

**Beitrag zur Aufklärung der  
Cisplatinresistenz von  
Ovarialkarzinomzellen und deren  
Überwindung durch Liposomen oder  
niedermolekulares Heparin**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Daniel Philipp Stölting**  
aus Koblenz

Bonn, November 2015



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2016

Erscheinungsjahr: 2016



Meinen lieben Eltern



# Inhaltsverzeichnis

	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<b>V</b>
<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>Theoretischer Teil</i></b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Cisplatin</b>	<b>3</b>
2.1.1	Chemische Eigenschaften	4
2.1.2	Zelluläre Aufnahme und Ausscheidung	6
2.1.3	Bindung an die Zielstruktur	8
2.1.4	Vermittlung der Zytotoxizität	9
<b>2.2</b>	<b>Apoptose und cisplatininduzierte Toxizität</b>	<b>10</b>
2.2.1	Abgrenzung zur Nekrose und Autophagie	10
2.2.2	Differenzierung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges	12
2.2.3	Aktivierung weiterer Signalkaskaden	16
<b>2.3</b>	<b>Resistenzmechanismen</b>	<b>17</b>
2.3.1	<i>Pre-target</i> Resistenz	18
2.3.2	<i>On-target</i> Resistenz	20
2.3.3	<i>Post-target</i> Resistenz	21
2.3.4	<i>Off-target</i> Resistenz	24
<b>2.4</b>	<b>Liposomen in der Chemotherapie</b>	<b>26</b>
2.4.1	Funktion der Liposomen als Arzneistoffträger	29
2.4.2	Liposomales <i>targeting</i>	30
<b>2.5</b>	<b>Heparin in der Krebstherapie</b>	<b>36</b>
2.5.1	Strukturelle Merkmale von Heparin und NMH	36
2.5.2	Postulierte Heparinwirkungen in Tumorpatienten	38
2.5.3	Einfluss von Heparin auf Chemoresistenz	41
<b>3</b>	<b><i>Ziel der Arbeit</i></b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>Verwendete Materialien</b>	<b>45</b>
4.1.1	Chemikalien und Ausgangsstoffe	45
4.1.2	Hergestellte Reagenzien	51
4.1.3	Verbrauchsmaterialien	62
4.1.4	Geräte	63
4.1.5	Software	67
4.1.6	Zelllinien	67

<b>4.2</b>	<b>Liposomenpräparation</b>	<b>68</b>
4.2.1	Hydratationsmethode	68
4.2.2	Homogenisierung	69
4.2.3	Kopplung von Holotransferrin an die Oberfläche der Liposomen	69
4.2.4	Aufreinigung der Liposomen	69
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung der Liposomen</b>	<b>70</b>
4.3.1	Größenbestimmung	70
4.3.2	Proteinbestimmung	70
4.3.3	Phosphatbestimmung	71
4.3.4	Bestimmung der Kopplungsrate	72
4.3.5	Quantitative Platinbestimmung	72
4.3.6	Bestimmung der Einschussrate	74
<b>4.4</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>74</b>
4.4.1	Inkulturnahme	75
4.4.2	Testung auf Mykoplasmen	75
4.4.3	Kultivierung	76
4.4.4	Zellzahlbestimmung	76
4.4.5	Aussäen der Zellen	77
4.4.6	Gewinnung von Proteinlysaten	78
4.4.7	Proteinbestimmung	79
4.4.8	Lagerung	80
<b>4.5</b>	<b>Cisplatin-uptake</b>	<b>81</b>
4.5.1	Inkubation der Zellen	81
4.5.2	Quantitative Platinbestimmung	82
4.5.3	Proteinbestimmung	82
4.5.4	Auswertung und Statistik	82
<b>4.6</b>	<b>Effluxuntersuchungen zur <i>multi drug resistance</i></b>	<b>82</b>
4.6.1	Probenvorbereitung	82
4.6.2	Durchführung der <i>assays</i> zur <i>multi drug resistance</i>	83
4.6.3	Auswertung und Statistik	85
<b>4.7</b>	<b>Untersuchung der Expression von Proteinen</b>	<b>85</b>
4.7.1	Inkubationsexperimente	85
4.7.2	Elektrophorese (SDS-PAGE)	86
4.7.3	<i>Western blotting</i>	87
4.7.4	Visualisierung der Proteine	87
4.7.5	Auswertung und Statistik	88

<b>4.8</b>	<b>Zytotoxizität</b>	<b>89</b>
4.8.1	Inkubationsexperimente	89
4.8.2	MTT- <i>assay</i>	90
4.8.3	Auswertung und Statistik	91
<b>4.9</b>	<b>Titrationsskalorimetrische Bestimmungen</b>	<b>91</b>
4.9.1	Bindungsuntersuchungen von Tinzaparin an Kupfer	92
4.9.2	Auswertung und Statistik	93
<b>4.10</b>	<b>Proteinexpression apoptoseassoziiierter Proteine</b>	<b>93</b>
4.10.1	Inkubationsexperimente	94
4.10.2	Durchführung des Protein- <i>arrays</i>	94
4.10.3	Auswertung und Statistik	95
<b>4.11</b>	<b>Analyse der Genexpression nach Tinzaparinbehandlung</b>	<b>97</b>
4.11.1	Inkubation der Zellen	97
4.11.2	RNA-Isolierung	97
4.11.3	<i>Gene array</i> -Analyse	98
4.11.4	Auswertung und Statistik	98
<b>4.12</b>	<b>Überprüfung des Effektes der Cisplatinliposomen <i>in vivo</i></b>	<b>99</b>
4.12.1	Herstellung der Liposomen	99
4.12.2	Untersuchte Liposomensorten	99
4.12.3	Durchführung der <i>in vivo</i> -Experimente	99
4.12.4	<i>In vivo-imaging</i> -Verfahren und <i>ex vivo</i> -Visualisierung in Geweben	100
<b>5</b>	<b><i>Ergebnisse und Diskussion</i></b>	<b>101</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung der Cisplatinresistenz</b>	<b>101</b>
5.1.1	Verwendete Liposomen und deren Eigenschaften	101
5.1.2	Zytotoxizität der Liposomen	107
5.1.3	Zelluläre Aufnahme von Cisplatin	112
5.1.4	Untersuchung des Kupfer-/Cisplatininfluxtransporters CTR1	114
5.1.5	DNA-Platinierung	117
<b>5.2</b>	<b>Einfluss der Cisplatinliposomen auf Transkriptionsebene</b>	<b>120</b>
5.2.1	Die Resistenzsignatur der Ovarialkarzinomzellen	120
5.2.2	Beeinflussung der Transkription durch freies Cisplatin	121
5.2.3	Beeinflussung der Transkription durch Cisplatinliposomen	122
5.2.4	p53-abhängige Unterschiede in der transkriptionellen Antwort	123
<b>5.3</b>	<b>Durch Cisplatinliposomen aktivierte intrazelluläre Signalwege</b>	<b>124</b>
5.3.1	Proteinexpression von apoptoseinduzierenden Proteinen	124
5.3.2	Differenzierung des intrinsischen und extrinsischen Signalweges	136
5.3.3	Die Auswirkungen von Lipoplatin <sup>TM</sup> auf die Chemoresistenz <i>in vitro</i>	142

<b>5.4</b>	<b>Übertragbarkeit des Liposomeneffektes</b>	<b>144</b>
5.4.1	Caov-3-Ovarialkarzinomzellen	144
5.4.2	Cisplatinliposomen <i>in vivo</i>	146
<b>5.5</b>	<b>Einfluss von niedermolekularem Heparin auf die Chemoresistenz</b>	<b>158</b>
5.5.1	Cisplatintoxizität bei Heparinbehandlung	158
5.5.2	Toxizität des Tinzaparins	161
5.5.3	Effluxresistenzen	162
5.5.4	Influxresistenz	165
5.5.5	Zelluläre Aufnahme nach NMH-Behandlung	168
5.5.6	Mögliche Ursachen der Sensitivierung	170
<b>5.6</b>	<b>Veränderungen auf Transkriptionsebene durch Tinzaparin</b>	<b>172</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>175</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>177</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>201</b>
8.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	201
8.2	Publikationsliste	207
8.3	Danksagung	210

## Abkürzungsverzeichnis

Nicht aufgelöst werden in Produktbezeichnungen inkorporierte Abkürzungen und Rechtsformen von Gesellschaften. Als allgemein bekannt vorausgesetzt werden römische Ziffern, griechische Zahlen, chemische und stereochemische Abkürzungen sowie die internationalen Abkürzungen für Aminosäuren und im internationalen Einheitensystem definierte Dezimalpräfixe. Beschreibt eine nicht durch eine deutsche Entsprechung ersetzbare Abkürzung einen fremdsprachigen Begriff, so ist dieser stellvertretend *kursiv* dargestellt.

% (m/v)	Masseprozent
% (v/v)	Volumenprozent
[Zahl] % mPEG	Liposomen mit [Zahl] % mPEG-Lipidanteil
[Zahl] % mPEGDiR	Liposomen mit [Zahl] % mPEG-Lipidanteil und 1 % membraninkorporiertem DiR
[Zahl] % mPEGDiRCyTf	Liposomen mit [Zahl] % mPEG-Lipidanteil und 1 % membraninkorporiertem DiR sowie mittels Cyanurchlorid an Lipid konjugiertes Holotransferrin
®	<i>Registered Trade Mark</i>
°C	Grad Celsius
a	<i>Ambiguous</i>
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ABCG2	ABC-Familie G Vertreter 2, Synonym: BCRP1
Ac	Acetyl-
ad	Zu (Endvolumen)
Akt	Proteinkinase B, Synonym: PKB
-AM	-acetoxymethylester
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APAF-1	Apoptotischer Proteaseaktivierungsfaktor-1
Aqua dem.	<i>Aqua demineralisata</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A	<i>Copper transporting ATPase 1</i> , Synonym: MNK
ATP7B	<i>Copper transporting ATPase 2</i> , Synonym: WND
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3related protein</i> , Synonym: FRP1

---

Bad	<i>Bcl-2 associated death promoter</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
bar	Bar
BARD	<i>BRCA1 associated RING domain protein</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2 protein</i>
Bcl-x	<i>B-cell lymphoma-extra protein</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large protein</i>
Bcl-xS	<i>B-cell lymphoma-extra short protein</i>
BH	Bcl-2 Homologie
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BikDD	<i>Bcl-2 interacting killer mutant</i>
BLP25	Lipoprotein BLP25
BRCA1	<i>Breast cancer protein 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer protein 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cal	Kalorie
CAM-DR	<i>Cell adhesion mediated-drug resistance</i>
CARD	Caspaserekrutierungsdomäne
Caspase	Cystein-Aspartatspezifische Protease
cDDP	<i>cis</i> -Diammindichloridoplatin(II), Synonym: (SP-4-2)-Diammindichloridoplatin(II), Cisplatin
CDK 1A	<i>Cyclin dependent kinase 1A</i>
CDK 1B	<i>Cyclin dependent kinase 1B</i>
cFLIP	<i>FLICE-like inhibitory protein</i> , Synonym: CFLAR
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Chk1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
Chol	Cholesterol
cIAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
c-Jun	Protoonkogen JUN Proteinprodukt c-Jun
c-raf	<i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase rapidly accelerated fibrosarcoma 1</i>
CTR1	<i>Copper transporter 1</i> , Synonym: SLC31A1

## Abkürzungsverzeichnis

---

Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
DAXX	<i>Death domain associated protein</i>
DD	<i>Death domain</i>
DED	<i>Death effector domain</i>
DiR	1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindotricarbocyanin-iodid
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Synonym: DNS
DOPE	1,2-Di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOTAP : Chol-fus1	Liposomen aus 1,2-Di-(9Z-octadecenoyl)-3-trimethylammonium-propan : Cholesterol (1:1) mit einem komplexierten Plasmid des Gens des Fusion 1 Tumorsuppressorproteins
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DPPG	1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
DR3	<i>Death receptor 3</i> , Synonym: TNFRSF25
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DYRK1B	<i>Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B</i>
EC <sub>50</sub>	<i>Half maximal effective concentration</i>
ECACC	<i>European collection of cell cultures</i>
ECE	<i>Electrical current exclusion</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EPR	<i>Enhanced permeability and retention</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCC	<i>Excision repair cross complementing protein</i>
ERK	Extrazellulärsignal regulierte Kinase
et al.	<i>Et alii</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FADD	<i>Fas associated protein with death domain</i> , Synonym: MORT1
Fas	<i>First apoptotic signal receptor</i> , Synonyme: APO-1, CD95

---

FasL	<i>First apoptotic signal ligand</i> , Synonym: CD95L
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FLICE	<i>Fas associated death domain like interleukin-1<math>\beta</math> converting enzyme</i> , Synonym: Caspase-8
FMK-	Fluoromethylketon-
FMP2.1/AS02A	<i>Falciparum Malaria Protein 2.1/ GlaxoSmithKline (GSK) proprietary adjuvant system 02A</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Normfallbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
G2/M-Arrest	Zellzyklusarrest zwischen der <i>gap2</i> - und Mitosephase
GADD45a	<i>Growth arrest and DNA damage inducible protein alpha</i>
GAG	Glykosaminoglykan
gDNA	<i>Genomic DNA</i>
GF	<i>Growth factor</i>
GF-AAS	<i>Graphite furnace-atomic absorption spectrometry</i>
GlcA	<i>Glucuronic acid</i>
GlcN	Glucosamin
GRB2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
GS-	Glutathion in Konjugation mit anderen Substanzen
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Planck'sches Wirkungsquantum
h	Stunde
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER-2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

HIF-1 $\alpha$	Hypoxieinduzierbarer Faktor 1 $\alpha$
HMG1	<i>High mobility group protein 1</i>
HMG2	<i>High mobility group protein 2</i>
HO-1	Hämoxygenase-1
HO-2	Hämoxygenase-2
holo-Tf	Holotransferrin
HR	Homologe Rekombination
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HTRA2/Omi	<i>High temperature requirement protein A2/Omi protein</i> , Synonym: HTRA2, Omi
I.E.	Internationale Einheit
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
IC <sub>50</sub>	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IdoA	<i>Iduronic acid</i>
IgG	Immunglobulin G
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
ILK	<i>Integrin linked kinase</i>
IMP	<i>Investigational medicinal product</i>
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KG	Körpergewicht
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
Korr.	Korrigiert
L	Liter
L9NC	Liposomales 9-Nitro-20(S)-Camptothecin
LErafAON-ETU	<i>Liposome entrapped c-raf antisense oligonucleotide-easy to use formulation</i>
L-MTP-PE	Liposomales Muramyltri-peptid-phosphatidylethanolamin
L-NDDP	<i>cis</i> -Bisneodecanoato- <i>trans</i> -(R,R)-1,2-diammincyclohexanplatin(II)
L-Selektin	Leukozytenselektin
LUV	<i>Large unilamellar vesicle</i>
m	Meter

---

m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
min	Minute
Mio.	Million
MLH1	<i>MutL protein homolog 1</i>
MLV	<i>Multilamellar vesicle</i>
MMP-9	Matrixmetalloprotease-9
MMR	<i>DNA mismatch repair</i>
mol	Mol
mPEG	Methoxypolyethylenglykol
MRP2	<i>Multidrug resistance associated protein 2</i> , Synonyme: cMOAT, ABCC2
MSH2	<i>MutS protein homolog 2</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
MVV	<i>Multivesicular vesicle</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
n.v.	Nicht verfügbar
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF-κB	Nukleärer Faktor des Immunglobulin κ <i>locus</i> in B-Zellen
NIR	Nahes Infrarot
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NMH	Niedermolekulares Heparin
NSCLC	<i>Non small cell lung cancer</i>
OCT2	<i>Organic cation transporter 2</i> , Synonym: SLC22A2
P-	Phosphoryliert
p21	Tumorsuppressorprotein p21, Synonym: CDKN1A
p27	Tumorsuppressorprotein p27, Synonym: CDKN1B

## Abkürzungsverzeichnis

---

p38	Tumorsuppressorprotein p38, Synonym p38 MAPK
p53	Tumorsuppressorprotein p53
p73	Tumorsuppressorprotein p73
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
P-ATPase	P-Typ-Adenosintriphosphatase, Synonym: E1-E2 ATPase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCS	<i>Photon correlation spectroscopy</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
pEC <sub>50</sub>	Negativer dekadischer Logarithmus der EC <sub>50</sub>
PEG	Polyethylenglykol
pERK	Phosphorylierte ERK
P-GP	P-Glykoprotein 1, Synonyme: MDR1, ABCB1
pGT-1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Glutathiontransporter-1
pH	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Stoffmengenkonzentration von H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionen in einer wässrigen Lösung
Ph. Eur.	<i>Pharmacopoea Europaea</i>
PI	Polydispersitätsindex
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pIC <sub>50</sub>	Negativer dekadischer Logarithmus der IC <sub>50</sub>
PIDD	<i>p53-induced protein with a death domain</i> , Synonym: LRDD
PKC	Proteinkinase C
pK <sub>s</sub>	pK <sub>s</sub> -Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PMS2	<i>Mismatch repair endonuclease 2 discovered by postmeiotic segregation gene screening</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol ζ	DNA-Polymerase ζ
PON2	Serumparaoxonase/-arylesterase 2
Pro-Caspase	Proteolytisch aktivierbare Vorläuferform einer Caspase
P-Selektin	<i>Platelet</i> -Selektin
PVDF	Polyvinylidenfluorid

---

PYD	<i>Pyrin domain</i>
RAB8	<i>Ras related protein Rab-8, Synonym: RAB8A</i>
RAD17	<i>Zellzyklus-checkpoint-protein RAD17</i>
RAD51	<i>RAD51 Rekombinase</i>
Ras	<i>Rattensarkomprotein</i>
RES	<i>Retikuloendotheliales System, Synonym: RHS</i>
REV3	<i>Reversionless 3 subunit</i>
REV7	<i>Reversionless 7 subunit</i>
R <sub>f</sub>	<i>Resistenzfaktor</i>
RINGdomain	<i>Really interesting new gene finger domain</i>
RIP1	<i>Receptor interacting protein kinase 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid, Synonym: RNS</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium 1640</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
s	<i>Sekunde</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SE	<i>Standard error</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLC	<i>Solute carrier</i>
SMAC/Diablo	<i>Second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low isoelectric point, Synonym: SMAC, Diablo</i>
SN-38	<i>7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin</i>
SOS1	<i>Son of sevenless homolog 1</i>
SPC	<i>Sojaphosphatidylcholin</i>
S-Phase	<i>Synthesephase des Zellzyklus</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
Stabw	<i>Standardabweichung</i>
SUV	<i>Small unilamellar vesicle</i>
T	<i>Tesla</i>
T4N5	<i>T4 EndonukleaseV</i>
Tab.	<i>Tabelle</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

tBID	<i>Truncated BID</i>
TBP	<i>TATA-Box binding protein</i>
TBS	<i>TRIS buffered saline</i>
TBS-T	<i>TRIS buffered saline with Tween 20</i>
Tf	Transferrin
TF	<i>Tissue factor</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TfR	Transferrinrezeptor
Tinza	Tinzaparin
TL1A	<i>TNF-like ligand 1A</i>
TLK199 HCl	Ezatiostat-hydrochlorid
TLS	Translasionssynthese
TM	Transmembrandomäne
TMEM	Transmembranprotein 205
TNF R1	Tumornekrosefaktorrezeptor 1
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TP53	Tumorsuppressorgen TP53
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein</i>
TRAF-2	<i>TNF receptor associated factor 2</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tweak	<i>Tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis</i>
TWEAK R	<i>Tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis receptor</i>
T-Zelle	Thymus-Lymphozyt
™	<i>Unregistered Trade Mark</i>
U	Umdrehung
UBF	<i>Upstream binding factor</i>
UFH	Unfraktioniertes Heparin
ultraNMH	Gruppe der kleinsten Vertreter des Niedermolekularen Heparins
UV	Ultraviolett
UV	<i>Unilamellar vesicle</i>
V	Volt

VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VDAC1	<i>Voltage dependent anion selective channel protein 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIS	Visuell sichtbar
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i> , Synonym: Integrin $\alpha 4\beta 1$
vs.	<i>Versus</i>
Wnt	<i>Wingless int-1</i>
x	-fach konzentriert
XAF1	<i>XIAP associated factor 1</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum group F complementing protein</i>
Z-	Benzyloxycarbonyl-
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
$\lambda_{em.}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ext.}$	Extinktionswellenlänge
v	Frequenz

# 1 Einleitung

Krebs ist eine der häufigsten und oft tödlich verlaufenden Krankheiten der heutigen Zeit. In den USA und in Westeuropa stellen Krebserkrankungen in den letzten Jahren die zweithäufigste Todesursache dar.<sup>1</sup> Weltweit gab es im Jahr 2012 ca. 14 Millionen Neuerkrankungen und 8,2 Millionen Todesfälle, die direkt mit einer Krebserkrankung assoziiert sind. Der Trend ist steigend. So wird in den nächsten zwei Jahrzehnten statistisch eine Zunahme der jährlichen Neuerkrankungen auf 22 Millionen erwartet.<sup>2</sup>

Die fünf häufigsten Krebsarten sind nach absteigender Häufigkeit bei Männern in Lunge, Prostata, Kolon/Rektum, Magen und Leber positioniert, bei Frauen in Brust, Kolon/Rektum, Lunge, Zervix und Magen. Betrachtet man jedoch die Sterblichkeit für alle Krebsarten, rangiert das Ovarialkarzinom auf dem siebten Platz.<sup>3</sup> Dies verdeutlicht eindrucksvoll, dass es sich bei Ovarialkarzinomen trotz ihres glücklicherweise seltenen Auftretens um den tödlichsten gynäkologischen Tumor handelt.<sup>4,5</sup>

Diese maligne Veränderung ist in verschiedenen Patientinnen oftmals sehr heterogen, und kann auf unterschiedliche Weise kategorisiert werden. Gemäß der Progression des Tumors werden morphologisch vier Stadien unterschieden, wobei die Diagnose in der Mehrzahl der Fälle erst im letzten Stadium erfolgt. Dies liegt in dem relativ späten Auftreten von Symptomen und der Verwechslungsgefahr mit Symptomen anderer Erkrankungen, z.B. denen des Magen-Darmtraktes, begründet.<sup>3</sup> Außerdem existieren aufgrund der hohen Heterogenität unterschiedliche genetische Varianten, die Hinweise auf die Aggressivität des Tumors geben können. Sehr oft betroffen ist das Tumorsuppressorgen 53 (p53), nach dessen Status (mutiert gegenüber nicht mutiert) eine Einteilung in zwei Oberkategorien abseits der rein morphologischen Eigenschaften des Tumors möglich ist.<sup>6</sup>

Zur Behandlung des Ovarialkarzinoms hat sich bis heute eine platinhaltige Chemotherapie als einzelne Wirkstoffkomponente oder in Kombination etabliert, die einer nicht platinhaltigen Therapie überlegen ist.<sup>7</sup> Behandlungen ohne Cisplatin oder eines seiner Analoga bieten sich nur als Alternativen an, wenn der Tumor gar kein Ansprechen mehr auf jegliche zytostatische platinhaltige Substanz zeigt und ein Erhöhen der Dosierung aufgrund der Nebenwirkungen des Cisplatins wie Oto-/Nephrotoxizität oder Myelosuppression nicht mehr möglich ist.<sup>8</sup>

Daraus ergibt sich auch die größte Herausforderung für die Forschung zur Behandlung von Ovarialkarzinomen mit Cisplatin und verwandten Substanzen: Ein Gewährleisten der

Aufrechterhaltung der Cisplatinwirkung, also im Umkehrschluss ein Überwinden der Cisplatinresistenz der Tumore, die teilweise intrinsisch vorhanden ist, aber nach mehreren Behandlungszyklen fast immer zwangsläufig eintritt.<sup>9</sup>

Bei dieser Art der Chemoresistenz handelt es sich um einen (vorhandenen oder erworbenen) Adaptionsmechanismus der Zellen des Tumors an die Exposition gegenüber einem Zytostatikum. Sie ist eng verknüpft mit weiteren genetischen Veränderung, die wiederum die starke morphologische Heterogenität des Sammelbegriffs „Ovarialkarzinom“ erklären.<sup>10</sup>

Ziel der modernen platinbasierten Chemotherapie ist es also Behandlungsschemata mit Cisplatin oder anderen platinhaltigen Substanzen zu finden, die die Chemoresistenz umgehen. Ein Überwinden der Cisplatinresistenz kann teilweise durch eine modifizierte Verteilung und Zielsteuerung des Arzneistoffes im Tumor oder eine vorherige Behandlung mit anderen chemosensitivierenden Substanzen erreicht werden.<sup>11</sup>

Dies kann jedoch nur gelingen, wenn das zu großen Teilen noch unbekanntes Phänomen der Chemoresistenz gegen Cisplatin besser verstanden wird und Mechanismen auf molekularer Ebene aufgezeigt werden, die die Chemoresistenz therapeutisch beeinflussen können.

Somit steht diese Arbeit in dem Kontext, einen Überblick über die Cisplatinresistenz in Ovarialkarzinomzellen zu geben und aufbauend auf den vorangegangenen Erkenntnissen von KRIEGER ET AL.<sup>12</sup> einen Beitrag zur Überwindung der Resistenz in ausgewählten Ovarialkarzinomzelllinien durch die Anwendung von cisplatinhaltigen Liposomen zu leisten. In diesem Zusammenhang wird die Inhibition apoptoserelevanter Schaltstellen als möglicher Beitrag aufgezeigt. Darüber hinaus werden in dieser Arbeit erstmals Erkenntnisse zur Chemosensitivierung der Zellen mittels niedermolekularem Heparin vorgestellt und in ihrer therapeutischen Perspektive skizziert.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Cisplatin

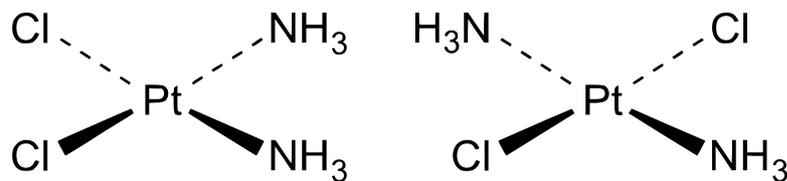
Cisplatin als Zytostatikum wurde vor über 40 Jahren von dem Amerikaner Barnett Rosenberg entdeckt. Ursprünglich war es sein Ziel, die Auswirkungen eines elektrischen Feldes auf die Zellteilung zu ergründen. Nach dem Einbringen von Platinelektroden in die Wachstumskammer von *Escherichia coli* konnten starke morphologische Veränderungen an den Bakterien festgestellt werden, welche auf die entstehenden Elektrolyseprodukte an den Elektroden zurückzuführen waren.<sup>13</sup> Diese wurden als Platinderivate identifiziert und an Bakterien und Tumoren in Mäusen weiterentwickelt, sodass sich als die vielversprechendste Substanz das *cis*-Diammindichloridoplatin(II) (Cisplatin) herausstellte.<sup>14</sup> Interessanterweise wurde diese Verbindung bereits ein Jahrhundert vorher von dem Italiener Michele Peyrone als Peyrones Salz synthetisiert, jedoch kein Zusammenhang zu einer chemotherapeutischen Wirkung hergestellt.<sup>15,16</sup> Nach weiteren Experimenten unter anderem am Chester Beatty Institut in London wurde Cisplatin vom *US National Cancer Institute* in die klinische Prüfung aufgenommen und 1971 erstmalig einem Patienten verabreicht, was schließlich nach weiterer Forschung 1978 zur Zulassung durch die FDA führte.<sup>17</sup> Bis heute hat Cisplatin große Relevanz in der Tumorthherapie und ist nur schwer oder gar nicht zu ersetzen in der Behandlung metastasierender Hoden- und Ovarialtumore, Blasen- und solider Tumore von Zervix, Lunge und im Kopf-/Halsbereich.<sup>18</sup>

Dosislimitierende unerwünschte Arzneimittelwirkungen, besonders Nephrotoxizität<sup>19</sup>, stellten die erste treibende Kraft zur Weiterentwicklung dar, aus der Mitte der 80er Jahre das Carboplatin hervorging.<sup>20</sup> Die zweite bis heute teils unüberwindliche Hürde bei der Chemotherapie mit Cisplatin ist das Auftreten von Chemoresistenzen, die auch durch die wiederkehrenden Behandlungszyklen einer platinbasierten Chemotherapie provozierbar sind. Um diesem Rückschlag entgegenzuwirken, wurden zunächst weitere chemisch modifizierte Cisplatinanaloga wie das Oxaliplatin entwickelt.<sup>21</sup> Neben der Modifikation des Arzneistoffmoleküls wurde außerdem versucht, durch *drug delivery systems* die Wirkstoffkonzentration im Tumor zu erhöhen, wie es für das Doxorubicin als liposomale Formulierung schon erfolgreich durchgeführt wurde.<sup>22</sup> Mit fortschreitendem Kenntnisstand über die Vorgänge der Apoptose und damit auch der gegenregulierenden Resistenzmechanismen auf zellulärer Ebene beinhalten neuere Ansätze eine Modulation eben

dieser Prozesse. Ausgewählte experimentelle Ausgangspunkte stellen dabei z.B. enzymaktivierbare *prodrugs*<sup>23</sup>, resistenzgendemethylierende Substanzen<sup>24</sup> oder Kombinationstherapien mit molekular zielgerichteten Arzneistoffen wie Antikörpern oder etablierten Arzneistoffen aus anderen Indikationsgebieten<sup>25</sup> dar.

Trotz dieser vielfältigen Ansätze ist die Cisplatinresistenz ein bis heute nur unvollständig aufgeklärtes Phänomen. Die hohe Relevanz von Cisplatin und anderen platinhaltigen Zytostatika über Jahrzehnte hinweg verdeutlicht dabei jedoch die Notwendigkeit, Mechanismen der Chemoresistenz auf zellulärer Ebene zu verstehen, um einen Grundstein für die Entwicklung neuer Arzneistoffe und Therapien zu legen.

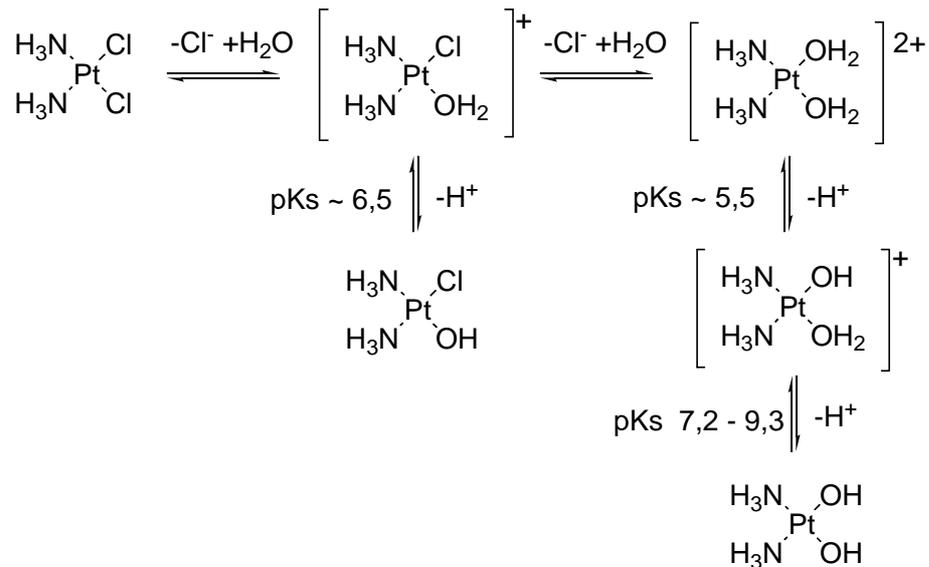
### 2.1.1 Chemische Eigenschaften



**Abb. 2.1:** Struktur des (SP-4-2)-Komplexes (Cisplatin), in dem sich Ammin- und Chloridoligand gegenüber stehen (links), und des (SP-4-1)-Komplexes (Transplatin), in dem beide Chloridoliganden gegenüber sind (rechts).

Bei (SP-4-2)-Diammindichloridoplatin(II) (Cisplatin) handelt es sich um einen quadratisch planaren Komplex mit zweiwertigem Platin als Zentralatom (Abb. 2.1). Die zweifach positive Ladung des Platins wird durch die beiden einfach negativ geladenen Chloridoliganden kompensiert, sodass der Gesamtkomplex nach außen hin neutral ist. Es existiert außerdem als Isomer (SP-4-1)-Diammindichloridoplatin(II) (Transplatin), welches als Verunreinigung aus dem Herstellungsprozess in den Arzneibüchern gelistet ist, jedoch *in vitro* eine stark reduzierte und *in vivo* kaum feststellbare Zytotoxizität an den Tag legt.<sup>26</sup>

In wässriger Lösung, also auch unter *in vitro*-Bedingungen, unterliegt Cisplatin einem zweistufigen Hydrolysevorgang zum Monoaqua- und Diaquakomplex (Abb. 2.2, horizontale Orientierung), in dessen Verlauf einer oder beide Chloridoliganden durch Wasser ausgetauscht werden. In 0,9 % Natriumchloridlösung wird aufgrund der erhöhten Chloridionenkonzentration diese Umsetzung auf der Stufe des Monoaquakomplexes verlangsamt.<sup>27</sup> Laut Arzneibuchkommentar gilt daher eine Cisplatinlösung mit isotonischer Natriumchloridlösung unter Lichtausschluss als 24 h stabil.<sup>18</sup>



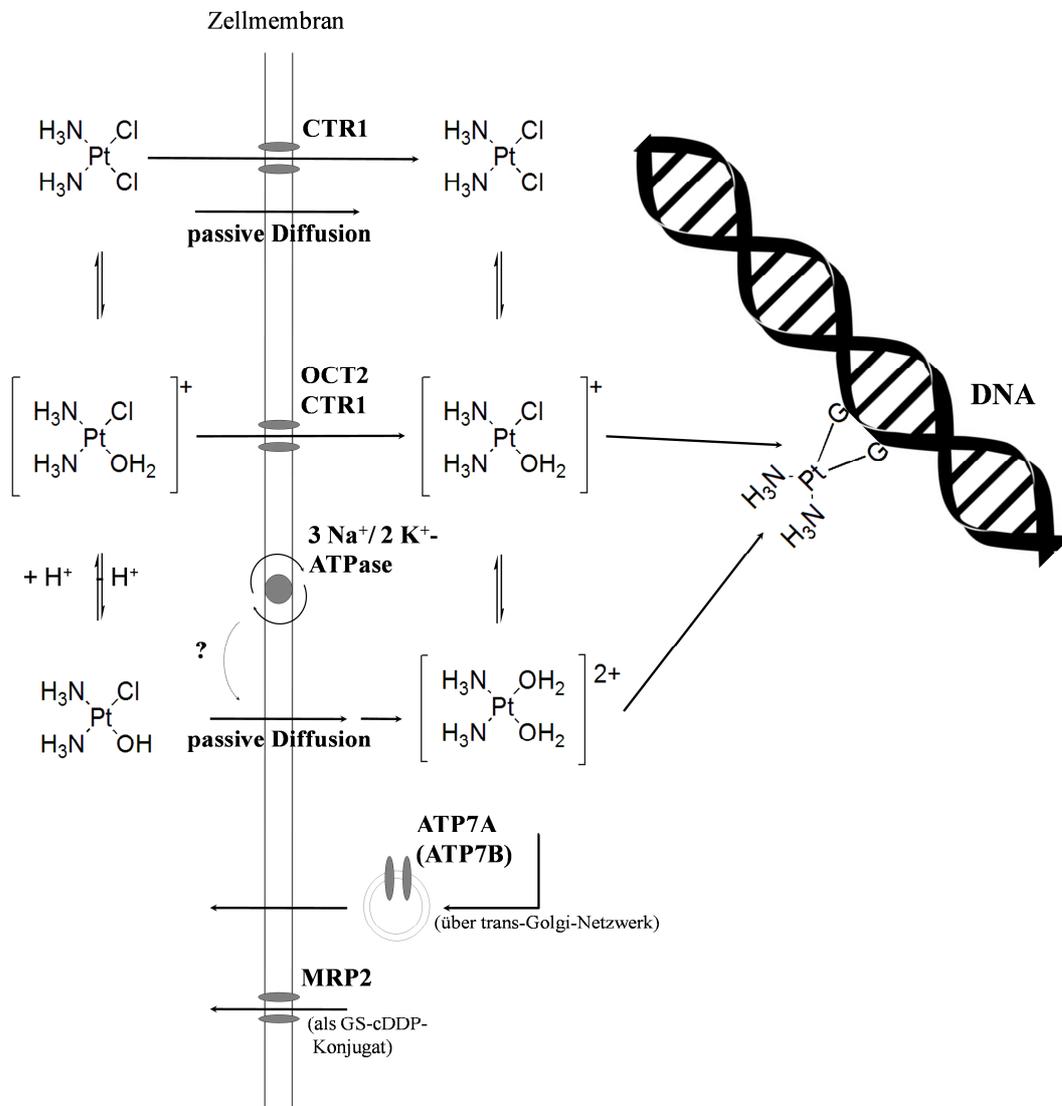
**Abb. 2.2:** Hydrolyse- und Protolyseverhalten von Cisplatin in wässrigem Milieu; modifiziert nach YOTSUYANAGI ET AL.<sup>28</sup>

Neben der fortschreitenden Hydrolyse ist ebenfalls das Protolyseverhalten der Aquakomplexe in Betrachtungen über eine Aufnahme von Cisplatin (bzw. entstehenden Produkten) in Tumorzellen mit einzubeziehen (Abb. 2.2, vertikale Orientierung). Hierzu existieren verschiedene experimentelle Daten: Der Monoaquakomplex besitzt einen  $\text{pK}_s$ -Wert von ca. 6,4–6,9 und der Diaquakomplex einen  $\text{pK}_{s1}$ -Wert von ca. 5,4–5,6 und  $\text{pK}_{s2}$ -Wert von ca. 7,2–9,3.<sup>27,29</sup>

Ohne zelluläre Strukturen wie Influx- oder Effluxtransporter zu betrachten, hat dies unter physiologischen Bedingungen die Auswirkung, dass Cisplatin extrazellulär bei einer Chloridionenkonzentration von ca. 140 mmol/L<sup>30</sup> fortschreitend in den Monoaquakomplex übergeht, der bei pH 7,4 überwiegend deprotoniert vorliegt. Da der Hydroxoligand den neutralen Ladungszustand des Gesamtkomplexes restituiert, hat dies entscheidende Auswirkungen auf die unspezifische Zellaufnahme durch passive Diffusion (Abschnitt 2.1.2). Intrazellulär sind bei einer niedrigeren je nach Zellkompartiment stark variierenden Chloridionenkonzentration von ca. 5–40 mmol/L<sup>30</sup> höchstwahrscheinlich beide Aquakomplexe im Protolysegleichgewicht. Hierbei spielt ebenfalls der intrazelluläre pH-Wert eine Rolle, der sich bei Tumorzellen deutlich von Zellen nicht pathologischer Morphologie unterscheiden kann.<sup>31</sup>

Es ergibt sich daher hauptsächlich durch die Parameter Cisplatinkonzentration, Chloridionenkonzentration und pH-Wert ein komplexes chemisches Verhalten der Verbindung, die daher spezifischen Aufnahmemechanismen in verschiedenen Formen bezüglich Ladung, Reaktivität und Affinität gegenübersteht.

## 2.1.2 Zelluläre Aufnahme und Ausscheidung



**Abb. 2.3:** Das intrazelluläre Konzentrationsgleichgewicht von Cisplatin und seinen Hydrolyseformen bestimmt durch Influx- und Effluxmechanismen sowie Bindung an die Zielstruktur DNA; Doppelpfeile stellen Hydrolysegleichgewichte dar, mit Protonenaufnahme/-abgabe beschriftete Doppelpfeile Protolysegleichgewichte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde im intrazellulären Bereich auf die Darstellung der Protolyseformen verzichtet. Hintereinander stehende Pfeile deuten eine starke Vereinfachung in der Darstellung ablaufender Prozesse an. Das Fragezeichen deutet an, dass der Einfluss stark diskutiert wird. Modifiziert nach MORE ET AL.<sup>32</sup>

Neben der passiven Diffusion durch die Zellmembran, für die nur die ungeladenen Platinkomplexe in Frage kommen, findet ebenfalls eine Aufnahme über Transporter der SLC-Familie statt. Hierbei sind besonders CTR1 und OCT2 beschrieben<sup>33</sup> (Abb. 2.3).

CTR1 ist ein integrales Membranprotein aus ca. 190 Aminosäuren<sup>34</sup>, dessen drei Transmembrandomänen höchstwahrscheinlich als funktionelles Trimer bei der Aufnahme von Cisplatin in Erscheinung treten.<sup>35</sup> Es spielt im Körper eine entscheidende Rolle für die

Kupferhomöostase durch den Transport einwertigen Kupfers.<sup>36</sup> Daher liegt es nahe, dass gezeigt werden konnte, dass neben Cisplatin selbst auch der einfach positiv geladene Monoaquakomplex als Substrat fungiert. Platinkomplexe bewegen sich als schwache Lewis-Säuren höchstwahrscheinlich wie einwertiges Kupfer unter mehrmaliger Chelatierung durch die Pore des CTR1-Trimers<sup>37</sup>, allerdings wird ebenfalls eine Aufnahme durch Internalisierung diskutiert.<sup>38</sup>

OCT2 ist im Gegensatz zu CTR1 nicht ubiquitär vorhanden. Aus diesem Grund muss sein Beitrag zur Cisplatin Aufnahme immer im Kontext zum untersuchten Gewebe bzw. der untersuchten Zelllinie betrachtet werden.<sup>39</sup> Besonderes Augenmerk ist dabei der Tatsache geschuldet, dass OCT2 vornehmlich dort exprimiert wird, wo Gewebeschädigungen von Cisplatin verstärkt auftreten wie im Nierentubulus und der Cochlea des Hörapparates. Somit wird der Transporter stark mit den unerwünschten Arzneimittelwirkungen platinhaltiger Verbindungen assoziiert.<sup>40</sup>

Es wurde zudem festgestellt, dass die intrazelluläre Cisplatinkonzentration im Zellsystem mit dem ATP-Angebot und der Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase korreliert. Der in manchen Zelllinien stark ausgeprägte Effekt ist mit einer Beeinflussung der passiven Diffusion über das Membranpotential möglich, aber auch Auswirkungen auf andere Aufnahmewege können nicht ausgeschlossen werden.<sup>41,42</sup>

Intrazellulär wird Cisplatin leicht hydrolysiert, wodurch der Wirkstoff unter anderem in ein- oder zweifach positiv geladener Form als Aqua- bzw. Diaquakomplex vorliegt und die Zelle passiv nur schwer verlassen kann (Abschnitt 2.1.1). Der Efflux erfolgt daher vornehmlich durch P-ATPasen für Kupfer wie ATP7A und ATP7B. Viele der für andere Zytostatika relevanten Transporter, die mit *multi drug resistance* in Zusammenhang stehen wie P-GP, spielen beim Cisplatinexport eine untergeordnete Rolle. Hier gibt es Belege für MRP2.<sup>33</sup>

ATP7A und ATP7B sind Isoformen von kationentransportierenden P-ATPasen. Die Kristallstruktur ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wird von acht Transmembrandomänen und einer N-terminalen Region mit sechs Bindungsstellen für Kupfer und einer Länge von ca. 1500 (ATP7A) bzw. 1465 (ATP7B) Aminosäuren ausgegangen.<sup>43</sup> Beide Formen werden im trans-Golgi-Netzwerk exprimiert und vermitteln dort den Einstrom von Kupfer aus dem Zytosol in den Golgi-Apparat; findet jedoch eine Translokation über Vesikel zur Zellmembran statt, sind sie direkt am Kupferefflux beteiligt. Der Mechanismus des Cisplatintransports verläuft wahrscheinlich analog zu dem des Kupfers. Bei genetischer

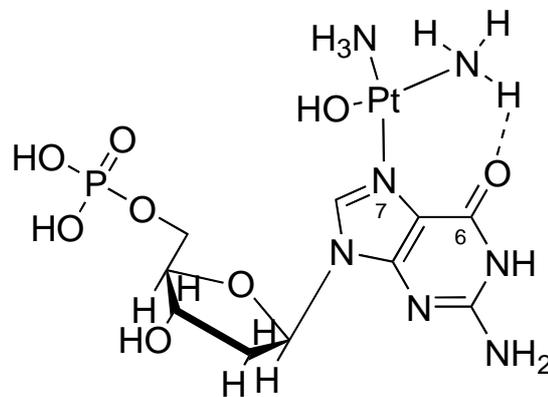
Variation, die die Funktionsfähigkeit der Transporter blockiert, kommt es im Organismus symptomatisch zum Wilson- (ATP7A) bzw. Menke-Syndrom (ATP7B).<sup>44</sup>

MRP2 aus der Familie der ABC-Transporter besitzt 17 Transmembrandomänen und hat eine Länge von 1545 Aminosäuren.<sup>45,46</sup> Der Transport ist wie bei den Kupfereffluxtransportern ATP-abhängig und setzt zudem eine vorherige Bindung des Platinkomplexes an Glutathion voraus.<sup>47</sup>

Diese Influx- und Effluxmechanismen bedingen somit hauptsächlich die intrazelluläre Konzentration von Cisplatin, welches dann aus dem Gleichgewicht der beiden Aquakomplexe elektrophil an die DNA bindet.<sup>48</sup>

### 2.1.3 Bindung an die Zielstruktur

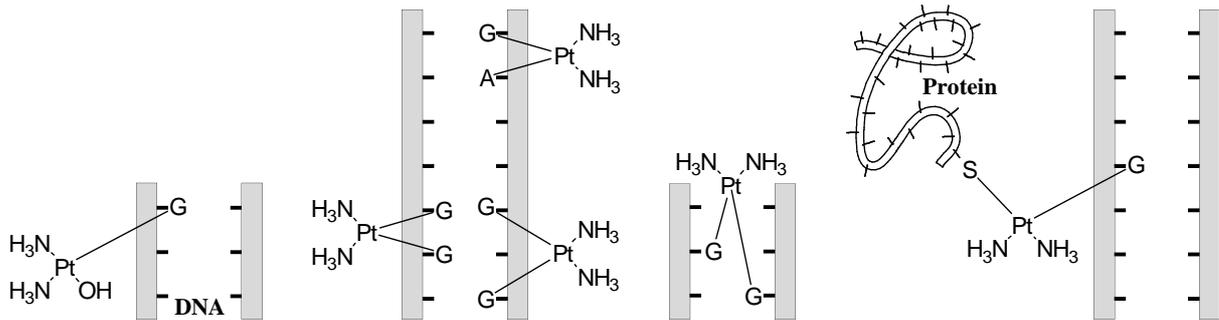
Cisplatin interagiert mit den Basen der DNA vornehmlich am elektronenreichen Purin-Stickstoff in Position 7. Als Hauptbindungspartner fungiert Guanin, welches im Vergleich zu Adenin durch den an Position 6 substituierten Sauerstoff zur Ausbildung einer stabilisierenden Wasserstoffbrücke zum Amminliganden des Aquakomplexes fähig ist<sup>49</sup> (Abb. 2.4).



