.*, **1988**, *48*, 6058 - 6062.
- 144 Reardon, J. T., Vaisman, A., Chaney, S. G., Sancar, A., Efficient Nucleotide Excision Repair of Cisplatin, Oxaliplatin, and Bis-aceto-amine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) Platinum Intrastrand DNA Diadducts, *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 3968 – 3971.
- 145 Zamble, D. R., Mu, D., Reardon, J. T., Sancar, A., Lippard, S. J., Repair of Cisplatin-DNA Adducts by the Mammalian Excision Nuclease, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 10004 – 10013.
- 146 Huang, J.-C., Sancar, A., Determination of Minimum Substrate Size for Human Excinuclease, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 19034 – 19040.
- 147 Calsou, P., Sage, E., Moustacchi, E., Salles, B., Preferential Repair Incision of Cross-Links *versus* Monoadducts in Psoralen-Damaged Plasmid DNA by Human Cell-Free Extracts, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 14963 – 14969.
- 148 Page, J. D., Husain, I., Sancar, A., Chaney, A. G., Effect of the Diamino-cyclohexane Carrier Ligand on Platinum Adduct Formation, Repair, and Lethality, *Biochemistry*, **1990**, *29*, 1016 – 1024.
- 149 Alazard, R., Germanier, M., Johnson, N. P., *Mutat. Res.*, **1982**, *93*, 327 - 337.

- 150 Pinto, A. L., Lippard, S.J., Sequence-Dependent Termination of *In Vitro* DNA Synthesis by *cis*- and *trans*-Diamminedichloroplatinum(II), *Proc. Natl., Acad. Sci., U.S.A.*, **1985**, *780*, 167 – 180.
- 151 Crul, M., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., Maliepaard, M., Cisplatin Resistance and DNA Repair, *Cancer Treat. Rev.*, **1997**, *23*, 341 – 366.
- 152 Little, J. W., Mount, D. W., The SOS Regulatory System of *Escherichia coli*, *Cell*, **1982**, *29*, 11 - 22.
- 153 Selby, C. P., Sancar, A., Molecular Mechanism of Transcription-Repair Coupling, *Science*, **1993**, *260*, 53 – 58.
- 154 Bohr, V. A., Smith, C. A., Okumoto, D. S., Hanawalt, P. C., DNA Repair in an Active Gene: Removal of Pyrimidine Dimers from the DHFR Gene of CHO Cells Is Much More Efficient than in the Genome Overall, *Cell*, **1985**, *40*, 359 - 369.
- 155 Micetich, K., Zwelling, L. A., Kohn, K. W., Quenching of DNA:Platinum(II) Monoadducts as a Possible Mechanism of Resistance to *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) in L1210 Cells, *Cancer Res.*, **1983**, *43*, 3609 - 3613.
- 156 Zwelling, L. A., Anderson, T. Kohn, K. W., DNA-Protein and DNA Interstrand Cross-Linking by *cis*- and *trans*-Platinum(II)diamminedichloride in L1210 Mouse Leukemia Cells and Relation to Cytotoxicity, *Cancer Res.*, **1979**, *39*, 365 - 369.
- 157 Zlatanova, J., Yaneva, J., Leuba, S. H., Proteins That Specifically Recognize Cisplatin-Damaged DNA: A Clue to Anticancer Activity of Cisplatin, *FASEB J.*, **1998**, *12*, 791 – 799.
- 158 van Houten, B., Illenye, S., Qu, Y., Farrell, N., Homodinuclear (Pt,Pt) and Heterodinuclear (Ru,Pt) Metal Compounds as DNA-Protein Cross-Linking Agents: Potential Suicide DNA Lesions, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 11794 - 11801.
- 159 Fichtinger-Schepman, A. M. J., Lohman, P. H. M., Reedijk, J., Detection and Quantitation of Adducts Formed Upon Interaction of Diamminedichloroplatinum(II) with DNA by Anion-Exchange Chromatography after Enzymatic Degradation, *Nucleic Acids Res.*, **1982**, *10*, 5345 – 5356.
- 160 Lambert, B., Jestin, J.-L., Bréhin, P., Oleykowski, C., Yeung, A. T., Mailliet, P., Prétot, C., Le Pecq, J.-B., Jacquemin-Sablon, A., Chottard, J.-C., Binding of the *Escherichia coli* UvrAB Proteins to the DNA Mono- and Diadducts of *cis*-[*N*-2-Amino-*N*-2-methylamino-2,2,1-bicycloheptane]-dichloroplatinum(II) and Cisplatin, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 21251 - 21257.
- 161 Bernges, F., Dörner, G., Holler, E., *Escherichia coli* DNA Polymerase I: Inherent Exonuclease Activities Differentiate Between Monofunctional and Bifunctional Adducts of DNA and *cis*- or *trans*-diamminedichloroplatinum(II), *Eur. J. Biochem.*, **1990**, *191*, 743 – 753.

- 162 Maillet, P., Segal-Bendirdjian, E., Kozelka, J., Barreu, M., Baudoin, B., Bissery, M-C., Gontier, S., Laoui, A., Lavelle, F., Le Pecq, J.-B., Chottard, J.-C., Asymmetrically Substituted Ethylenediamine Platinum(II) Complexes as Antitumor Agents: Synthesis and Structure-Activity Relationships, *Anticancer Drug Design*, **1995**, *10*, 51 – 73.

Lebenslauf

Name	<u>Stefan</u> Christian Wild
Geburtsdatum	4. September 1972
Geburtsort	Kempten (Allgäu)
Eltern	Dieter Wild, Berufsschullehrer Edeltraud Wild geb. Foigele, Hausfrau
Geschwister	Susanne Cobonpue, geb. Wild, 3. Juli 1970 Johannes Wild, 11. April 1980
Schulbesuch	Grundschule 1979 - 1983 Volksschule Kempten (Allgäu) am Haubenschloß Gymnasium 1983 - 1992 Allgäu Gymnasium Kempten
Schulabschluß	allgemeine Hochschulreife 1992
Studium	Chemie Diplom mit Wahlpflichtfach Biochemie 1992 - 1998 Ludwig-Maximilians-Universität München
Diplomarbeit	Studie über Cytotoxizität und Wirksamkeit neuer Cisplatinanaloga
Abschluß	Chemie Diplom, 15. Januar 1998
Promotion	Strukturelle und funktionelle Eigenschaften neuer <i>cis</i> -Platin-Chelatkomplexe und ihrer DNA-Addukte: Relevanz für die cytotoxische Wirkung 15. Januar 1998 bis 20. Juli 2001 Ludwig-Maximilians-Universität München