**Abb. 2.4:** Isolierte Darstellung der Bindung eines Aquakomplexes von Cisplatin an Guanosinphosphat; neben der Komplexbindung in Position 7 wirkt die Wasserstoffbrückenbindung des an Position 6 substituierten Stickstoffes stabilisierend. Das Protolyseverhalten ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt.

Nur ein geringer Teil des DNA-gebundenen Aquakomplexes verbleibt auf der Stufe des Monoadduktes, der Großteil bildet Vernetzungen mit benachbartem Guanin/Adenin oder dem übernächsten Guanin. Die so entstehenden 1,2-*intrastrand crosslinks* Guanin-Pt-Guanin und Guanin-Pt-Adenin machen bis zu 90 % bzw. bis zu 10 % der möglichen Addukte aus.<sup>50</sup> Alle anderen Vernetzungen wie 1,3-*intrastrand crosslinks* und *interstrand crosslinks* stellen einen

verhältnismäßig kleinen Anteil dar.<sup>51</sup> Prinzipiell ist auch eine Bindung der Aquakomplexe an andere Nukleophile wie Proteine mit schwefelhaltigen Aminosäuren (z.B. Glutathion) möglich. Diese kann auch mit einem Monoaddukt Pt-DNA stattfinden, sodass sich DNA-Pt-Protein-Komplexe bilden (Abb. 2.5). Die Affinität zu Glutathion wird allerdings geringer als die zu Purinbasen eingeschätzt.<sup>52</sup>



**Abb. 2.5:** Schematische Darstellung der möglichen Cisplatin-DNA-Addukte; v.l.n.r.: Monoaddukt, 1,2- und 1,3-*intrastrand crosslinks*, *interstrand crosslink* und DNA-Protein-Addukt

Bei der Entstehung der prädominanten Guanin-Pt-Guanin 1,2-*intrastrand crosslinks* kommt es zur Ausbildung eines Winkels in der DNA-Doppelhelix, welcher Strangbrüche begünstigt und Transkriptions- und Replikationsvorgänge stark beeinträchtigt.<sup>53</sup>

### 2.1.4 Vermittlung der Zytotoxizität

Auf die vorliegenden DNA-Schäden bzw. -Veränderungen reagieren eine Reihe von Erkennungsproteinen und Transkriptionsfaktoren, darunter MSH2 aus dem MMR-Komplex, die HMG1 und HMG2, der UBF für die RNA-Polymerase I und der Transkriptionsfaktor TBP.<sup>54,55,56</sup> Die HMG1 schirmt aufgrund ihres erhöhten Bindungsvermögens an das Platinaddukt die DNA vor Reparaturmechanismen ab<sup>57</sup> und die Transkription wird durch verminderte Affinität des UBF und TBP gehemmt.

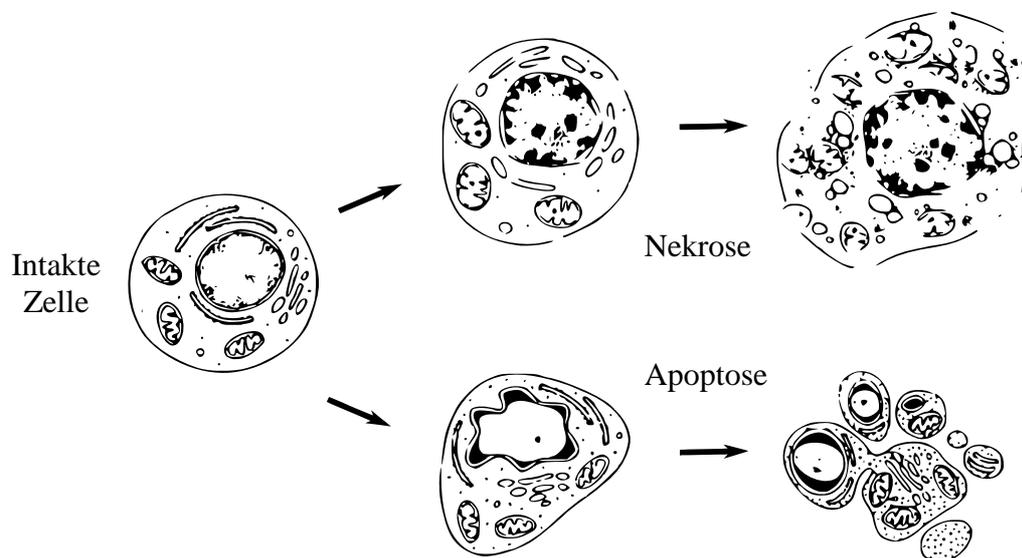
Allerdings korrelieren verminderte Transkription und Replikation nicht unbedingt direkt mit dem Zelltod<sup>58</sup>; d.h. die Zelle stirbt nicht ausschließlich durch eine Verarmung an lebenswichtigen Transkriptionsprodukten oder Unfähigkeit zur Zellteilung. Vielmehr handelt es sich um Apoptose. Ein Bindeglied zwischen der Erkennung von DNA-Schäden und der Initiation apoptotischer Prozesse stellt ATR dar, welches über Chk1 eine Phosphorylierung und somit Stabilisierung von p53 mit dem intrinsischen Signalweg der Apoptose verknüpft ist.<sup>59,60</sup> Die Phosphorylierung wirkt dabei schützend gegenüber einer Ubiquitinylierung durch

MDM2, welches als negativer *feedback*-Mechanismus p53 abbaut.<sup>61</sup> Die p53-Bindung an die DNA wird außerdem direkt durch die HMG 1 und 2 vermittelt.<sup>62</sup> Da jedoch lediglich 1 % des zytoplasmatischen Cisplatin an DNA im Zellkern binden<sup>63</sup>, sind eine Reihe weiterer Stimuli wie z.B. Interaktionen mit Komponenten des Zytoplasmas oder Effekte von außerhalb der Zelle möglich. Im Folgenden wird die Zusammenführung und Beeinflussung dieser Auslöser bis zur Effektorebene der Apoptose betrachtet.

## 2.2 Apoptose und cisplatininduzierte Toxizität

### 2.2.1 Abgrenzung zur Nekrose und Autophagie

Morphologisch sind Unterschiede zwischen sterbenden Zellen schon seit mehreren Jahrzehnten bekannt. Dabei kann zwischen Nekrose, bei der die Zellen anschwellen und schließlich die Zellmembran und Organellen ihre Integrität verlieren, und Apoptose, bei der das Volumen abnimmt und die Zellen sich zu mehreren Kompartimenten abschnüren, unterschieden werden<sup>64</sup> (Abb. 2.6).



**Abb. 2.6:** Stark vereinfachter, morphologischer Vergleich zwischen Nekrose und Apoptose; modifiziert nach KERR ET AL.<sup>64</sup>

Nekrose wird hauptsächlich durch physikochemischen Stress ausgelöst und galt lange als zufallsabhängiger, unkontrollierter Prozess. Neueren Erkenntnissen zufolge scheint sie aber auch durch verschiedene Einflussfaktoren reguliert zu sein, weshalb der Begriff Nekroptose geprägt wurde. Dessen Abgrenzung zur eigentlichen Nekrose wird jedoch diskutiert.<sup>65,66</sup>

Neben der Nekrose besitzen Zellen außerdem die Fähigkeit zur Autophagie. Dieser Vorgang fördert zunächst die Proliferation von Zellen, indem geschädigte zelluläre Komponenten lysosomal abgebaut und wiederverwertet werden. Ist eine Kompensation der Zellschädigung jedoch nicht mehr möglich, kann auch der Zelltod vermittelt werden. Somit spielt Autophagie ebenfalls eine Rolle bei der Suppression von Tumorzellen.<sup>67</sup> Sie wird von Faktoren wie Beclin-1, PI3K, mTOR und Bcl-2 reguliert und steht somit ebenfalls in Zusammenhang mit p53. Autophagie und Apoptose wirken gegenseitig aufeinander regulierend ein, wobei letztere ungehemmt unweigerlich zum Tod der Zelle führt.<sup>68</sup>

### 2.2.2 Differenzierung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges

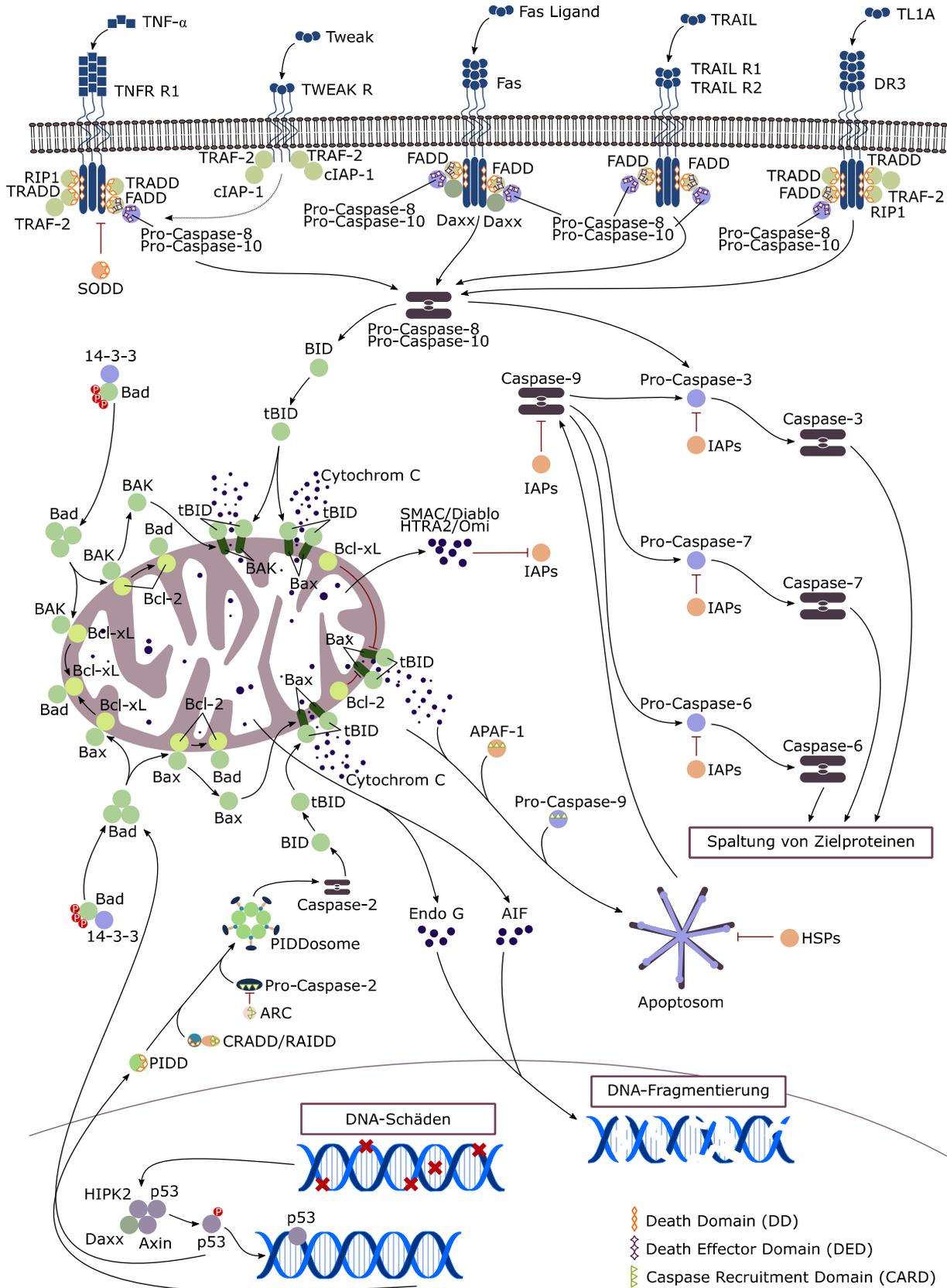


Abb. 2.7: Gesamtübersicht über den intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweg; modifiziert nach der Abb. „Apoptosis Signaling Pathways“ von R&D Systems

### 2.2.2.1 Der intrinsische Apoptosesignalweg

Ist das Ausmaß der DNA-Schädigung so hoch, dass die Fähigkeit zur Reparatur diese nicht mehr kompensieren kann, überwiegen die apoptotischen Signale des p53. Dazu gehört die intrazellulär ausgelöste Apoptose, bei der unter Einfluss von p53 Proteine der Bcl-2-Familie in der Nähe der Mitochondrien lokalisiert werden. Diese haben das Vorhandensein einer bis vier homologer Domänen, den sogenannten BH-Domänen, gemein, die von Bedeutung für eine funktionell entscheidende Homo- oder Heterodimerisierung sind. Die antiapoptotischen Vertreter wie Bcl-2 und Bcl-xL weisen vier verschiedene solcher Domänen auf, während die apoptosefördernden Vertreter Bax und BAK BH1 bis BH3 enthalten. Zu den BH3only gehören Bad und BID; sie haben lediglich einen der Bcl-2-homologen Bereiche<sup>69</sup> (Abb. 2.8).

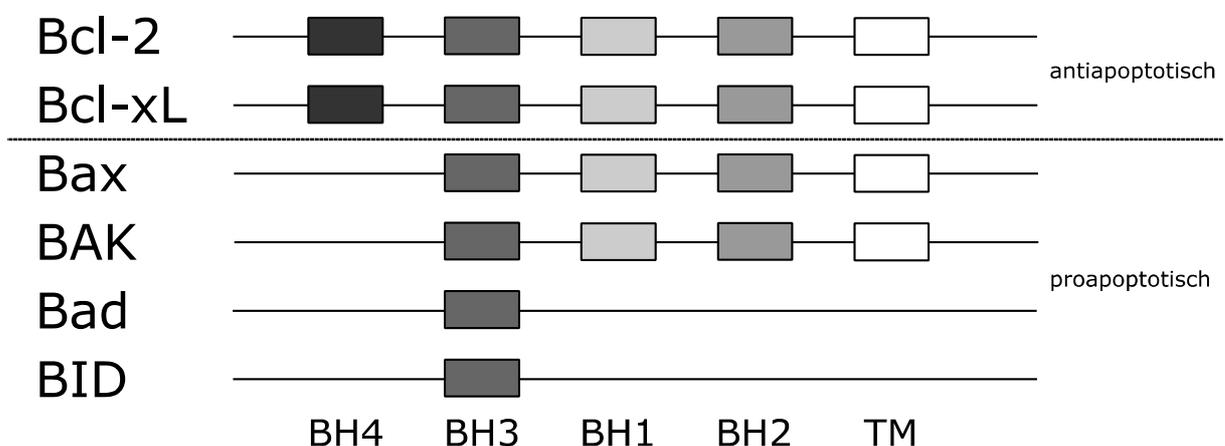


Abb. 2.8: Übersicht über die BH-Domänen einiger Vertreter der Bcl-2-Familie; modifiziert nach CHAO & KORSMEYER<sup>70</sup>

Über eine Assoziation zweier gleicher oder verschiedener der Bcl-2-Proteine wird die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran gesteuert. Formieren sich zwei proapoptotische Vertreter, kommt es zu einer Permeabilitätserhöhung und der Freisetzung von Cytochrom C, SMAC/Diablo und HTRA2/Omi. Ist ein antiapoptotisches Protein an der Assoziation beteiligt, wird die Undurchlässigkeit für mitochondriale Signalstoffe aufrecht erhalten.<sup>71</sup>

Besonders entscheidend für die reflektorische Ausschüttung von Cytochrom C scheint das Verhältnis von Bax zu seinem Gegenspielerprotein Bcl-2 zu sein, wenn es sich zugunsten des Bax verschiebt. Dazu ist sowohl vorstellbar, dass der cisplatininduzierte DNA-Schaden die Bax Expression steigert, als auch dass Bcl-2 abgebaut wird.<sup>72</sup>

Eine Sonderstellung nimmt BID ein, welches zur Beeinflussung der Mitochondrienmembran in seine aktive Form tBID umgewandelt werden muss, welche ohne Beteiligung anderer Bcl-2-Proteine wahrscheinlich nicht zur Ausbildung einer Membranpore fähig ist. Die Aktivierung geschieht unter Beteiligung von PIDD und Bildung eines PIDDosomes durch Caspase-2-Aktivierung. Außerdem bildet es eine Verbindung zum extrinsischen Signalweg, da es ebenfalls durch Caspase-8 direkt aktivierbar ist.<sup>73,74</sup> Eine PIDDosomen-unabhängige Aktivierung der Caspase-2 nur über Caspase-8 wurde ebenfalls festgestellt.<sup>75</sup>

Kommt es aufgrund des Überwiegens proapoptotischer Bcl-2-Proteine zum Ausstrom von Cytochrom C, bildet dieses im Zusammenspiel mit APAF-1 und Pro-Caspase-9 das Apoptosom, ein Oligomer aus vermutlich sieben APAF-1-Molekülen und Bindungsstellen für fünf bis sieben Pro-Caspase-9-Moleküle, welches direkt die Initiator-Caspase-9 aktiviert.<sup>76</sup> Diese wiederum aktiviert die Effektor-Caspasen-6 und -7 und wirkt ebenfalls konzertiert mit einem aktiven extrinsischen Signalweg auf Caspase-3 ein.<sup>77</sup>

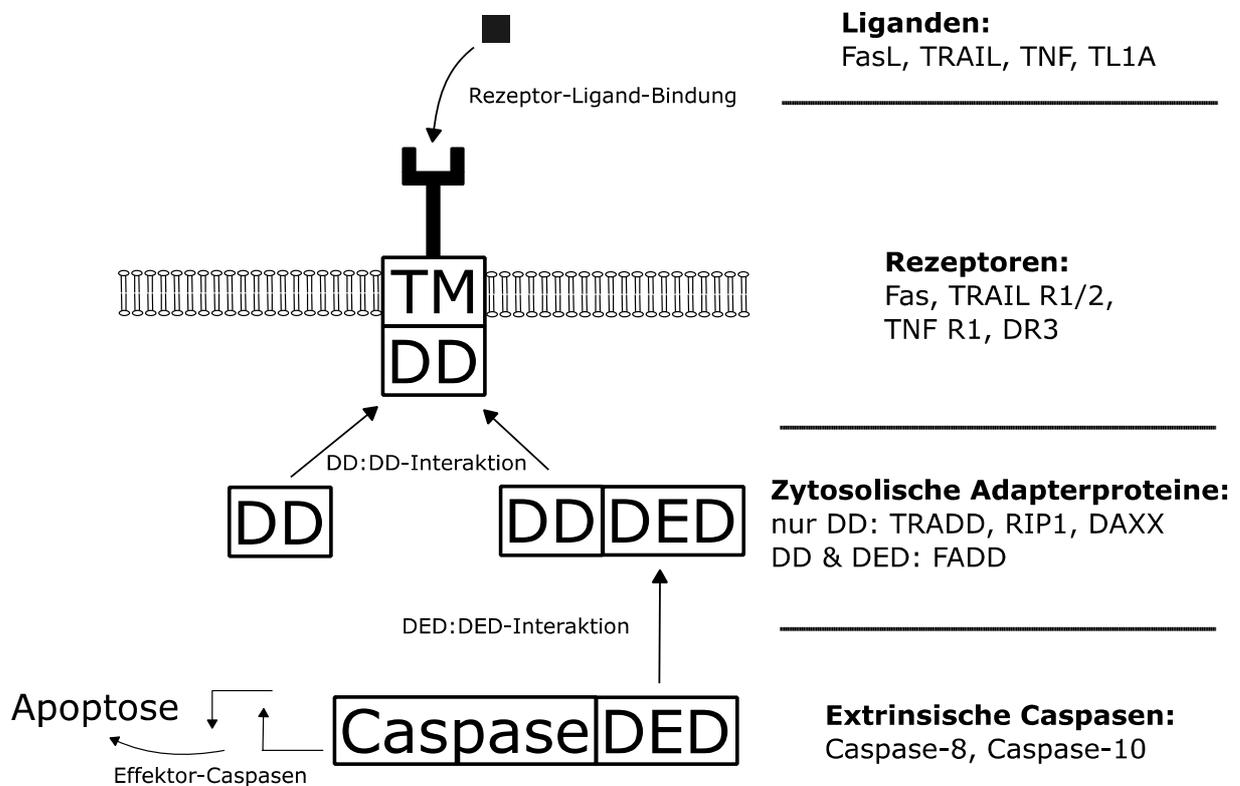
Eine Unterbrechung des apoptotischen Signals auf dem intrinsischen Weg ist bis zur Aktivierung der Effektor-Caspasen möglich, indem entweder das Apoptosom durch HSPs wie HSP 70<sup>78</sup> oder Caspase-9 und die Pro-Caspasen-6, -7 und -3 durch IAPs wie Survivin oder XIAP gehemmt werden. Die neben Cytochrom C aus den Mitochondrien ausgeschütteten Proteine SMAC/Diablo und HTRA2/Omi wirken im Gegensatz über eine Inhibierung der IAPs sekundär apoptotisch.<sup>79,80</sup>

#### **2.2.2.2 Der extrinsische Apoptosesignalweg**

Neben einer intrazellulären Reaktion auf DNA-Schäden ist über Todesrezeptoren auch eine vom extrazellulären Raum aus ausgelöste Apoptose möglich. Der Ursprung des apoptotischen Signals kann dabei im Zellverband primär extrazellulär in einer parakrinen Stimulation durch benachbarte sterbende Zellen liegen. Im Organismus werden die Liganden oftmals von Zellen des Immunsystems wie z.B. aktivierten T-Zellen und NK-Zellen ausgeschüttet.<sup>81</sup> Andererseits kann die Zelle auch auf p53-abhängige Weise mit einer gesteigerten Expression von Todesrezeptorliganden auf DNA-Schäden reagieren.<sup>82,83</sup> So wird ein autokrines sekundär extrazelluläres Signal generiert.

Die hauptsächlich für die Apoptose relevanten membranständigen Rezeptoren sind Fas, TRAIL R1 und TRAIL R2, TNF R1 und DR3 mit ihren Liganden FasL, TRAIL, TNF $\alpha$  und TL1A. Diese Transmembranrezeptoren gehören zur DD-Superfamilie, die eine ca. 80 Aminosäuren lange zytoplasmatische *death domain* gemeinsam hat. DD-Proteine können

nach ihrer Sequenzhomologie in vier weitere Subtypen (DD, DED, CARD und PYD) unterteilt werden (Abb. 2.9). Die Membranrezeptoren gehören dabei zur DD-Unterfamilie.<sup>84</sup>



**Abb. 2.9:** Proteindomänen des extrinsischen Apoptosesignalweges und deren Interaktionsmöglichkeiten, die zur Aktivierung der Apoptose führen.

Da es zur Interaktion zweier gleicher Subtypondomänen bedarf, sind am extrinsischen Signalweg hauptsächlich die DD-haltigen zytosolischen Proteine FADD, TRADD, RIP1 und DAXX beteiligt, die mit den Todesrezeptoren wechselwirken. Es kommt zur Ausbildung von Komplexen, die über FADD, welches zusätzlich zu seiner DD noch eine DED enthält, imstande sind, Pro-Caspase-8 und -10 zu aktivieren. Im Fall des Fas wird der DISC ausgebildet, bei dem die DD des FADD direkt mit dem zytosolischen Teil des Rezeptors wahrscheinlich im Zusammenspiel mit DAXX<sup>85</sup> interagiert. TRAIL R1 und R2 bilden einen sehr ähnlichen Komplex aus, jedoch ohne Beteiligung des DAXX.<sup>86</sup>

TNF R1 assoziiert zytosolisch mit TRADD und FADD zu Komplex 1, ebenfalls einem DISC. Beide vermitteln über die Aktivierung der benannten Initiator-Caspasen die Effektor-Caspase-3, -6 und -7.<sup>87,88</sup> Mit TRADD, welches RIP1 und TRAF-2 rekrutiert, formiert TNF R1 außerdem einen Komplex I, der über IKK und NF- $\kappa$ B cFLIP aktiviert. Diese hemmen als Rückkopplung DISC und Komplex II und wirken somit antiapoptotisch.<sup>89,90</sup>

DR3 ist intrazellulär zur Ausbildung derselben zwei Komplexe fähig wie TNF R1.<sup>91</sup>

Der weniger erforschte TWEAK R gehört ebenfalls zu oben beschriebener Rezeptorfamilie, weshalb ein Einfluss auf apoptotische Prozesse nicht ausgeschlossen werden kann. Vermutlich ist dieser Rezeptor ebenfalls zur Bildung zytosolischer Komplexe mit TRAF-2 fähig. Eine Beeinflussung der Apoptose wird über NF- $\kappa$ B angenommen.<sup>92,93</sup>

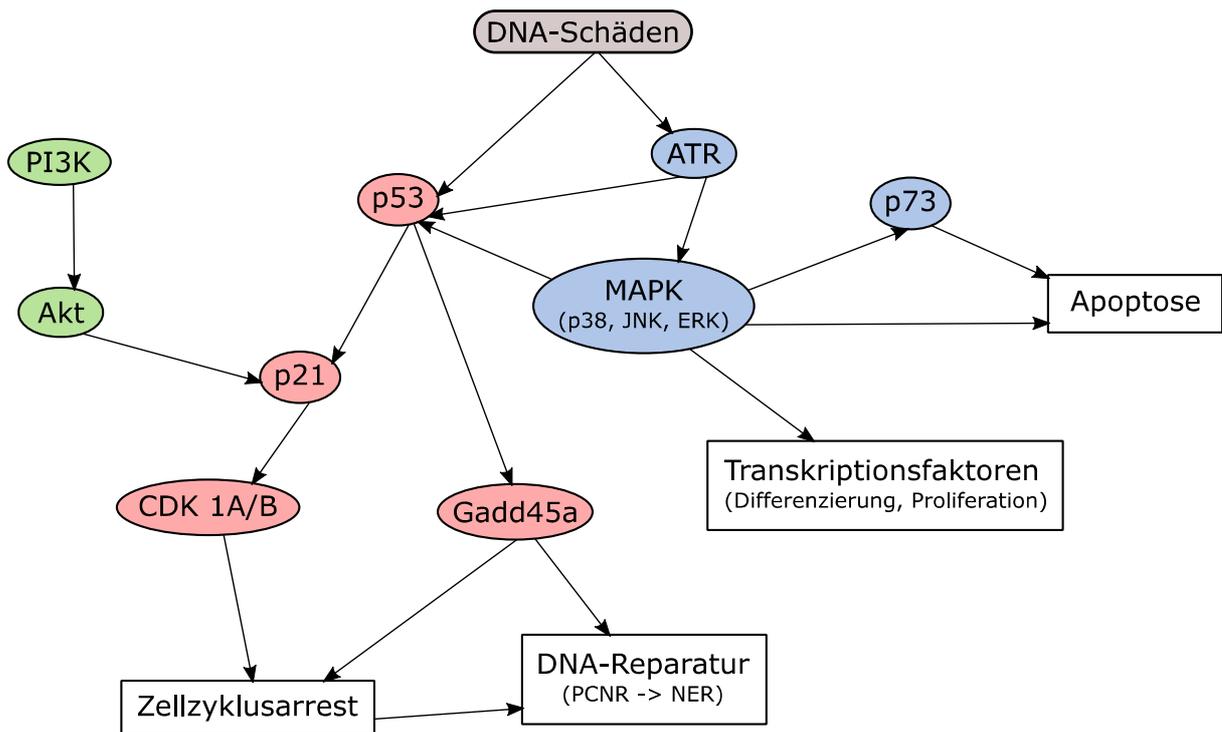
### **2.2.3 Aktivierung weiterer Signalkaskaden**

Da die Reaktion auf cisplatininduzierte Toxizität stark p53-abhängig ist, kommt es gerade im subtoxischen Konzentrationsbereich zunächst zur Einleitung eines Zellzyklusarrestes mittels p21. Es tritt in Wechselwirkung mit mehreren Zyklinen durch z.B. Hemmung der CDK1A und B, aufgrund derer die meisten mit Cisplatin behandelten Zellen im G2/M-Arrest verharren.<sup>94</sup> Aber auch andere Arreststadien sind möglich.<sup>95</sup> Ziel des Arrestes aufgrund von DNA-Schädigungen ist die Möglichkeit zur DNA-Reparatur. Diese wird ebenfalls durch p53 induziert, indem es stimulierend auf GADD45a wirkt, welches sich darauf mit dem PCNA assoziiert und die NER-Aktivität steigert.<sup>96</sup>

Über die ATR-Kinase ist neben einer Aktivierung von p53 ebenfalls eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs möglich, im Besonderen der Kinasen der p38-, ERK- und JNK-Familie.<sup>97</sup> Diese transformieren extrazelluläre Signale in intrazelluläre Impulse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben oder Apoptose der Zelle.<sup>98</sup> ERK wirkt vermutlich über eine p53-Aktivierung apoptotisch<sup>99</sup>, während die p38-Kinasen wahrscheinlich mit p73, ebenfalls einem Tumorsuppressorprotein, in Wechselwirkung stehen.<sup>100</sup> Aber auch Auswirkungen auf die zytosolischen Kinasen und das Zytoskelett wurden beschrieben.<sup>101</sup>

Durch seine generelle Bindungsfähigkeit an Nukleophile wie GSH, Metallothioneine und thiolhaltige Proteine können höhere Cisplatinkonzentrationen ebenfalls durch eine Verarmung der Zelle an Antioxidantien zu oxidativem Stress und der Entstehung von ROS führen. Diese initiieren in kritischer Konzentration Apoptose.<sup>102</sup>

Obwohl die exakten Mechanismen der durch Cisplatin ausgelösten Apoptose nicht in allen Einzelheiten bekannt sind, setzt die Substanz eine Vielzahl von Prozessen in Gang, die letztlich durch das Überwiegen von Todessignalen zum programmierten Tod menschlicher Zellen führen. Ist die Wirkung einer antineoplastischen Verbindung jedoch so vielschichtig und synergistisch, stehen der Zelle auf der anderen Seite ebenfalls viele Möglichkeiten der Umgehung ihrer Toxizität zur Verfügung. Dies führt zur Ausbildung von Resistenzen.<sup>103</sup>



**Abb. 2.10:** Aktivierung primär apoptoseunabhängiger Signalwege durch Cisplatin induzierte DNA-Schäden. Beteiligt sind unter anderem der PI3K-Signalweg (grün), G1/S-checkpoint- & Zellzyklusarrest-Signalweg (rot) und MAPK-Signalweg (blau). Modifiziert nach SIDDIK<sup>103</sup>

## 2.3 Resistenzmechanismen

Chemoresistenz kann als das Phänomen bezeichnet werden, bei dem Tumorzellen unter klinisch relevanten Dosen eines Zytostatikums nicht dem Zelltod unterzogen werden. Diese Unempfindlichkeit gegenüber antineoplastisch wirksamen Substanzen kann zunächst in intrinsische und erworbene Chemoresistenz eingeteilt werden.<sup>103</sup> Bei ersterer handelt es sich um eine schon in den Zellen vorhandene Resistenz, deren Ursache nicht mehr erfassbar ist, da sie den Mutationen zugeordnet wird, die auch zur eigentlichen Entstehung des Karzinoms führten. Die erworbene Chemoresistenz beruht auf einer chronischen Exposition mit Zytostatika in Konzentrationen, die nicht für die Gesamtpopulation an Zellen tödlich ist. Die Fähigkeit zur Toleranz der toxischen Substanz entsteht dabei sowohl durch Selektion resistenzbegünstigender Mutationen, als auch durch Kommunikation und Austausch genetischer Informationen zwischen den Zellen.<sup>104</sup> Klinisch betrachtet werden beispielsweise Ovarialtumore als resistent bezeichnet, wenn der Patient in einem Zeitraum von unter sechs Monaten nach leitlinienkonformer Ersttherapie einen Rückfall erleidet.<sup>9</sup>

Auf biochemischer bzw. molekular-pharmakologischer Ebene ist Chemoresistenz ein sehr komplexer Vorgang und fast immer multifaktoriell.<sup>103</sup> Um einen möglichst übersichtlichen

wie umfassenden Überblick zu geben, eignet sich die Klassifizierung der Resistenzmechanismen nach GALLUZZI ET AL.<sup>11,105</sup> in *pre-target*, *on-target*, *post-target* und *off-target* Resistenz.

### **2.3.1 Pre-target Resistenz**

Betrachtet man die Zytotoxizität als konzentrationsabhängiges Phänomen, ist der intrazelluläre Anteil an Cisplatin ausschlaggebend.<sup>106</sup> Dieser wird entscheidend durch das Vorhandensein und die Aktivität der Cisplatin Aufnahme- und Ausscheidungsmechanismen (Abschnitt 2.1.2) bestimmt. *Pre-target* Resistenz beinhaltet somit alle Veränderungen der Zelle, die sich auf das intrazelluläre Cisplatin-Gleichgewicht zugunsten einer geringeren Konzentration auswirken, die dann einer Bindung an Zielstrukturen wie die DNA oder zytosolische Komponenten zur Verfügung steht.

#### **2.3.1.1 Reduzierte Akkumulation**

Am stärksten verknüpft mit reduzierter Cisplatinakkumulation ist der Kupfertransporter CTR1. In vielen resistenten Zellen ist eine verminderte Expression zu beobachten, die mit einer erhöhten Cisplatinintoleranz verknüpft ist.<sup>107</sup> Außerdem konnte für eine Koinkubation mit Kupfer eine Erhöhung<sup>108</sup> und für Kupferdepletion eine Verminderung der Resistenz festgestellt werden.<sup>109</sup> Durch Cisplatin wird der Transporter in bestimmten Zelllinien ebenfalls weniger stark exprimiert.<sup>110</sup>

Andere Transporter wie z.B. die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase spielen wahrscheinlich auch eine Rolle<sup>111</sup>, ebenso wie Veränderungen in den passiven Diffusionsvorgängen durch Modifikationen in der Zellmembran.<sup>112</sup>

Den OCT wird aufgrund ihrer gewebespezifischen Expression eine untergeordnete Bedeutung bei der verallgemeinernden Betrachtung der Chemoresistenz beigemessen (Abschnitt 2.1.2).

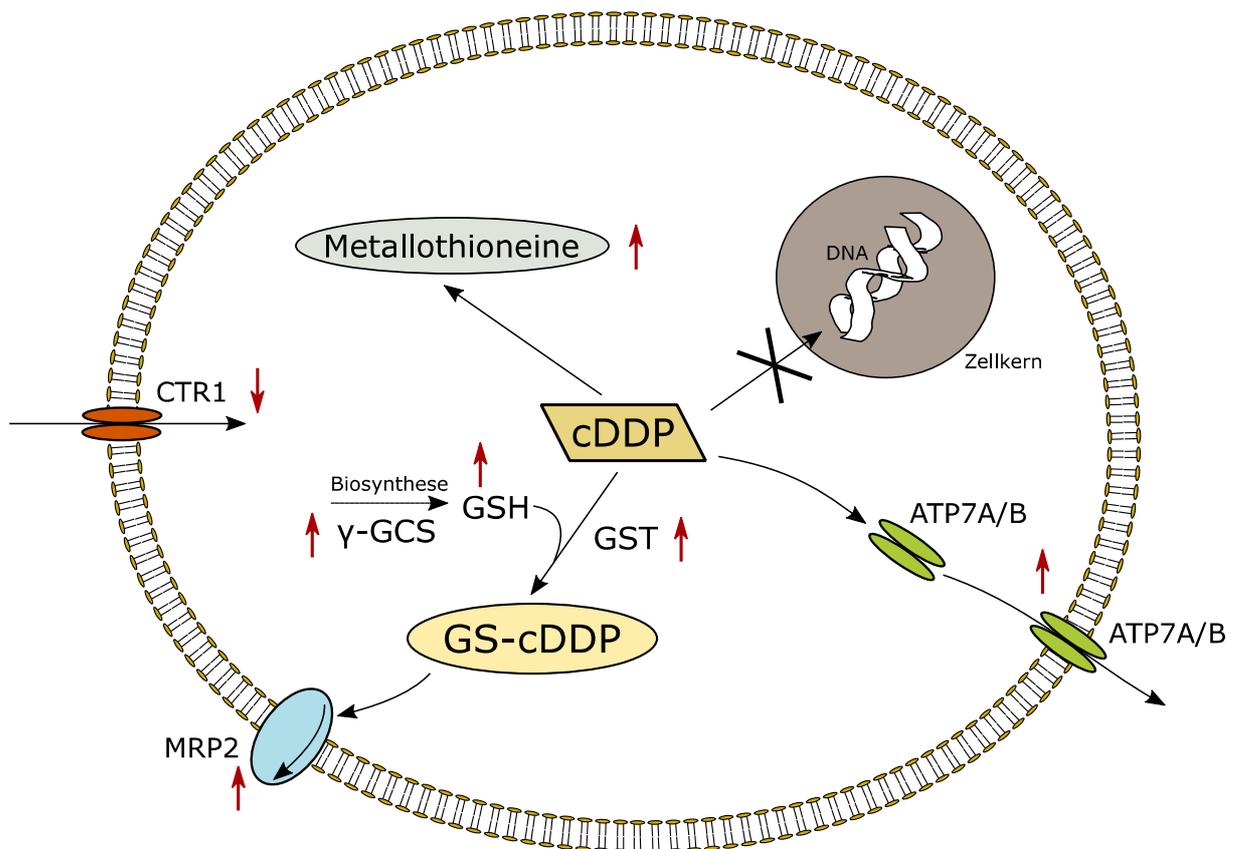
#### **2.3.1.2 Gesteigerter Efflux**

Für die Effluxkupfertransporter ATP7A und ATP7B (Abb. 2.11) wurde speziell für Cisplatin eine Translokation vom trans-Golgi-Netzwerk zur Membran gezeigt<sup>113</sup>, zusätzlich zu einer generellen Überexpression<sup>114</sup>, deren klinische Relevanz noch nicht geklärt ist.<sup>115</sup>

Nach seiner Bioaktivierung kann Cisplatin anstelle der DNA mit reduziertem GSH reagieren und somit inaktiviert werden. Diese normalerweise nicht enzymatische Reaktion kann durch GST $\pi$  katalysiert werden, deren Überexpression wahrscheinlich zur Resistenz führt.<sup>116</sup> Genauso denkbar sind eine stärkere Reaktivität durch Umwandlung von extrazellulärem GSH

in Cysteinylglycin, katalysiert durch überexprimierte  $\gamma$ -GT, oder gesteigerte Bereitstellung von GSH durch Hochregulierung von c-JUN und einhergehende hohe  $\gamma$ -GCS-Konzentrationen.<sup>117</sup> Der Efflux des GS-konjugierten Cisplatins wird durch die verstärkte Transkription von ABC-Transportern bewirkt, die instande sind gebundenes GSH zu exportieren<sup>118</sup> (Abschnitt 2.1.2). Obwohl die ABC-Transporter im Sinne der *multi drug resistance* starken Einfluss auf den Efflux und somit die Toxizität vieler Zytostatika haben, spielt bei Cisplatin und anderen platinhaltigen Zytostatika höchstwahrscheinlich lediglich MRP2 eine Rolle.<sup>119</sup> Für andere prominente Vertreter wie P-GP ist eine Beeinflussung der Chemoresistenz platinhaltiger Zytostatika nicht hinreichend belegt.

Neben Glutathion nehmen basierend auf demselben Mechanismus der Inaktivierung Metallothioneine eine Funktion bei der Detoxifikation von Cisplatin ein. Ihre genaue Beteiligung an der Chemoresistenz und ein mit ihnen verbundener Transport in den Extrazellularraum ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt.<sup>120</sup>



**Abb. 2.11:** Pre-target Resistenzmechanismen, die die Toxizität von Cisplatin vor dem Erreichen der DNA verringern. Nach oben gerichtete Pfeile zeigen an, dass das Protein im Sinne einer Resistenz hochreguliert wird, nach unten gerichtete Pfeile runterreguliert. Modifiziert nach KELLAND<sup>17</sup>

### 2.3.2 *On-target* Resistenz

Kommt es zur Bindung von Cisplatin an die DNA, wird der Schaden durch Signalproteine erkannt und in die Konsequenzen Reparatur oder Apoptose übersetzt. Für die Weiterleitung zytotoxischer Signale wurde vornehmlich der MMR-Komplex gezeigt<sup>55</sup> (Abschnitt 2.1.4). Gleichzeitig werden aber auch kompensatorisch Reparaturmechanismen angestoßen, deren gesteigerte Expression und Aktivität prinzipiell einen Beitrag zur Cisplatinintoleranz leisten können. Das NER-System schneidet DNA auf der 5'-Seite von Platinaddukten durch eine Heterodimerisierung<sup>121</sup> von ERCC1 und ERCC4<sup>122</sup> und das REV3-REV7-Heterodimer der Polymerase  $\zeta$  kann in seiner Aktivität Guanin-Pt-Guanin-Addukte überspringen.<sup>123</sup> Von Cisplatin verursachte Doppelstrangbrüche können in oder kurz nach der S-Phase des Zellzyklus durch BRCA-Proteine repariert werden<sup>124</sup> (Abb. 2.12). Ebenfalls ist eine Bindung von Cisplatin an den VDAC1 der Mitochondrien beschrieben, mit der eine Permeabilitätsveränderung einhergeht.<sup>125</sup>

Als *on-target* Resistenz können somit Veränderungen in den beschriebenen cisplatininduzierten Vorgängen bezeichnet werden, bei denen trotz vollzogener Bindung an die Zielstruktur eine Übersetzung in zytotoxische Signale ausbleibt.

#### 2.3.2.1 Gesteigerte DNA-Reparatur

Auf zellulärer Ebene korrelieren die Überexpression von ERCC1, einer Endonuklease, mit Chemoresistenz<sup>126</sup> sowie eine Fehlfunktion von Polymerasen mit gesteigerter Sensitivität<sup>127</sup> und deren Überexpression mit Resistenz.<sup>128</sup> Durch einen Funktionsverlust der in Brust- und Ovarialkarzinom häufig veränderten BRCA1- und BRCA2-Gene<sup>129</sup>, die über ihre Proteine die Reparatur von Doppelstrangbrüchen regulieren, wird die Sensitivität gegenüber DNA-bindenden Substanzen erhöht. Sekundär kann die Reparaturdefizienz jedoch oftmals über andere Mechanismen überkompensiert werden.<sup>130</sup>

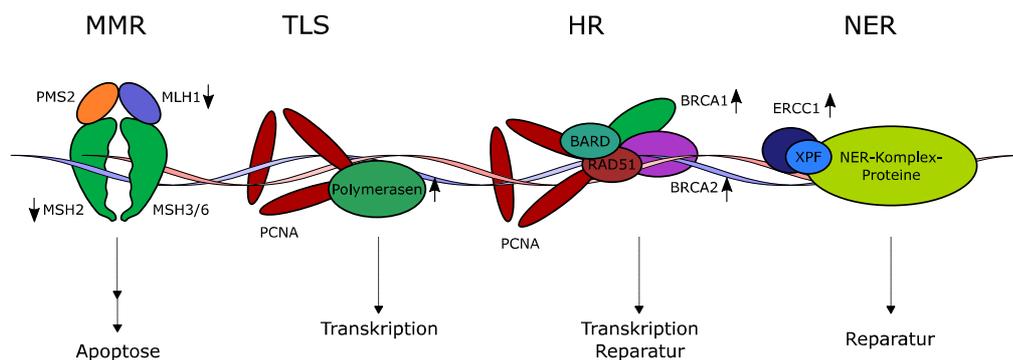
Können diese Mechanismen die durch Platinbindung geschädigte DNA weitestgehend wiederherstellen, bleibt ein Vorantreiben apoptotischer Signale aus.

#### 2.3.2.2 Unterbrochene Weiterleitung von DNA-Schäden

Sind die Reparaturmechanismen nicht imstande, die DNA hinreichend wiederherzustellen, kann eine Veränderung des MMR-Komplexes trotzdem ein Auslösen toxischer Signale unterbinden. Diesbezüglich sind Mutationen oder Fehlen von MLH1 und MSH2 (Abb. 2.12) beschrieben.<sup>131</sup> Dadurch wird trotz fortschreitender Platinierung eine Weiterleitung apoptotischer Signale über nachgeschaltete Proteine an Apoptoseregulatoren wie p53

unterbunden. Allerdings scheint dieser dem Zelltod vorgeschaltete Mechanismus keine Voraussage über das Ansprechen auf eine Cisplatintherapie zu erlauben.<sup>132,133</sup>

Im Falle des VDAC1 konnte eine erhöhte Cisplatin toleranz bei NSCLC-Zellen mit VDAC1-*knockdown* festgestellt werden.<sup>134</sup> Es gilt jedoch als umstritten, ob der Ionenkanal direkt durch die Cisplatinbindung oder durch vorangehende Apoptosesignale reguliert wird. Daher ist die Einordnung als *on-target* Resistenz nicht eindeutig.

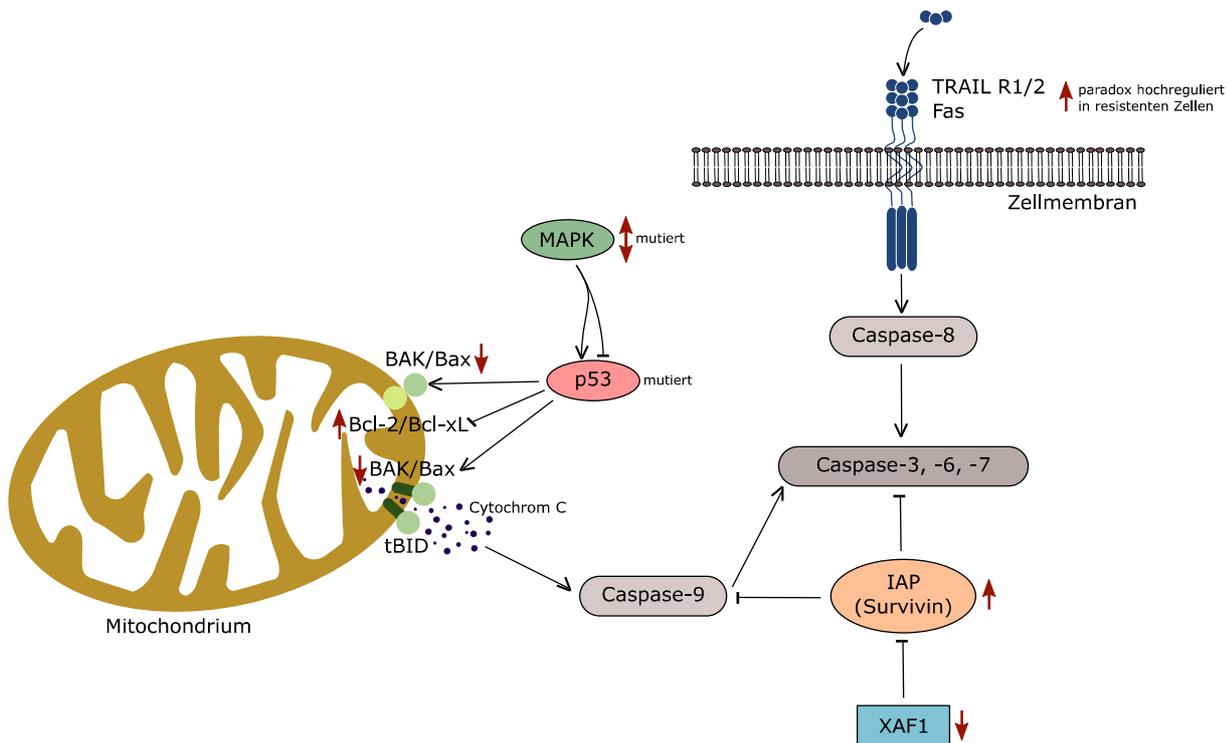


**Abb. 2.12:** *On-target* Resistenzmechanismen, die direkt mit der DNA interferieren. Nach oben gerichtete Pfeile zeigen an, dass das Protein im Sinne einer Resistenz hochreguliert wird, nach unten gerichtete Pfeile runterreguliert. Modifiziert nach SINICROPE & SARGENT<sup>135</sup>, WELCSH ET AL.<sup>136</sup> und KIRSCHNER & MELTON<sup>137</sup>

Obwohl diese Art von Mechanismen keinen so großen Einfluss auf die Resistenz hat wie z.B. die erhöhte Cisplatininaktivierung, ist sie nicht minder relevant, da sie substanzunabhängig auch für Platinanaloga zutrifft, die ansonsten bei resistenten Zellen gut wirksam sind.<sup>138</sup>

### 2.3.3 *Post-target* Resistenz

Die Mechanismen der *post-target* Resistenz sind eng verknüpft mit dem Ablauf der intrinsischen und extrinsischen Apoptose und anderen cisplatininduzierten Signalwegen, wie sie in Abschnitt 1.2.2 und 1.2.3 beschrieben wurden. Verallgemeinert handelt es sich um Veränderungen der Zelle, die nach der Bindung von Cisplatin an Zielstrukturen und nach Initiation der Apoptose zu erhöhter Cisplatin toleranz bzw. geringerer Cisplatin sensitivität führen (Abb. 2.13).



**Abb. 2.13:** *Post-target* Resistenzmechanismen, die mit der Apoptosekaskade nach deren Auslösung durch DNA-Schädigung verknüpft sind. Nach oben gerichtete Pfeile zeigen an, dass das Protein im Sinne einer Resistenz hochreguliert wird, nach unten gerichtete Pfeile runterreguliert.

### 2.3.3.1 Modulation der Signaltransduktion

Ein zentraler Umschaltzentrum für das Überleben oder Absterben ist wie schon beschrieben p53. Besteht hier ein Defekt oder eine Instabilität, kann die Zelle Apoptosesignale nur fehlerhaft weiterleiten, wodurch vorhandene DNA-Addukte trotz Erkennung keine Konsequenzen haben. Dafür spricht, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Toleranz gegenüber DNA-Schäden und dem Resistenzgrad besteht.<sup>139</sup> Außer der Inaktivität von p53 treten in ca. 50 % aller Tumore p53-Mutationen auf, wobei der Anteil bei Ovarialkarzinomen isoliert betrachtet sogar noch höher liegt.<sup>10</sup> Diese sind sehr vielschichtig und treten durch die Unfähigkeit zur Bax-Aktivierung bis hin zur Unterbrechung von kritischen Stellen im Zellzyklus als Resistenzen in Erscheinung.<sup>140</sup> Auch klinisch ist der p53-Status mit einem Ansprechen auf ein cisplatinhaltiges Behandlungsregime verknüpft.<sup>141,142</sup>

Obwohl Veränderungen oder Defekte an p53 zu einem Verlust an Cisplatininsensitivität führen können, sind sie aufgrund der Vielzahl anderer Möglichkeiten zur Beeinflussung des Apoptosesignalweges keine zwingende Voraussetzung für Chemoresistenz.<sup>143</sup>

Da cisplatininduzierte Effekte auch eine Aktivierung des MAPK-Signalweges zur Folge haben, liegt eine Beeinflussung der Cisplatinresistenz durch Veränderungen der beteiligten

Kinasen nahe. Dabei werden ERK1/2 vornehmlich proliferierende<sup>144</sup> und p38 und den JNK apoptotische<sup>145,146</sup> Stimuli zugeschrieben. *In vitro* gibt es Hinweise auf eine Assoziation zwischen Chemoresistenz und verminderter Aktivierung von p38 und JNK.<sup>147</sup> Über ERKs ergibt sich außerdem eine Verbindung zur intrinsischen Apoptose, da es die Bad-Phosphorylierung hemmt, wodurch Ovarialkarzinomzellen eine erhöhte Cisplatintoleranz zeigen.<sup>148</sup>

Aber auch die veränderte Expression proapoptotischer Proteine wie Bax oder BAK und antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder Bcl-xL der Bcl-2-Familie selbst hat eine Veränderung der Kaskade als Konsequenz und somit Einfluss auf die Chemoresistenz.<sup>149,150</sup>

Auf dem extrinsischen Weg wird Chemoresistenz mehr mit einem Funktionsverlust der Todesrezeptoren assoziiert. Trotz einer oft beobachteten cisplatininduzierten Erhöhung der Expression von TRAIL R1/2 und Fas wird in manchen Tumoren und Zelllinien ein geringeres Ansprechen auf das Zytostatikum beobachtet.<sup>151,152</sup>

Defekte in diesen Kaskaden unterbrechen die Übersetzung eines DNA-Schadens oder einer Bindung an andere Zielstrukturen in eine Initiation und Exekution der Apoptose durch Caspasen.

### 2.3.3.2 Veränderungen von Caspasen

Die Initiator-Caspase-8 und Caspase-9 dienen einer Akkumulation apoptotischer Stimuli des extrinsischen (Caspase-8) und intrinsischen (Caspase-9) Apoptosesignalweges. Wirken auf sie überwiegend proapoptotische Reize, wird das Signal auf die Effektorebene in Gestalt der Caspasen-3, -6 und -7 weitergeleitet, welche den Zelltod unaufhaltsam vorantreiben. Obwohl eine Veränderung der Caspasen prinzipiell die Apoptose und somit Cisplatintoleranz sehr stark beeinflusst, wie durch Inhibitorstudien deutlich wird<sup>153</sup>, sind Änderungen der konstitutiven Expression als Manifestation einer Chemoresistenz kaum beschrieben.<sup>154</sup> In bestimmten Zellen kann eine erhöhte Expression beider Initiator-Caspasen beobachtet werden, die allerdings mit einer geringeren Aktivität der Effektor-Caspasen verbunden ist.<sup>155</sup> Dies lässt evtl. einen Kompensationsmechanismus vermuten. Es liegt der Schluss nahe, dass eine Mutation der Caspasen als Resistenzmechanismus weniger verbreitet ist, da sie neben der Apoptose noch weitere Aufgaben in der Zelle übernehmen<sup>156</sup> und eine absolute Hemmung oder Unterexpression für Krebszellen keinen Vorteil darstellt.

### 2.3.3.3 Inhibition der Apoptosekaskade

Überwiegen proapoptotische Signale, die ursprünglich aus der Bindung von Cisplatin an DNA oder andere Zielstrukturen entstanden sind, kann die Exekution des Zelltodes mittels

IAP durch eine Hemmung der Caspase-9 oder auf Effektorebene durch Hemmung der Pro-Caspasen-3, -6 und -7 unterbunden werden.<sup>157</sup>

In diesem Zusammenhang ist besonders für das Inhibitorprotein Survivin eine Korrelation erhöhter Expression mit Chemoresistenz vorhanden<sup>158</sup>, die ebenfalls klinisch mit einer schlechteren Prognose verknüpft ist.<sup>159</sup> Erste Inhibitoren befinden sich bereits in klinischen Studien.<sup>160</sup>

Der XAF1, welcher das Inhibitorprotein XIAP antagonisiert, ist dagegen mit erhöhter Cisplatinempfindlichkeit<sup>161</sup> und einer Verbesserung des progressionsfreien Überlebens<sup>159</sup> verbunden.

### **2.3.4 Off-target Resistenz**

Bei dieser Form der Chemoresistenz handelt es sich um kompensatorische alternative Signalwege, die die Cisplatinempfindlichkeit abschwächen. Die Veränderungen der resistenten Zelle oder des resistenten Tumors liegen dabei nicht direkt in Signalwegen der Apoptose, sondern regulieren ausgleichende physiologische Vorgänge wie das Zellwachstum und Überleben.

So findet man bei 20-30 % der Brust- und Ovarialkarzinompatienten mit HER-2/neu einen zum EGFR homologen Rezeptor überexprimiert.<sup>162</sup> Er fungiert als Wachstumsrezeptor, indem er auf den PI3K/Akt-Signalweg (Abb. 2.10) in der Form wirkt, dass er die Aktivität des Akt steigert. Daraus resultiert eine Hemmung von p21<sup>163</sup> und Bad<sup>148</sup>, einem proapoptotischen Protein. Letzteres wird auch auf einem zweiten Weg unterdrückt, indem HER-2/neu über GRB2 und SOS1 auf dem MAPK-Weg die ERK stimuliert, welche dann auf Bad einwirkt.<sup>164</sup>

Auch eine höhere Toleranz gegenüber oxidativem Stress vermindert die Cisplatinempfindlichkeit, was hauptsächlich einer Überexpression der DYRK1B zugeschrieben wird.<sup>165</sup> Deren Depletion kann in Ovarialkarzinomzellen die Sensitivität wiederherstellen.<sup>166</sup>

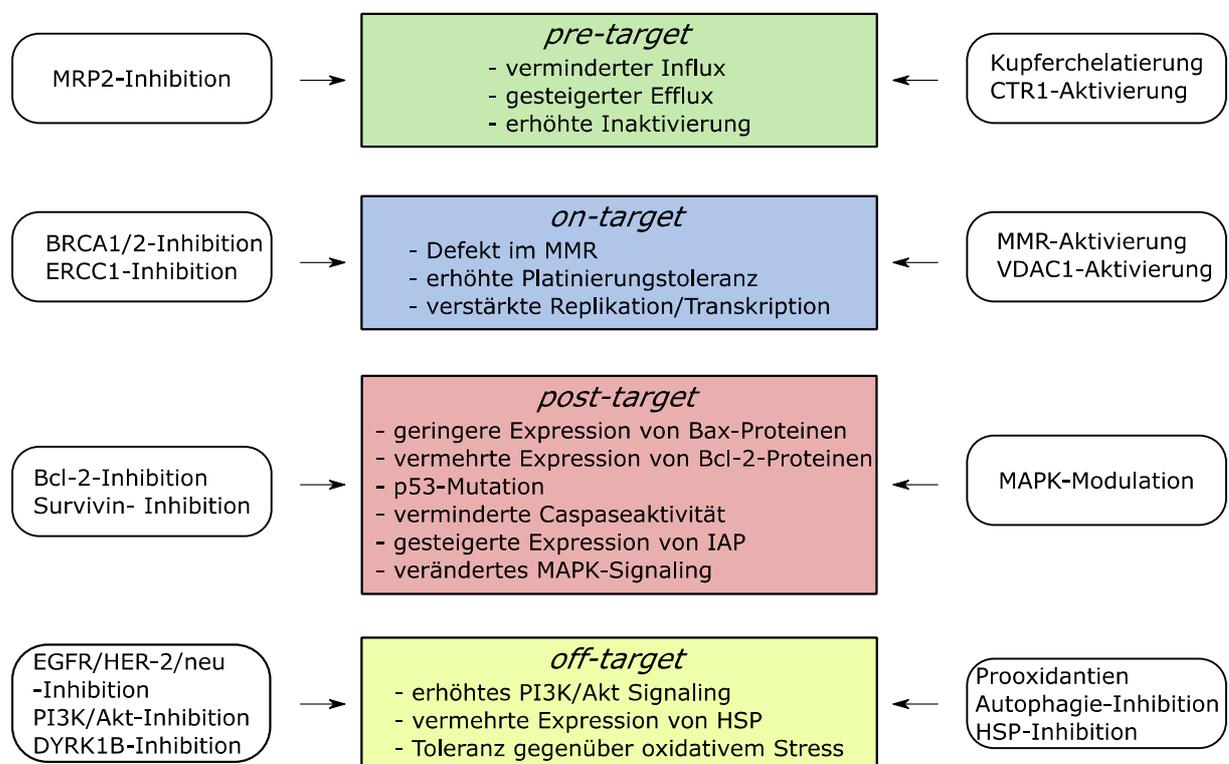
Einige HSPs wie HSP27 und HSP90 kommen besonders in chemoresistenten Phänotypen einiger Krebszellen vor.<sup>167</sup> Ihre genaue Rolle im Überleben von Tumorzellen ist nicht abschließend geklärt, es wurde jedoch keine inhibitorische Wirkung auf das Apoptosom wie für HSP70 gezeigt. Eine Inhibierung wirkt sich allerdings hemmend auf das Tumorzellwachstum aus<sup>168</sup> und ein hoher Phosphorylierungsstatus von HSP27 wirkt proapoptotisch.<sup>169</sup>

Trotz des Fehlens eines konkreten funktionellen Zusammenhangs kann das verstärkte Auftreten der relativ neu entdeckten Proteine RAB8 und TMEM205 in der Nähe des

Zellkerns in resistenten Zellen beobachtet werden. Ob es sich dabei um einen neuen sekretorischen Resistenzmechanismus oder eine Kommunikation mit bekannten Mechanismen handelt, ist ungeklärt.<sup>170</sup>

Des Weiteren wird Autophagie mit einem Überleben von Krebszellen in Zusammenhang gebracht. Sie wird von Zytostatika selbst ausgelöst und spielt verschiedene Rollen im Tumorwachstum, die generell suppressiv und proliferativ sein können. Insgesamt überwiegt in mit antineoplastischen Substanzen behandelten Zellen jedoch der proliferative Effekt der Autophagie.<sup>171</sup>

Die durch Cisplatinaddukte hervorgerufenen Signalkaskaden und gegenregulierenden Mechanismen umfassen eine Fülle von Schaltstellen, die verändert sein können, um Chemoresistenz zu begünstigen. Sie haben jedoch alle eines gemeinsam: Die Signale müssen, egal in welcher Form, dahingehend manipuliert sein, dass letztendlich antiapoptotische oder proliferative Reize überwiegen und die Krebszelle weiterhin teilungs- und überlebensfähig bleibt.



**Abb. 2.14:** Antiapoptotische Mechanismen der cisplatininduzierten Chemoresistenz (mittig) und mögliche Angriffspunkte einer Chemosensitivierung (links & rechts); modifiziert nach GALLUZZI ET AL.<sup>11</sup>

## 2.4 Liposomen in der Chemotherapie

Zur Verbesserung der Therapie maligner Erkrankungen besteht ein sehr starkes Interesse an der Reduzierung der therapielimitierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei gleich bleibender Wirksamkeit. Somit wäre es möglich, die Wirksamkeit durch Gabe höherer Dosen weiter zu steigern, wenn unter herkömmlicher Medikation schon therapielimitierende Bereiche erreicht wären. Die Notwendigkeit erhöhter Dosen ergibt sich aus dem Auftreten von Chemoresistenzen<sup>172</sup>, weshalb deren Überwindung ein Hauptziel in der Tumorthherapie ist. Neben vielfältigen Möglichkeiten im Bereich der individualisierten Chemotherapie<sup>173</sup> besteht aus chemischer Sicht großes Potential in der Modifizierung eines Wirkstoffes. Im Falle des Cisplatin liegt ein seit fast 40 Jahren etabliertes, nicht ersetzbares Zytostatikum vor<sup>17</sup>, weshalb die Verbesserung seiner Verteilung, spezifischen Aufnahme und intrazellulären Freisetzung ein wichtiges Ziel der Modifikationen ist. Möglichkeiten sind dabei neben der Variation von Komplexliganden und der Kopplung an Polymere auch das Einschließen in Liposomen, wobei sich die einzelnen Verfahren nicht gegenseitig ausschließen.<sup>174</sup>

Als sehr relevant im Potential zur Verringerung der Toxizität und unerwünschten Arzneimittelwirkungen hat sich eine liposomale Formulierung von Zytostatika im Allgemeinen, aber besonders für Doxorubicin<sup>175</sup> erwiesen.<sup>176,177</sup> Bezüglich einer höheren Wirksamkeit gegenüber freiem Cisplatin zeichnet sich ebenfalls eine positive Tendenz ab.<sup>178,179</sup> Neuere Erkenntnisse zeigen zudem, dass das Phänomen der Chemoresistenz auf liposomales Cisplatin keinen so starken Einfluss hat wie auf den freien Wirkstoff.<sup>12</sup>

Forschungen auf dem Gebiet liposomaler Arzneistoffe haben daher zu mehreren FDA-Zulassungen und weiterer klinischer Forschung geführt (Tab. 2.1).<sup>180</sup>

**Tab. 2.1:** Übersicht über die von der FDA zugelassenen (dunkelgrau) und in der klinischen Prüfung befindlichen (weiß) liposomalen Wirkstoffformulierungen.<sup>181,182,183</sup> Für Nyotran (hellgrau) ist die Präklinik abgeschlossen, die Zulassung steht derzeit allerdings noch aus. \*: Bei den Namensbezeichnungen handelt es sich vielfach um angemeldete oder bereits eingetragene Marken, deren Kennzeichnung mit <sup>TM</sup> bzw. <sup>®</sup> aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit aufgeführt wurde.

Name*	Substanz	Indikation
Abelcet	Amphotericin B	Pilzinfektionen
AmBisome	Amphotericin B	Pilzinfektionen
Amphocil	Amphotericin B	Pilzinfektionen
DaunoXome	Daunorubicin-zitrat	Kaposi-Sarkom
DepoCyt	Cytarabin	Lymphomatöse Meningitis
Doxil	Doxorubicin	Kaposi-Sarkom
Visudyne	Verteporfin	Sensitivierer für photodynamische Therapie

## Theoretischer Teil

Evacet	Doxorubicin	Ovarialkarzinom
Lipo-Dox	Doxorubicin	Solide Tumore
Epaxal	Inaktivierter Hepatitis A-Virus (Stamm RG-SB)	Hepatitis A
Inflexal	Inaktiviertes Hämagglutinin des Influenzavirus Stamm A und B	Influenza
DepoDur	Morphin-sulfat	Schmerzen
Nyotran	Nystatin	Pilzinfektionen
AeroLEF	Fentanyl	Schmerzen
Alocrest	Vinorelbin	Solide Tumore
AmBiL	Amphotericin B	Pilzinfektionen
Arikace	Amikacin	Zystische Fibrose
<b>Aroplatin</b>	<b>Cisplatinanalogon (L-NDDP)</b>	<b>Kolorektale Neoplasien</b>
ATI-1123	Docetaxel	Solide Tumore
Atragen	Tretinoin	Solide Tumore
Atu027	siRNA	Solide Tumore
BAY 79-4980	Octocog $\alpha$	Hämophilie a
BP-100-1.01	Grb-2	Leukämie
BP-100-1.02	Bcl-2	Lymphome
BP-100-2.01	siRNA	Ovarialkarzinom
Brakiva	Topotecan	Solide Tumore
CAF01	Impfstoff	Tuberkulose
CFTR gene liposome	CFTR-Gen	Zystische Fibrose
CPX-1	Irinotecan	Solide Tumore
CPX-351	Cytarabin & Daunorubicin	Akute myeloische Leukämie
C-VI SA bikDD	BikDD	Pankreaskrebs
Dimericine	T4N5	Krebsvorstadien
Doxisome	Doxorubicin	Solide Tumore
DPX-0907	Krebsimpfstoff	Neoplasien
EndoTAG-1	Paclitaxel	Solide Tumore
I HL-305	Irinotecan	Solide Tumore
I L-2 LI PO	Interleukin-2	Melanom
I NGN-401	DOTAP: Chol-fus1	Lungenkrebs
JVRS-100	Immunstimulierende DNA	Leukämie
L9NC	L9NC	Solide Tumore
l-annamycin	Annamycin	Akute lymphozytäre Leukämie
L-CsA	Ciclosporin	Bronchiolitis obliterans
LE-DT	Docetaxel	Solide Tumore
LE-M	Mitoxantron	Solide Tumore
LEP-ETU	Paclitaxel	Solide Tumore
LE-rafAON	LErafAON-ETU	Neoplasien
LE-SN38	SN-38	Solide Tumore
L-Grb-2	Grb-2 Antisense-Oligonukleotid	Leukämie
Lip glucantime	Meglumin-antimonat	Kutane Leishmaniose
<b>LiPlaCis</b>	<b>Cisplatin</b>	<b>ausstehend</b>
<b>Lipoplatin</b>	<b>Cisplatin</b>	<b>Solide Tumore</b>
Liposomales Alendronat	Alendronat	Koronararterienstenose
Lipotecan	Camptothecin	Solide Tumore
Lipovaxin-MM	Impfstoff	Melanom
Lipoxal	Oxaliplatin	Fortgeschrittener Darmkrebs
Liprostin	Prostaglandin	Periphere Verschlusskrankheit
L-MTP-PE	L-MTP-PE	Osteosarkom

Marqibo	Vincristin	Solide Tumore
MBP-426	Oxaliplatin	Solide Tumore
MBP-Y003	Methotrexat	Lymphom
MBP-Y004	Docetaxel	Solide Tumore
MBP-Y005	Gemcitabin	Solide Tumore
MCC-465	Doxorubicin	Magenkrebs
Myocet	Doxorubicin-zitrat	Brustkrebs
Nanocort	Prednisolon	Rheumatoide Arthritis
NanoDOX™	Doxycyclin-monohydrat	Diabetischer Fußulcerus
NanoVNB	Vinorelbin	Kolonkarzinom
ONCO-TCST™	Vincristin	Solide Tumore
OSI-211	Lurtotecan	Solide Tumore
OX-NLA	Cetirizin-hydrochlorid	Allergische Rhinitis
PEP02	Irinotecan	Solide Tumore
pGT-1 gene liposome	pGT-1-Gen	Zystische Fibrose
PLCLUV	Prilocain	Dentalanästhesie
PNT2258	Oligonukleotid	Krebs
RTS S/AS02	FMP2.1/AS02A	Malaria
RVCLUV	Ropivacain	Anästhetikum
SapC-DOPS	Saposin C	Solide Tumore
S-CKD602	Camptothecinanalogen	Fortgeschrittene bösartige Tumore
<b>SPI-77</b>	<b>Cisplatin</b>	<b>Solide Tumore</b>
Stimuvax	BLP25-Impfstoff	Solide Tumore
T4N5 liposomal lotion	Bacteriophagen-T4 Endonuklease V	Hautkrebs
Telintra	TLK199 HCl	Myelodysplastische Syndrome
ThermoDox	Doxorubicin, thermosensitiv	Solide Tumore
TKM-ApoB	siRNA	Hypercholesterinämie
TKM-Ebola	siRNA	Ebola
TKM-PLK1	siRNA	Solide Tumore
VaxiSome	Impfstoff	Influenza

Die reine Anzahl der in der klinischen Prüfung befindlichen liposomalen Ansätze zeigt zum einen die Relevanz der Liposomen als Arzneistoffträger, zum anderen unterstreichen die vielen Indikationsgebiete, die Gegenstand der Forschung sind, deren Vielseitigkeit.

Für Cisplatin sind derzeit vier Formulierungen in der klinischen Prüfung (Tab. 2.1, fett). Zunächst stellte man für Aroplatin eine vollkommen andere Biodistribution des eingeschlossenen Wirkstoffes gegenüber dem freien Cisplatin fest, dies jedoch bei einer eher geringen Halbwertszeit.<sup>184</sup> Mit SPI-77, einer langzirkulierenden Formulierung, wurde diese deutlich erhöht und ermöglicht somit eine bessere Anreicherung im Tumorgewebe.<sup>185</sup> Bei dem schon in der klinischen Phase III befindlichen Lipoplatin™ sind zudem höhere Dosierungen möglich, da aufgrund dessen Herstellungsweise das für die Applikation kritische Cisplatin-Lipidverhältnis von ca. 1:70 für herkömmliche Herstellungsverfahren auf 1:10 erhöht ist.<sup>186</sup> Hierbei handelt es sich um das in der Entwicklung am weitesten fortgeschrittene liposomale Arzneimittel. Weitere Ansätze wie beim LiPlaCis nutzen die hohe chemische Variabilität der Liposomen und verfolgen eine Optimierung der Wirkstofffreisetzung durch bspw. enzymausgelöste Freisetzung mittels einer Phospholipase.<sup>187</sup> Diese graduelle

Weiterentwicklung demonstriert die Diversität der Liposomen als Arzneistoffträger, welche in den folgenden Kapiteln näher betrachtet wird.

### 2.4.1 Funktion der Liposomen als Arzneistoffträger

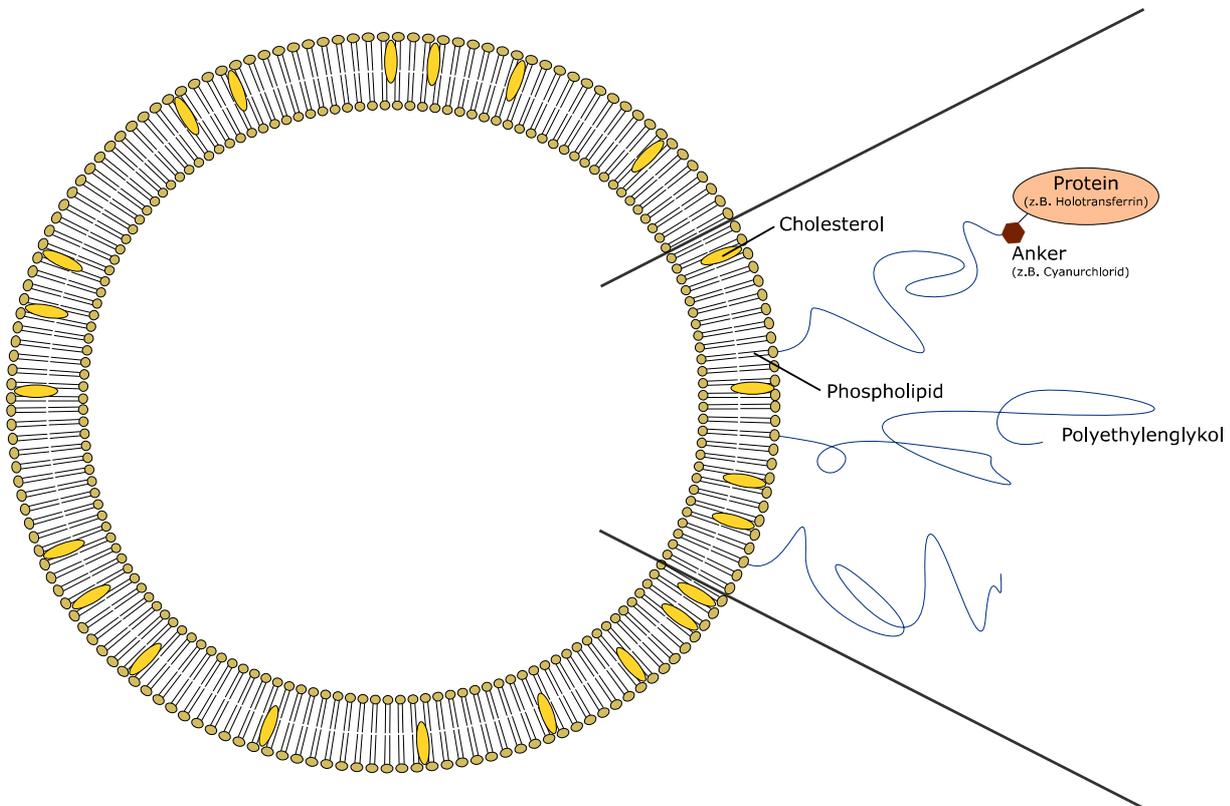
Bei Liposomen handelt es sich um konzentrisch angeordnete Vesikel aus amphiphilen Molekülen, vornehmlich Phospholipiden. Sie formen sich in wässrigem Dispersionsmittel spontan durch Selbstassoziation der Lipide, wobei sich hydrophile Molekülteile nach innen und außen zur hydrophilen Flüssigkeit hin anordnen und die lipophilen Anteile durch van-der-Waals-Kräfte den Kern der Doppelmembran bilden. Diese einer physiologischen Doppelmembran sehr ähnliche Struktur erklärt die hohe Biokompatibilität, Abbaubarkeit und geringe Toxizität von Liposomen im Organismus.

Sie können sowohl für lipophile Arzneistoffe (z.B. Mifamurtid/Mepact<sup>®188</sup>) als auch für eher hydrophile (z.B. Doxorubicin/Caelyx<sup>®176</sup>) als Transportsystem eingesetzt werden. Lipophile Substanzen lagern sich dabei in die Lipiddoppelschicht ein, während sich hydrophile Substanzen im mit Dispersionsmittel gefüllten Lumen befinden.

Aufgrund ihrer Größe kann man Liposomen in SUV (*small unilamellar vesicles*) und LUV (*large unilamellar vesicles*) einteilen, aufgrund ihrer Membranbeschaffenheit in UV (*unilamellar vesicles*), MLV (*multilamellar vesicles*) und MVV (*multivesicular vesicles*).<sup>189</sup>

Der entscheidende Vorteil der liposomalen Formulierung eines Arzneistoffes liegt darin, dass seine substanzspezifischen pharmakokinetischen Parameter zugunsten derer des Liposoms in den Hintergrund treten. Die Verteilung einer eingeschlossenen Substanz kann somit nahezu unabhängig ihrer physikochemischen Eigenschaften über die Beschaffenheit des Liposoms gesteuert werden. Hierbei gibt es eine Vielzahl von Modifikationen. Das Verhältnis und die Art der bei der Herstellung eingesetzten Lipide sind dabei entscheidend. Sie bestimmen durch ihre Struktur die Ladung des Liposoms und dessen Membraneigenschaften. Lipide mit niedrigen Phasenübergangstemperaturen, die reich an ungesättigten Fettsäuren sind, führen beispielsweise zu einer eher fluiden Membran, während ein hoher Anteil an gesättigten Fettsäuren die Membran rigider werden lässt.<sup>190</sup> Durch Homogenisierungsverfahren bei der Herstellung kann die Größe und Beschaffenheit der Liposomen verändert werden. Extrusion oder Ultraschallbehandlung führen je nach ihren Parametern von MLV und MVV zu SUV oder LUV.<sup>191</sup> Für Liposomen als *drug delivery systems* sind Modifikationen der chemischen Struktur der Lipide bedeutend. Es können an die Kopf- oder Schwanzgruppe z.B. PEG-

Ketten, Proteine/Peptide oder Antikörper konjugiert werden, die ein *targeting* ermöglichen<sup>192</sup> (Abb. 2.15).



**Abb. 2.15:** Schematischer Querschnitt durch ein *targetiertes* Liposom. In die sphärische Phospholipiddoppelschicht ist Cholesterol (gelb) eingelagert. Über die Phosphatkopfgruppe (ocker) einzelner Lipide sind Polyethylenglykolketten an die Liposomenoberfläche gebunden. Diese können zusätzlich über Ankerstrukturen (dunkelrot) mit zielgerichteten Proteinen (orange) verbunden sein. Je nach angewandter Herstellungsmethode können sich die Modifikationen auch an der inneren Oberfläche der Lipidmembran befinden. Dies wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit in der Abbildung nicht berücksichtigt.

### 2.4.2 Liposomales *targeting*

Um Liposomen als zielgerichtete Arzneistoffträger zu funktionalisieren, ist ihre Pharmakokinetik zu berücksichtigen. Hierbei spielen die Prozesse ihrer Verteilung, Aufnahme und ihres Abbaus bzw. der Freigabe des Arzneistoffes eine determinierende Rolle. Im Folgenden wird ein Überblick über die komplexen, teilweise noch unzureichend aufgeklärten Vorgänge bei der Applikation von liposomalen Wirkstoffen gegeben. Gleichzeitig werden Ansätze des *targetings* und deren Auswirkungen auf die Chemoresistenz gezeigt.

#### **2.4.2.1 Verteilung und passives *targeting***

Nach intravenöser Applikation werden Liposomen als körperfremde Substanzen erkannt, durch Komplementfaktoren opsonisiert und reichern sich in Geweben mit einem ausgeprägten RES wie Leber, Milz oder Lunge an. Dort werden sie nach wenigen Minuten phagozytisch eliminiert und erreichen somit nur sehr geringe Plasmahalbwertszeiten.<sup>193</sup>

Außerdem für geringe Zirkulationszeiten verantwortlich sind die vielen Interaktionsmöglichkeiten mit Plasmaproteinen. Bekannt sind unter anderem Bindung und Lipidaustausch von Liposomen mit HDL.<sup>194</sup>

Eine wichtige Modifizierung, um die Zirkulation im Blutkreislauf zu erhöhen, sind langzirkulierende Liposomen. Sie enthalten in ihrer Membran voluminöse, hydrophile Amphiphile, häufig mit Polyethylenglykol bzw. Methoxypolyethylenglykol (PEG/mPEG) kopfgruppenmodifizierte Lipide, und schirmen durch ihre Hydratisierung die Liposomen vor körpereigenen Substanzen wie Opsoninen ab, indem sie deren Diffusionsweg zur Membran verlängern.<sup>195</sup> Dabei gelingt es die Halbwertszeit bis auf ca. 20 h anzuheben.<sup>196</sup> Ebenso weisen kleinere Liposomen eine längere Halbwertszeit auf als größere.<sup>197</sup>

Liegen kleinere (ca. 100–200 nm) PEG-modifizierte Liposomen vor, kann man sich deren Zurückhaltung in RES-Organen als passives *targeting* zunutze machen. Die Anreicherung erfolgt nicht aktiv durch Ansteuern einer zellulären Struktur durch z.B. Kopplung mit Liganden, sondern passiv aufgrund der liposomalen Pharmakokinetik. Dies wurde z.B. für einen ausgeprägten Leber- und Milzbefall mit Leishmaniose gezeigt.<sup>198</sup>

Wie die Organe des RES zeichnen sich auch stark vaskularisierte, solide Tumore durch Lücken zwischen den Endothelzellen und in der Basalmembran aus, wodurch die Akkumulation von Liposomen gefördert wird. Zusätzlich zur lückenhaften Vaskularisierung trägt ein nur schwach oder gar nicht ausgebildetes Lymphsystem im Tumor durch fehlende Drainage zur Anreicherung bei.<sup>199</sup> Im Zusammenhang von Liposomen mit diesem passiven *targeting* spricht man vom *enhanced permeability and retention effect* (EPR-Effekt; Abb. 2.16).<sup>193</sup>

#### **2.4.2.2 Aufnahme und aktives *targeting***

Nach der Akkumulation von Liposomen aufgrund des EPR-Effektes gibt es mehrere Möglichkeiten der Interaktion mit einer Tumorzelle. Neben der Adsorption der Liposomen an die Zelle, Fusion mit der Zellmembran und endozytotischen Aufnahmemechanismen kann auch passive Diffusion von freigesetztem Wirkstoff stattfinden. Welcher dieser Wege dominant beschritten wird, ist sowohl vom hydrostatischen und onkotischen Druck im

Gewebe, den physikochemischen Eigenschaften des Liposoms und dessen Konzentration, sowie dem Vorhandensein eines Rezeptors für membranständige Liganden des Liposoms abhängig.<sup>200</sup>

Für Partikel zwischen 50–300 nm wie Liposomen werden Fusion, Phagozytose und clathrin- sowie caveolavermittelte Endozytose als Hauptaufnahmemechanismen diskutiert.<sup>201</sup>

Bei der Fusion von Liposomen mit der Zellmembran handelt es sich um einen passiven Mechanismus, der spontan abläuft. Die Lipiddoppelmembran des Liposoms tritt zunächst in einen Lipidaustausch mit der Zellmembran und integriert sich schließlich in diese, während der Inhalt der inneren wässrigen Phase in das Zytosol der Zelle abgegeben wird. Der eingeschlossene Arzneistoff wird dann nicht endosomal prozessiert und die Freisetzung des inkorporierten Wirkstoffes geht mit der Aufnahme des Liposoms einher. Allerdings ist die Membranbeschaffenheit ein unspezifisches *target*.<sup>202</sup> In gewissem Maße ist es möglich durch den Einsatz fusogener Lipide wie DOPE den Mechanismus zu fördern, welcher aber in gleichem Maße in physiologischen und neoplastischen Zellen stattfindet.<sup>201</sup>

Ein weiterer unspezifischer, jedoch energieabhängiger Prozess ist die Phagozytose. Sie kann teilweise über die Partikelgröße beeinflusst werden. Größere Partikel (> 500 nm) werden eher phagozytiert, kleinere Partikel (< 200 nm) eher endozytotisch aufgenommen.<sup>203,204</sup>

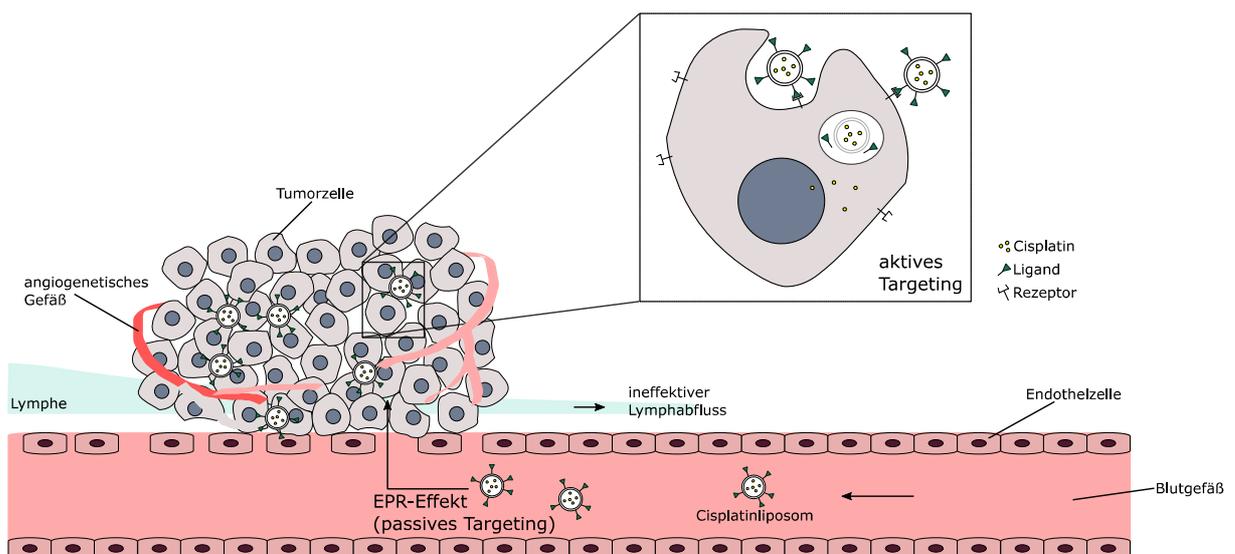
Die clathrinvermittelte Endozytose (Abb. 2.16) ist der natürliche Aufnahmemechanismus für eine Reihe von Substanzen wie Cholesterol bzw. HDL, Protein hormone (z.B. Insulin), Glykoproteine und Eisen. Dabei wird ein membranständiger Rezeptor bei Bindung eines Liganden über Adaptin mit Clathrin verbunden und es kommt zur Ausbildung von *clathrin coated pits*.<sup>205</sup> Diese werden mit benachbarten Rezeptor-Ligandkomplexen durch Dynamin und seine assoziierten Proteine zu einem Vesikel mit Clathrinsaum abgeschnürt. Die Ablösung der Clathrinschicht erfolgt unter Beteiligung der *uncoating ATPase*, wobei das freie Transportvesikel mit einem Endosom fusioniert. Dieses durchläuft verschiedene Stadien und differenziert sich über das frühe und späte Endosom zum Lysosom. Der genaue Ablauf dieser Differenzierung ist noch nicht vollständig aufgeklärt; sicher ist jedoch, dass es in deren Verlauf durch eine membranassoziierte ATP-abhängige Protonenpumpe zur pH-Absenkung (ca. pH 5) im Lumen kommt.<sup>206</sup>

Dieser Aufnahmemechanismus lässt sich durch die Konjugation der Liposomen mit dem natürlichen Liganden des Transferrinrezeptors 2 (TfR2), Holo-transferrin (holo-Tf), ansteuern. Der Rezeptor ist ubiquitär vorhanden, jedoch bei einem Großteil von Tumorzellen, so auch A2780-Zellen, überexprimiert.<sup>207</sup> Hierbei wird sowohl die Verteilung der Liposomen zu TfR-

reichen Geweben (Tumoren) beeinflusst, als auch ihr Aufnahmeweg zugunsten clathrinvermittelter Endozytose moduliert. Neben dem Liganden kann der Rezeptor ebenfalls durch anti-TfR-Antikörper oder an den TfR bindende Peptide *targetiert* werden.<sup>208,209</sup> Für antikörperkonjugierte Liposomen (Immunoliposomen) sind auch viele andere Zielstrukturen denkbar wie z.B. die Rezeptor-Tyrosinkinase HER-2/neu.<sup>210</sup>

Liposomen werden allerdings auch über caveolavermittelte Endozytose aufgenommen. Liganden für diesen Endozytoseweg, die ein *targeting* ermöglichen könnten, sind Folsäure, Albumin und eine Reihe von Toxinen (z.B. Cholera, Tetanus) und Viren, da deren Zielrezeptoren in Caveolae geclustert sind.<sup>211</sup> Nach dem Anheften bewegen sie sich lateral auf der Zelloberfläche und werden immobilisiert. Es entstehen Membraneinstülpungen in Regionen von *lipid rafts*, die reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind, unter Beteiligung von Caveolinen. Durch Einwirkung von Dynamin kommt es zur Abschnürung eines Vesikels, des sog. Caveosoms. Es bewegt sich mithilfe von Aktinstrukturen durch das Zytosol, allerdings ist sein Bestimmungsort nicht genau bekannt. Es wurde festgestellt, dass es im Austausch mit dem endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat steht. Inwieweit es mit Endosomen fusioniert oder ob es im Zytosol verbleibt und wieder zurück zur Plasmamembran zirkuliert, ist unbekannt.<sup>212,213</sup>

Bei manchen Zelltypen werden Liposomen auch über Makropinozytose aufgenommen, die für die Aufnahme großer (kolloidal) gelöster Partikel zuständig ist.<sup>201</sup>



**Abb. 2.16:** Übersicht über passives und aktives *targeting* mittels Cisplatinliposomen; modifiziert nach PEER ET AL.<sup>214</sup>

### 2.4.2.3 Freisetzung liposomaler Wirkstoffe und bedingte Limitationen der Effektivität

Außer bei der zellulären Aufnahme von Liposomen durch Fusion haben alle anderen Mechanismen gemein, dass das Liposom intrazellulär in einer vesikulären Struktur verbleibt (Endosom, Caveosom, Phagosom; Abb. 2.16). Daher führt die zelluläre Aufnahme eines liposomalen Wirkstoffes nicht automatisch zu dessen Freisetzung ins Zytosol, selbst wenn die umgebende Lipiddoppelmembran abgebaut wird. Der transportierte Wirkstoff kann die Zelle jedoch wieder durch Verschmelzen des Vesikels mit der Zellmembran verlassen oder zum ER dirigiert werden. Von dort aus erfolgt dann unter Umständen ebenfalls eine Exkretion durch Einschluss in Exportvesikel.<sup>215</sup>

Im Laufe ihrer Prozessierung können endozytotische Vesikel außerdem zu Lysosomen, späten Endosomen oder anderen Strukturen mit niedrigem pH-Wert und/oder enzymatisch degradierender Funktion heranreifen, welche nach ihrem Abbau den Wirkstoff ins Zytosol freigeben.<sup>216</sup>

Daraus ergibt sich die Schwierigkeit der Balance zwischen Serumstabilität der Liposomen und intrazellulärer Freisetzung ihrer Wirkstoffe. Um die Freisetzung zu erhöhen gibt es verschiedene Ansätze wie etwa pH-, thermo- oder photosensitive Liposomen, die intrazellulär durch externe Stimuli destabilisiert werden können, um den Wirkstoff freizusetzen.<sup>217</sup>

### 2.4.2.4 Auswirkungen auf die Chemoresistenz

Da Liposomen höchstwahrscheinlich über mehrere Aufnahmewege konzentriert in die Tumorzelle gelangen, bewirkt ihre Modifikation keine rein spezifische Aufnahme, sondern eine Präferenz. Dies ist jedoch gerade im Hinblick auf die Resistenzentwicklung vorteilhaft, da es der Tumorzelle kaum möglich ist, Mutationen gegen weitestgehend unspezifische Aufnahmemechanismen wie Membranfusion und Endozytoseprozesse zu konservieren, ohne überlebenswichtige Stoffwechselwege zu beeinträchtigen.<sup>218</sup>

Wenn man Chemoresistenz als Phänomen einer zu geringen Arzneistoffkonzentration im Bereich der Zielstruktur durch Veränderungen zellulärer Strukturen resistenter Tumorzellen versteht, hat die ursprüngliche Verwendung von Liposomen als Arzneistoffträger das Ziel, dieses Defizit in resistenten Tumoren auszugleichen. Die Aufnahmewege der Liposomen unterscheiden sich im Idealfall deutlich von denen des zu transportierenden Wirkstoffes. Im Falle des Cisplatin wird beispielsweise durch eine liposomale Formulierung die physiologische Aufnahme über Influxtransporter wie CTR1<sup>38</sup> umgangen. Liposomen nivellieren daher zunächst das Phänomen der vorher beschriebenen *pre-target* Resistenz.

Neuere Herangehensweisen beinhalten jedoch auch das Ansteuern intrazellulärer Strukturen wie der Mitochondrien mit Liposomen<sup>219</sup> oder apoptose- und wachstumsrelevanter Rezeptoren wie TRAIL-<sup>220</sup> und VEGF-Rezeptoren<sup>221</sup>. Diese *targets* sind im Bereich der apoptotischen Signalweiterleitung (*post-target* Resistenz) anzusiedeln.

Außerdem gibt es erste Hinweise, dass Liposomen selbst Einfluss auf das Transkriptom nehmen, wie es für ein liposomales Transfektionsreagenz gefunden wurde.<sup>222</sup> Daher bleibt der Einfluss von liposomalen Antitumorwirkstoffen auf jegliche Art der Chemoresistenz offen und Gegenstand der Forschung.

Die Gesamtheit der oben beschriebenen Eigenschaften von Liposomen bietet jedoch eine Vielzahl an Möglichkeiten einer Chemoresistenz zu begegnen. Einerseits stellt die Pharmakokinetik von langzirkulierenden Liposomen in Kombination mit dem EPR-Effekt eine überaus günstige Modifizierung im Vergleich zu den Verteilungseigenschaften der meisten Wirkstoffe dar, da sie eine Tumoranreicherung im Sinne eines passiven *targetings* bewirkt, gegen die eine Ausbildung von Resistenzmechanismen kaum möglich ist (Abschnitt 2.4.2.1). Andererseits schafft die hohe chemische Variabilität und Modifizierbarkeit der Liposomenoberfläche die Voraussetzung für eine spezielle Zielsteuerung des eingeschlossenen Wirkstoffes (Abschnitt 2.4.2.2).

Trotz ihres Potentials zur Effektivierung einer Chemotherapie durch aktive oder passive Wirkstoffakkumulation im Tumor werden Liposomen in bisherigen Studien nur indirekt mit dem Phänomen der Chemoresistenz verbunden. Zwar zeigen verschiedene bereits angeführte Studien eine bessere Sensitivität des Tumors durch liposomale Wirkstoffapplikation, dies ist aber als rein quantitativer Effekt zu werten. Inwieweit Liposomen auch funktionell mit den molekularen Prozessen der zellulären Resistenz auf mechanistischer Ebene interagieren können, wurde bisher nicht explizit untersucht. Erkenntnisse dazu können auf die liposomalen Wirkstoffträger in der Tumorthherapie ein völlig neues Licht werfen.

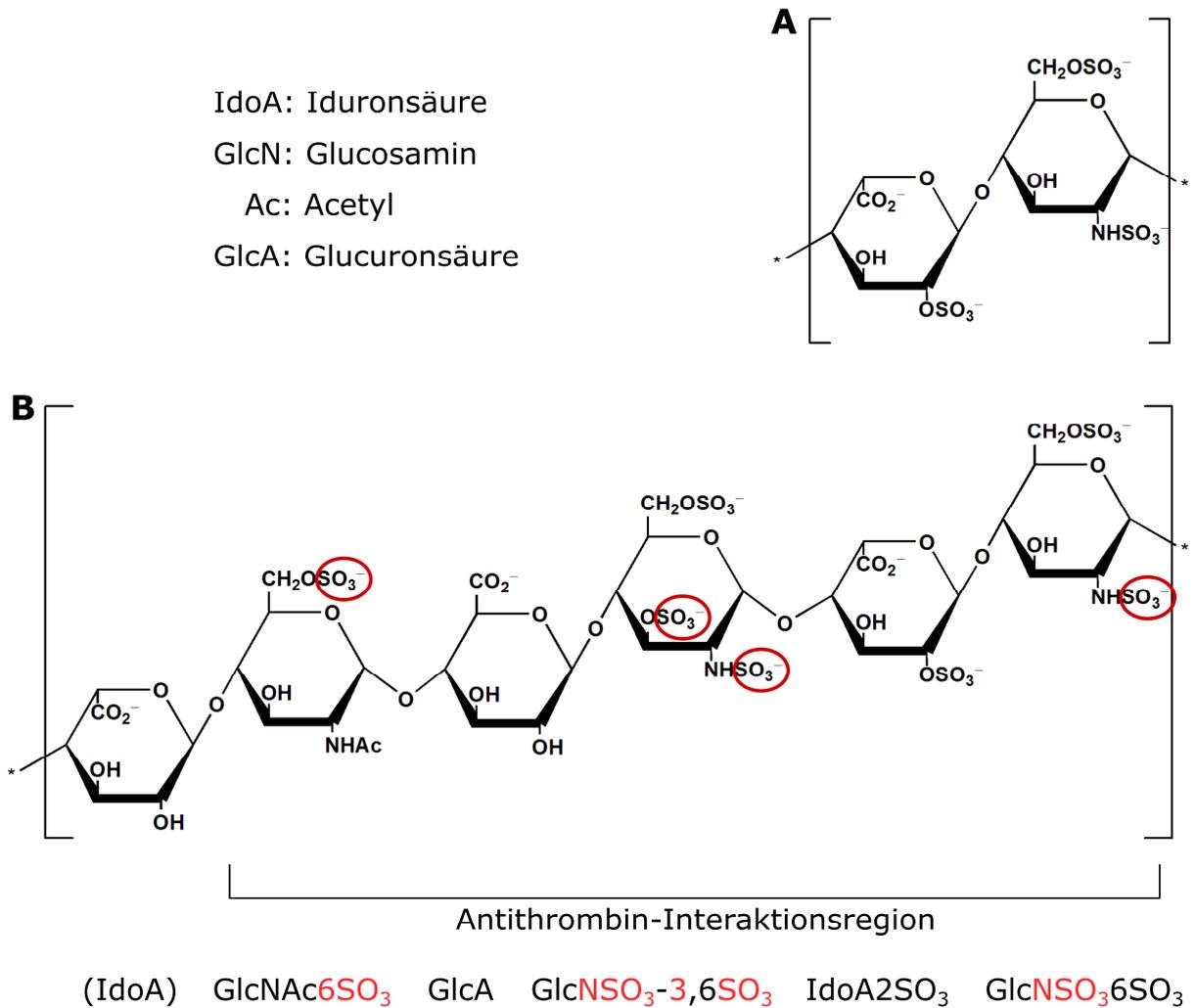
## 2.5 Heparin in der Krebstherapie

Da mit einer fortschreitenden Tumorerkrankung das Risiko thrombotischer Erkrankungen siebenfach erhöht ist und diese eine der hauptsächlichen Todesursachen sind, wird in der Überzahl der Krebstherapien eine antithrombotische Behandlung mit eingeschlossen.<sup>223</sup> Die Entstehung tumorassoziierter Thrombose wird auf die Freisetzung hämatostatischer Substanzen wie TF<sup>224</sup>, Faktor VII, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder VEGF zurückgeführt.<sup>225</sup> Zur Regulierung der Gerinnung bei Krebspatienten werden vermehrt niedermolekulare Heparine (NMH) leitlinienkonform eingesetzt, welche sich als effektiv und nebenwirkungsarm herausgestellt haben.<sup>226</sup> Diese unterscheiden sich in ihrer gerinnungshemmenden Wirkung von UFH darin, dass sie aufgrund ihrer geringeren Kettenlänge vorwiegend an Faktor Xa eine Antithrombin III-Bindung vermitteln, während der UFH-Antithrombin III-Komplex auch an Thrombin (Faktor IIa) wirksam ist.<sup>227</sup> Das Anti-Faktor Xa:IIa-Verhältnis, welches allgemein als Effektivitätskriterium der antikoagulativen Therapie gilt, ist daher für NMH zugunsten von Faktor Xa verschoben.<sup>228</sup>

### 2.5.1 Strukturelle Merkmale von Heparin und NMH

Heparin ist ein heterogenes körpereigenes Polysaccharid, welches zur Familie der Glykosaminoglykane gehört. Es kommt vorwiegend in Mastzellen und basophilen Granulozyten vor und wird zur Anwendung als Arzneimittel aus Säugerdarmmucosa oder aus Lungen gewonnen<sup>229</sup> und dabei nachträglich modifiziert. Für eine vollsynthetische Herstellung wurde zwar kürzlich eine effektive Strategie veröffentlicht<sup>230</sup>, diese hat aber gegenüber der Isolation aus natürlichen Quellen keine wirtschaftliche Relevanz.

Physiologisches Heparin hat je nach Kettenlänge eine Molekularmasse von 6000 bis 30.000 Da und ist aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aufgebaut. Auf eine Uronsäure, entweder D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure, folgt dabei immer ein Glucosaminmolekül. An den Zuckermolekülen der Disaccharideinheit sind als Modifikationen O- und N-Sulfatierung sowie N-Acetylierung möglich. Bei natürlichem Heparin ist 2-O-sulfatierte  $\alpha$ -L-Iduronsäure verknüpft mit 6-O- und N-sulfatiertem  $\alpha$ -D-Glucosamin mit 75–85 % der prädominante Kettenbestandteil (Abb. 2.17A). Durch die im wässrigen Milieu permanent deprotonierten Sulfatgruppen ist das Molekül im gesamten pH-Bereich negativ geladen.<sup>231</sup>



**Abb. 2.17:** **A:** Prädominanter Disaccharidgrundbaustein des Heparins aus  $\alpha$ -L-Iduronsäure verknüpft mit 6-O- und N-sulfatiertem  $\alpha$ -D-Glucosamin; **B:** Antithrombin-Interaktionsregion eines Heparinmoleküls aus fünf Zuckern mit den vier entscheidenden Sulfatierungsstellen (rot); modifiziert nach CASU ET AL.<sup>231</sup>

NMH werden aus dem natürlich gewonnenen UFH hauptsächlich durch Depolymerisation gewonnen, wobei die am häufigsten angewendeten Verfahren die desaminierende Spaltung, chemische oder enzymatische  $\beta$ -Elimination und oxidative Depolymerisation sind.<sup>232</sup> Sie werden als Derivate mit einer mindestens 60%igen Fraktion unter 8000 Da definiert. Ihr durchschnittliches Molekulargewicht variiert zwischen 3.600 Da bei den *ultra*NMH wie Bemiparin und 6.500 Da bei Tinzaparin, dem größten Vertreter.<sup>232</sup> Steigendes Molekulargewicht korreliert hierbei mit der Thrombinaffinität bzw. antiproportional mit dem Xa:IIa-Verhältnis. So konnte schon Ende der 80er Jahre eine deutliche Verlagerung der Aktivität von Thrombin zu Faktor Xa für eine Kettenlänge unter 18 Sacchariden gezeigt werden.<sup>233</sup> Die Antithrombininteraktionsstelle, also das eigentliche Pharmakophor der antithrombotischen Wirkung der Heparine, besteht aus einer Pentasaccharideinheit (Abb. 2.17B), die somit einer Ergänzung um 13 Saccharide bedarf, um bedeutsame Effekte auf

Thrombin zu zeigen.<sup>234</sup> Dieses Pentasaccharid wurde vollsynthetisch hergestellt und wird ebenfalls in der Thrombose­therapie eingesetzt (Fondaparinux).<sup>235</sup>

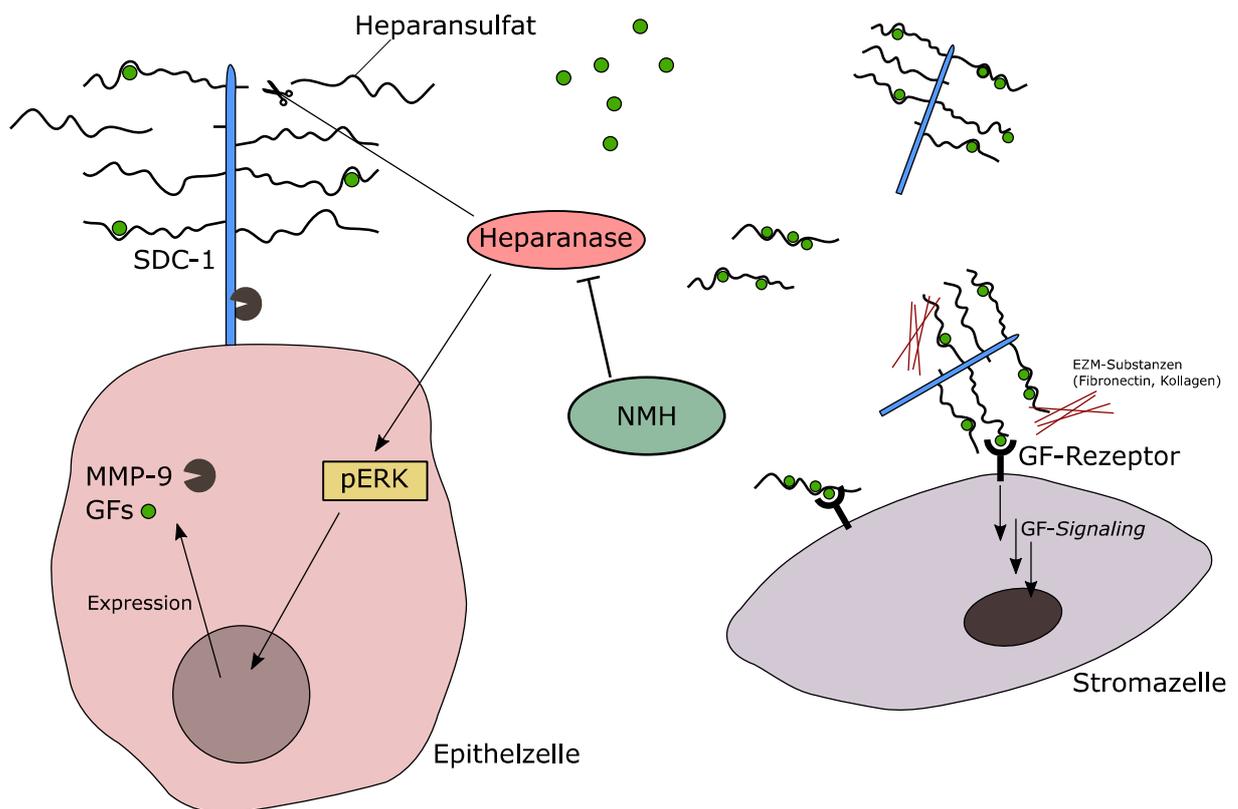
## 2.5.2 Postulierte Heparinwirkungen in Tumorpatienten

Erstaunlicherweise konnte schon Ende der 90er Jahre eine längere Überlebenszeit für heparinisierte Krebspatienten im Vergleich zu mit Vitamin K-Antagonisten antikoagulierten Patienten gezeigt werden.<sup>236</sup> Dieser erste Hinweis auf eine krebsassoziierte Heparinwirkung abseits der antikoagulativen Aktivität wurde weitergehend durch retrospektive Analysen bestätigt.<sup>237,238,239,240</sup> So ist die Mortalität von heparinbehandelten Krebspatienten, die primär keine standardtherapeutische oder prophylaktische Indikation für NMH (oder UFH) besitzen, günstig beeinflusst.<sup>241</sup> Dabei scheinen NMH dem UFH bei einer initialen Therapie überlegen zu sein.<sup>237</sup>

Da eine Aktivierung der Gerinnungskaskade *in vitro* stark mit dem Auftreten metastatischer Vorgänge in Verbindung steht<sup>242</sup>, wird der Benefit für die Überlebenszeit heparinisierter Krebspatienten vorwiegend auf die Wechselwirkungen des Heparin mit metastatischen Vorgängen zurückgeführt.<sup>243</sup> Diese Beeinflussung der Metastasierung durch Heparin ist seit ca. einem Jahrzehnt bekannt und nach wie vor, gerade seit dem Auftreten neuer oraler Antikoagulantien, Gegenstand intensiver Forschung. Als Hauptangriffspunkte auf molekularer Ebene haben sich vier Mechanismen als besonders anerkannt herausgestellt.

Zunächst ist Heparin selbst ein Substrat der Heparanase, kann somit deren Aktivität signifikant senken und schwächt deren tumorigenen Mechanismus ab.<sup>244</sup>

Heparanase ist eine  $\beta$ -Endoglucuronidase, die durch den enzymatischen Abbau von Heparansulfatketten vielfältige Funktionen im Körper entfaltet. Eine besondere Bedeutung besitzt die Heparanase durch die Remodellierung der extrazellulären Matrix. Dieses Enzym findet sich häufig überexprimiert in Tumorzellen<sup>245</sup> und ist auch über den Insulinrezeptorsignalweg unter Beteiligung der PKC mit einer ERK Phosphorylierung verbunden.<sup>246</sup> Diese bewirkt eine verstärkte Transkription von Wachstumsfaktoren wie VEGF und HGF und Proteasen wie MMP-9. Durch MMP-9 proteolytisch in die extrazelluläre Matrix freigesetztes Syndecan-1, ein HSPG, konzentriert die freigesetzten, an den GAG-Seitenketten komplexierten Wachstumsfaktoren in Tumornähe durch Bindung an Fibronectin, Kollagen oder andere Matrixstrukturen. Dadurch wird deren Bindung an Wachstumsrezeptoren erleichtert, was letztlich die Tumoraggressivität steigert<sup>247</sup> (Abb. 2.18).

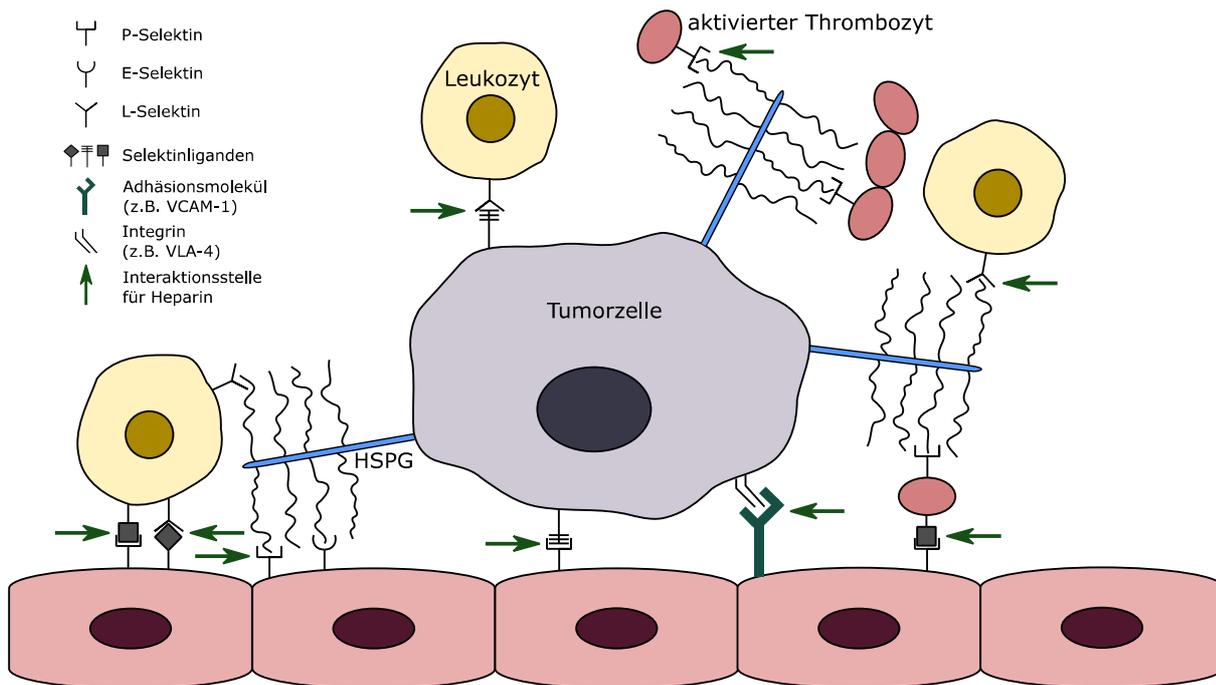


**Abb. 2.18:** Vereinfachte Darstellung der enzymatischen und nicht enzymatischen Heparanaseeffekte, deren Auswirkungen durch niedermolekulare Heparine (NMH) hemmend beeinflusst werden. Modifiziert nach PURUSHOTHAMAN ET AL.<sup>246</sup>

Um klinisch eine in diesem Fall unerwünschte antikoagulatorische Wirkung des Heparin zu vermeiden und somit die therapeutische Breite deutlich zu erhöhen, befinden sich nicht gerinnungswirksame Heparine in der Forschung als potentielle Heparanaseinhibitoren.<sup>248</sup>

Außerdem ist Heparin imstande, an Selektine zu binden und somit ein erstes Annähern von Leukozyten, Blutplättchen, aber auch Tumorzellen an das Endothel zu verhindern.<sup>249</sup> Obwohl das Bindungsmotiv der Selektine im Gegensatz zur Heparinstruktur eigentlich sialylierte, fucosylierte Lactosamin-Oligosaccharide (Sialyl Lewis x) beinhaltet, konnte für Heparin eine hochaffine Bindung an P- und L-Selektine gezeigt werden, wodurch die Bindungsfähigkeit von Tumorzellen an das Endothel sowie deren Wechselwirkungen mit Thrombozyten stark reduziert wird<sup>250</sup> (Abb. 2.19).

Neben Selektinen spielen auch Integrine als Adhäsionsrezeptoren eine Rolle bei der Extravasation von Blutzellen.<sup>251</sup> Ähnlich wie bei den Selektinen ist auch hier Heparin imstande, an das Integrin VLA-4 zu binden und eine Wechselwirkung mit seinem natürlichen Liganden, VCAM-1, zu verhindern. Infolgedessen konnte eine Inhibition der Metastasierung *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden.<sup>252</sup> Die Interaktionsdomäne des Heparins scheint jedoch eine andere zu sein als die mit Selektinen.<sup>253</sup>



**Abb. 2.19:** Schematische Übersicht über selektin-/integrinvermittelte Tumorzellinteraktionen mit Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten während der hämatogenen Metastase und mögliche Interaktionsstellen, an denen Heparin eine Bindung verhindert. Modifiziert nach BENDAS & BORSIG<sup>243</sup>

Auch zur Untersuchung einer Bindung von Heparin an Selektine oder Integrine bietet sich die Verwendung nicht-antikoagulativer Heparinderivate mit günstigen Bindungseigenschaften an, um Effekte isoliert von der Blutgerinnung zu betrachten und perspektivisch unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu vermeiden.<sup>253</sup>

Der vierte Mechanismus des Eingreifens von Heparin in die metastatische Kaskade ist die reflektorische Freisetzung von TFPI aufgrund einer Heparinbehandlung.<sup>254</sup>

Bei Endothelverletzungen wird zur Auslösung der Gerinnung TF freigesetzt, welcher Faktor VII aktiviert und als Faktor VIIa komplexiert. Dieser Komplex aktiviert wiederum Faktor X und treibt die späte Gerinnungskaskade voran. Neben dieser physiologischen Funktion konnte mehrfach eine Korrelation zwischen TF-Expression und erhöhter Tumoraggressivität bzw. -angiogenese gezeigt werden.<sup>255</sup>

Der natürliche Inhibitor dieses Komplexes mit gleichzeitiger Affinität zu Faktor Xa ist der TFPI. Dieser besitzt eine Bindedomäne für den TF/Faktor VIIa-Komplex und ist daher mit antiangiogenetischen Effekten<sup>256</sup> und reduzierter Tumoraggressivität<sup>257</sup> assoziiert.

Nach einer TFPI-Freisetzung aufgrund von Heparinabgabe wird die Neuformierung von Epithelzellen zu Blutgefäßen deutlich gesenkt, wobei die Stärke des Effektes mit steigendem Molekulargewicht des NMH bis hin zum Tinzaparin zunimmt.<sup>258</sup>

### 2.5.3 Einfluss von Heparin auf Chemoresistenz

Trotz intensiver Forschungsaktivität auf dem beschriebenen Gebiet der Beeinflussung der Metastasierung durch Heparin gibt es kaum Untersuchungen zu dessen Auswirkungen auf die Chemoresistenz. Dies ist in mehrfacher Hinsicht erstaunlich, da stark metastasierende Tumore sehr häufig Chemoresistenzen aufweisen<sup>259</sup>, aber auch weil es sich mehrende Hinweise auf die Effektivierung einer Chemotherapie durch Heparin gibt.

So profitierten schon Mitte der 90er Jahre Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom deutlich von einer Heparin-gabe vor dem Beginn der Chemotherapie<sup>260</sup>, was für diese Krebsart mehrfach in klinischen Studien bestätigt werden konnte.<sup>261,262</sup> Aber auch für Pankreaskrebs konnte unter der Behandlung mittels einer Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Cisplatin eine signifikante Erhöhung der Überlebensrate festgestellt werden.<sup>263</sup> Erste Erklärungsansätze auf der Ebene des Wirkmechanismus zeigen im *xenograft*-Modell in Mäusen eine erhöhte Aufnahme von Paclitaxel oder Doxorubicin in Adenokarzinome der Lunge durch die Kombination mit NMH.<sup>264</sup>

Allerdings stellen nahezu keine Ansätze einen adäquaten Zusammenhang zwischen Heparinbehandlung und Chemoresistenz wie etwa Untersuchungen an einem Resistenzmodell her, weshalb die Frage nach der Natur des Heparineffektes abseits der Metastasierung bis heute unbeantwortet bleibt.

Erste Erklärungsansätze beinhalten die Vorstellung, dass Heparin die vermehrt im Tumor auftretenden Blutgerinnsel auflöst. Der dadurch zurückgehende interstitielle Druck erleichtert zytostatisch aktiven Substanzen ein Eindringen in das Gewebe erheblich.<sup>265</sup>

Außerdem weisen besonders resistente Tumorzellen phänotypisch starke Veränderungen ihrer Adhäsionsmoleküle und -rezeptoren sowie ihrer umgebenden extrazellulären Matrix auf<sup>251,266</sup>, die potentielle Interaktionspartner von Heparin darstellen (Abschnitt 2.5.2). Dieses Phänomen wird unter dem Begriff *cell adhesion mediated drug resistance* (CAM-DR) zusammengefasst. Dabei vermitteln vor allem Integrine über die ILK unter anderem eine proliferationsunabhängige Resistenz über Apoptoseinhibition, indem Akt phosphoryliert wird und hemmend auf Bad, Bax, Caspase-9 und Caspase-3 einwirkt.<sup>267</sup>

In Zusammenhang mit einer erhöhten Aufnahme von Zytostatika in die Zelle wurde vereinzelt MDR-abhängige Sensitivierung resistenter Tumorzellen aufgezeigt. So lässt sich beispielsweise die Doxorubicinaufnahme und -sensitivität *in vitro* in matrixähnlicher Umgebung und *in vivo* durch vorausgehende NMH-Behandlung steigern.<sup>268</sup> Für Cisplatin

wurde in Kombination mit NMH eine Sensitivierung verbunden mit einem erhöhten Abbau von ABCG2 über Proteasomen und verringertem Tumorwachstum gefunden.<sup>269</sup>

Allerdings wird Cisplatin als Substrat MDR-relevanter Transporter stark diskutiert, weshalb die alleinige Rückführung einer Sensitivierung auf ABCG2 oder andere verwandte Transporter fragwürdig bleibt.<sup>270</sup>

Aufgrund der schon lange bekannten Antitumorwirkungen von Heparinen (Abschnitt 2.5.2), die dem sehr aktuellen Phänomen der Chemoresistenz (Kapitel 2.3) gegenüber stehen, ist es daher sehr verwunderlich, dass zu diesem Zusammenhang keine konsequenten Untersuchungen vorliegen. Daher soll in dieser Arbeit auch der Zusammenhang einer Behandlung mit NMH und Cisplatinresistenz untersucht werden.

### 3 Ziel der Arbeit

Nach der Entdeckung des Liposomeneffektes durch vorangegangene Arbeiten<sup>12</sup>, der die Chemoresistenz der Ovarialkarzinomzelllinie A2780cis überwindet, gilt es, diese Wirkung weiter herauszuarbeiten und das Potential der etablierten liposomalen Formulierung zu charakterisieren. Dabei soll vor allem Wert auf die Hintergründe der zytotoxischen Wirkung des liposomal eingeschlossenen Cisplatin gelegt werden. Insbesondere ist es von Bedeutung, aufzuklären, warum sich die zytotoxische Effektivität der Liposomen in resistenten Zellen stark von der des freien Wirkstoffes unterscheidet und welche potentiellen Unterschiede in den Wirkmechanismen bestehen.

Durch die Kombination von Experimenten zur Zytotoxizität und zellulären Cisplatin Aufnahme mit Expressionsanalysen der mRNA und relevanter apoptoseregulierender Proteine bis hin zu Untersuchungen zu deren Aktivität soll ein umfassender Einblick in das intrazelluläre apoptotische Geschehen der resistenten Ovarialkarzinomzelle gegeben werden, welches auf eine Behandlung mit Cisplatin und Cisplatinliposomen erfolgt. Neben den vielversprechenden Möglichkeiten sollen ebenfalls die Grenzen des liposomalen Arzneistoffträgersystems aufgezeigt werden, indem dessen Effektivität zusätzlich in einem anderen zellulären Resistenzmodell und *in vivo* getestet wird.

Neben den Auswirkungen der galenischen Veränderung des Cisplatin wird auch die Konsequenz einer Kombination des freien Wirkstoffes mit dem niedermolekularen Heparin Tinzaparin überprüft, welches durch klinische Befunde neben anderen NMH immer wieder als vorteilhaft in Kombination mit einer Chemotherapie diskutiert wird. Die für die Cisplatinliposomen etablierten Techniken können dabei Aufschluss über einen potentiell sensitivierenden Effekt abseits der metastatischen und koagulativen Signalkaskade geben.

Vor dem Hintergrund der Wirkmechanismen von liposomalem Cisplatin und Tinzaparin können somit Beiträge zur Aufklärung der vielfältigen Resistenzmechanismen in den untersuchten Ovarialkarzinomzellen geleistet werden. Diese können perspektivisch Anstoß zur klinischen Betrachtung des in dieser Arbeit dargestellten Phänomens geben und Alternativen zur Entgegnung einer vorhandenen oder sich entwickelnden Chemoresistenz eines Tumors liefern.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien und Ausgangsstoffe

##### 4.1.1.1 Substanzen

Tab. 4.1: Informationen zu den verwendeten Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Aprotinin aus Rinderlunge in Natriumchloridlösung 0,9 % (1,7 mg/mL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Argon 4.6	Air Products GmbH, Hattingen
Bacillol® AF	Paul Hartmann AG, Heidenheim
BCA Protein Assay Kit Novagen®	Merck KGaA, Darmstadt
Borsäure	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Bovines Serumalbumin, BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CASY® ton	Schärfe Systems GmbH, Reutlingen
Cell Extraction Buffer	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Chloroform	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Cisplatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Clarity™ ECL Western Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Cyanurchlorid	ACROS Organics, Geel, Belgien
4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid, DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazoliumbromid, MTT	AppliChem GmbH, Darmstadt

---

DPBS ohne Calcium und Magnesium pH 7,4, steril	PAN Biotech GmbH, Aldenbach
Ethanol 96 % (v/v)	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Fluoromount™ wässriges <i>mounting</i> -Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötale Kälberserum F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gigasept® Instru AF	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
L-Glutaminlösung (200 mmol/L)	PAN Biotech GmbH, Aldenbach
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Helium	Praxair Deutschland GmbH, Düsseldorf
holo-Transferrin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Isopropanol 100 %	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Kohlenstoffdioxid	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
Kupfersulfat-pentahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Laemmlli-Probenpuffer, 2x Konzentrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Leupeptin-hemisulfat	R&D Systems Europe Ltd., Abingdon
Melsept® SF	B. Braun AG, Melsungen
Methanol	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcarbonat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Grüssing GmbH, Filsum
Natriumcitrat-dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid	Grüssing GmbH, Filsum
Natronlauge (1 mol/L)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

---

## Material und Methoden

Penicillin-Streptomycinlösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	PAN Biotech GmbH, Aldenbach
Pepstatin A	R&D Systems Europe Ltd., Abingdon
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Precision Plus Protein™ WesternC™ Pack	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteome Profiler™ Human Apoptosis Array Kit	R&D Systems Europe Ltd., Abingdon
RPMI-1640® Nährmedium	PAN Biotech GmbH, Aldenbach
Salpetersäure 65 % Suprapur®	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Salpetersäure 65 % zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt
Salzsäure, (1 mol/L)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sephadex® G-50, fine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIS-Base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung 0,25 %	PAN Biotech GmbH, Aldenbach
Tween™ 20	AppliChem GmbH, Darmstadt

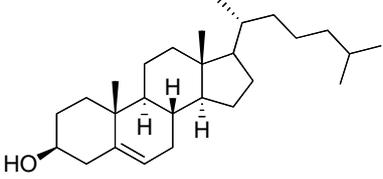
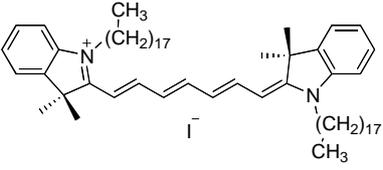
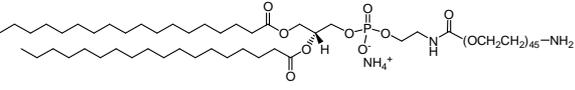
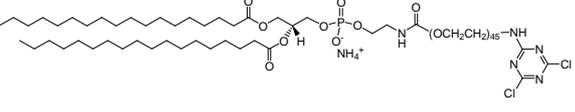
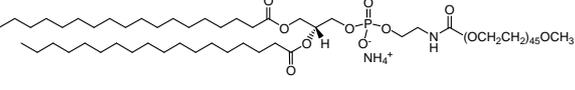
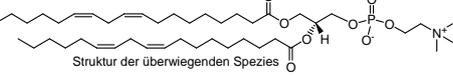
## 4.1.1.2 Lipide und Liposomenbestandteile

Tab. 4.2: Informationen zu den verwendeten Lipiden

Lipid/Substanz	Hersteller
5-Cholesten-3β-ol, Cholesterol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindotricarbocyanin-iodid, DiR-iodid	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

1,2-Dioctadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-[amino(polyethylenglykol)-2000] (Ammoniumsalz)	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster
1,2-Dioctadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-[cyanur(polyethylene glykol)-2000] (Ammoniumsalz)	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster ACROS Organics, Geel (Ausgangsstoffe)
1,2-Dioctadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-2000] (Ammoniumsalz)	Genzyme Pharmaceuticals, Cambridge
Sojaphosphatidylcholin	Lipoid GmbH, Ludwigshafen

Tab. 4.3: Strukturen der verwendeten Lipide<sup>271</sup>

Lipid/Substanz	Struktur
Chol	
DiR	
Amino-PEG-PE	
Cyanur-PEG-PE	
mPEG-PE	
SPC	 Struktur der überwiegenden Spezies

### 4.1.1.3 Antikörper

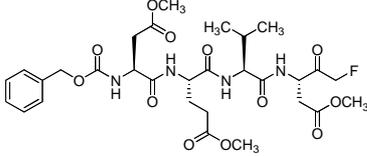
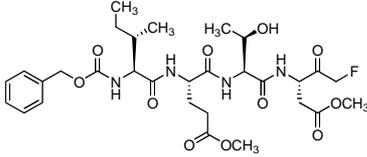
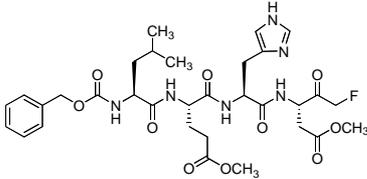
Tab. 4.4: Informationen zu den verwendeten Antikörpern

Antikörper	Epitop	Eigenschaften	Hersteller
$\beta$ -Aktin (C4), primär	Volle Länge von $\beta$ -Aktin aus dem Muskelmagen des Vogels (alle Isoformen)	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
ATP7A (D-9), primär	Aminosäuren 1–180 der N-terminalen zytoplasmatischen Domäne	Maus, monoklonal, IgG <sub>2a</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
ATP7B (A-11), primär	Aminosäuren 1372–1465 der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
CTR1 (FL-190), primär	Aminosäuren 1–190 entsprechend der vollen Länge	Kaninchen, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Donkey anti-goat IgG-HRP, sekundär	Ziegen-IgG	Esel, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Goat anti-Mouse IgG, sekundär	Maus-IgG	Ziege, HRP-konjugiert	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Goat anti-rabbit IgG-HRP, sekundär	Kaninchen-IgG	Ziege, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Human Caspase-8 Antibody, primär	Aminosäuren 234–391	Maus, monoklonal, IgG <sub>2a</sub>	R&D Systems Europe Ltd., Abingdon
Human Caspase-9 Antibody, primär	Aminosäuren 1–134	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	R&D Systems Europe Ltd., Abingdon

Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha$ 1 (N-15), primär	Region des N-Terminus	Ziege, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
--	--------------------------	------------------------	---

#### 4.1.1.4 Caspaseinhibitoren

Tab. 4.5: Informationen zu den verwendeten Caspaseinhibitoren

Inhibitor	Struktur	Hersteller
Z-DEVD-FMK, Caspase-3- Inhibitor		R&D Systems Europe Ltd., Abingdon
Z-IETD-FMK, Caspase-8- Inhibitor		R&D Systems Europe Ltd., Abingdon
Z-LEHD-FMK, Caspase-9- Inhibitor		R&D Systems Europe Ltd., Abingdon

#### 4.1.1.5 Fertigarzneimittel

Tab. 4.6: Informationen zu den verwendeten Fertigarzneimitteln

Fertigarzneimittel	Inhaltsstoffe	Inhaber, Patenthalter
Arixtra® 2,5 mg/0,5 mL Injektionslösung, Fertigspritze	Fondaparinux-Natrium 2,5 mg Natriumchlorid Wasser für Injektionszwecke Salzsäure Natriumhydroxid	Aspen Pharma Trading Ltd., Dublin

---

 Material und Methoden
 

---

innohep® 20.000 Anti-Xa I.E./mL Fertigspritzen Injektionslösung (241,143 mg/mL)	Tinzaparin-Natrium 20.000 I.E./mL Natriummetabisulfit (Ph. Eur.) (E 223) Natriumhydroxid Wasser für Injektionszwecke	LEO Pharma A/S, Ballerup Örtlicher Vertreter: LEO Pharma GmbH, Neu- Isenburg
Lipoplatin™ (IMP)	Cisplatin 3 mg/mL DPPG SPC Chol mPEG-PE	Regulon AE, Alimos

---

#### 4.1.2 Hergestellte Reagenzien

Die Bestandteile der hergestellten Reagenzien sind in der Reihenfolge ihrer Zugabe aufgelistet. Die unterste Position bezeichnet dabei das vorgelegte Lösungs- bzw. Dispersionsmittel.

Die Cisplatinarbeitslösungen wurden ausgehend von der genau quantifizierten Cisplatinstammlösung in Natriumchloridlösung 0,9 % (5 mmol/L) hergestellt; der Cisplatinstandard (50 ng/mL) und die Qualitätskontrollen (10, 20, 40 ng/mL) ausgehend von der ebenfalls genau quantifizierten Cisplatinstammlösung in Purelab Plus®-Wasser (5 mmol/L) über eine Cisplatinarbeitslösung (10 µg/mL).

##### 4.1.2.1 Substanzlösungen

**Tab. 4.7:** Informationen zu den hergestellten Substanzlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Caspase-3-Inhibitor-Arbeitslösung (0,5 mmol/L)	Caspase-3-Inhibitor- Stammlösung	75,0 µL
	Vollmedium	3,000 mL
Caspase-3-Inhibitor-Stammlösung (20 mmol/L)	Z-DEVD-FMK	1,0 mg
	DMSO	75,0 µL

---

Caspase-8-Inhibitor-Arbeitslösung (0,5 mmol/L)	Caspase-8-Inhibitor-Stammlösung	76,5 µL
	Vollmedium	2,984 mL
Caspase-8-Inhibitor-Stammlösung (20 mmol/L)	Z-IETD-FMK	1,0 mg
	DMSO	76,5 µL
Caspase-9-Inhibitor-Arbeitslösung (0,5 mmol/L)	Caspase-9-Inhibitor-Stammlösung	62,0 µL
	Vollmedium	2,418 mL
Caspase-9-Inhibitor-Stammlösung (20 mmol/L)	Z-LEHD-FMK	1,0 mg
	DMSO	62,0 µL
Cisplatinarbeitslösung (0,5 mmol/L)	Cisplatinstammlösung (5 mmol/L) in Natriumchloridlösung 0,9 % (m/v)	1,0 mL
	Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 mL
Cisplatinarbeitslösung (0,4 mmol/L)	Cisplatinstammlösung (5 mmol/L) in Natriumchloridlösung 0,9 % (m/v)	0,800 mL
	Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 mL
Cisplatinarbeitslösung (10 µg/mL)	Cisplatinstammlösung (5 mmol/L) in Purelab Plus®-Wasser	66,66 µL
	Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 mL
Cisplatinlösung (8 mg/mL, übersättigt)	Cisplatin	8,0 mg
	DPBS	ad 1,0 mL
	Erhitzen auf 80°C	
Cisplatinqualitätskontrolle (10 ng/mL)	Cisplatinarbeitslösung (10 µg/mL)	50 µL
	Purelab Plus®-Wasser	ad 50,0 mL
Cisplatinqualitätskontrolle (20 ng/mL)	Cisplatinarbeitslösung (10 µg/mL)	100 µL
	Purelab Plus®-Wasser	ad 50,0 mL

## Material und Methoden

Cisplatinqualitätskontrolle (40 ng/mL)	Cisplatinarbeitslösung	
	(10 µg/mL)	200 µL
	Purelab Plus®-Wasser	ad 50,0 mL
Cisplatinstammlösung (5 mmol/L) in Natriumchloridlösung 0,9 %	Cisplatin	15,0 mg
	Natriumchloridlösung 0,9 % (m/v)	ad 10,0 mL
	exakte Quantifizierung	
	mittels GF-AAS (siehe 2.3.5)	
Cisplatinstammlösung (5 mmol/L) in Purelab Plus®-Wasser	Cisplatin	15,0 mg
	Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 mL
	exakte Quantifizierung	
	mittels GF-AAS (siehe 2.3.5)	
Cisplatinstandard (50 ng/mL)	Cisplatinarbeitslösung	
	(10 µg/mL)	250 µL
	Purelab Plus®-Wasser	ad 50,0 mL
Cyr61-Arbeitslösung (2 µg/mL)	Cyr61-Stammlösung	
	(50 µg/mL)	80 µL
	Vollmedium	ad 2 mL
Cyr61-Arbeitslösung (4 µg/mL)	Cyr61-Stammlösung	
	(50 µg/mL)	160 µL
	Vollmedium	ad 2 mL
Cyr61-Stammlösung (50 µg/mL)	Recombinant Human	
	Cyr61/CCN1 Fc Chimera	50 µg
	DPBS, steril	ad 1,000 mL
Tinzaparinarbeitslösung (0,5 mg/mL)	Tinzaparin-stammlösung	
	(24,114 mg/mL)	0,104 mL
	DPBS, steril	ad 5,0 mL
Tinzaparinarbeitslösung (1 mg/mL)	Tinzaparin-stammlösung	
	(24,114 mg/mL)	0,415 mL
	Vollmedium	ad 10,0 mL
Tinzaparinarbeitslösung (50 µmol/L)	Tinzaparin-stammlösung	
	(24,114 mg/mL)	13,5 µL
	Aqua millipore	ad 10,0 mL

Tinzaparinstantammllösung (24,114 mg/mL)	innohep®	0,100 mL
	DPBS, steril	ad 1,0 mL

#### 4.1.2.2 Antikörperverdünnungen

Tab. 4.8: Informationen zu den hergestellten Antikörperverdünnungen

Antikörperverdünnung/-stammllösung	Zusammensetzung	
β-Aktin (1:200–1000)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	β-Aktin (C4)	10–50 µL
	TBS-T	10,0 mL
Anti-goat Antikörperstammllösung	Donkey anti-goat IgG-HRP	5 µL
	TBS-T	ad 50 µL
Anti-mouse Antikörperstammllösung	Goat anti-Mouse IgG	5 µL
	TBS-T	ad 50 µL
Anti-rabbit Antikörperstammllösung	Donkey anti-rabbit IgG-HRP	5 µL
	TBS-T	ad 50 µL
ATP7A (1:500)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	ATP7A (D-9)	20 µL
	TBS-T	10,0 mL
ATP7B (1:500)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	ATP7B (A-11)	20 µL
	TBS-T	10,0 mL
Caspase-8 (1:500)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	Caspase-8-Stammllösung	20 µL
	TBS-T	10,0 mL
Caspase-8-Stammllösung	Human Caspase-8 Antibody	0,1 mg
	DPBS, steril	0,200 mL

## Material und Methoden

---

Caspase-9 (1:500)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	Caspase-9-Stammlösung	20 µL
	TBS-T	10,0 mL
Caspase-9-Stammlösung	Human Caspase-9 Antibody	0,1 mg
	DPBS, steril	0,200 mL
CTR1 (1:500)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	CTR1 (FL-190)	20 µL
	TBS-T	10,0 mL
Sekundärer anti-goat Antikörper (1:10.000)	Magermilchpulver	1,000 g
	Anti-goat	
	Antikörperstammlösung	20 µL
	Streptaktin aus Precision	
	Plus Protein™ WesternC™	0,5 µL
	Pack	20,0 mL
	TBS-T	10,0 mL
Sekundärer anti-mouse Antikörper (1:10.000)	Magermilchpulver	1,000 g
	Anti-mouse	
	Antikörperstammlösung	20 µL
	Streptaktin aus Precision	
	Plus Protein™ WesternC™	
	Pack	0,5 µL
	TBS-T	20,0 mL
Sekundärer anti-rabbit Antikörper (1:10.000)	Magermilchpulver	1,000 g
	Anti-rabbit	
	Antikörperstammlösung	20 µL
	Streptaktin aus Precision	
	Plus Protein™ WesternC™	
	Pack	0,5 µL
	TBS-T	20,0 mL

---

Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase (1:500)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha$ 1 (N-15)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10,0 mL

### 4.1.2.3 Lipidstammlösungen

**Tab. 4.9:** Informationen zu den verwendeten Lipidstammlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Chol-Stammlösung (10 mmol/L)	193 mg ad 50,0 mL Chloroform
DiR-Stammlösung (1 mmol/L)	25 mg ad 24,7 mL Chloroform
DPPG-Stammlösung(1,8 mmol/L)	67 mg ad 50,0 mL Chloroform
Amino-PEG-PE-Stammlösung (1 mmol/L)	140 mg ad 50,0 mL Chloroform
Cyanur-PEG-PE-Stammlösung (1 mmol/L)	147 mg ad 50,0 mL Chloroform
mPEG-PE-Stammlösung (1 mmol/L)	138 mg ad 50,0 mL Chloroform
SPC-Stammlösung (10 mmol/L)	379 mg ad 50,0 mL Chloroform

### 4.1.2.4 Puffer und Lösungen

**Tab. 4.10:** Informationen zu den verwendeten Puffern und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
<i>blocking</i> -Lösung	Magermilchpulver 5,0 g TBS-T ad 100,0 mL

## Material und Methoden

Boratpuffer pH 8,8	Borsäure	618 mg
	Aqua millipore	ad 100,0 mL
	pH-Einstellung mit 1 mol/L NaOH	
DAPI-Arbeitslösung (3 mmol/L)	DAPI-Stammlösung	209,8 µL
	DPBS	790,2 µL
DAPI-Stammlösung (5 mg/mL, 14,3 mmol/L)	DAPI	10,0 mg
	Aqua dem.	2,0 mL
Elektrodenpuffer	Elektrodenpuffer 10x	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000 mL
Elektrodenpuffer 10x	Glycin	72 g
	TRIS-Base	15 g
	SDS	5 g
	Aqua millipore	ad 500 mL
Holotransferrinlösung (25 mg/mL)	Holotransferrin	125,0 mg
	Natriumchloridlösung 0,9 % (m/v)	5,0 mL
Kryomedium	FKS	50,0 mL
	DMSO	5,6 mL
Kupfersulfatlösung (30 mmol/L)	Kupfersulfat-pentahydrat	74,9 mg
	Aqua millipore	ad 10,0 mL
Leupeptinstammlösung (5 mg/mL)	Leupeptin-hemisulfat	25 mg
	Natriumchloridlösung 0,9 % (m/v)	ad 5,0 mL
Lösung A (Peterson-Lowry)	Kupfersulfat-pentahydrat	0,5 g
	Natriumcitrat-dihydrat	1,0 g
	Aqua millipore	ad 100,0 mL
Lösung B (Peterson-Lowry)	Natriumhydroxid	4,0 g
	Natriumcarbonat	20,0 g
	Aqua millipore	ad 500,0 mL
Lösung C, Biuret-Reagenz (Peterson-Lowry)	Lösung A (Peterson-Lowry)	1,0 mL
	Lösung B (Peterson-Lowry)	49,0 mL

---

Luminol-Peroxidlösung (1:1)	Clarity Western	
	Peroxidlösung	1,0 mL
	Clarity Western	
	Luminollösung	1,0 mL
	(beides aus Clarity™ ECL Western Blotting Substrate)	
Lysepuffer	PMSF-Stammlösung	
	(0,3 mol/L)	34 µL
	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	500 µL
	Cell Extraction Buffer	10,0 mL
MTT-Reagenz (5 mg/mL)	MTT	50,0 mg
	DPBS-Puffer	ad 10,0 mL
Natriumchloridlösung 0,9 % (m/v)	Natriumchlorid	9,0 g
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
Natriumdeoxycholatlösung 0,3 % (m/v)	Natriumdeoxycholat	300,0 mg
	Aqua millipore	ad 100,0 mL
Paraformaldehydlösung (4 %)	Paraformaldehyd	1,0 g
	Aqua dem.	25,0 mL
	pH-Einstellung mit 1 mol/L NaOH	
Pepstatin A-Stammlösung	Pepstatin A	10 mg
	Natriumchloridlösung 0,9 % (m/v)	ad 10 mL
PMSF-Stammlösung (0,3 mol/L)	PMSF	250 mg
	DMSO	4,783 mL
Proteinstandardlösung (0,2 mg/mL)	BSA	2,0 mg
	Aqua millipore	ad 10,0 mL
Salpetersäure 6,5 % (v/v)	Salpetersäure 65 %	
	Suprapur® (v/v)	5,0 mL
	Aqua millipore	ad 50,0 mL

---

## Material und Methoden

Salpetersäure 6,5 % (v/v) zur Dekontamination	Salpetersäure 65 % (v/v) zur Analyse	50,0 mL
	Aqua dem.	ad 500,0 mL
Sephadex <sup>®</sup> G-50-Suspension	Sephadex <sup>®</sup> G-50, fine	6,0 g
	Natriumchloridlösung 0,9 % (m/v)	ad 100,0 mL
Spüllösung (GF-AAS)	Aqua millipore, entgast mit Helium	1000,0 mL
	Salpetersäure 6,5 % (v/v)	1,0 mL
	Triton <sup>®</sup> X-100-Lösung 1 % (m/v)	1,0 mL
TBS	TBS 10x	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
TBS 10x	Natriumchlorid	40,0 g
	TRIS-Base	6,060 g
	Aqua millipore	ad 500,0 mL
	pH-Einstellung mit 1 mol/L Salzsäure auf 7,3	
TBS-T	TBS 10x	100,0 mL
	Tween <sup>™</sup> 20	2,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
Transferpuffer	Transferpuffer 10x	100 mL
	Aqua millipore	ad 1000 mL
Transferpuffer 10x	Glycin	72,0 g
	TRIS-Base	15,0 g
	Aqua millipore	ad 500,0 mL
Trichloressigsäure 70 % (m/m)	Trichloressigsäure	70,0 g
	Aqua millipore	ad 100,0 g
Triton <sup>®</sup> X-100-Lösung 1 % (m/v)	Triton X-100	1,0 g
	Aqua millipore	ad 100,0 mL

Vollmedium	Fötale Kälberserum F7524	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycin- lösung	
	(10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	L-Glutaminlösung	
	(200 mmol/L)	7,5 mL
	RPMI-1640 <sup>®</sup> Nährmedium	500,0 mL

#### 4.1.2.5 Liposomendispersionen

Es wurde mit einer totalen Lipidkonzentration von 60  $\mu\text{mol/mL}$  gearbeitet und die benötigte Lipidmenge als jeweilige Stammlösung in Chloroform (siehe 2.1.2.3) zugegeben. Als Dispersionsmittel diente für Leerliposomen DPBS und für Cisplatinliposomen übersättigte Cisplatinlösung.

Der Cyanur-PEG-PE-Anker wurde von Frau Michaela Borrmann (ehem. Krieger) zur Verfügung gestellt, welche diesen nach einer modifizierten Herstellungsmethode von BENDAS ET AL.<sup>272</sup> aus Amino-PEG-PE und Cyanurchlorid synthetisierte.

**Tab. 4.11:** Informationen zu den hergestellten Liposomendispersionen

<b>Cisplatinliposomen, 5 % mPEG-PE</b>	
SPC	65 mol%
Chol	30 mol%
mPEG-PE	5 mol%
<b>Cisplatinliposomen, 2 % mPEG-PE, DiR-markiert</b>	
SPC	67,5 mol%
Chol	29,5 mol%
mPEG-PE	2 mol%
DiR	1 mol%

**Cisplatinliposomen, 5% mPEG-PE,  
DiR-markiert**

SPC	64,5 mol%
Chol	29,5 mol%
mPEG-PE	5 mol%
DiR	1 mol%

**Cisplatinliposomen, 7 % mPEG-PE,  
DiR-markiert**

SPC	63 mol%
Chol	29 mol%
mPEG-PE	7 mol%
DiR	1 mol%

**Cisplatinliposomen, 5 % mPEG-PE,  
zur Kopplung**

SPC	65 mol%
Chol	30 mol%
mPEG-PE	3 mol%
Cyanur-PEG-PE	2 mol%

**Cisplatinliposomen, 5 % mPEG-PE,  
DiR-markiert zur Kopplung**

SPC	64,5 mol%
Chol	29,5 mol%
mPEG-PE	3 mol%
Cyanur-PEG-PE	2 mol%
DiR	1 mol%

### 4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 4.12: Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
CASY <sup>®</sup> cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CHROMABOND <sup>®</sup> Säulen (6 mL)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Combitips advanced <sup>®</sup> (1,0 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
CytoOne <sup>®</sup> 96 Well-Platte, TC-behandelt	Starlab GmbH, Ahrensburg
Deckgläser Stärke No. 1, rund	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Einmal-Küvetten PMMA (1,5 mL halbmikro)	BrandGmbH&Co.KG, Wertheim
Einmal-Küvetten PS (4,5 mL)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Einmalspritzen NORM-JECT <sup>®</sup> (10 mL)	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Einmalspritzen NORM-JECT <sup>®</sup> (20 mL)	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Gel-Pipettenspitzen MultiFlex Round	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City
Glasperlen (Ø2,5 mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Graphitröhrchen, Omega platform tubes	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Gummisauger für Pasteurpipetten, Naturkautschuk	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Handdispenser Aufsätze (0,5 mL)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Handdispenser Aufsätze (2,5 mL)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Handdispenser Aufsätze (12,5 mL)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Handdispenser Aufsätze (25 mL)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Mikro-Reagenzgläser (Ø 10 mm)	Reichert Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg
Mini-PROTEAN <sup>®</sup> TGX <sup>™</sup> Precast Gels (10 %, 10 Wells a 50 µL)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini Trans-Blot Filter Paper	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kryoröhrchen PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Nagellack p2 nail art topcoat	dm-drogerie markt GmbH + Co. KG, Karlsruhe

## Material und Methoden

Objektträger Stärke ca. 1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen (1-10 µL), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (1-200 µL), gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (101-1000 µL), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (5 mL) Plastibrand <sup>®</sup> , natur	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Platinhohlkathodenlampe, UltrAA <sup>®</sup> lamps	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Probenvials (2 mL), konisch	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Reagiergefäße (0,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (2,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhrchen, 15 mL, PP, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, 50 mL, PP, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturflaschen, 50 mL, 25 cm <sup>2</sup> , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 250 mL, 75 cm <sup>2</sup> , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 550 mL, 175 cm <sup>2</sup> , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

## 4.1.4 Geräte

Tab. 4.13: Informationen zu den verwendeten Geräten

Gerät	Hersteller
Absaugsystem BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Accu-Jet <sup>®</sup> pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Analysenwaage Mettler Toledo Classic Plus AB135-S	Mettler-Toledo GmbH, Giessen

---

Analysenwaage Sartorius basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen
Autosampler PSD 100	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Badgefäß LAUDA ecoline 019	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CO <sub>2</sub> -Inkubator NuAire™ DH AutoFlow	NuAire Inc., Plymouth
CO <sub>2</sub> -Inkubator Thermo	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Einhängethermostat LAUDA ecoline E 100	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
GLW L46 Probenmischer	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg
Graphitrohratomisator GTA 100	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Hamilton-Spritze Gastight 1002 LTN, stumpf	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Nikon A1R	Nikon GmbH, Düsseldorf
Laborschüttler KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Laminar-Air-Flow-Werkbank Heraeus Herasafe HSP 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Laminar-Air-Flow-Werkbank Holten safe 2010	Heto-Holton A/S, Allerød, DK
Lichtmikroskop Wilovert 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Lichtmikroskop Wilovert Standard HF/K	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Mehrfachdispenser HandyStep® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Mehrfachdispenser HandyStep® electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (10 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (50 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (100 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (250 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

---

## Material und Methoden

---

Messkolben BLAUBRAND <sup>®</sup> , Klasse A (500 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND <sup>®</sup> , Klasse A (1 L)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND <sup>®</sup> , Klasse A (2 L)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messpipetten Klasse AS, 1 mL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messpipetten Klasse AS, 5 mL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messpipetten Klasse AS, 10 mL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mini-PROTEAN <sup>®</sup> Tetra Cell and Blotting Module mit PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multipette <sup>®</sup> M4	Eppendorf AG, Hamburg
Multiskan <sup>®</sup> EX	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold
Multiwellreader FLUOstar <sup>™</sup> OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Multiwellreader LUMIstar <sup>™</sup> OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Multiwellreader POLARstar <sup>™</sup> OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Offenburg
PARAFILM <sup>®</sup> M	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
PCS Malvern Autosizer 2c	Malvern Instruments Ltd., Worcestershire
Peleusball	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
pH-Meter S20 SevenEasy <sup>™</sup> pH	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Pinzetten, diverse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipette (1–5 mL) Finnpipette <sup>®</sup>	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Pipette (10 µL) Research <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (100 µL) Research <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (1000 µL) Research <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (10 µL) Transferpipette <sup>®</sup> S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (100 µL) Transferpipette <sup>®</sup> S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (1000 µL) Transferpipette <sup>®</sup> S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (200 µL) Transferpipette <sup>®</sup> S-12	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (100 µL) Transferpipette <sup>®</sup> -12 electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim

---

---

Pipette (200 µL) Transferpipette®-12 electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Probenaufbereiter MicroCal ThermoVac	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Purelab® Plus Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle
Rotationsverdampfer Rotavapor R-3	Büchi AG, Essen
RS-P42 Drucker	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Rundkolben, Klarglas (5 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rundkolben, Klarglas (10 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Schraubdeckelgefäße Rotilabo® ND8 (1,5 mL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schraubdeckelgefäße Rotilabo® ND11 (4 mL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schüttelinkubator Unimax® 1010	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
SONOPULS HD 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Spatel, diverse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Spektrometer SpectrAA® Zeeman 220	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Steri-Cycle® CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Thermomixer comfort (IsoTherm 1,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Titrationsskalorimeter MicroCal VP-ITC	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Trockenschrank 60°C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Ultraschallbad Sonorex® Super RK 103 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV/VIS-Spektrophotometer Ultrospec 4000	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Vakuum-Chemiepumpstand PC5	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vakuum-Konzentrations-Zentrifuge UNIVAPO 100 H	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg
Reagenzglasschüttler VWR Collection	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasseraufbereitungsanlage Elix	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Zellzähler CASY® 1 Model TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge Allegra™ R5	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Avanti J-25	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld

---

Zentrifuge Microfuge® Lite	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Micro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

## 4.1.5 Software

Tab. 4.14: Informationen zu der verwendeten Software

Bezeichnung/Version	Urheber
2007 Microsoft Office System:	© Microsoft Corporation 2006
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microsoft Office Excel v12.0.4518.0</li> <li>• Microsoft Office Word v12.0.4518.0</li> </ul>	
Ascent Software™ v2.6	© Thermo LabSystems Oy 1996–2002
ChemDraw Ultra v9.0	© CambridgeSoft 1996–2004
Image Lab (Beta 2) v3.0.1	© Bio-Rad Laboratories 2010
Inkscape	© Free Software Foundation 1989, 1991
NIS-Elements Advanced Research	© Nikon Instruments 2000–2010
PCS for Windows v1.52 Rev.1	© Malvern Instruments Ltd. 1992
Prism 5 for Windows v5.00	© GraphPad Software Inc. 1992–2007
SpectrAA 220Z, AA 240Z v5.1 PRO	© Varian Australia 1997–2006
SWIFT-Instrument Control v1.08	© Biochrom Ltd. 1995–1998

## 4.1.6 Zelllinien

Für diese Arbeit wurde die humane Ovarialkarzinomzelllinie A2780 verwendet, die dem Epithel einer unbehandelten Patientin entnommen wurde, sowie die cisplatinresistente Zelllinie A2780cis. Bezogen wurden die Zelllinien von der ECACC (*European Collection of Cell Cultures*; A2780 Katalog-Nr.: 93112519, A2780cis Katalog-Nr.: 93112517). Die Resistenz wurde erreicht, indem man die ursprüngliche A2780-Zelllinie schrittweise gegenüber erhöhten Cisplatinkonzentrationen expositionierte.

Zur Untersuchung von Auswirkungen auf die *multi drug resistance* wurden von Frau Martina Lebbing-Neuber aus dem Arbeitskreis Prof. Wiese außerdem doxorubicinresistente A2780adr-Zellen (ECACC, A2780adr Katalog-Nr.: 93112520) verwendet.

Des Weiteren wurde mit der ebenfalls humanen, epithelialen Ovarialkarzinomzelllinie Caov-3 gearbeitet, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Kassack vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurde. Ursprünglich wurde die Zelllinie von der ATCC (*American Type Culture Collection*, ATCC<sup>®</sup> Nr.: HTB-75<sup>™</sup>) erworben und eine resistente Zelllinie durch ein Behandlungsschema mit einer Steigerung subtoxischer Cisplatinkonzentrationen erhalten. Diese wurde als Caov-3cis benannt.

## 4.2 Liposomenpräparation

### 4.2.1 Hydratationsmethode

Die Lipidstamm Lösungen wurden im benötigten Verhältnis in einem Rundkolben gemischt und das Lösungsmittel bei 40°C und 250 mbar mit einem Rotationsverdampfer abgezogen. Der erhaltene Lipidfilm wurde darauf bei maximalem Unterdruck 1 h lang getrocknet und anschließend im gewünschten Dispersionsmittel unter Mischen mit Glasperlen rehydratisiert.

Zum Einschluss von Cisplatin wurde eine 8 mg/mL übersättigte Cisplatinlösung in DPBS pH 7,4 hergestellt. Nach der Einwaage des Cisplatins wurde im Wasserbad bei 80°C so lange erhitzt, bis eine klare Lösung ohne Bodensatz entstand. War ein Vergleich mit Leerliposomen nötig, wurden zwei identische Lipidmischungen angesetzt, von denen eine in Cisplatinlösung und eine mit DPBS resuspendiert wurde. Als direkter Vergleich wurde der Cisplatingehalt der Cisplatinliposomen als der theoretische Gehalt der Leerliposomen angenommen und mit gleichem Volumen behandelt.

Die Liposomenbildung wurde durch Schütteln über Nacht auf einem Laborschüttler bei 150 Bewegungen/min und RT unterstützt, wodurch sich vorwiegend sehr unterschiedlich große, multilamellare Vesikel (MLV) bildeten. Bei eingeschlossenem Cisplatin und fluoreszenzmarkierten Liposomen wurde dies unter Lichtausschluss durchgeführt, um einen lichtinduzierten Zerfall des Komplexes bzw. ein *photobleaching* der Fluorophore zu vermeiden.

### 4.2.2 Homogenisierung

Die cisplatinhaltigen Liposomen wurden unter Eiskühlung durch Ultraschall homogenisiert. Nach dem Einbringen des Ultraschallstabes in die Liposomendispersion wurde mit 60 % relativer Intensität 30 Sekunden lang jede Sekunde ein Impuls ausgelöst. Dies wurde in sieben Zyklen durchgeführt mit einer Pause von 60 Sekunden zwischen den einzelnen Durchgängen.

Das Verfahren führte zu Liposomen einer Größe zwischen ca. 100–140 nm.

### 4.2.3 Kopplung von Holotransferrin an die Oberfläche der Liposomen

Für eine Optimierung der Cisplatinfreisetzung *in vivo* wurde ein Teil der Liposomen mit Holotransferrin *targetiert*. Für *untargetierte* Liposomen entfiel dieser Schritt.

Die durch Ultraschall homogenisierte Liposomendispersion wurde dazu mit der Hälfte ihres Volumens Boratpuffer versetzt, um den in der Membran enthaltenen Lipidanker für eine Proteinkopplung zu aktivieren. Im Folgenden wurde in das nun basische Dispersionsmittel Holotransferrinlösung im molaren Verhältnis 1:1000 (holo-Tf : Gesamtlipid) gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht auf einem Laborschüttler bei RT und 150 Bewegungen/min geschüttelt. Das Holotransferrin wurde wie in Abb. 4.1 dargestellt an das PEG-Lipid gebunden.

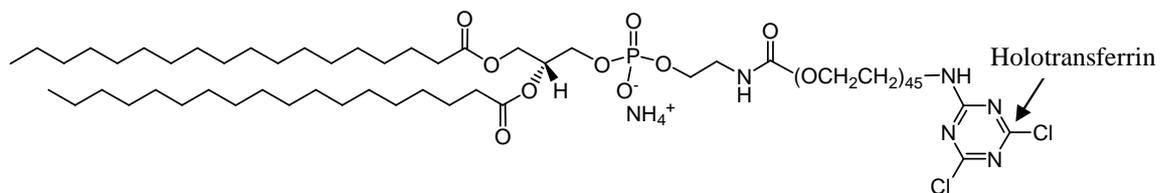


Abb. 4.1: Struktur des Lipidankers und Kopplungsstelle für Holotransferrin<sup>273</sup>

### 4.2.4 Aufreinigung der Liposomen

Die Abtrennung von nicht eingeschlossenem Cisplatin und bei gekoppelten Ansätzen von ungebundenem Holotransferrin erfolgte durch Größenausschlusschromatographie.

Der Filter der Chromatographiesäule wurde zunächst mit Isopropanol befeuchtet, mit DPBS gespült und anschließend mit Sephadex<sup>®</sup> G-50-Suspension befüllt und erneut mit DPBS konditioniert. Es wurden je nach Bedarf max. 500 µL Liposomen auf die Säule gegeben und als größte und somit erste Fraktion in einem 2,0 mL Reagiergefäß aufgefangen. Der

Lipidverlust durch dieses Verfahren wurde mit 20 % abgeschätzt, bezogen auf die Gesamtlipidmenge der hergestellten Liposomen.

## 4.3 Charakterisierung der Liposomen

### 4.3.1 Größenbestimmung

Die Größe der Liposomen wurde mithilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) überprüft. Bei diesem dynamischen Streulichtverfahren wird die Größe von Partikeln quantitativ und qualitativ aus der Schwankungsgeschwindigkeit der Streulichtintensität eines im 90°-Winkel eingestrahnten Lasers abgeleitet. Diese ist für kleinere Partikel, die stärker der Brown'schen Molekularbewegung unterliegen, schneller als für größere.<sup>273</sup>

Die Messung am Malvern Autosizer 2c umfasst drei Durchläufe mit jeweils zehn Einzelmessungen, bei denen die Größe sowie der Polydispersitätsindex (PI) als Maß für die Größenverteilung der Liposomendispersion erfasst wurden.

Es wurden je nach Konzentration der Liposomendispersion 20–50 µl mit ca. 1 mL sterilfiltriertem Dispersionsmittel in eine 1,5 mL Halbmikroküvette gegeben und gemessen.

### 4.3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung des an die Liposomen gekoppelten Holotransferrins erfolgte als Direktbestimmung mit einem modifizierten Peterson-Lowry-*assay*. Die Empfindlichkeit der Biuret-Reaktion wird hierbei durch den Anschluss der Folin-Reaktion verbessert und die Störung durch andere Substanzen minimiert.

Die Biuret-Reaktion beruht auf einer Komplexbildung des Proteins mit zweiwertigem Kupfer, wodurch sich eine rot-blaue Färbung ergibt (Abb. 4.2). Der Mechanismus der angeschlossenen Folin-Reaktion ist noch ungeklärt. Vermutlich werden durch Zugabe des Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenzes das darin als Heteropolyphosphorsäuren enthaltene Molybdat bzw. Wolframat sowie Kupfer aus dem Biuret-Reagenz reduziert. Als Reduktionsmittel dient das Tyrosin des Proteins, aber auch andere Aminosäuren wie beispielsweise Tryptophan sind nicht ausgeschlossen. Die Farbe schlägt von gelb nach blau um, wodurch sich mit dem rot-blauen Biuret-Komplex eine tiefblaue Mischfarbe ergibt.<sup>274</sup>

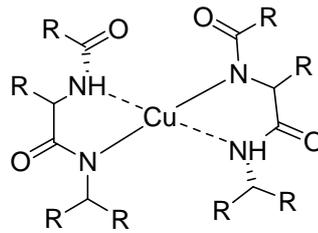


Abb. 4.2: Struktur des rot-blauen Biuret-Komplexes vor der Umsetzung mit Folin-Reagenz

Zur Bestimmung der Liposomenproben wurden zunächst in 2,0 mL Reagiergefäßen zwei Kalibrierungen mit Blindwert im Bereich von 2 bis 12  $\mu\text{g/mL}$  Protein durch Verdünnen der Proteinstandarlösung hergestellt. Von den Liposomendispersionen wurde je nach Konzentration ein Probenvolumen von 10 bis 20  $\mu\text{L}$  in Triplikaten verwendet. Aufgefüllt wurde mit Aqua dem. auf 1,0 mL. Zur Lyse der Liposomen wurden 50  $\mu\text{L}$  des Detergens Natriumdeoxychololat als 0,3 %ige Lösung zugesetzt, gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Trichloressigsäure 70 % und erneutem Mischen wurden die Proben zur Ausfällung der Proteine 20 min bei 4°C und 13520 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1,0 mL Biuret-Reagenz (Lösung C) resuspendiert. Auf 10 min Inkubation bei RT folgte die Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz (Lösung D), an die sich eine weitere Inkubation unter Lichtausschluss ebenfalls bei RT anschloss. Hatte sich ein Niederschlag gebildet, wurde dieser abzentrifugiert (13520 g) und nur der Überstand für die Messung verwendet. Bei der Bestimmung in Halbmikroküvetten wurde zunächst der Blindwert eingestellt und bei ebenfalls 750 nm die Kalibrierung und die Proben gemessen. Durch lineare Regression der gemessenen Werte der Kalibrierung konnte auf die Konzentration der Proben geschlossen werden. Die hergestellte Proteinstandarlösung wurde zur Korrektur der Kalibrierung unverdünnt ebenfalls am UV/VIS-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 278 nm in einer Quarzhalbmikroküvette bestimmt.

### 4.3.3 Phosphatbestimmung

Ausgehend vom Bartlett-*assay*<sup>275</sup> wurde der Gesamtlipidgehalt der gekoppelten Liposomen als Phosphatgehalt bestimmt, um Aussagen zur Kopplungseffizienz zu treffen. Da Cholesterol kein Phosphat enthält, wurde der übrige Lipidgehalt bestimmt und über das an Lipidstammlösung eingesetzte molare Verhältnis auf dessen Konzentration rückgeschlossen.

Bei dieser photometrischen Bestimmung wird die aus dem Phospholipid im stark Sauren freigesetzte Phosphorsäure mit Molybdatreagenz zu einem gelblichen Komplex umgesetzt,

welcher in niedrigen Konzentrationen löslich ist. Durch anschließende Reduktion mit Ascorbinsäure bildet sich Molybdänblau.

Aus Phosphatstandardlösung (0,65 mmol/mL) wurden zwei Kalibrierreihen im Bereich von 2 nmol bis 65 nmol einschließlich Blindwert hergestellt. Von den Liposomendispersionen wurden je nach hergestellter Lipidkonzentration 40–80  $\mu\text{L}$  als Triplikate zur Bestimmung verwendet. Zur Spaltung der Phosphatesterbindungen wurde in die Mikroreagenzgläser mit den Proben 200  $\mu\text{L}$  Perchlorsäure 70 % pipettiert und 30 min bei 190°C in einem Heizblock erhitzt. Nach 15 min Abkühlen auf RT wurden zu jedem Ansatz 2 mL Molybdatreagenz und 250  $\mu\text{L}$  Ascorbinsäurelösung 10 % gegeben, gemischt und 10 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Abgekühlt wurden die nun gefärbten Proben unter fließendem Wasser und zur Quantifizierung in 4,5 mL Einmalküvetten überführt. Die UV-Messung der Proben wurde bei 812 nm an einem UV/VIS-Spektrometer durchgeführt. Die Quantifizierung der Liposomenproben erfolgte mittels linearer Regression der Werte der Kalibrierung.

#### **4.3.4 Bestimmung der Kopplungsrate**

Die Kopplungsrate des Holotransferrins wurde aus dem Quotienten aus Proteinkonzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ] und Phosphatkonzentration [ $\mu\text{mol/mL}$ ] als  $\mu\text{g Protein}/\mu\text{mol Phosphat}$  ermittelt.

#### **4.3.5 Quantitative Platinbestimmung**

Die Platinbestimmung erfolgte mittels Graphitofen-Atomabsorptionsspektroskopie<sup>276</sup> (GF-AAS), wobei 20  $\mu\text{L}$  der Probe in ein pyrolytisch beschichtetes Graphitrohr injiziert wurden. Dabei durchläuft die Probe mehrere Aufheizzyklen, bei denen die Temperaturpunkte 650°C und 1200°C durchlaufen werden, um alle membranären Bestandteile zu veraschen, und schließlich bei 2300°C die eigentliche Messung stattfindet (Tab. 4.15). Hierbei wird das atomisierte Platin aus dem Cisplatin-Komplex mit einer Platinhohlkathodenlampe durch einen Monochromator von 265,9 nm bestrahlt und absorbiert einen Teil des Lichtes. Durch das bekannte Verhältnis zwischen eingestrahlttem und aus der Probe wieder austretendem Licht (Extinktion) kann aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Platinkonzentration ermittelt werden, die sich proportional zum absorbierten Licht verhält. Zur Unterdrückung des Hintergrundrauschens wird der sog. Zeeman-Effekt<sup>277</sup> ausgenutzt. Es erfolgt leicht zeitversetzt eine zweite Messung der Probe in einem Magnetfeld von 0,8 T, bei der sich das Absorptionsspektrum des atomaren Platins in senkrecht polarisiertes ( $\sigma^-$  und  $\sigma^+$ ) und parallel polarisiertes ( $\pi$ ) Licht aufspaltet, wobei das senkrecht polarisierte Licht einem Wellenlängen-

*shift* unterliegt und parallel polarisiertes Licht durch einen nachgeschalteten Polarisator von der Messung ausgeschlossen wird. Auf diese Weise wird also nur der Hintergrund aus Resten organischer oder sonstiger Partikel gemessen und kann von der Messung ohne Magnetfeld subtrahiert werden. Dadurch wird die alleinige Absorption des Platins analysiert.<sup>278</sup>

**Tab. 4.15:** Parameter des Graphitofens im Verlauf einer Messung mit dem Spektrometer SpectrAA® Zeeman 220

Schritt	Phase	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Gasstrom [L/min]	Detektion
1	Trocknung	95	5,0	3	nein
2		110	60,0	3	nein
3		120	10,0	3	nein
4	Vorveraschung	650	15,0	3	nein
5		650	20,0	3	nein
6	Veraschung	1300	10,0	3	nein
7		1300	4,0	3	nein
8		1300	2,0	0	nein
9	Atomisierung	2700	0,7	0	ja
10		2700	2,0	0	ja
11	Reinigung	2700	2,0	3	nein

Für die Quantifizierung wurden zunächst ein Standard 50 (50 ng Platin/mL) und Qualitätskontrollen 10, 20 und 40 (10, 20 bzw. 40 ng Platin/mL) aus einer 10 µg/mL Cisplatinarbeitslösung hergestellt. Diese wurde bei jeder neuen Messung frisch aus einer genau quantifizierten 5 mmol/L Cisplatinstammlösung hergestellt. Der Autosampler erstellte nun automatisiert eine Kalibrierung durch Verdünnen des Standards 50 mit Salpetersäure Suprapur® 6,5 % im Bereich von 5–50 ng/mL. Als Blindwert diente die Salpetersäure (Cal zero). Nach der Erstellung der Kalibrierung und am Ende des Messdurchlaufs wurden alle drei Qualitätskontrollen quantifiziert. Die Proben wurden als Triplikate untersucht, wobei nach jedem Triplikat im Wechsel zufällig eine der drei Qualitätskontrollen folgte. Die

Gesamtmessung galt als erfolgreich, wenn die Abweichung von mindestens Dreivierteln der Qualitätskontrollen nicht größer als 15 % war.<sup>279</sup>

Die Proben der fertigen Liposomen wurden 1:3000 verdünnt, die der unbearbeiteten Liposomendispersion 1:500.000, die der Cisplatinstammlösung 1:50.000 und ein Probenvolumen von 150 µL eingesetzt. Bei nicht ausreichender Verdünnung war der Autosampler in der Lage, die Probe selbstständig weiter zu verdünnen. Ein Messdurchlauf bestand aus maximal vier Einzelmessungen, aber mindestens zwei, sofern die Präzision unter 5 % lag. Für jedes der Probenreplikate wurde ein Messdurchlauf durchgeführt und der Mittelwert  $\pm$  SD als Konzentration der Probe angenommen.

#### **4.3.6 Bestimmung der Einschlussrate**

Die Bestimmung der Einschlussrate von Cisplatin erfolgte durch Entnahme einer Probe aus der unbearbeiteten Liposomendispersion nach der Rehydratation des Lipidfilms mit übersättigter Cisplatinlösung und Entnahme einer weiteren Probe aus den fertigen Liposomen nach Größenausschlusschromatographie. Diese Proben wurden mithilfe der Atomabsorptionsspektroskopie (Abschnitt 4.3.5) analysiert und der Gehalt der ersten Probe als 100 % angenommen.

Für jede liposomale Formulierung wurde die Einschlussrate in drei Versuchen mit jeweils Probenreplikaten bestimmt.

### **4.4 Zellkultur**

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter einer Laminar-Air-Flow- oder Zytostatika-Werkbank unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen aller Art zu vermeiden. Jegliches Material, das mit den Zellen direkt in Berührung kam, wurde nur einmal verwendet, damit kein Austausch von genetischen Informationen zwischen den verschiedenen Zelllinien oder Kontaminationen möglich waren.

Außerdem wurden alle Zellen spätestens nach Passage zehn verworfen, um sich nicht genetisch vom Masterstock zu entfernen. Für die A2780- und A2780cis-Zellen wurde die Identität des Masterstocks am 20.04.2015 durch die DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bestätigt.

#### 4.4.1 Inkulturnahme

Zur Reaktivierung der eingefrorenen *backups* wurde Medium auf 37°C erwärmt und 1 mL schrittweise in das Kryovial gegeben, sodass der Inhalt auftaute. Die Suspension wurde dann in eine T25-Zellkulturschale mit vorgelegten 4 mL Medium überführt. Die Schalen wurden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Dabei adhären die Zellen am Schalenboden und bilden bei genügender Oberfläche einen Monolayer.

Um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten, wurde das Nährmedium alle zwei bis drei Tage ausgetauscht. Der im Medium enthaltene Farbindikator Phenolrot, der durch eine Ansäuerung des Mediums aufgrund von Stoffwechselprodukten der Zellen langsam von roter zu gelber Farbe umschlägt, bot dabei einen Richtwert für den geeigneten Zeitpunkt.

Der Mediumwechsel wurde durchgeführt, indem das vorhandene Medium abgesaugt und durch 5 mL (T25), 15 mL (T75) oder 30 mL (T175) neues ersetzt wurde. Damit einhergehend wurde das Wachstum der Zellen visuell mithilfe eines inversen Mikroskops kontrolliert.

#### 4.4.2 Testung auf Mykoplasmen

Um eine Kontamination mit Mykoplasmen zu vermeiden, wurden die Zellen jedes Mal vor dem Einfrieren und halbjährlich im regulären Zellkulturbetrieb getestet. Außerdem wurden die mykoplasmenfreien Aliquots des *working stocks* maximal zehnmal passagiert, bevor sie verworfen wurden.

Für die Testung wurden die Zellen mit DAPI angefärbt. Dazu wurde die zu testende Zellsuspension eine Woche in antibiotikafreiem Medium (ohne Penicillin/Streptomycin) kultiviert und dann eine Million Zellen/Well in eine 6 Well-Platte mit einem am Boden des Wells befindlichen runden Deckglas überführt. Nach dem Anwachsen der Zellen über Nacht wurde zweimal mit DPBS gewaschen und 5 min mit 300 µL 300 nmol/L DAPI-Lösung, die aus der Arbeitslösung hergestellt wurde, bei RT inkubiert. Es wurde erneut zweimal mit DPBS gewaschen, alle Flüssigkeitsrückstände möglichst vollständig abgesaugt und das Deckglas ca. 30 min zur Trocknung mit der Zellseite nach oben auf ein Papiertuch gelegt. Abschließend wurden zwei Tropfen *mounting*-Medium auf einen Objektträger gegeben und das Deckglas mit der Zellseite nach unten auf den Tropfen aufgelegt. Am nächsten Tag wurde der Rand des Deckglases mit farblosem Nagellack auf dem Objektträger fixiert.

Die Betrachtung erfolgte am konfokalen *laser scanning*-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und der Aufnahme des Emissionsspektrums bei 450 nm

mit einer Bandbreite von 50 nm ( $\pm$  25 nm). Da DAPI an doppelsträngige DNA der Zellen, aber auch der Mykoplasmen bindet, die man morphologisch anhand ihrer geringeren Größe leicht von den DAPI-gefärbten Zellen unterscheiden kann, konnte bei Abwesenheit kleinerer angefärbter Punkte und Agglomerate von einem kontaminationsfreien Zustand der Zellen ausgegangen werden.

### 4.4.3 Kultivierung

Ergab sich bei der visuellen Wachstumskontrolle eine über 80 %ige Konfluenz der Zellen oder wurden für einen Versuch größere Zellmengen benötigt, mussten die Zellen in reduzierter Menge in andere Kulturschalen überführt werden.

Zu diesem Zweck wurde zunächst das Medium abgesaugt und zur Entfernung angesammelter Stoffwechselprodukte mit 10 mL DPBS-Puffer gespült und erneut abgesaugt. Das Ablösen der adhären Zellen erfolgte mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,5, 1 o. 2 mL, je nach Größe der Zellkulturschale), das im Inkubator 2 min auf den Zellen verblieb. Nach einer mikroskopischen Kontrolle des Ablösevorgangs wurde das Trypsin mit 9 mL Medium inaktiviert. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension bewirkte ein zusätzliches mechanisches Ablösen. Die in ein 50 mL Röhrchen überführte Suspension wurde 4 min bei 1680 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 10 mL frischem Medium resuspendiert. Bei Versuchen, die für standardisierte Bedingungen eine bestimmte Zellzahl erfordern, wurden an dieser Stelle 20  $\mu$ L zur Zellzählung entnommen. Zur Weiterkultivierung wurde ein Drittel bis ein Sechstel der Zellen (je nach Versuch und Größe der Zellkulturschale) in eine neue Schale mit vorgelegtem Medium gegeben und durch Schwenken in der Kulturschale gleichmäßig verteilt.

Der Resistenzgrad der cisplatinresistenten Zellen wurde regelmäßig mit dem MTT-*assay* (Kapitel 4.8) überprüft.

### 4.4.4 Zellzahlbestimmung

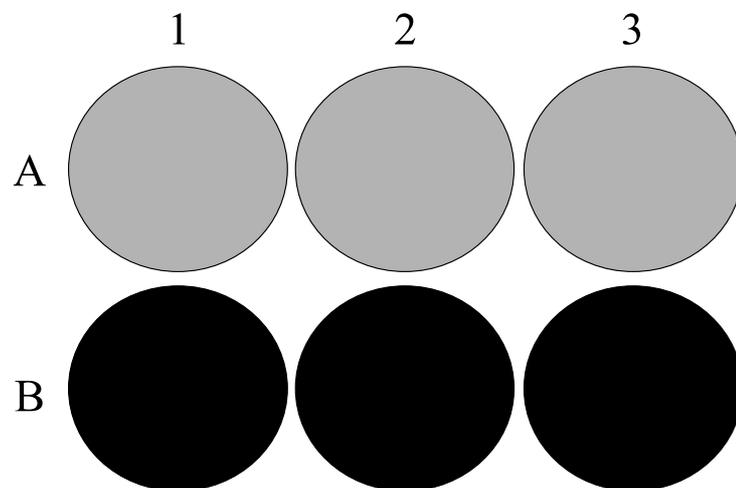
Die Zellzahlbestimmung wurde mittels CASY<sup>®</sup> 1 Model TT<sup>280</sup> (*Cell Counter & Analyser System*) durchgeführt und basiert auf dem Prinzip des *electrical current exclusion* (ECE). Hierbei fließt Elektrolytflüssigkeit mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare, an deren Enden Platinelektroden angelegt sind. Der induzierte Stromfluss sowie der Widerstand sind in diesem Zustand gleich. Tritt nun eine lebende Zelle in die Kapillare ein, wirkt sie durch ihre intakte Zellmembran als Isolator, indem sie im Moment ihres Durchflusses den

Querschnitt der Kapillare senkt und der Widerstand sich erhöht. Die Änderung des Widerstandes verhält sich proportional zur Größe bzw. zum Volumen der Zelle. Die Aufreihung der einzelnen Zellen durch die Kapillare ermöglicht es, die Größenverteilung in der gemessenen Zellsuspension als Diagramm wiederzugeben. Die Anzahl der einzelnen Ereignisse sind Maß für die Zellzahl, die als Konzentrationsangabe ausgegeben wird [*counts*/mL  $\approx$  Zellen/mL].

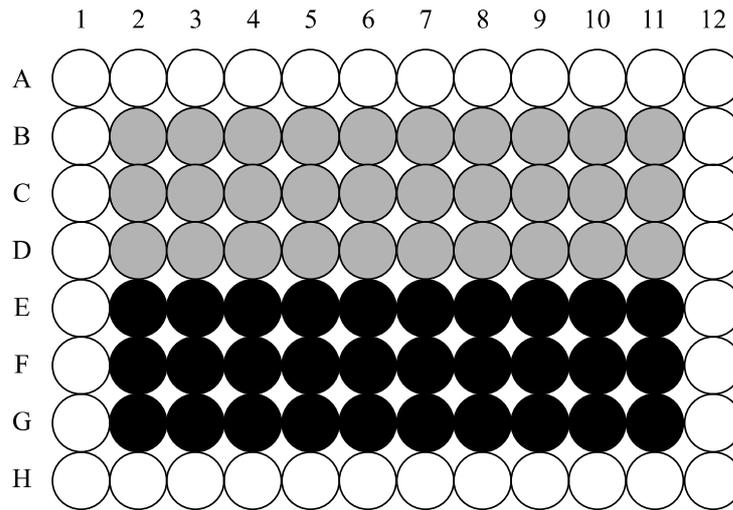
Für die Messung wurden 20  $\mu$ L aus den nach Ablösen resuspendierten Zellen entnommen, in mit 10 mL sterilfiltriertem CASY<sup>®</sup>*ton* befüllte CASY<sup>®</sup>*cups* überführt und in zwei Messzyklen durch eine 150  $\mu$ m Kapillare bestimmt.

#### 4.4.5 Aussäen der Zellen

Das Aussäen einer definierten Zellzahl in einem bestimmten Volumen wurde durch Verdünnung einer am CASY<sup>®</sup> bestimmten Zellsuspension mit Medium erreicht. Die entsprechende Zellzahl wurde dann je nach Bedarf in Zellkulturplatten überführt (Abb. 4.3; Abb. 4.4).



**Abb. 4.3:** Schematische Darstellung des Pipettierschemas einer 6 Well-Platte für Cisplatin-*uptake*-Untersuchungen mit A2780- (grau) und A2780cis-Zellen (schwarz); 1 Mio. Zellen/1,0 mL



**Abb. 4.4:** Schematische Darstellung des Pipettierschemas einer 96 Well-Platte für den MTT-*assay* mit A2780- bzw. Caov-3-Zellen (grau), A2780cis- bzw. Caov-3cis-Zellen (schwarz) und Verdunstungsschutz DPBS (weiß); 20.000 und 40.000 Zellen/100  $\mu\text{L}$  Endvolumen

Für die Gewinnung von Lysaten der A2780- und A2780cis-Zellen zur Untersuchung der Proteinexpression mittels immunohistochemischer Methoden und zwecks RNA-Isolierung wurden 2,25 Millionen Zellen in T-75-Zellkulturflaschen ( $30.000/\text{cm}^2$ ) in 15 mL Gesamtvolumen Vollmedium ausgesät.

Falls eine Vorinkubation mit Tinzaparin vorgesehen war, wurde 1 h nach dem Aussäen eine Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  im Medium eingestellt.

Dann wurde 18–24 h inkubiert (über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ), um den Zellen Zeit zur Adhäsion zu geben.

#### 4.4.6 Gewinnung von Proteinlysaten

##### 4.4.6.1 Lysate für die Gelelektrophorese

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Flaschenwand abgelöst und das nach Zentrifugation gewonnene Pellet in 5 mL kaltem DPBS resuspendiert. 20  $\mu\text{L}$  wurden zur Zellzählung entnommen und die übrigen Zellen in DPBS erneut pelletiert. Alle Pufferrückstände wurden vollständig entfernt, das Pellet in 500–1000  $\mu\text{L}$  (je nach Zellkulturflasche und Konfluenz) fertig zusammengesetztem Lysepuffer aufgenommen und nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in ein 1,5 mL Reagiergefäß überführt. Die Lyse erfolgte 30 min lang in einem Thermomixer bei  $4^\circ\text{C}$  und 800 U/min. Die membranären Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$

abgetrennt und der proteinhaltige Überstand in neue Reagiergefäße dekantiert. Die fertigen Lysate wurden zu 100  $\mu\text{L}$  aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  maximal zwei Monate lang gelagert.

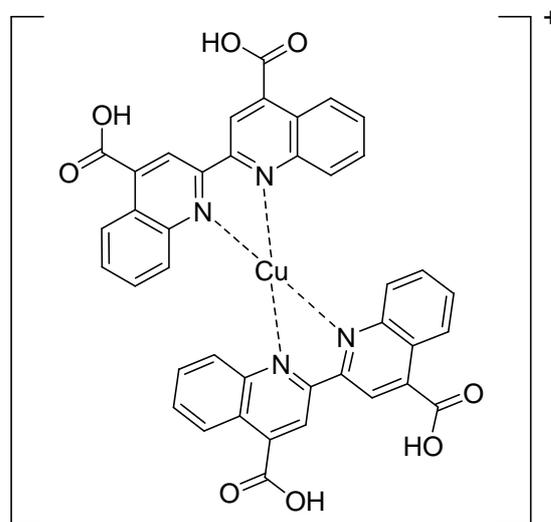
#### 4.4.6.2 Lysate für den Apoptose-array

Die Lysate zur Analyse mithilfe des *Proteome Profiler™ Human Apoptosis Array Kit* wurden nach dessen Anleitung unter dem Abschnitt „Cell Lysates“ hergestellt.<sup>281</sup> Dem *Lysis Buffer 17* aus dem Kit wurden 10  $\mu\text{g/mL}$  Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin zugesetzt, um eine Zersetzung der Proteine zu verhindern. Die gewonnenen Lysate wurden zu 100  $\mu\text{L}$  aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  maximal zwei Monate gelagert.

#### 4.4.7 Proteinbestimmung

Die Gesamtproteinmengen der Zelllysate wurden mittels des *BCA-assays*<sup>282</sup> quantifiziert.

Auch hier geht eine Biuret-Reaktion (Abschnitt 4.3.2) voran. Die Bicinchoninsäure bildet dann mit entstehendem, einwertigen Kupfer aus dem Biuret-Komplex einen weiteren violetten Farbkomplex (Abb. 4.5).

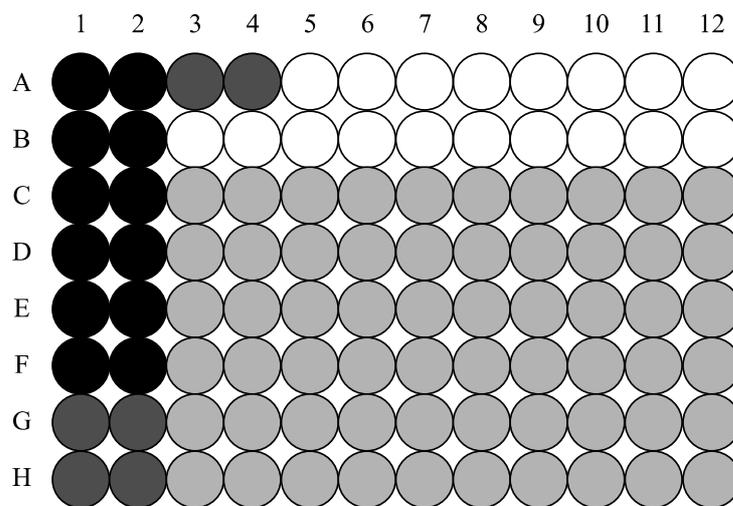


**Abb. 4.5:** Struktur des violetten BCA-Komplexes; aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde das Protolyseverhalten außer Acht gelassen. Im verwendeten basischen Puffer befinden sich die Carbonsäuren im deprotonierten Zustand.

Die Zelllysate wurden 1:20, 1:50 und 1:100 verdünnt, um Messwerte im linearen Kalibrierbereich zu erhalten.

Die Bestimmung wurde mithilfe des *BCA-Protein-assay kits* durchgeführt. Die einzelnen Konzentrationen der Kalibrierung zwischen 50  $\mu\text{g/mL}$  und 400  $\mu\text{g/mL}$  und

Qualitätskontrollen von 150 µg/mL, 250 µg/mL und 350 µg/mL, sowie die Proben wurden in 0,5 mL Reagiergefäße pipettiert. Pro Proteinplatte wurden zwei Kalibrierungen und jeweils Duplikate der Qualitätskontrollen und Proben mit einem Volumen von 40 µL angelegt. Zum Aufschluss wurde mit 40 µL Natronlauge (1 mol/L) versetzt. Nach 30 min Inkubationszeit bei RT und Durchmischung wurde mit dem gleichen Volumen an Salzsäure (1 mol/L) neutralisiert und erneut gemischt. Die so vorbereiteten Proben, Kalibrierungskonzentrationen und Qualitätskontrollen wurden dann zu 20 µL auf 96 Well-Platten überführt (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6:** Pipettierschema des BCA-assays mit Kalibrierung (schwarz), Qualitätskontrollen (dunkelgrau) und Proben (grau); Endvol.: 220 µL/Well

In jedes Well wurde 200 µL frisch hergestellte BCA-Lösung gegeben und 60 min bei 60°C im Trockenschrank inkubiert. Nach dem Abkühlen erfolgte die Messung gegen die Kalibrierung bei 570 nm im Mikroplattenphotometer.

#### 4.4.8 Lagerung

Zur längeren Lagerung wurden die Zellpellets, die bei der Weiterkultivierung erhalten wurden, in Kryomedium aus neun Teilen FKS und einem Teil DMSO als Kryoprotektor resuspendiert und zu 1,0 mL aliquotiert. Ein zufällig ausgewähltes Aliquot wurde direkt auf Mykoplasmen getestet (Abschnitt 4.4.2) und die übrigen zunächst in einem Hochleistungsgefrierschrank aufbewahrt. Durch schnelles Einfrieren bei -80°C werden alle zellulären Prozesse gestoppt, es kommt durch das DMSO nur zur Ausbildung sehr kleiner

Eiskristalle, die die Membran und Organellen nicht zerstören. Nach einer Woche wurde die endgültige Lagerung in der Gasphase eines Stickstofftanks bei  $-196^{\circ}\text{C}$  vorgenommen.

## 4.5 Cisplatin-uptake

### 4.5.1 Inkubation der Zellen

Zur Quantifizierung des von den Ovarialkarzinomzellen aufgenommenen Cisplatins, speziell bezüglich der Auswirkung einer gleichzeitigen und vorherigen Tinzaparinbehandlung, wurde sowohl die A2780- als auch die A2780cis-Zelllinie Inkubationsversuchen unterzogen.<sup>283</sup>

Es wurden Zellen in 21 sterile 6 Well-Platten wie in Abb. 4.3 dargestellt in 0,9 mL Medium ausgesät. Für die alleinige Cisplatin- und gleichzeitige Tinzaparininkubation wurden weitere 100  $\mu\text{L}$  Medium ergänzt, für eine Tinzaparinvorinkubation 100  $\mu\text{L}$  einer 0,5 mg/mL Tinzaparinarbeitslösung und über Nacht inkubiert. Sämtliche Flüssigkeit wurde vor dem Beimpfen mit Cisplatin abgesaugt. Die einzelnen Wells wurden so beimpft, dass in 1 mL Medium, bzw. Medium mit 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tinzaparin bei den gleichzeitig inkubierten Zellen, eine Cisplatinkonzentration von 20  $\mu\text{mol}/\text{L}$  vorlag. Bei der Untersuchung der Cisplatinliposomen wurde ebenfalls 20  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Cisplatin in 1 mL dosiert. Für den 24 h-Wert wurde jeweils das Volumen bei Beibehaltung der Konzentrationen auf 2 mL erhöht, um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen über diesen Zeitraum zu gewährleisten.

Nach den entsprechenden Inkubationszeiten zwischen 30 min und 24 h wurde die Cisplatin Aufnahme unterbrochen, indem das Medium abgesaugt wurde. Anschließend wurde mit 1 mL DPBS-Puffer gewaschen, dieser entfernt und die Zellen mit 200  $\mu\text{L}$  Trypsin/EDTA 2 min im Inkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  abgelöst. Die Trypsinisierung wurde mit 1 mL Medium abgestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Plattenboden gelöst. Nach der Überführung in 2 mL Reagiergefäße wurde die Suspension mit 1580 g 1 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Aus den mit 1 mL DPBS-Puffer resuspendierten Zellen wurden 20  $\mu\text{L}$  als Proteinprobe entnommen (Abschnitt 4.5.3) und in ein 0,5 mL Reagiergefäß pipettiert. Die verbleibende Suspension wurde mit 18620 g 1 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.5.2 Quantitative Platinbestimmung

Zu jedem tiefgekühlten Zellpellet wurden 50  $\mu\text{L}$  Salpetersäure Suprapur<sup>®</sup> 65 % gegeben und diese bei 80°C im Wasserbad 1 h lysiert. Es wurde nach der gleichen Methode wie bei der Quantifizierung einer Liposomendispersion gearbeitet (Abschnitt 4.3.5). Die *uptake*-Proben wurden je nach Inkubationsdauer im Bereich von 1:2 bis 1:25 verdünnt und hatten ein Probenvolumen von 100 bis 200  $\mu\text{L}$ .

### 4.5.3 Proteinbestimmung

Zur Lyse wurden die *uptake*-Proben (Abschnitt 4.5.1) mit 10  $\mu\text{L}$  Natronlauge (1 mol/L) versetzt. Nach Durchmischung und 30 min Inkubationszeit bei RT wurde mit dem gleichen Volumen an Salzsäure (1 mol/L) neutralisiert. Es wurden zusätzlich 10  $\mu\text{L}$  Aqua millipore hinzugefügt und erneut gemischt, um sich bei der Messung im Kalibrierbereich zu bewegen. Die so vorbereiteten Proben wurden zu 20  $\mu\text{L}$  auf 96 Well-Platten überführt und wie bei der Proteinbestimmung von Zelllysaten verfahren (Abschnitt 4.4.7).

### 4.5.4 Auswertung und Statistik

Die spektroskopisch ermittelte, aufgenommene Cisplatinmenge [ng] wurde auf die im *BCA-assay* ermittelte Proteinmenge [ $\mu\text{g}$ ] bezogen, um verschieden starkes Grundwachstum der Zellen zu relativieren.

Es wurden drei Inkubationsversuche in Triplikaten durchgeführt und die Platinmenge der Proben bestimmt. Die dabei entnommenen Proteinproben wurden ebenfalls jeweils als drei unabhängige Proben untersucht. Bei den dargestellten Graphen handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Stabw. aller Versuche.

## 4.6 Effluxuntersuchungen zur *multi drug resistance*

Zur Untersuchung des Einflusses auf an *multi drug resistance* beteiligte Transporter wurden Verdünnungsreihen des NMH Tinzaparin und Pentasaccharids Fondaparinux an die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wiese übergeben.

### 4.6.1 Probenvorbereitung

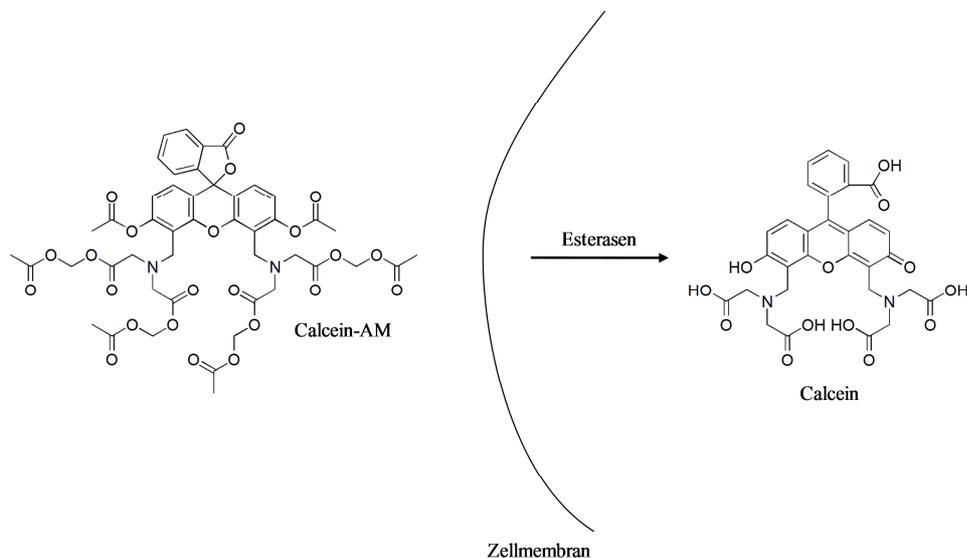
Es wurden zur Aufbewahrung der Verdünnungsreihen von Tinzaparin und Fondaparinux 1,5 mL Schraubdeckelgefäße autoklaviert und alle Arbeitsschritte unter einer sterilen

Werkbank durchgeführt. Die beiden Verdünnungsreihen wurden ausgehend von den sterilen Fertigarzneimitteln innohep<sup>®</sup> (Tinzaparin) und Arixtra<sup>®</sup> (Fondaparinux) hergestellt. Für Tinzaparin wurden Konzentrationen zwischen  $7,7 \times 10^{-4}$  mol/L und  $2,4 \times 10^{-9}$  mol/L und für Fondaparinux zwischen  $2,9 \times 10^{-3}$  mol/L und  $9,2 \times 10^{-9}$  mol/L hergestellt und zur weiteren Untersuchung Frau Martina Lebbing-Neuber aus dem Arbeitskreis Prof. Wiese übergeben.

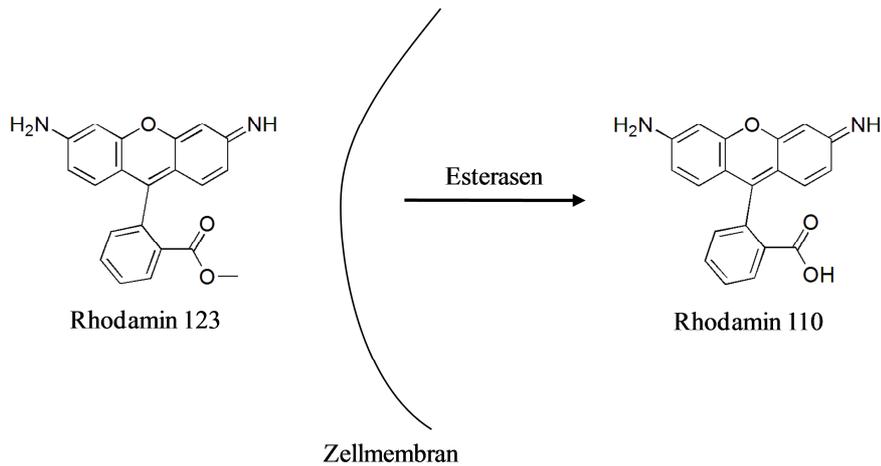
#### 4.6.2 Durchführung der *assays* zur *multi drug resistance*

Alle *assays* wurden von Frau Martina Lebbing-Neuber in den Labors der AG Prof. Wiese durchgeführt. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt:

Sowohl bei Calcein-AM als auch bei Rhodamin 123 macht man sich die Membrangängigkeit der Substanzen zunutze, welche durch intrazelluläre Metabolisierung, hauptsächlich durch Esterasen, verloren geht. Dabei bleibt jedoch ihr Substratcharakter gegenüber ABC-Transportern, die an der *multi drug resistance* beteiligt sind, wie P-GP und verschiedenen Transportern der MRP-Familie erhalten.<sup>284,285</sup>



**Abb. 4.7:** Intrazelluläre Metabolisierung des Calcein-AM durch Esterasen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde das Protolyseverhalten außer Acht gelassen. Im intrazellulären pH-Bereich befinden sich die Carbonsäuren im deprotonierten Zustand.



**Abb. 4.8:** Intrazelluläre Metabolisierung des Rhodamin 123 durch Esterasen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde das Protolyseverhalten außer Acht gelassen. Im intrazellulären pH-Bereich befindet sich die Carbonsäure im deprotonierten Zustand

Eine potentiell funktionelle Beeinflussung der Transporter durch Tinzaparin und Fondaparinux wurde zusätzlich an der doxorubicinresistenten Zelllinie A2780adr untersucht, da bei dieser ein direkter Zusammenhang zwischen Resistenz und den beteiligten ABC-Transportern<sup>286</sup> bekannt ist.

#### 4.6.2.1 Bestimmung am Multiwellreader

Zur fluorimetrischen Bestimmung am Multiwellreader wurden 27.000 Zellen pro Well in KHP-Puffer bzw. Medium mit den Verdünnungsreihen der Testsubstanzen beimpft (Endkonzentrationen: Tinzaparin:  $7,7 \times 10^{-5}$  mol/L bis  $2,4 \times 10^{-10}$  mol/L; Fondaparinux:  $2,9 \times 10^{-4}$  mol/L bis  $9,2 \times 10^{-10}$  mol/L). Zum Vergleich wurden ebenfalls die P-GP-Inhibitoren X24 (Endkonzentrationen:  $10^{-3}$  mol/L bis  $10^{-10}$  mol/L) und Verapamil (Endkonzentrationen:  $10^{-3}$  mol/L bis  $10^{-9}$  mol/L) untersucht, sowie jede Multiwellplatte mit einer Kontrolle mit lediglich KHP-Puffer bzw. Medium versehen. Das Endvolumen betrug 200  $\mu$ L. Es wurde für eine KHP-Zellsuspension 1 h und für eine Medium-Zellsuspension 3 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde Calcein-AM zu einer Endkonzentration von 0,3  $\mu$ mol/L ergänzt und die Platten direkt am Multiwellreader ( $\lambda_{\text{ext.}} = 485$  nm,  $\lambda_{\text{em.}} = 520$  nm) über 40 min kontinuierlich gemessen.

#### 4.6.2.2 Bestimmung am Durchflusszytometer

Bei der durchflusszytometrischen Bestimmung wurden die Verdünnungsreihen vorgelegt und 100.000 Zellen/Well eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 100  $\mu$ L/Well. Nach halbstündiger Inkubation (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurde zu 0,3  $\mu$ mol/L mit Rhodamin 123 oder

Calcein-AM beimpft, 120 min erneut inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer die Fluoreszenz bestimmt ( $\lambda_{\text{ext.}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 530 \text{ nm}$ ).

### 4.6.3 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Rohdaten wurde ebenfalls von Frau Martina Lebbing-Neuber der AG Prof. Dr. Wiese durchgeführt. Der Versuchsaufbau war in Triplikaten angelegt. Jeder Versuch wurde mindestens  $n = 3$  bis  $n = 5$  durchgeführt.

Die Rohdaten wurden als FSC-SSC-*dotplot* der Beziehung Zellgröße zu Oberflächenbeschaffenheit abgebildet, um tote Zellen und Zellagglomerate aus der Betrachtung auszuschließen. Zur weiteren Auswertung der Fluoreszenz wurde dann lediglich die gesunde Hauptpopulation betrachtet.

## 4.7 Untersuchung der Expression von Proteinen

### 4.7.1 Inkubationsexperimente

Die Zellen wurden wie unter Abschnitt 4.4.5 beschrieben in T-75-Flaschen ausgesät. Sollte mit Tinzaparin vorinkubiert werden, wurde im Vollmedium eine TinzaparinKonzentration von  $50 \mu\text{g/mL}$  eingestellt (Tab. 4.16, Kultivierung).

Am nächsten Tag wurde das Medium ausgetauscht und mit der/den gewünschten Testsubstanz/-en beimpft (Tab. 4.16, Behandlung). Das Endvolumen der T-75-Zellkulturflasche von  $15 \text{ mL}$  wurde dabei beibehalten. Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit, hier  $72 \text{ h}$ , wurden die Zellen aufgearbeitet (Abschnitt 4.4.6) und deren Proteine bestimmt (Abschnitt 4.4.7).

**Tab. 4.16:** Behandlungsschemata der einzelnen Inkubationsansätze für das *western blotting*

Bezeichnung	Kultivierung	Behandlung (72 h)
unbehandelt	Vollmedium	keine
Tinza	$50 \mu\text{g/mL}$ Tinzaparin in Vollmedium	$50 \mu\text{g/mL}$ Tinzaparin in Vollmedium
cDDP	Vollmedium	$\text{EC}_{50}$ Cisplatin bzw. $2 \mu\text{mol/L}^*$

<b>Liposomales cDDP</b>	Vollmedium	EC <sub>50</sub> Cisplatinliposomen, 5 % mPEG-PE bzw. 2 µmol/L*
<b>cDDP + Tinza</b>	50 µg/mL Tinzaparin in Vollmedium	EC <sub>50</sub> Cisplatin bzw. 2 µmol/L* 50 µg/mL Tinzaparin
<b>cDDP + Tinza (gl.)</b>	Vollmedium	EC <sub>50</sub> Cisplatin bzw. 2 µmol/L* 50 µg/mL Tinzaparin

\*Bei der Untersuchung von Influx- bzw. Effluxtransportern wurde eine Cisplatinkonzentration von 2 µmol/L gewählt (liposomal und freier Wirkstoff); bei der Untersuchung apoptoserelevanter Proteine wurde jeweils eine Passage zuvor mittels MTT-*assay* die individuelle EC<sub>50</sub> bestimmt und mit dieser beimpft.

#### 4.7.2 Elektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde ein Volumen der wie unter Abschnitt 4.4.6.1 beschrieben hergestellten Lysate, welches einer Gesamtproteinmenge von 50 µg entspricht, mit dem gleichen Volumenteil Laemmli-Probenpuffer (2x Konzentrat) versetzt, gemischt und für 30 min bei RT inkubiert.

Die Fertiggele mit 10 % Acrylamid wurden in die Halterungen eingespannt und die *blotting*-Kammer und die durch zwei Fertiggele gebildeten Innenräume der Halterungen wurden mit Elektrodenpuffer gefüllt. Um Gelagglomerate am Rand der Taschen zu entfernen und ein gleichmäßiges Befüllen zu gewährleisten, wurde jede Tasche mit einem *Geltip* und Elektrodenpuffer durchgespült. Anschließend wurden die Taschen mit den in Laemmli-Puffer verdünnten Proben in die Taschen eingebracht, wobei ein Gesamtvolumen von 50 µL möglich war. Die beiden äußeren Taschen wurden aufgrund ihrer teilweise schlechteren Laufeigenschaften nur mit Laemmli-Puffer befüllt und zwei der acht verbleibenden mit 2,5 µL Proteinstandard, der zehn aufgereinigte rekombinante Proteine zwischen zehn und 250 kDa enthält. So konnten pro Gel jeweils sechs Proben unter optimalen Laufbedingungen untersucht werden.

Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 200 V für 45 min durchgeführt.

Die Auftrennung erfolgte nach der Größe der Proteine, da im Puffer enthaltenes, negativ geladenes Natriumdodecylsulfat sich anlagert und somit eine Proportionalität zwischen (negativer) Ladung und Molekülgröße herstellt. Die Eigenladung der verschiedenen Proteine tritt somit in ihren Auswirkungen auf die Wanderung im elektrischen Feld in den Hintergrund.

### 4.7.3 *Western blotting*

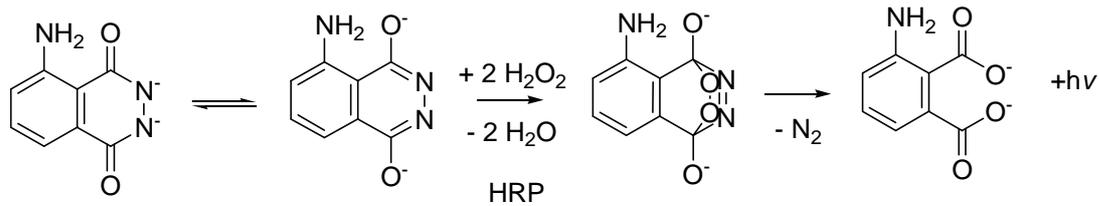
Nach der Elektrophorese wurden die Fertiggele aus ihrem Plastikrahmen entfernt und 5 min in Transferpuffer equilibriert. Die Elektrophoresekammer wurde gereinigt und zur *blotting*-Kammer umgebaut und mit Transferpuffer zur Hälfte befüllt. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden auf PVDF-Membranen übertragen, die zuvor 20 s in Methanol aktiviert wurden und anschließend mit dem Gel sowie beidseitig jeweils einem *blotting paper* und *fiber pad* in die *blotting*-Halterungen der Kammer eingeklemmt wurden. Nach dem vollständigen Befüllen der Kammer fand die Übertragung der Proteine unter Kühlung (Kühlakku aus dem  $-20^{\circ}\text{C}$  Gefrierschrank) sowie Rühren bei einer konstanten Spannung von 100 V für 60 min statt. Dabei wurde eine maximale Stromstärke von 350 mA nie überschritten.

### 4.7.4 *Visualisierung der Proteine*

Die Membranen mit den übertragenen Proteinen wurden in Entwicklerschalen überführt, in denen sie für eine 1 h bei RT in 50 mL *blocking*-Lösung geschüttelt wurden, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen. Anschließend wurde dreimal 10 min mit 20 mL TBS-T-Puffer gespült, um noch gebundenes Natriumdodecylsulfat sowie überschüssiges Milchprotein aus der *blocking*-Lösung abzuwaschen. Die Inkubation mit 10 mL Lösung des primären Antikörpers (Abschnitt 4.1.2.2) erfolgte 1 h bei RT und wurde im Kühlschrank über Nacht fortgesetzt.

Am nächsten Tag wurde dreimal 10 min mit TBS-T-Puffer gespült und 1,5 h bei RT mit der Lösung des sekundären Antikörpers (Abschnitt 4.1.2.2) inkubiert. Diese wurde ebenfalls durch zweimaliges Spülen mit TBS-T-Puffer (10 min) entfernt und die Membran in TBS-T-Puffer bis zur Detektion belassen.

Die Visualisierung des Zielproteins erfolgte im ChemiDoc™ XRS+ System. Hierbei wird die bei der Luminolreaktion freigesetzte Chemilumineszenz detektiert. Rettichperoxidase (HRP) katalysiert zunächst die Oxidation des Luminols durch Peroxid zu einem intermediär auftretenden Epoxid, welches unter Stickstofffreisetzung zum Dicarboxylatanion gespalten wird. Der vorliegende angeregte Triplettzustand ( $T_1$ ) im Orbital eines Sauerstoffs geht dabei zunächst strahlungslos in einen angeregten Singulettzustand ( $S_1$ ) über, welcher dann durch Freisetzung von Licht (428 nm) in den Singulettgrundzustand zurückfällt (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9:** Ablauf der von Rettichperoxidase katalysierten Luminolreaktion; Luminol wird oxidiert und reagiert darauf unter der Freisetzung von Stickstoff zum Dicarboxylatanion. Die auftretende Lumineszenz kann optisch detektiert werden.

Vor dem Start der optischen Detektion wurde die Oberfläche der Membran mit 2 mL einer Luminol-Peroxidlösung (Abschnitt 4.1.2.4) vollständig bedeckt. Die auftretende Chemilumineszenz wurde über 15 min verfolgt, in denen jede Minute eine Aufnahme der detektierten Photonen ausgegeben wurde. Stellten sich der Zeitraum oder das Intervall der Einzelbilder als zu lang dar, wurden beide verkürzt bis maximal zu einer Aufnahme über 1 min mit einem Bild alle 10 s.

#### 4.7.5 Auswertung und Statistik

Um halbquantitative Aussagen über die Expression der untersuchten Proteine zu treffen, bedurfte es eines Standards (*housekeeping protein*). Zu diesem Zweck wurde zu jedem Gel ein Duplikat erstellt und in derselben Kammer unter exakt gleichen Bedingungen aufgetrennt, *geblottet* und entwickelt. Für das aufgetrennte und übertragene identische Proteinlysate wurde ein primärer Antikörper gegen ubiquitär exprimiertes  $\beta$ -Aktin verwendet. So konnte eine gleiche Proteinmenge pro Probe zusätzlich zur vorangegangenen Proteinbestimmung gewährleistet werden.

Die einzelnen Versuche wurden für jedes Zielprotein in oben beschriebenen Duplikaten mindestens als  $n = 2$  durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Auswirkung verschiedener Behandlungsmethoden auf die Proteinexpression zu gewährleisten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im Ergebnisteil dieser Arbeit lediglich eine repräsentative Visualisierung dargestellt. Die Einzelexperimente wurden zudem durch Bestimmung der Pixeldichte im Vergleich zur jeweiligen  $\beta$ -Aktinexpression der Probe zusammengefasst.

## 4.8 Zytotoxizität

### 4.8.1 Inkubationsexperimente

Es wurden jeweils 20.000 und 40.000 Zellen in 96 Well-Platten wie in Abb. 4.4 skizziert ausgesät. Das Endvolumen der Zellsuspension betrug dabei, wenn eine Vorinkubation mit Caspaseinhibitoren durchgeführt wurde, 80  $\mu\text{L}$  bzw. bei der Behandlung nur mit einer Verdünnungsreihe oder Tinzaparinvorinkubation 90  $\mu\text{L}$ . Die Vorinkubation mit Tinzaparin (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) wurde mindestens 1 h nach dem Aussäen mit 10  $\mu\text{L}$  einer 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Arbeitslösung durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden die MTT-Platten pro vertikaler Reihe von links nach rechts mit 10  $\mu\text{L}$  ansteigender Konzentrationen Cisplatin bzw. zu testender Substanz beimpft (Endvolumen: 100  $\mu\text{L}$ ). Die erste Reihe von links stellte dabei die Wachstumskontrolle mit 10  $\mu\text{L}$  DPBS bzw. Natriumchloridlösung 0,9 % für freien Wirkstoff dar. Für freies Cisplatin wurde ein Konzentrationsbereich zwischen  $10^{-7,5}$  mol/L und  $10^{-3,5}$  mol/L betrachtet. Bei der liposomalen Formulierung variierte der Konzentrationsbereich je nach Einschussrate der Liposomen zwischen ca.  $10^{-8,5}$  mol/L und  $10^{-4,0}$  mol/L, wobei die höchste Konzentration die unverdünnte Liposomendispersion darstellte. Das IMP Lipoplatin™ wurde zwischen  $10^{-7,0}$  mol/L und  $10^{-3,0}$  mol/L untersucht, die Toxizität von Tinzaparin wurde zwischen  $10^{-8,0}$  mol/L und  $10^{-4,0}$  mol/L und die von Kupfersulfat zwischen  $10^{-5}$  mol/L und  $10^{-1}$  mol/L bestimmt (Tab. 4.17). Die so erhaltenen Probenreplikate für jede Cisplatinformulierung und jeweils 20.000 und 40.000 Zellen wurden für 72 h (bei Bedarf auch 24 h und 48 h) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in den Inkubator gegeben.

Tab. 4.17: Behandlungsschemata der einzelnen Inkubationsansätze für MTT-assays

Bezeichnung	Vorinkubation	Behandlung
Tinzaparintoxizität	keine	Tinzaparin-Verdünnungsreihe
Kupfersulfattoxizität	keine	Kupfersulfat-Verdünnungsreihe
cDDP	keine	Cisplatin-Verdünnungsreihe
Liposomales Cisplatin	keine	Liposomen*-Verdünnungsreihe

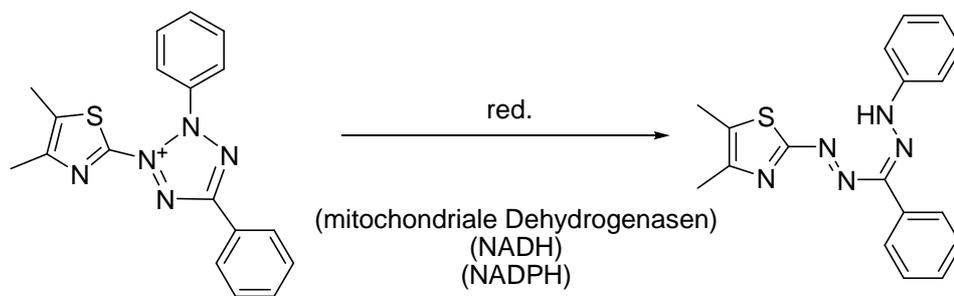
<b>Lipoplatin™</b>	keine	Lipoplatin™-Verdünnungsreihe
<b>cDDP + Tinza</b>	50 µg/mL Tinzaparin für 18 h	Cisplatin-Verdünnungsreihe
<b>cDDP + Caspaseinhibitor</b>	50 µmol/L Caspaseinhibitor** für 3 h	Cisplatin-Verdünnungsreihe
<b>Liposomales Cisplatin + Caspaseinhibitor</b>	50 µmol/L Caspaseinhibitor** für 3 h	Liposomen*-Verdünnungsreihe

\*Nach diesem Behandlungsschema wurden alle untersuchten Liposomen getestet (Tab. 4.11). \*\*Es wurden Inhibitoren von Caspase-3, -8 und -9 eingesetzt (Tab. 4.5)

## 4.8.2 MTT-assay

Die konzentrationsabhängige Zytotoxizität der untersuchten Substanzen wurde anhand des MTT-assay überprüft.

Bei diesem kolorimetrischen Analyseverfahren wird in Wasser und Medium gut lösliches 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem magentablauen Formazanpräzipitat umgesetzt<sup>287</sup> (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10:** Reduktion von MTT zum Formazan durch mitochondriale Redoxenzyme/-cofaktoren in lebenden Zellen

Neueren Erkenntnissen zufolge scheinen mitochondriale Dehydrogenasen wie die Succinatdehydrogenase nur einen Teil des MTT zu reduzieren. Eine größere Rolle als Reaktionspartner spielen wohl NADH und NADPH.<sup>288,289</sup> Durch Lösen der Formazankristalle in DMSO kann deren Konzentration photometrisch bestimmt werden, wobei sich die auftretende Absorption proportional zur Anzahl der intakten, lebenden Zellen verhält.

Praktisch wurden 1 h vor Ablauf der Inkubationszeit 20 µL MTT-Reagenz zu jedem Well pipettiert und die Inkubation fortgesetzt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Platten

ausgeschlagen und die Formazankristalle in 200  $\mu$ L DMSO gelöst. Die Platten wurden darauf im Mikroplattenphotometer (Multiskan<sup>®</sup> EX) geschüttelt und bei 570 nm gemessen. Die Hintergrundabsorption durch Medium- bzw. Serumrückstände wurde subtrahiert, indem die Platte zusätzlich bei 690 nm bestimmt wurde.

### 4.8.3 Auswertung und Statistik

Die Versuche wurden  $n = 3$  in Triplikaten durchgeführt. Lediglich die Versuche zur Caspaseinhibition wurden  $n = 2$  durchgeführt.

Zur graphischen Auswertung wurden die Absorptionswerte gegen den dekadischen Logarithmus der Cisplatinkonzentration aufgetragen und anschließend normalisiert, indem der höchste Absorptionswert als 100 % festgesetzt wurde. Die Kurvenanpassung erfolgte durch nichtlineare Regression als *dose response*-Kurve eines Inhibitors. Aus dem sigmoidalen Verlauf des Graphen wurde die  $EC_{50}$  bestimmt. Dieser beschreibt den Konzentrationswert auf der Abszisse, bei dem das mittlere Niveau zwischen der Wirkung bei der Dosierung 0 und der maximalen Wirkung erreicht ist. Es handelt sich demnach um diejenige Konzentration der eingesetzten Substanz, bei der 50 % der Zellen abgestorben sind. Bei den gezeigten MTT-Graphen handelt es sich somit um einen repräsentativen Versuch in Triplikaten aus  $n = 3$ .

Der Resistenzgrad ergibt sich aus dem Quotienten der  $EC_{50}$  von resistenten (A2780cis bzw. Caov-3cis) und ursprünglichen (A2780 bzw. Caov-3) Zellen und ist somit ein Maß dafür, um wieviel toleranter die resistenten Zellen gegenüber der Exposition mit einer Substanz sind als ihre im gleichen Versuch eingesetzten Ausgangszelllinien.

Da die eingesetzten Konzentrationen und die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien des Ovarialkarzinoms sehr klein sind, wurde zur statistischen Auswertung wie z.B. Bildung von Mittelwerten und Berechnung der Standardabweichung der  $pEC_{50}$ -Wert herangezogen, der sich als dekadischer Logarithmus der  $EC_{50}$  darstellt. Die gemittelten  $EC_{50}$  konnten so aus den statistisch betrachteten  $pEC_{50}$  zurückgewonnen werden.

## 4.9 Titrationskalorimetrische Bestimmungen

Eine mögliche Interaktion von Tinzaparin und Kupfer wurde mit isothermaler Titrationskalorimetrie bestimmt.

Zusammenfassend gesagt werden bei diesem Verfahren eine Referenz- und Messzelle im adiabatischen System so beheizt, dass in beiden Zellen eine konstante Temperatur vorherrscht. Empfindliche Temperaturlaufnehmer sind dabei mit der Heizquelle rückgekoppelt, sodass die Heizleistung stetig angepasst wird. Über eine Mikroliterspritze werden kontinuierlich kleine Volumina eines potentiellen Bindungspartners zu einer in der Messzelle vorgelegten Untersuchungslösung gegeben. Aufgrund von exothermen oder endothermen Bindungsereignissen kann so die Differenz der Heizleistung beim Aufrechterhalten einer konstanten Temperatur in beiden Zellen in  $\mu\text{cal/s}$  bestimmt werden.<sup>290</sup>

#### 4.9.1 Bindungsuntersuchungen von Tinzaparin an Kupfer

Die Proben wurden zunächst im Probenaufbereiter unter Rühren 8 min bei 24°C evakuiert. Die Referenzzelle wurde mit 1,8 mL Aqua millipore und die Messzelle mit 1,8 mL der entlüfteten 0,05 mmol/L Testlösung (Titrant) befüllt und luftdicht verschlossen. Die zweite Substanz (Titrator) wurde zu 1,5 mL als 30 mmol/L Lösung in den Vorratsbehälter der automatisch gesteuerten Mikroliterspritze gegeben und diese befüllt. Die Messparameter (Tab. 4.18) wurden am PC konfiguriert und die Experimente mit dem Titrationskalorimeter MicroCal VP-ITC automatisiert durchgeführt.

Tab. 4.18: Parameter einer Messung am Titrationskalorimeter

Parameter	Größe
Anzahl der Injektionen	50
Injektionsvolumen	5 $\mu\text{L}$
Injektionsdauer	12 s
Abstand zwischen Einzelmessungen	180 s
Dauer einer Einzelmessung	1 s
Zellentemperatur	25°C
Referenzleistung	8 $\mu\text{Cal/s}$
Initiale Verzögerung	120 s
Rührgeschwindigkeit	310/min

Zur Ermittlung einer Tinzaparin-Kupferbindung wurde Tinzaparin als Titrand in die Messzelle vorgelegt und Kupfersulfat-pentahydrat als Titrator aus der Mikroliterspritze in die Messzelle injiziert (Tab. 4.19).

**Tab. 4.19:** Versuchsbedingungen der isothermalen Titration

Messzelle [0,05 mmol/L]	Spritze [30 mmol/L]	Referenzzelle
Tinzaparin	Kupfersulfat-pentahydrat	Aqua millipore
Aqua millipore	Kupfersulfat-pentahydrat	Aqua millipore
Tinzaparin	Aqua millipore	Aqua millipore

#### 4.9.2 Auswertung und Statistik

Alle drei Kombinationen (Tab. 4.19) wurden dreimal unabhängig voneinander bestimmt, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Als Graph wird lediglich ein repräsentativer Durchlauf dargestellt.

Da für diese Arbeit, die Auswirkungen auf Chemoresistenz betreffend, nur eine qualitative Aussage entscheidend ist, ob eine Bindung von Tinzaparin und Kupfer prinzipiell stattfindet, wurde auf die Berechnung der Bindungsaffinität, -enthalpie und -stöchiometrie verzichtet.

#### 4.10 Proteinexpression apoptoseassoziiierter Proteine

Die Expression apoptoserelevanter Proteine wurde mit dem *Proteome Profiler™ Human Apoptosis Array Kit* nach Anweisungen des Herstellers bestimmt.<sup>281</sup> Hierbei wird ein Zelllysate auf eine Nitrozellulosemembran gegeben, auf der Antikörper gegen 35 verschiedene Apoptoseproteine immobilisiert sind. Die Detektion erfolgt durch Zugabe biotinylierter Antikörper, ebenfalls gegen die 35 Proteine, und Streptavidin-HRP, welches nach Zugabe der Detektionsreagenzien wie in Abschnitt 4.7.4 beschrieben kaltes Licht emittiert (Abb. 4.9).

### 4.10.1 Inkubationsexperimente

Die Inkubation der Zellen erfolgte wie die Inkubation für Proteinexpressionsanalysen mittels SDS-PAGE/*western blot* (Abschnitt 4.7.1). Dabei wurden folgende Behandlungen durchgeführt und mit dem Protein-*array* untersucht:

**Tab. 4.20:** Behandlungsschemata der einzelnen Inkubationsansätze für Protein-*arrays*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Behandlung (72 h)</b>
<b>unbehandelt</b>	keine
<b>cDDP</b>	EC <sub>50</sub> * Cisplatin
<b>Liposomales cDDP</b>	EC <sub>50</sub> * Cisplatinliposomen, 5 % mPEG-PE
<b>Leerliposomen</b>	EC <sub>50</sub> ** Liposomen, 5 % mPEG- PE, ohne Cisplatin
<b>Lipoplatin™</b>	EC <sub>50</sub> *Lipoplatin™

\*Es wurde jeweils eine Passage zuvor mittels MTT-*assay* die individuelle EC<sub>50</sub> bestimmt und mit dieser beimpft.\*\*Es wurden in einer Charge cisplatinhaltige und Leerliposomen hergestellt, deren theoretische Cisplatinkonzentration als die der cisplatinhaltigen festgesetzt und mit dieser beimpft wurde.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lysate wie in Abschnitt 4.4.6.2 beschrieben aufgearbeitet. Die Protein-*array*-Untersuchungen wurden nur mit der cisplatinresistenten Zelllinie A2780cis durchgeführt.

### 4.10.2 Durchführung des Protein-*arrays*

Die Bestimmung der Apoptoseproteine erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers wie unter dem Abschnitt „*Array Procedure*“ beschrieben.<sup>281</sup>

Dabei wurde die Membran zunächst durch Schütteln in 2,0 mL *Array Buffer 1* für 1 h aktiviert und die Schutzschicht von den Antikörpern entfernt. Die Zelllysate wurden mit *Lysis Buffer 17* auf eine Konzentration von 1,2 mg/mL verdünnt und 250 µL in 1,25 mL *Array Buffer 1* gegeben. Der Puffer wurde von den Membranen entfernt und mit den 1,5 mL

Lysatverdünnung über Nacht bei RT auf einem Laborschüttler inkubiert. Die Gesamtproteinmenge auf einer Membran betrug so 300 µg.

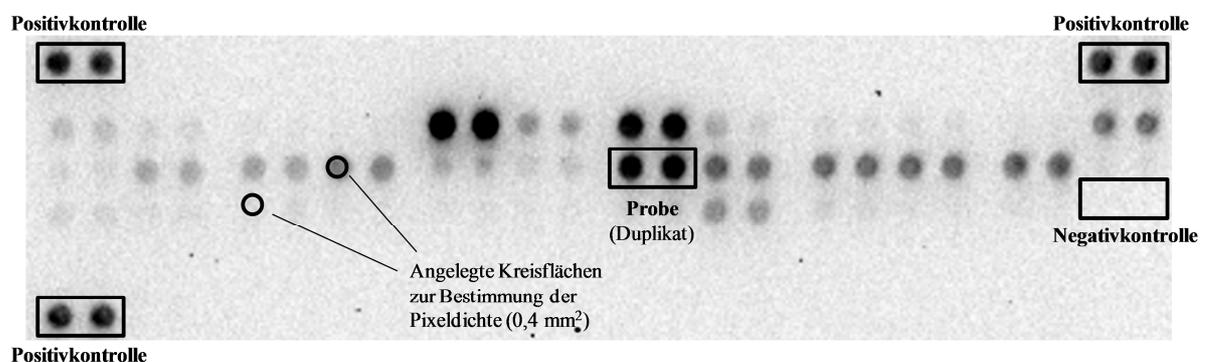
Am nächsten Tag wurde dreimal 10 min mit *Wash Buffer 1x* geschüttelt und 1 h mit 1,5 ml einer Verdünnung des Antikörpercocktails in *Array Buffer 2/3* inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen wurden 2,0 mL Streptavidin-HRP-Verdünnung zugegeben und 30 min geschüttelt. Diese wurde ebenfalls durch zweimaliges Spülen mit TBS-T-Puffer entfernt und die Membran in TBS-T-Puffer bis zur Detektion belassen.

Die Membranen wurden abweichend der Vorschrift nicht mit einem Röntgenfilm visualisiert, sondern wie die Membranen des *western blots* gemäß Abschnitt 4.7.4 mit dem ChemiDoc™ XRS+ System.

### 4.10.3 Auswertung und Statistik

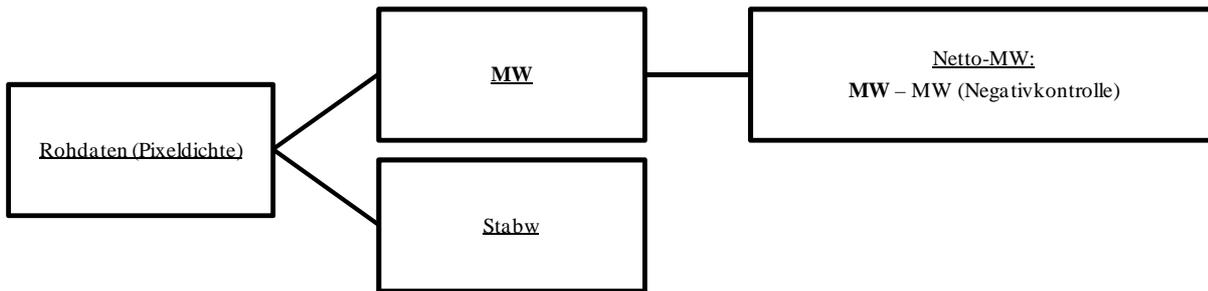
Die Pixeldichte der auf der Nitrozellulosemembran visualisierten *spots* wurde mit Image Lab® analysiert. Dabei wurde für alle Membranen eine Aufnahme bei derselben Visualisierungsdauer gewählt, bei der die maximale Pixeldichte von 65535 nicht überschritten wurde, um Linearität im Verhältnis zu den durch die Luminolreaktion frei werdenden Photonen, die sich wiederum proportional zur Proteinmenge verhalten, sicherzustellen. Die Messpunkte wurden zentrisch mit einer Fläche von 0,4 mm<sup>2</sup> erfasst, was der Fläche des kleinsten Punktes entsprach.

Auf einer Membran befinden sich drei Typen von Messpunkten, die Positivkontrolle (3x Duplikate), die Negativkontrolle (Duplikat) und die eigentlichen Probenmesspunkte der 35 Apoptoseproteine (Duplikate) (Abb. 4.11).



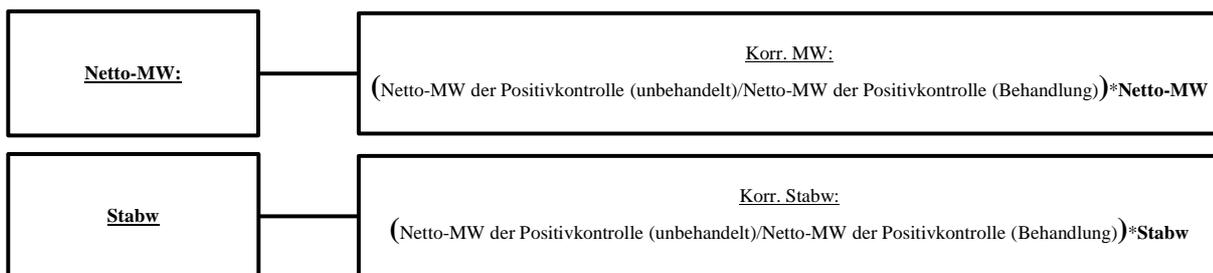
**Abb. 4.11:** Skizze der angelegten Kreisflächen zur Bestimmung der Pixeldichte und den drei unterschiedlichen Typen von Messpunkten auf einer Nitrozellulosemembran des Apoptose-arrays. Die Negativkontrolle dient zur Nivellierung des Hintergrundes der Membran und PBS-Puffers. Die Positivkontrolle dient zur Normalisierung der Probenwerte und dadurch dem Vergleich mit anderen Datensätzen.

Für den Datensatz der unbehandelten Zellen, der als Vergleich zur Bestimmung einer Über- bzw. Unterexpression diente, wurden zunächst Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stabw) der Duplikate gebildet. Für die Proben und Positivkontrollen wurde dann ein Netto-Mittelwert (Netto-MW) abzüglich der Negativkontrolle bestimmt (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12:** Ermittlung des Netto-Mittelwertes der Positivkontrollen und Probandaten aus dem Mittelwert der Rohdaten

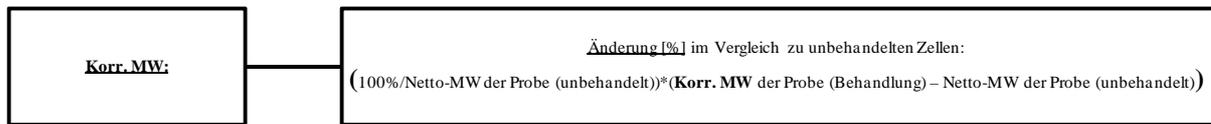
Um den Datensatz der unbehandelten Zellen mit den Behandlungsmethoden Cisplatin, Cisplatinliposomen, Lipoplatin™ und Leerliposomen zu vergleichen, wurden die Probandaten der drei Datensätze mithilfe deren Positivkontrolle auf die Positivkontrolle der unbehandelten Zellen normalisiert. Dieser Wert bildet den korrigierten Mittelwert (Korr. MW). Dies wurde ebenfalls für die Standardabweichungen der Proben (Korr. Stabw) durchgeführt (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13:** Ermittlung des korrigierten Mittelwertes aus dem Netto-Mittelwert und der korrigierten Standardabweichung aus der Standardabweichung der Rohdaten

Die erhaltenen korrigierten Mittelwerte der Datensätze der mit Cisplatin, Cisplatinliposomen, Lipoplatin™ und Leerliposomen behandelten resistenten Zellen können auf diese Weise jeweils mit dem Datensatz unbehandelter Zellen und auch untereinander verglichen werden. Zur Veranschaulichung der Expression der Apoptoseproteine wurde die Änderung der vier

Behandlungsmethoden gegenüber den unbehandelten Zellen auch in Prozent bestimmt (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14:** Ermittlung der Expressionsänderung der Proben [%] gegenüber unbehandelten resistenten Zellen aus dem korrigierten Mittelwert

Die Unterschiede zwischen den Grundgesamtheiten von unbehandelten Zellen und einer der vier Behandlungsmethoden wurden mit einer Varianzanalyse (ANOVA, einfaktoruell) abgesichert, der sich ein Turkey's Test anschloss, um Unterschiede in den Mittelwerten der einzelnen Duplikate herauszustellen.

## 4.11 Analyse der Genexpression nach Tinzaparinbehandlung

### 4.11.1 Inkubation der Zellen

Die Zellen wurden wie unter Abschnitt 4.4.5 beschrieben ausgesät und nach 1 h mit 50 µg/mL Tinzaparin versehen oder keine weitere Behandlung vorgenommen (Tab. 4.16, unbehandelt und Tinza).

### 4.11.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der totalen RNA der Zellen erfolgte mit dem RNeasy® Plus Mini Kit nach den Anweisungen des beiliegenden Handbuchs.<sup>291</sup>

Die inkubierten Zellen wurden geerntet und gezählt. Da ihre Zellzahl zwischen minimal  $5 \times 10^6$  und maximal  $1 \times 10^7$  lag, wurden die Extraktionsbedingungen für pelletierte Zellen dieser Anzahl nach dem Handbuch geschaffen und die Puffervolumina entsprechend gewählt.

Die Extraktion der RNA und die Entfernung anderer zellulärer Bestandteile erfolgten hierbei durch Festphasenextraktion aus einer Silikamembran. Vorher wurde genomische DNA mit einer gDNA-*eliminator*-Säule entfernt. Die Fraktion, die bei der Zentrifugation die Membran der Säule passierte, wurde 1:1 mit Ethanol 70 % versetzt, und in eine RNeasy® Mini-Säule

überführt. Dort wurden ebenfalls durch Zentrifugation andere zelluläre Bestandteile wie Proteine und Polysaccharide abgeschieden, während die RNA an dem Silikagel gebunden wurde. Nach mehrfachen Waschschritten wurde sie anschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **4.11.3 Gene array-Analyse**

Die isolierte RNA wurde an das Institut für Humangenetik und Anthropologie der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf übergeben. Dort wurden alle Arbeiten unter der Aufsicht von Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer im Zuge eine Kooperation durchgeführt.

Kurz beschrieben wurden die RNA-Proben zunächst mit CY3-CTP amplifiziert und so gelabelte cRNA erhalten. Die hinreichende Einbaurate ( $\geq 8 \text{ pmol}/\mu\text{g RNA}$ ) wurde an einem *Nanodrop* Photometer bestimmt. Es wurden jeweils 825 ng einer Probe auf einem einzelnen Agilent 44k *whole genome microarray* hybridisiert. Die Extraktion der Rohdaten erfolgte mithilfe der Agilent Extracting Software und die Prozessierung wurde wie bei ROYER-POKORA ET AL.<sup>292</sup> beschrieben durchgeführt.

### **4.11.4 Auswertung und Statistik**

Die Daten wurden mit der MetaCore™ Software analysiert. Dabei wurden für die Rohdaten zunächst die Einschlusskriterien wie bekannte Genfunktion, Fluoreszenzintensität  $>300$  und Expressionsrate  $>2,0$  festgelegt. Die beiden einzelnen *arrays* wurden *in silico* verglichen. Es konnten dabei auch funktionelle Einheiten von Genfamilien oder sich gegenseitig beeinflussende Zielproteine aus einem Signalweg oder biologischen Prozess zusammengefasst werden. Zur Unterstützung diente dabei ebenfalls die Java-Applikation Advanced Search.

Die Auswertung und Statistik wurden wie die Durchführung des *gene arrays* von Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer durchgeführt.

## 4.12 Überprüfung des Effektes der Cisplatinliposomen *in vivo*

### 4.12.1 Herstellung der Liposomen

Die Liposomen wurden entsprechend Kapitel 4.2 hergestellt und entsprechend Kapitel 4.3 analysiert.

Um eine für eine immundefiziente, athymische Nacktmaus adäquate Dosierung zu erreichen, musste der Herstellungsmaßstab vergrößert werden. Zunächst wurden Lipidmengen für ein Gesamtvolumen von 5 mL einer Liposomendispersion eingesetzt (60  $\mu\text{mol/L}$ ). Diese wurde komplett aufbereitet, wobei das Maximalvolumen der Chromabond<sup>®</sup>-Säulen von 500  $\mu\text{L}$  den praktisch limitierenden Schritt darstellte. Alle erhaltenen Fraktionen wurden vor der Quantifizierung vereinigt und gründlich gemischt. Als letzter Schritt wurden die Liposomen an einer Vakuumzentrifuge um den Faktor 5-10 eingengt, um eine maximale Dosierung von 12 mg/kgKG Cisplatin in der Maus erreichen zu können. Nach dieser Prozedur wurde erneut die Größe der Liposomen mittels PCS bestimmt, um die Bildung von Agglomeraten auszuschließen.

### 4.12.2 Untersuchte Liposomensorten

Es wurden Liposomen mit einem mPEG-PE-Anteil zwischen 2 % und 7 % mit und ohne eingeschlossenem Cisplatin untersucht. Cisplatinliposomen mit 5 % mPEG-PE wurden ebenfalls mit Holotransferrin *targetiert* untersucht (Tab. 2.11).

### 4.12.3 Durchführung der *in vivo*-Experimente

Die fertiggestellten Liposomen wurden noch am selben Tag per Übernachtpost an das Uniklinikum Halle (Saale) geschickt, wo alle Arbeiten im Zuge einer Kooperation persönlich durch sowie unter Aufsicht von Herrn Dr. Thomas Müller durchgeführt wurden.

Dabei wurden für die Liposomendosierungen zwischen 3 und 12 mg/kgKG Cisplatin in die Schwanzvene einer Nacktmaus injiziert. Es erhielten jeweils eine Maus oder zwei Mäuse pro Versuch dieselbe liposomale Cisplatinformulierung. Wie viele Einzelinjektionen ohne schwere Nebenwirkungen dabei möglich waren und wann der Versuch aufgrund fortschreitender Tumorgöße beendet werden musste, unterlag dabei der Expertise von Herrn Dr. Thomas Müller.

#### **4.12.4 *In vivo-imaging*-Verfahren und *ex vivo*-Visualisierung in Geweben**

Die größten Probleme des *in vivo-imaging* stellen die hohe Eigenfluoreszenz des Gewebes sowie dessen geringe Lichtdurchlässigkeit dar. Daher wurde der Farbstoff DiR zur Markierung der Liposomen verwendet, dessen Anregungs- und Emissionswellenlänge im nahen IR-Bereich liegt (Anregung: 748 nm; Emission: 780 nm). Die Ein-/Ausdringtiefe des Lichts erweist sich in diesem Bereich als passender Kompromiss zwischen der Absorption von körpereigenen Substanzen wie z.B. Hämoglobin oder Melanin, aber auch Wasser.<sup>293</sup>

Die *in vivo*-Aufnahmen wurden am Maestro™ *in vivo Fluorescence Imaging* System (CRi, Woburn) an narkotisierten Mäusen durchgeführt. Auch das *ex vivo-imaging* wurde an diesem Gerät nach der Präparation verschiedener Gewebe und Organe vorgenommen.

Eine detaillierte Beschreibung der Methodik findet sich in der Dissertation von Frau Dr. Henrike Caysa der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Karsten Mäder am Pharmazeutischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.<sup>294</sup>

Alle Arbeiten außer der Markierung der Liposomen wurden auch hier durch oder unter Aufsicht von Herrn Dr. Thomas Müller am Uniklinikum Halle (Saale) durchgeführt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Vorangegangene Untersuchungen von KRIEGER ET AL.<sup>12</sup> konnten zeigen, dass konventionelle langzirkulierende *targetierte* und *untargetierte* Liposomen imstande sind, die Cisplatinresistenz in Ovarialkarzinomzellen (A2780cis) zu umgehen. Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit mit denselben Liposomen gearbeitet, die bereits von Frau Borrmann (ehem. Krieger) in ihrer Herstellung und Beschaffenheit optimiert und analysiert wurden.

### 5.1 Charakterisierung der Cisplatinresistenz

Um eine weiterführende Vergleichbarkeit zu gewährleisten und einen Einblick in das verwendete Modellsystem zu geben, wird die Chemoresistenz der A2780- und A2780cis-Ovarialkarzinomzellen charakterisiert und die hergestellten Liposomen werden kurz beschrieben.

#### 5.1.1 Verwendete Liposomen und deren Eigenschaften

Die verwendete A2780-Zelllinie internalisiert Cisplatinliposomen hauptsächlich über clathrinvermittelte Endozytose.<sup>295</sup> Die optimale Liposomengröße liegt dabei zwischen 100 und 300 nm, wobei kleinere Partikel tendenziell eine schnellere Aufnahme zeigen als große. So können Liposomen unter 200 nm schon nach einstündiger Inkubation im Zytosol beobachtet werden; der Großteil der Liposomen ist nach ca. 2 h von der Zelle aufgenommen.<sup>296</sup>

Die verwendeten Liposomen bestehen aus einer Lipidgrundmischung aus Sojaphosphatidylcholin und Cholesterol, welche je nach Zielsetzung des Experiments durch verschiedene funktionalisierte Lipide oder lipidähnliche Substanzen ergänzt wurde. Zur perspektivischen Verbesserung pharmakokinetischer Parameter enthalten die Liposomen zwischen 2 % und 5 % Methoxypolyethylenglykol, die Sichtbarkeit im *imaging*-System wird durch Inkorporation von DiR sichergestellt und eine aktive Zielsteuerung ins Tumorgewebe soll durch cyanurgekoppeltes Holotransferrin erreicht werden (Abschnitt 4.1.2.5). Zur Ermittlung der Toxizität der Liposomenbestandteile und als *in vivo*-Vergleich wurden auch Liposomen hergestellt, die statt Cisplatin lediglich DPBS enthielten. Die verwendeten Liposomen wurden alle mittels der Hydratationsmethode hergestellt. Die resultierenden MLV wurden durch Ultraschall homogenisiert.

**Tab. 5.1:** Liposomengröße, Polydispersitätsindex, Lipidgehalt und Cisplatingehalt der Cisplatinliposomen (A) und Leerliposomen (B). Es handelt sich um Mittelwerte aller hergestellten Liposomen der jeweiligen Sorte (n = 3–16). <sup>\*1</sup>: Die gekennzeichneten Leerliposomen wurden nicht chromatographisch aufgearbeitet, daher gibt es keinen Lipidverlust, da eingesetzte Lipidmenge = Lipidmenge der fertigen Liposomen; eine nachträgliche Lipidbestimmung ist nicht notwendig, daher keine Standardabweichung verfügbar. <sup>\*2</sup>: 7 % mPEGDiR-Cisplatinliposomen und 2 % mPEGDiR-Leerliposomen wurden nur n = 1 für einen *in vitro*-Vergleich hergestellt; bei den Standardabweichungen handelt es sich um die Standardabweichung der Bestimmungsmethode und nicht um eine kumulierte Standardabweichung aus mehreren Herstellungschargen.

<b>A Cisplatinhaltige Liposomen</b>								
Liposomensorte	Größe [nm]	Stabw	Poly	Stabw	Lipid [mmol/L]	Stabw	cDDP [μmol/L]	Stabw
5 % mPEG	<b>104,7</b>	9,9	<b>0,284</b>	0,078	<b>19,1</b>	3,3	<b>532,70</b>	245,76
5 % mPEGDiR	<b>123,1</b>	14,1	<b>0,378</b>	0,047	<b>17,6</b>	4,8	<b>861,50</b>	295,44
7 % mPEGDiR	<b>143,4</b>	5,1 <sup>*2</sup>	<b>0,390</b>	0,025 <sup>*2</sup>	<b>19,2</b>	2,2 <sup>*2</sup>	<b>966,48</b>	204,72 <sup>*2</sup>
5 % mPEGCyTf	<b>107,8</b>	5,4	<b>0,267</b>	0,054	<b>19,2</b>	4,5	<b>671,22</b>	235,53
5 % mPEGDiRCyTf	<b>104,9</b>	16,3	<b>0,485</b>	0,045	<b>18,0</b>	8,5	<b>1219,78</b>	600,44

<b>B Leerliposomen</b>								
Liposomensorte	Größe [nm]	Stabw	Poly	Stabw	Lipid [mmol/L]	Stabw	cDDP [μmol/L]	Stabw
5 % mPEG	<b>123,3</b>	33,4	<b>0,293</b>	0,098	<b>17,5</b>	2,7	n.v.	n.v.
2 % mPEGDiR	<b>105,0</b>	11,7 <sup>*2</sup>	<b>0,303</b>	0,074 <sup>*2</sup>	<b>60,0</b>	n.v. <sup>*1</sup>	n.v.	n.v.
5 % mPEGDiR	<b>107,0</b>	5,2	<b>0,282</b>	0,076	<b>60,0</b>	n.v. <sup>*1</sup>	n.v.	n.v.
5 % mPEGDiRCyTf	<b>122,1</b>	1,8	<b>0,334</b>	0,029	<b>11,6</b>	2,1	n.v.	n.v.

### 5.1.1.1 Partikelgröße

Die Liposomen weisen eine Partikelgröße zwischen 104,5 nm und 143,4 nm auf (Tab. 5.1). Dieser Größenbereich qualifiziert jede hergestellte Liposomensorte für eine Tumoraufnahme, sowohl indirekt durch den EPR-Effekt als auch in die einzelne Zelle mittels Endozytose, was eine maßgebliche Voraussetzung für darauf folgende *in vitro*- und *in vivo*-Versuche ist.

Es gibt eine leichte Tendenz zu einer größeren Partikelgröße in Abhängigkeit zu einem höheren mPEG-Gehalt. Die größten Liposomen sind die 7 % mPEGDiR-Cisplatinliposomen, die kleinsten die 2 % mPEGDiR-Leerliposomen. Diese Tatsache ist teilweise der stärkeren Hydratisierung der Liposomenoberfläche zuzuschreiben, welche ebenfalls für den *stealth*-Effekt der Transportsysteme im Organismus verantwortlich ist. Betrachtet man die am intensivsten untersuchte Gruppe der 5 % mPEG-haltigen Liposomen, kann kein Einfluss eines Cisplatineinschlusses auf die Größencharakteristik beobachtet werden.

Die Cisplatinliposomen haben eine Größe zwischen 104,5 nm und 123,1 nm, die Leerliposomen zwischen 107,0 nm und 123,3 nm. Dies lässt vermuten, dass es für die Pharmakokinetik *in vivo* zunächst nicht bestimmend ist, ob das Transportliposom mit dem eigentlichen Arzneistoff, der den zytostatischen Effekt auslösen soll, beladen ist oder nicht.

Die Größenverteilung repräsentiert durch den Polydispersitätsindex (Dimension zwischen 0 und 1) ist für alle Liposomensorten sehr heterogen. Es ist anzunehmen, dass es sich nicht um gleichgroße unilamellare Vesikel, sondern eher um unterschiedlich große, teilweise auch multilamellare oder multivesikuläre Vesikel handelt. Für das angewendete Homogenisierungsverfahren mittels Ultraschallbehandlung der Lipiddispersion handelt es sich um ein typisches Größenverteilungsmuster. Eine höhere Homogenität wäre mit einer Extrudierung durch eine Filtermembran möglich, ist jedoch basierend auf vorangegangenen Erkenntnissen der Arbeitsgruppe zur Steigerung der *in vitro*-Effektivität nicht erforderlich.

### 5.1.1.2 Lipidgehalt

Die resuspendierten Lipidfilme wurden jeweils in einer Konzentration von 60 mmol/L Gesamtlipid hergestellt und homogenisiert. Alle Liposomenchargen wurden vor der Verwendung mittels Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Die dadurch erhaltenen, fertigen Liposomendispersionen wurden durch Phosphatanalytik auf ihren Lipidgehalt untersucht (Abschnitt 4.3.3). Dies wurde für die Grundlipidmischung 5 % mPEG sechsmal durchgeführt und für alle weiteren Chargen mit dem daraus erhaltenen mittleren Lipidverlust theoretisch abgeschätzt.

**Tab. 5.2:** Durchschnittliche Lipidgehalt ermittelt aus dem Phosphatgehalt der Phospholipide und der daraus resultierende Lipidverlust bezogen auf das Herstellungsvolumen der Dispersion. (n = 6)

Liposomensorte	Lipidgehalt [mmol/L]		Lipidverlust [%]
	MW	Stabw	
5 % mPEG	<b>47,55</b>	3,02	<b>20,8</b>

Der Lipidverlust der Dispersionen während ihres Herstellungsprozesses beträgt 20,8 % (Tab. 5.2). Dieser ist einerseits bedingt durch das unvollständige Resuspendieren des getrockneten Lipidfilms bei der Hydratationsmethode, aber hauptsächlich durch den Verbleib von Lipiden auf der Chromatographiesäule bei der Aufreinigung der Liposomen.

Die finale Lipidkonzentration der Liposomendispersionen liegt letztlich zwischen 11,6 und 19,2 mmol/L (Tab. 3.1), da das Durchlaufen der Säule mit einer erheblichen Volumenvergrößerung des Eluats verbunden ist, hat jedoch nichts mit dem Verlust an Lipidstoffmenge durch Verbleiben im Sorbens zu tun. Durch nachträgliches Entfernen von Dispersionsmittel (DPBS) mithilfe von Vakuumzentrifugation kann in gewissem Rahmen bis zum Eintreten erhöhter Viskosität die Lipidkonzentration und gleichzeitig auch die Cisplatinkonzentration erhöht werden.

### 5.1.1.3 Cisplatingehalt

Die Cisplatingehalte der Liposomen liegen im Mittel je nach Lipidformulierung zwischen 321,60  $\mu\text{mol/L}$  und 1219,78  $\mu\text{mol/L}$ . Die starke Streuung trat auch zwischen den Einzelwerten, die den Mittelwerten zugrunde liegen, auf und ist herstellungsbedingt, obwohl der Lipidfilm immer in einer 8 mg/mL konzentrierten Cisplatinlösung resuspendiert wurde. Die Lösung wurde erhitzt, bis mit dem Auge keine ungelösten Partikel mehr zu erkennen waren. Vermutlich sorgt aus der gesättigten Lösung in verschiedenem Maße ausfallender Wirkstoff für die variierenden Endkonzentrationen der Liposomendispersionen.

Da eine vollkommene Zytotoxizität der Liposomen jedoch in jedem Zellversuch erreicht werden konnte, wirkt sich die hohe Variabilität der Cisplatingehalte nicht negativ auf die Bestimmung der  $\text{EC}_{50}$  aus.

### 5.1.1.4 Kopplungseffizienz

Die Kopplungseffizienz wird mit der Kopplungskonstante als  $\mu\text{g Protein}/\mu\text{mol Lipid}$  (bzw.  $\text{nmol}/\mu\text{mol}$ ) angegeben. Vorangegangene Untersuchungen führten für diese Liposomensorte zu einer Kopplungskonstante von ca. 80  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ .<sup>12</sup>

**Tab. 5.3:** Kopplungskonstanten der holotransferringekoppelten Liposomen als Maß für die Kopplungseffizienz, \*: Ohne eingeschlossenes Cisplatin; †: Mit eingeschlossenem Cisplatin

Liposomensorte	Kopplungskonstante [ $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ]		Kopplungskonstante [ $\text{nmol}/\mu\text{mol}$ ]	
	MW	Stabw	MW	Stabw
5 % mPEG <sup>+</sup>	<b>0,344</b>	0,023	<b>0,004</b>	0,0003
5 % mPEGDiRCyTf*	<b>21,269</b>	2,759	<b>0,276</b>	0,0358
5 % mPEGDiRCyTf <sup>†</sup>	<b>23,928</b>	2,034	<b>0,311</b>	0,0264

Die Kopplungseffizienz ist für die verwendeten gekoppelten Liposomen deutlich niedriger als in vorangegangenen Arbeiten. Mit 21,269  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$  für holotransferringekoppelte Leerliposomen und 23,928  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$  für holotransferringekoppelte Cisplatinliposomen liegt die Kopplungskonstante bei lediglich einem Viertel der Erfahrungswerte für diese Liposomensorte (Tab. 5.3).

Der einzige Unterschied in der Lipidzusammensetzung zu früheren Arbeiten ist der amphiphile, in die Membran eingelagerte Farbstoff. Eine direkte Kopplung des DiR an Cyanurchlorid und damit der Entzug von potentiellen Bindungsstellen des Holotransferrins auf der Liposomenoberfläche ist unwahrscheinlich, da der Chloridsubstituent des Cyanurchlorid gegen Nukleophile ausgetauscht werden kann, nicht aber gegen Elektrophile

wie den mesomeriestabilisierten permanent positiv geladenen Stickstoff des DiR, dem zusätzlich eine Abgangsgruppe fehlt. Außerdem ist eine Delokalisation des Farbstoffes aus der Membran hin zum endständigen Cyanurchlorid an der mPEG-Kette des derivatisierten Lipids nicht vorstellbar. Eine Veränderung der Membranbeschaffenheit wäre denkbar, wobei jedoch fraglich ist, ob sich dies so stark auf die Kopplung des Holotransferrin auswirkt wie im vorliegenden Fall. Wahrscheinlich führen eher herstellungsbedingte Schwankungen zu der niedrigeren Kopplungsrate. Da kein scharfer Grenzwert für die Kopplungsrate bekannt ist, der über den Erfolg eines *in vivo-targetings* entscheidet, ist eine perspektivische Applikation in Mäuse unter Berücksichtigung der hier vorliegenden Kopplungseigenschaften möglich.

#### **5.1.1.5 Cisplatineinschlussrate**

Bei der Herstellung der liposomalen Formulierung von Cisplatin wurde der getrocknete Lipidfilm in erhitzter (ca. 80°C), übersättigter Cisplatinlösung dispergiert, um einen möglichst hohen Einschluss des Arzneistoffes zu bewirken. Die fertige Zubereitung wurde anschließend auf ihren Platingehalt analysiert, was einen Vergleich zwischen eingesetztem und in die Liposomen eingeschlossenem Cisplatin erlaubte. Außerdem wurde die Cisplatinkonzentration jedes Ansatzes auf die jeweilige Lipidkonzentration der Liposomendispersion bezogen und eine Aussage über die Stoffmenge Cisplatin pro Lipidmenge getätigt.

Es ist bekannt, dass Lipide in sehr hohen Konzentrationen toxische Effekte auf eine Zellpopulation haben können.<sup>12</sup> Daher ist es bei Einschluss eines Wirkstoffes jeglicher Art in Liposomen erstrebenswert, eine möglichst hohe Einschlussrate zu erreichen. So kann eine unerwünschte Toxizität der Lipide vermieden werden.

Durch eine Steigerung der eingesetzten Lipidmenge kann die Einschlussrate positiv beeinflusst werden. Bei einer Lipidkonzentration von 40 mmol/L kann für andere Lipidzusammensetzungen eine Einschlussrate von ca. 18 % erreicht werden.<sup>297</sup> Um die Effizienz weiter zu steigern, wurden die Liposomen in einer Konzentration von 60 mmol/L hergestellt.

**Tab. 5.4:** Einschussrate der vier hauptsächlich untersuchten Cisplatinliposomen berechnet aus der eingesetzten Cisplatinmenge im Verhältnis zur liposomal eingeschlossenen Cisplatinmenge in Prozent und im Verhältnis zur eingesetzten Lipidmenge als  $\mu\text{mol}$  Cisplatin/mmol Lipid

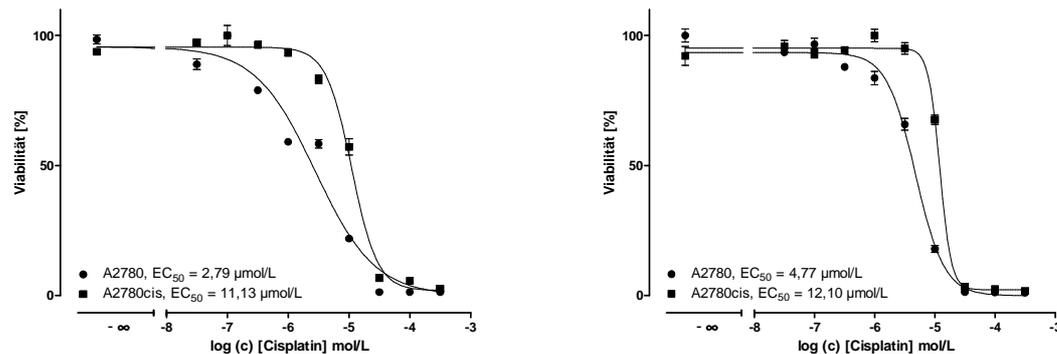
Liposomensorte	Einschlussrate [%]		Einschlussrate [ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ ]	
	MW	Stabw	MW	Stabw
5 % mPEG <sup>+</sup>	<b>2,00</b>	1,20	<b>27,89</b>	16,84
5 % mPEGDiR	<b>3,23</b>	1,76	<b>48,95</b>	26,76
5 % mPEGCyTf	<b>2,51</b>	1,11	<b>34,96</b>	15,39
5 % mPEGDiRCyTf	<b>4,57</b>	1,84	<b>67,77</b>	27,31

Die zur Herstellung der Liposomen angewandte Hydratationsmethode führt zu einem Einschluss von Cisplatin, der 2,00 % bis 4,57 % des eingesetzten Arzneistoffes bzw. einem Cisplatin : Lipid-Verhältnis zwischen 27,89  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  und 67,77  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  entspricht (Tab. 5.4). Der sehr hohe Verlust von über 95 % ist durch die Methode bedingt, da der Einschluss allein durch die Ausbildung von MLV in gesättigter Cisplatinlösung geschieht. Es wurden keine osmotischen Verfahren angewendet, um die Einschlusseffizienz zu erhöhen. Dies kann für die Inkubationsexperimente in Kauf genommen werden, da die erhaltenen Liposomen in der höchsten Konzentration nach 24 h alle Zellen eliminieren und die Lipidmenge der Liposomen ohne Cisplatin im Bereich der  $\text{EC}_{50}$  von Cisplatinliposomen nicht toxisch ist (Abschnitt 5.1.2.3). Für *in vivo*-Experimente ist eine nachträgliche Konzentrierung mittels Vakuumzentrifugation möglich.

## 5.1.2 Zytotoxizität der Liposomen

### 5.1.2.1 Cisplatintoxizität in A2780- und resistenten A2780cis-Zellen

Um die Cisplatinresistenz der Zellen zu überprüfen, wurden zunächst Inkubationsversuche über 72 h mit freiem Wirkstoff durchgeführt.



**Abb. 5.1:** Zytotoxizität des freien Cisplatins in A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 Zellen (links) und 40.000 Zellen (rechts); die Graphen zeigen jeweils exemplarisch einen Versuch in Triplikaten.

**Tab. 5.5:** Zusammenfassung der Zytotoxizität von freiem Cisplatin in allen Versuchen (n = 3) mit den daraus resultierenden Resistenzfaktoren (EC<sub>50</sub> A2780cis / EC<sub>50</sub> A2780)

Inkubationszeit	Zellen/Well	A2780		A2780cis		R <sub>f</sub>		
		pEC <sub>50</sub>		EC <sub>50</sub>				
		MW	SE	[μmol/L]	[μmol/L]			
72 h	20.000	5,60	0,06	<b>2,51</b>	4,98	0,04	<b>10,47</b>	<b>4,2</b>
	40.000	5,44	0,06	<b>3,63</b>	4,95	0,08	<b>11,22</b>	<b>3,1</b>

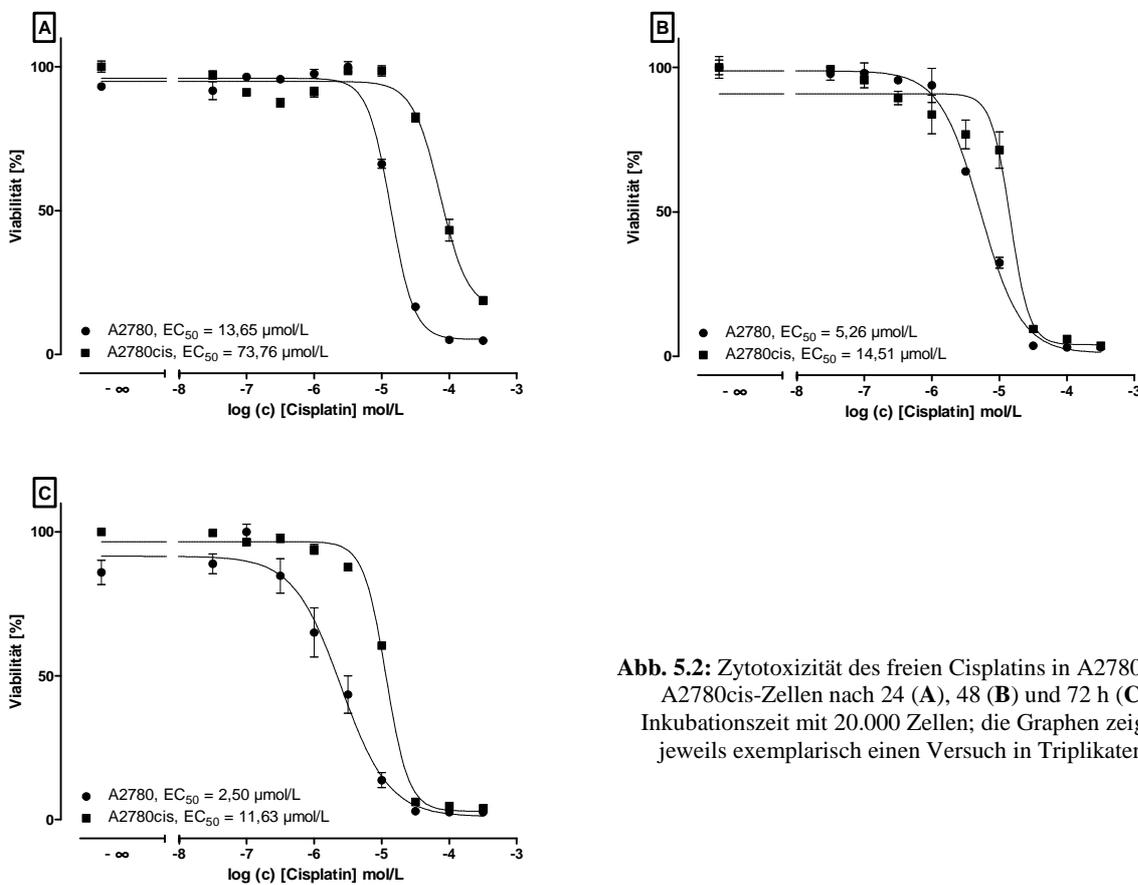
Die Toxizität von freiem Wirkstoff liegt nach 72 h bei den A2780-Zellen je nach Zellzahl bei 2,51 und 3,63 μmol/L und bei den cisplatinresistenten A2780cis-Zellen bei 10,47 und 11,22 μmol/L (Tab. 5.5). 20.000 der resistenten Ovarialkarzinomzellen tolerieren 4,2 mal so hohe Cisplatinkonzentrationen wie 20.000 der nicht resistenten Zellen. Bei 40.000 Zellen ist der Resistenzfaktor 3,1.

Sowohl bei resistenten als auch bei A2780-Zellen ist die benötigte Konzentration, um die Hälfte der Zellen abzutöten, bei einer größeren Zelldichte höher. Dies kann einerseits ein reiner Mengeneffekt sein, da bei gleichen Cisplatinkonzentrationen im Medium der einzelnen Zelle bei höherer Zellzahl eine geringere Platinmenge zur Aufnahme zur Verfügung steht, andererseits ist die Interaktionsfähigkeit bei direktem Kontakt der Zellen untereinander für

höhere Zellzahlen eher gegeben. Mögliche Überlebenssignale könnten unter den Zellen bei höherer Zelldichte eher weitergegeben werden.

### 5.1.2.2 Toxizität von freiem Wirkstoff im Vergleich zu liposomalem Wirkstoff

Es wurden Inkubationsversuche gleichzeitig mit freiem und liposomalem Cisplatin durchgeführt, um die Toxizität beider Formulierungen zu vergleichen und einen Einfluss der Liposomen auf die Chemoresistenz zu demonstrieren. Neben einer Inkubationszeit von 72 h wurden auch Zeiten von 24 h und 48 h gewählt, da der Wirkungsverlauf sich durch die unterschiedliche zelluläre Aufnahme beider Formulierungen deutlich unterscheiden kann.

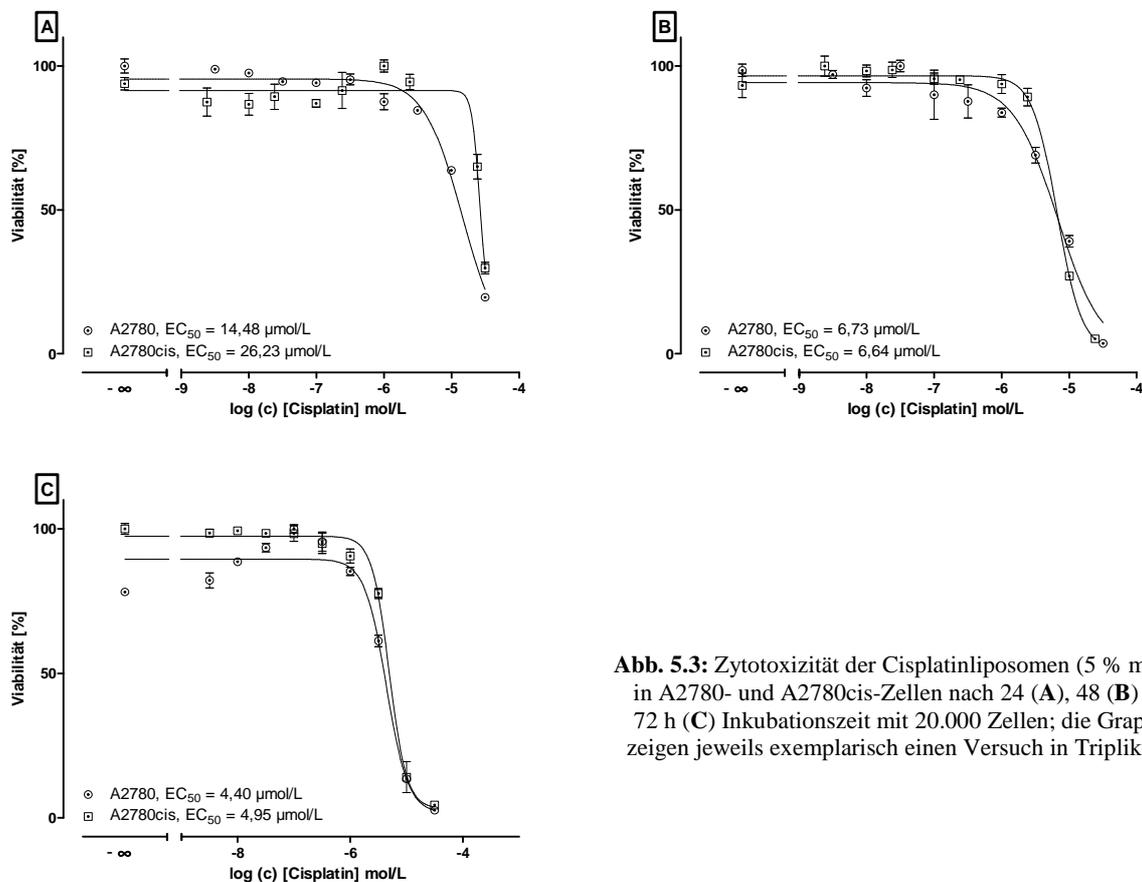


**Abb. 5.2:** Zytotoxizität des freien Cisplatin in A2780- und A2780cis-Zellen nach 24 (A), 48 (B) und 72 h (C) Inkubationszeit mit 20.000 Zellen; die Graphen zeigen jeweils exemplarisch einen Versuch in Triplikaten.

Die Toxizität des freien Cisplatin nimmt mit höherer Inkubationszeit für beide Zelllinien zu. Während der Effekt bei den A2780-Zellen über die drei Messzeiten gleichmäßig zunimmt, wird für die resistenten Zellen der stärkste Abfall der  $EC_{50}$  von 24 h zu 48 h (A2780cis, Abb. 5.2A zu 5.2B) sichtbar. Auch der zunächst große Unterschied zwischen den  $EC_{50}$  der nicht resistenten und resistenten Zellen nach 24 h ( $13,65 \mu\text{mol/L}$  gegenüber  $73,76 \mu\text{mol/L}$ , Abb. 5.2A) deutet auf ein verzögertes Eintreten der Cisplatinwirkung in resistenten Zellen hin, die

dann verstärkt zwischen 24 h und 48 h nach der Inkubation einsetzt. Dieses verzögerte Eintreten kann unter anderem durch eine reduzierte Platinaufnahme im Sinne der beschriebenen *pre-target* Resistenz verursacht sein.

Nach 72 h wird die stärkere Überlebensfähigkeit der resistenten Zellen ersichtlich, da sich die  $EC_{50}$  wieder verhältnismäßig entfernen. Der Resistenzfaktor nach 72 h schließt alle Resistenzmechanismen mit ein, wie auch die *on-target* und *off-target* Mechanismen, die sich nach 72 h im Vergleich zu 48 h in einem erhöhten Resistenzfaktor äußern (Tab. 5.6).



**Abb. 5.3:** Zytotoxizität der Cisplatinliposomen (5 % mPEG) in A2780- und A2780cis-Zellen nach 24 (A), 48 (B) und 72 h (C) Inkubationszeit mit 20.000 Zellen; die Graphen zeigen jeweils exemplarisch einen Versuch in Triplikaten.

Das liposomale Cisplatin weist insgesamt zu jedem Zeitpunkt in den nicht resistenten A2780-Zellen eine leicht geringere Toxizität auf als der freie Wirkstoff. Dies kann ein erster Hinweis auf eine Freisetzungproblematik der Arzneistoffträger sein, da die in die Zelle aufgenommene und wirksame Cisplatinkonzentration durch liposomale Darreichung nicht der absoluten Konzentration an eingesetztem freiem Wirkstoff entspricht.

Bemerkenswert ist jedoch, dass trotz dieser geringeren Toxizität der Cisplatinliposomen die  $EC_{50}$  in den resistenten Zellen zu jedem Zeitpunkt geringer ist als in den mit freiem Wirkstoff

behandelten resistenten Zellen (Abb. 5.3). Dies äußert sich auch in den zu allen Zeitpunkten niedrigeren Resistenzfaktoren der liposomal behandelten Zellen (Tab. 5.6).

**Tab. 5.6:** Zusammenfassung der Zytotoxizität von freiem Cisplatin und Cisplatinliposomen (5 % mPEG) in allen Versuchen (n = 3) mit den daraus resultierenden Resistenzfaktoren ( $EC_{50}$  A2780cis /  $EC_{50}$  A2780)

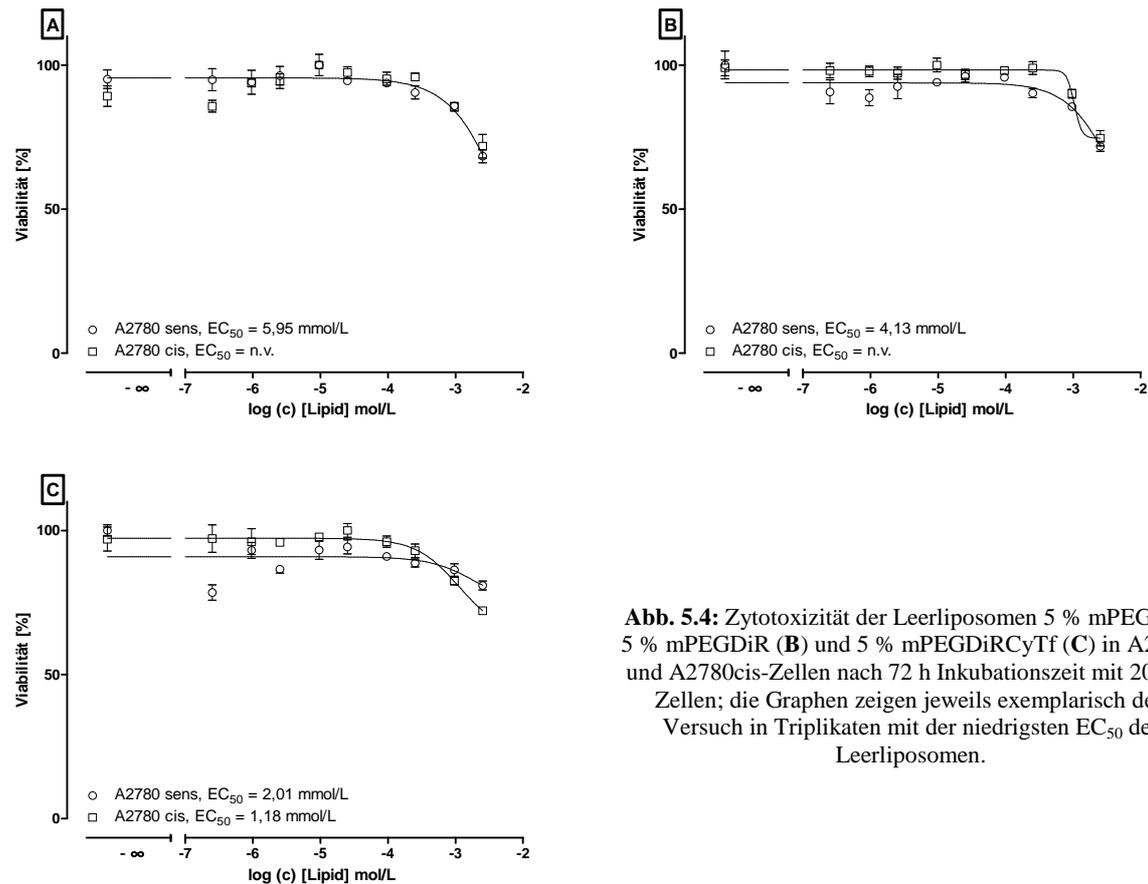
Inkubationszeit	Formulierung	Zellen/Well	A2780			A2780cis			$R_f$
			p $EC_{50}$		EC $_{50}$	p $EC_{50}$		EC $_{50}$	
			MW	SE	[ $\mu$ mol/L]	MW	SE	[ $\mu$ mol/L]	
24 h	cDDP	20.000	4,74	0,04	<b>18,20</b>	4,21	0,16	<b>61,66</b>	<b>3,4</b>
		40.000	4,68	0,03	<b>20,89</b>	4,14	0,05	<b>72,44</b>	<b>3,5</b>
	5 % mPEG	20.000	4,73	0,11	<b>18,62</b>	4,51	0,02	<b>30,90</b>	<b>1,7</b>
		40.000	4,50	0,02	<b>31,62</b>	4,22	0,20	<b>60,26</b>	<b>1,9</b>
48 h	cDDP	20.000	5,29	0,03	<b>5,13</b>	4,84	0,04	<b>14,45</b>	<b>2,8</b>
		40.000	5,22	0,03	<b>6,03</b>	4,84	0,03	<b>14,54</b>	<b>2,4</b>
	5 % mPEG	20.000	5,20	0,05	<b>6,31</b>	5,01	0,30	<b>9,77</b>	<b>1,5</b>
		40.000	4,88	0,03	<b>13,18</b>	4,81	0,23	<b>15,49</b>	<b>1,2</b>
72 h	cDDP	20.000	5,60	0,07	<b>2,51</b>	4,96	0,05	<b>10,96</b>	<b>4,4</b>
		40.000	5,42	0,02	<b>3,80</b>	4,89	0,04	<b>12,88</b>	<b>3,4</b>
	5 % mPEG	20.000	5,16	0,06	<b>6,92</b>	5,11	0,13	<b>7,76</b>	<b>1,1</b>
		40.000	5,14	0,07	<b>7,24</b>	5,04	0,03	<b>9,12</b>	<b>1,3</b>

Die zusammengefassten Ergebnisse aller Zytotoxizitätsversuche zeigen deutlich den starken Rückgang der Chemoresistenz zu jedem Zeitpunkt, in dem die Zellen mit Cisplatinliposomen behandelt werden. Dies geht sogar so weit, dass nach 72 h in liposomal behandelten resistenten Ovarialkarzinomzellen keine Resistenz mehr sichtbar ist ( $R_f = 1,1$  für 20.000 Zellen und  $R_f = 1,3$  für 40.000 Zellen, Tab. 5.6). Der Effekt ist in den resistenten Zellen sogar so stark, dass die *per se* geringere Zytotoxizität, wie sie in den A2780-Zellen an erhöhten  $EC_{50}$  im Vergleich zu freiem Wirkstoff sichtbar ist, vollständig kompensiert wird.

### 5.1.2.3 Toxizität der verwendeten Lipide

Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Effekten der Cisplatinliposomen um eine Zytotoxizität der in der Liposomenmembran enthaltenen Lipide handelt, wurden über 72 h Untersuchungen mit Leerliposomen durchgeführt.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5.4:** Zytotoxizität der Leerliposomen 5 % mPEG (A), 5 % mPEGDiR (B) und 5 % mPEGDiRCyTf (C) in A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 Zellen; die Graphen zeigen jeweils exemplarisch den Versuch in Triplikaten mit der niedrigsten  $EC_{50}$  der Leerliposomen.

**Tab. 5.7:** Jeweils niedrigste  $EC_{50}$  eines Einzelversuchs mit Leerliposomen aus einer Versuchsreihe mit  $n = 3$ ; n.v.: aufgrund fehlender Effekte konnte kein sigmoidaler Verlauf einer Toxizität simuliert werden; a: kein maximaler Effekt im Konzentrationsbereich erreichbar, daher konnte keine zuverlässige Berechnung der  $EC_{50}$  erfolgen.

Liposomensorte	Zellen/Well	A2780	A2780cis
		$EC_{50}$ [mmol/L]	$EC_{50}$ [mmol/L]
5 % mPEG	20.000	<b>5,95</b>	<b>n.v.</b>
	40.000	<b>7,48</b>	<b>a</b>
5 % mPEGDiR	20.000	<b>4,13</b>	<b>a</b>
	40.000	<b>n.v.</b>	<b>n.v.</b>
5 % mPEGDiRCyTf	20.000	<b>2,01</b>	<b>1,18</b>
	40.000	<b>n.v.</b>	<b>n.v.</b>

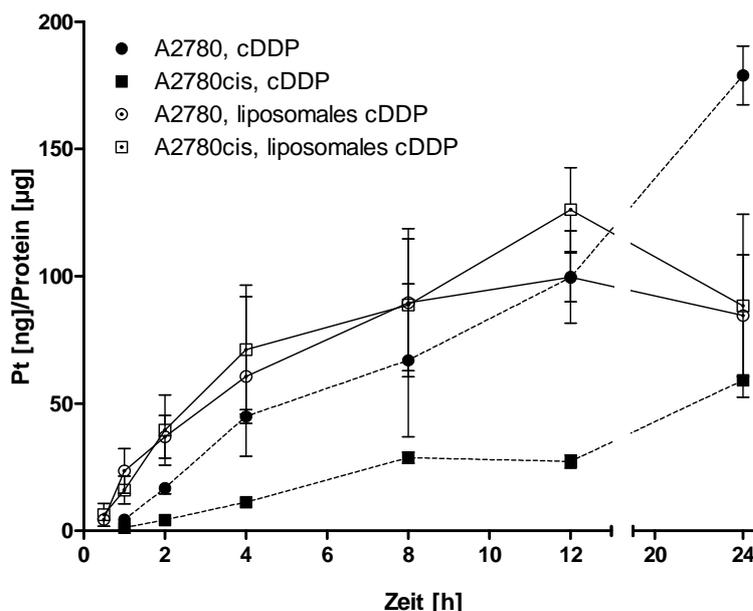
Die Leerliposomen zeigen entweder ausgesprochen schwache oder gar keine toxischen Effekte im eingesetzten Konzentrationsbereich. Da es bei Verwendung der Liposomenstammlösung als erste Verdünnung bei keiner Liposomensorte zu einem maximal toxischen Effekt kommt, sind die durch Simulation einer Dosis-Wirkungskurve erhaltenen  $EC_{50}$  teilweise nicht valide. Um die nicht gegebene Toxizität der Leerliposomen zu quantifizieren, wird die Lipidkonzentration bei der höchsten  $EC_{50}$  cisplatinhaltiger Liposomen

nach 72 h mit der niedrigsten Einschussrate aller Liposomensorten abgeschätzt und mit der niedrigsten  $EC_{50}$  der Leerliposomen verglichen.

Die niedrigste  $EC_{50}$  für Liposomen beträgt  $9,12 \mu\text{mol/L}$  für 40.000 der mit 5 % mPEG-Liposomen behandelten resistenten Zellen (Tab. 5.6). Die herstellungsbedingt geringste Einschussrate weisen ebenfalls 5 % mPEG-Liposomen mit  $27,89 \mu\text{mol/mmol}$  auf. Die Lipidkonzentration beträgt – diese Parameter zugrunde gelegt – bei  $9,12 \mu\text{mol/L}$  Cisplatin folglich ca.  $0,33 \text{ mmol/L}$ . Die niedrigste erhaltene  $EC_{50}$  der Lipide über diesen Zeitraum ist  $1,18 \text{ mmol/L}$  für 5 % mPEGDiRCyTf-Liposomen (Tab. 5.7). Diese pessimistische Abschätzung zeigt, dass im Bereich der  $EC_{50}$  der Liposomen die Lipidkonzentration mindestens dreifach unter der toxischen Lipidkonzentration liegt. Bei der Zytotoxizität der Cisplatinliposomen handelt es sich somit um eine durch Cisplatin verursachte Toxizität und nicht um einen reinen Lipideffekt.

### 5.1.3 Zelluläre Aufnahme von Cisplatin

Wie durch die Zytotoxizitätsuntersuchungen der Liposomen verdeutlicht (Abschnitt 5.1.2.2), sind die Liposomen etwas weniger toxisch als freier Wirkstoff. Demzufolge wurde auch die intrazelluläre Platinkonzentration untersucht, um die Effizienz der Liposomen als Wirkstoffträger zu untersuchen.

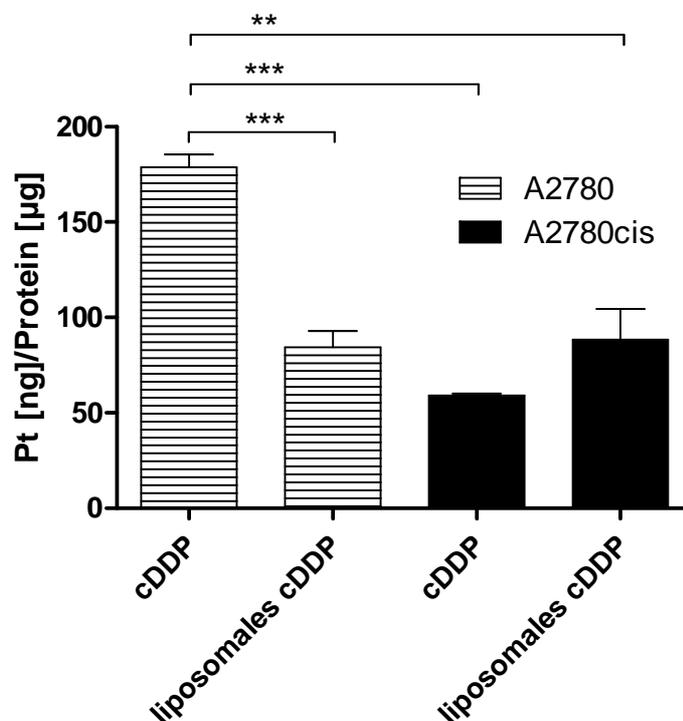


**Abb. 5.5:** Die intrazelluläre Akkumulation von  $20 \mu\text{mol/L}$  Cisplatin nach Behandlung mit freiem Wirkstoff (gestrichelte Linie) und Cisplatinliposomen (5 % mPEG, durchgezogene Linie) über 24 h in A2780- und cisplatinresistenten A2780cis-Zellen

Die Resistenz der Zellen spiegelt sich nicht nur in der Zytotoxizität, sondern auch deutlich in der verringerten Platinakkumulation des freien Wirkstoffs in den resistenten Zellen im Vergleich zu den nicht resistenten Zellen wider. Bereits 2 h nach einer Cisplatinbehandlung bleiben die intrazellulären Platinkonzentrationen in den resistenten Zellen über 12 h unter denen der anderen Zeitpunkte (Abb. 5.5).

Die Liposomen bewirken innerhalb der ersten 12 h eine gleiche Akkumulation in beiden Zelllinien, die auf einem tendenziell leicht höheren Niveau liegt als die Akkumulation des freien Wirkstoffs in nicht resistenten Zellen. Die initiale Cisplatin Aufnahme zeigt bei Liposomen somit ähnliche Charakteristika wie der Wirkstoff in nicht resistenten Zellen, was die Effizienz der Liposomen als Arzneistoffträger und die erste Überwindung einer *pre-target* Resistenz wie z.B. der Influxtransporter herausstellt.

Nach 24 h, dem ersten Zeitpunkt der Zytotoxizitätsuntersuchungen (Abschnitt 5.1.2.2), steigt die Cisplatinkonzentration in mit freiem Wirkstoff behandelten A2780-Zellen weiter an, während die intrazellulären Konzentrationen für die mit Liposomen behandelten Zellen auf dem Niveau verbleiben, auf das letztlich auch die Konzentration der mit freiem Wirkstoff behandelten resistenten Zellen ansteigt.



**Abb. 5.6:** Die intrazelluläre Akkumulation von 20 µmol/L Cisplatin in mit freiem Wirkstoff oder Cisplatinliposomen behandelten A2780- und resistenten A2780cis-Ovarialkarzinomzellen 24 h nach der Inkubation; Signifikanz analysiert mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test; \*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*:  $p < 0,0001$

Die fast 50 % niedrigeren intrazellulären Konzentrationen des liposomalen Cisplatin in beiden Zelllinien im Vergleich zu freiem Wirkstoff in A2780-Zellen (Abb. 5.6) erklärt zwar zunächst die etwas geringere Toxizität der Cisplatinliposomen in den nicht resistenten Zellen im Vergleich zu freiem Arzneistoff. Dies wirft jedoch gleichzeitig die Frage auf, wie es nach 24 h trotz annähernd gleicher intrazellulärer Platinkonzentrationen in resistenten Zellen, die mit Cisplatin oder Cisplatinliposomen behandelt wurden, zu einer deutlichen höheren Toxizität in den liposomal behandelten Zellen kommen kann, die der des freien Wirkstoffes in nicht resistenten Zellen entspricht (Tab. 5.6).

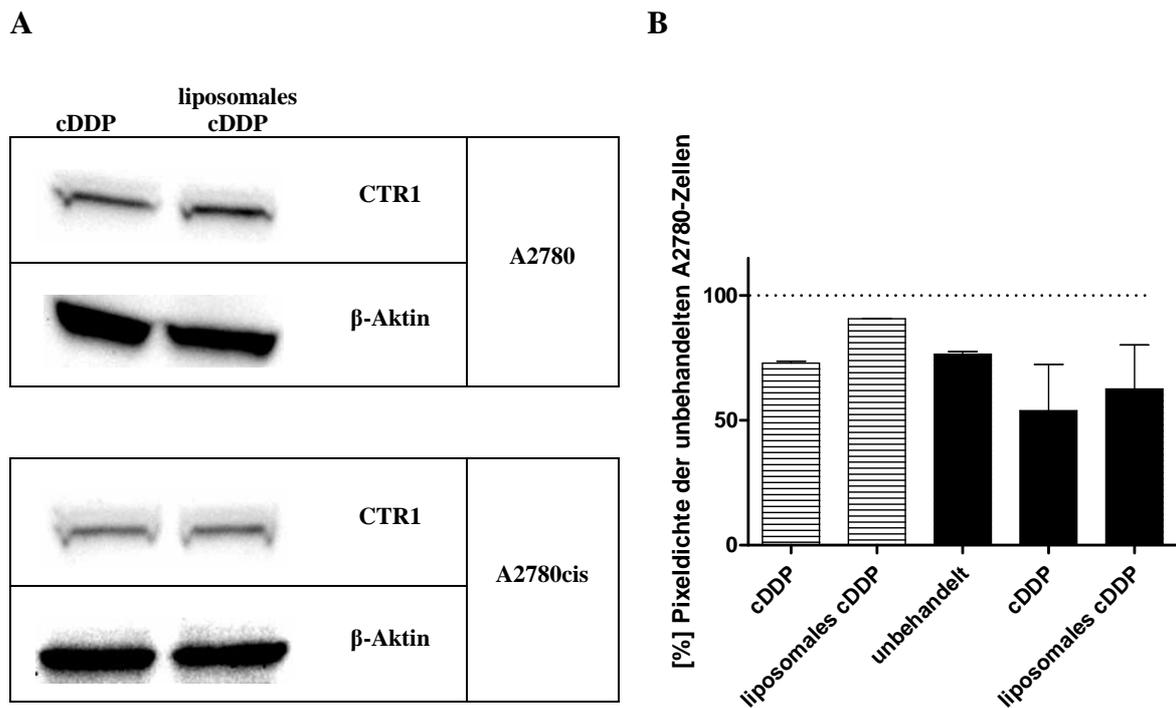
Zusammengenommen unterstützt die Untersuchung der intrazellulären Platinkonzentration die Erkenntnis, dass Resistenzmechanismen der A2780cis-Zelllinie zur Wirkung kommen, bevor Cisplatin die DNA erreicht. Die Cisplatin Aufnahme kann durch ein Umgehen dieser Mechanismen durch eine endozytotisch induzierte Aufnahme mittels Liposomen in resistenten Zellen zunächst wieder auf das Niveau der nicht resistenten Zellen erhöht werden. Nach 24 h zeigt sich jedoch, dass der Mechanismus der Cisplatinliposomen noch weitere Komponenten beinhaltet als die reine Wirkstoffträgerkomponente, da die Zytotoxizität der Cisplatinliposomen trotz der hier gezeigten stagnierenden Platinakkumulation weiter zunimmt (Abb. 5.6 gegenüber Tab. 5.6)

### **5.1.4 Untersuchung des Kupfer-/Cisplatininfluxtransporters CTR1**

Die Untersuchung der intrazellulären Cisplatinkonzentration durch vorangegangene Arbeiten wie auch in dieser Arbeit (Abschnitt 5.1.3) gab konkreten Anlass, die Expression des im Zusammenhang mit einer Cisplatinresistenz am besten beschriebenen Influxtransporters CTR1 zu untersuchen.

#### **5.1.4.1 Proteinexpression des Transporters**

Da bekannt ist, dass Lipide und somit auch der liposomale Einschluss eines Wirkstoffes Einfluss auf die Zytotoxizität haben können, sind auch andere Faktoren wie z.B. Auswirkungen auf Transportersysteme denkbar. Daher wurde die Expression des CTR1 immunohistochemisch analysiert und ein Einfluss der Cisplatinliposomen selbst auf den Transporter abgeklärt.



**Abb. 5.7:** **A:** CTR1-Expression nach Behandlung mit 2  $\mu\text{mol/L}$  Cisplatin oder liposomalem Cisplatin für 72 h in A2780- und resistenten A2780cis-Ovarialkarzinomzellen;exemplarische Darstellung eines einzelnen Versuchs **B:** Relative Quantifizierung der CTR1-Expression zweier gleicher Experimente ermittelt durch Auswertung der Pixeldichte (unbehandelte A2780-Zellen = 100 %);die Zellen wurden für 72 h mit 2  $\mu\text{mol/L}$  Cisplatin als freiem Wirkstoff oder liposomal beimpft.

Die Grundexpression des Cisplatininfluxtransporters liegt bei allen drei Behandlungsschemata in cisplatinresistenten Zellen unter der der nicht resistenten Zellen (Abb. 5.7B). Die resistenten Zellen exprimieren bei allen Versuchsbedingungen im Vergleich zu A2780-Zellen ca. 25 % weniger CTR1. Somit ist eine Unterexpression in diesem Zellsystem Bestandteil der vorhandenen Resistenzmechanismen.

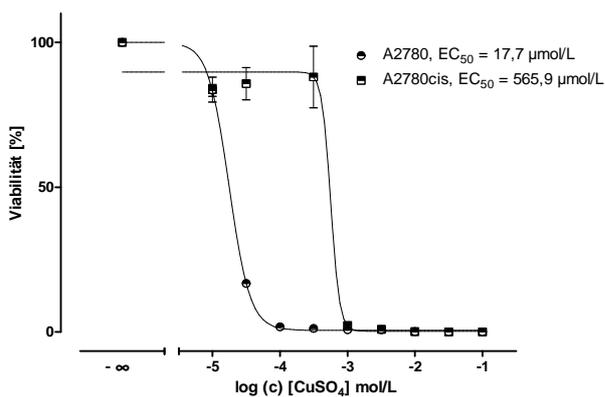
Beide mit Cisplatin behandelten Ansätze (Abb. 5.7A und 5.7B; cDDP gegenüber liposomalem cDDP) unterscheiden sich in den resistenten Zellen nicht signifikant, was darauf hindeutet, dass Liposomen keinen zusätzlichen Effekt auf die Transporterexpression haben. Vergleicht man eine Cisplatinbehandlung, liposomal oder mit freiem Wirkstoff, mit unbehandelten Zellen, fällt auf, dass die Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen leicht zurückgeht. Es handelt sich jedoch nicht um signifikante Unterschiede, so dass eine reflektorische Internalisierung des Transporters nur vermutet werden kann.

Eine Beeinflussung von CTR1 durch die Cisplatinliposomen, welche sich erhöhend oder erniedrigend auf den Influx von extrazellulär aus den Liposomen freigesetztes Cisplatin auswirken kann, ist daher in unserem Modell kein Mechanismus, der zur Resistenzüberwindung beiträgt.

Da mit der durchgeführten Zellyse die Proteinexpression in der gesamten Zelle und nicht ausschließlich in der Zellmembran untersucht wurde, ist die erwähnte Internalisierungsfähigkeit zu berücksichtigen. Der tatsächliche Effekt von Cisplatin allein auf den membraninkorporierten CTR1 könnte stärker oder schwächer sein als hier gezeigt. Auch vorangegangene Zytotoxizitätsuntersuchungen mit Cisplatin geben keinen alleinigen Aufschluss über die CTR1-Funktionalität, da Cisplatin auch durch passive Diffusion und auf anderen Wegen in die Zelle gelangen kann.

#### 5.1.4.2 Zytotoxizität von Kupfer

Im Gegensatz zu Cisplatin hat Kupfer eine hohe Prävalenz an CTR1. Es wird auf physiologischem Wege fast ausschließlich über diesen ubiquitär vorhandenen ATP-Transporter aufgenommen. Daher wurden Inkubationsexperimente mit A2780- und A2780cis-Zellen durchgeführt, um einen Einblick in die Funktionalität des Transporters zu erhalten.



**Abb. 5.8:** Zytotoxizität von Kupfersulfat-pentahydrat in A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 Zellen; der Graph zeigt jeweils exemplarisch einen Versuch in Triplikaten.

**Tab. 5.8:** Zusammenfassung der Zytotoxizität von Kupfersulfat-pentahydrat in allen Versuchen (n = 3) mit den daraus resultierenden Resistenzfaktoren ( $EC_{50} \text{ A2780cis} / EC_{50} \text{ A2780}$ )

Inkubationszeit	Zellen/Well	A2780		A2780cis		$R_f$		
		pEC <sub>50</sub>		EC <sub>50</sub> [µmol/L]				
		MW	SE	MW	SE			
72 h	20.000	4,74	0,01	<b>18,05</b>	3,25	0,01	<b>563,80</b>	<b>31,2</b>

Die  $EC_{50}$  von Kupfer ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ ) liegt bei cisplatinresistenten Zellen weit über der der A2780-Zellen (Tab. 5.8;  $563,80 \mu\text{mol/L}$  gegenüber  $18,05 \mu\text{mol/L}$ ). Der Resistenzfaktor ist mit 31,2 zehnmal höher als der für Cisplatin. Die resistenten A2780cis-Zellen exprimieren nicht nur weniger CTR1, dieses ist auch weniger aktiv, da sich in der Kupfertoxizität ein

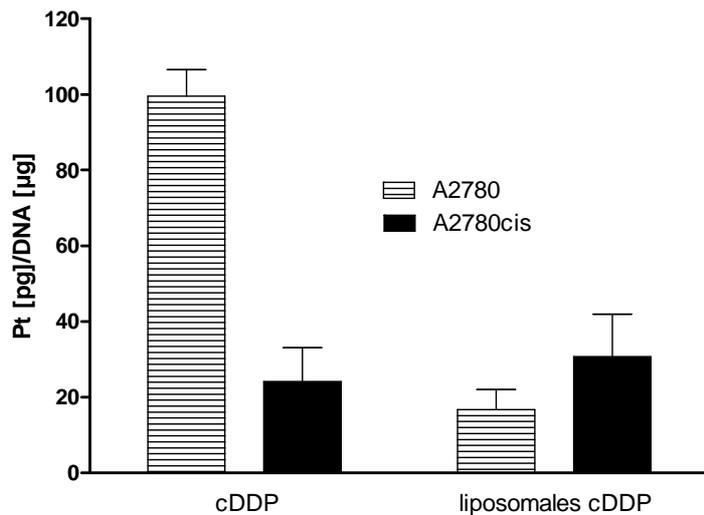
weitaus stärkere Unterschied zwischen den beiden Zelllinien zeigt als in der Expression des Transporters.

Dies verdeutlicht zusätzlich, dass die im *western blot* gezeigte Expression zwar mit der Funktionalität korreliert, die eigentliche Aktivität von CTR1 jedoch nicht allein durch dessen Proteinexpression gezeigt werden kann. Die unterschiedlichen Resistenzfaktoren von Cisplatin mit 4,4 für 20.000 Zellen und Kupfersulfat mit 31,2 bestätigen zudem, dass Cisplatin in den resistenten Zellen nicht ausschließlich über den CTR1 aufgenommen wird.

### **5.1.5 DNA-Platinierung**

Wie durch die Versuche zur Platinakkumulation festgestellt wurde (Abschnitt 5.1.3), gibt es eine hohe Diskrepanz zwischen der hohen zytotoxischen Aktivität des liposomalen Cisplatins in resistenten Zellen (Abschnitt 5.1.2.2) und der vergleichsweise geringen intrazellulären Platinkonzentration. Da die gesamte zelluläre Akkumulation betrachtet wurde, für die Cisplatinwirkung allerdings hauptsächlich die sehr geringe DNA-gebundene Menge verantwortlich gemacht wird, spiegeln die ermittelten intrazellulären Konzentrationen nicht zwangsläufig den für die Toxizität verantwortlichen Anteil wider.

Daher wurde von Frau Michaela Borrmann (ehem. Krieger) die DNA Platinierung untersucht, die aus der Behandlung der Zellen mit freiem Wirkstoff oder Cisplatinliposomen resultiert. Die zusammengefassten Ergebnisse werden hier zur Ergänzung der erhobenen Daten unverändert gezeigt, waren jedoch nicht Bestandteil des experimentellen Teils dieser Arbeit.



**Abb. 5.9:** DNA-Platinierung von cisplatinresistenten A2780- und A2780cis-Zellen nach der Behandlung mit 20 µmol/L freiem oder liposomalem Cisplatin über 24 h; die Laborexperimente, sowie statistische Auswertung der DNA-Platinierung wurden vollständig von Frau Michaela Borrmann in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

Die DNA-Platinierung (Abb. 5.9) verhält sich vergleichbar zu den Untersuchungen der intrazellulären Platinakkumulation (Abschnitt 5.1.3). Auch liegen die Werte für liposomal behandelte Zellen und mit freiem Wirkstoff behandelte resistente Zellen auf einem ähnlichen Niveau, während die Behandlung mit nicht eingeschlossenem Cisplatin in den nicht resistenten Zellen zu einer ca. dreifach höheren Platinierungsrate führt.

Dabei ist es auch hier erstaunlich, dass sich die Überwindung der Chemoresistenz sowie die gesteigerte Effektivität der Cisplatinliposomen in resistenten Zellen im Vergleich zu mit freiem Cisplatin behandelten Zellen nicht in Form einer gesteigerten DNA-gebundenen Platinmenge zeigt.

Die oben beschriebene Charakterisierung der Liposomen und des Zellsystems führt zunächst zu dem Ergebnis, dass die verwendeten Liposomen mit Größen deutlich kleiner als 150 nm für die Induzierung einer endozytotischen Aufnahme durch die Zellen abseits bestehender Resistenzmechanismen wie z.B. einer Veränderung der Influxtransporter geeignet sind. Auch eine Kopplung an Proteine für ein potentielles Tumor-*targeting* ist möglich, wie die erfolgreiche Oberflächenmodifizierung der Liposomen mit Holotransferrin zeigt. Den am stärksten variierenden Parameter bei der Herstellung stellt der Einschluss des Cisplatins dar. Hierbei ergeben sich für verschiedene liposomale Cisplatinformulierungen Endkonzentrationen von ca. 300 bis 1200 µmol/L. Dies ist für die durchgeführten *in vitro* Versuche dieser Arbeit jedoch vorerst unbedeutend, da bei den untersuchten

Cisplatinkonzentrationen eine Toxizität der Lipide experimentell ausgeschlossen wurde. Für perspektivische *in vivo* Versuche mit einem begrenzten Injektionsvolumen muss die Ineffizienz des Wirkstoffeinschlusses jedoch beachtet werden.

Die cisplatinresistenten A2780cis-Zellen liefern im Vergleich zu den A2780-Zellen eine wie in der Literatur beschriebene Cisplatinresistenz, durch die die resistenten Zellen je nach ausgesäter Zellzahl und Inkubationsdauer eine 2,2- bis 4,4-fach höhere Konzentration an freiem Arzneistoff tolerieren. Diese kann durch den Einsatz der Cisplatinliposomen deutlich zurückgedrängt und nach 72 h sogar nivelliert werden, wie ein Rückgang der Resistenzfaktoren auf 1,1 bzw. 1,3 verdeutlicht. Trotz dieser resistenzüberwindenden hohen Zytotoxizität der Cisplatinliposomen führt eine Behandlung mit diesen nicht zu höheren intrazellulären Platinkonzentrationen oder einer gesteigerten DNA-Platinierung, wie es zunächst das Prinzip der Liposomen als reine Wirkstoffträger voraussetzt. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass Liposomen keinen anderen Effekt auf den Influxtransporter CTR1 haben als freies Cisplatin.

Somit stellt sich die Frage nach dem Hintergrund des Einflusses der Liposomen auf die Chemoresistenz der Ovarialkarzinomzellen, der offenbar abseits einer Erhöhung intrazellulärer und DNA-gebundener Platinkonzentrationen existiert.

Dies gab den Anlass, in Kooperation mit dem Institut für Anthropologie und Humangenetik in Düsseldorf einen *gene array* mit den A2780- und A2780cis-Zellen durchzuführen, die zuvor mit freiem Cisplatin oder Cisplatinliposomen behandelt wurden. Die Vorbehandlung der Zellen wurde von Frau Michaela Borrmann und der *gene array* von Herrn Dr. PD Hans-Dieter Royer in Düsseldorf durchgeführt und in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Martin Koch ausgewertet. Die daraus erhaltenen Daten, die weiterer Ausgangspunkt dieser Arbeit sind, werden im Folgenden (Kapitel 5.2) in Ausschnitten rekapituliert. Eine ausführliche Erläuterung ist in der Veröffentlichung von KOCH ET AL.<sup>298</sup> zu finden.

## 5.2 Einfluss der Cisplatinliposomen auf Transkriptionsebene

Der beschriebene *gene array* wurde ausgewertet, indem jeweils zwei Datensätze mit Unterstützung mehrerer spezieller Auswertungsprogramme verglichen wurden. Daraus können die Konsequenz einer bestimmten Behandlung abgeleitet oder Transkriptome verschiedener Zelllinien verglichen werden. Die Ergebnisse zeigen somit eine relative Über- oder Unterexpression im Verhältnis zum gewählten Vergleich.

Die Ansätze, die ausgewählt wurden, beinhalteten:

- unbehandelte A2780- und A2780cis-Zellen
- unbehandelte A2780cis-Zellen im Vergleich zu mit freiem Wirkstoff behandelten A2780cis-Zellen
- mit Leerliposomen behandelte A2780cis-Zellen im Vergleich zu mit Cisplatinliposomen behandelten A2780cis-Zellen.

Diese Behandlungsmethoden geben Aufschluss über die Resistenzsignatur der resistenten A2780cis-Zellen, also prinzipielle Unterschiede der mRNA-Expression zwischen den für diese Arbeit verwendeten resistenten und nicht resistenten Ovarialkarzinomzellen. Außerdem wird der Einfluss einer Cisplatinbehandlung durch freien Wirkstoff oder Cisplatinliposomen auf die resistenten Zellen abgeklärt.

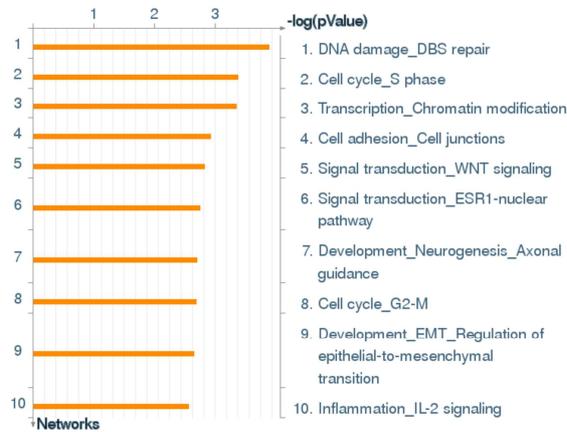
Mithilfe der verwendeten Software können die transkriptionell beeinflussten Gene nach Lokalisation in der Zelle, Funktion des resultierenden Proteins und zellulärem Prozess eingeteilt werden und nach Abgleich mit publizierten Daten und hinterlegten Datenbanken auch entsprechenden Signalkaskaden zugeordnet werden.

### 5.2.1 Die Resistenzsignatur der Ovarialkarzinomzellen

Die Chemoresistenz kann in den unbehandelten cisplatinresistenten A2780cis-Zellen durch die Transkriptionsanalyse deutlich sichtbar gemacht werden. Ein Großteil der hochregulierten Gene ist direkt oder indirekt mit einer Cisplatinresistenz verknüpft.

Hauptsächlich sind diese Gene Vorgängen in den Zellorganellen, darunter auch den Mitochondrien, zuzuordnen. Funktionell sind die aus den Genen resultierenden Proteine unter anderem Transferasen, Hydrolasen, Kinasen und Oxidoreduktasen. Unter den am stärksten regulierten Prozessen sind Zellmetabolismus, Zellzyklus und Reaktion auf oxidativen Stress, die alle gegenregulierend in die Cisplatintoxizität eingreifen können.

Die Zuordnung zu zellulären Signalwegen ergab unter den zehn am stärksten regulierten Vorgängen auch eine Beeinflussung der Chromatinmodifikation, der Zelladhäsion und des Wnt-Signalwegs, welche im Zusammenhang mit Cisplatinresistenz stehen (Abb. 5.10).

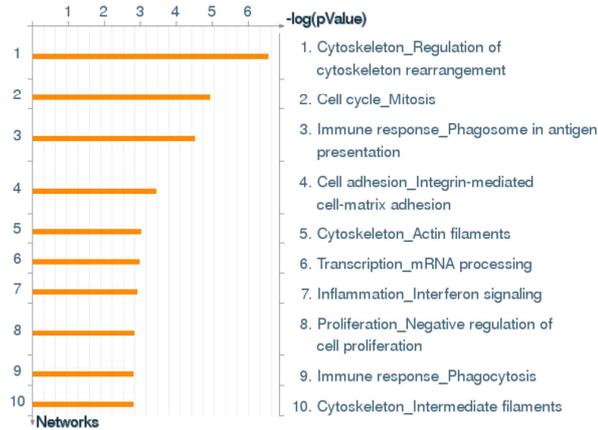


**Abb. 5.10:** Identifizierung der zehn am stärksten regulierten *GeneGO process networks* in chemoresistenten A2780cis-Ovarialkarzinomzellen. Abbildung zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer des Instituts für Anthropologie und Humangenetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### 5.2.2 Beeinflussung der Transkription durch freies Cisplatin

Die durch freien Wirkstoff beeinflussten zellulären Vorgänge sind zu einem großen Teil den Zellorganellen wie den Mitochondrien, speziell der inneren Mitochondrienmembran zuzuordnen. Das Muster und die Verteilung der molekularen Proteinfunktionen sind dabei sehr ähnlich zu den unbehandelten A2780cis-Zellen, was den Zusammenhang zwischen den in resistenten Zellen im Vergleich zu nicht resistenten Zellen veränderten Vorgängen und der zellulären Antwort auf eine Cisplatinbehandlung deutlich aufzeigt. Neben einer erhöhten Transkription von Genen, die mit zellulärem Stress assoziiert sind, ist bei den mit der  $EC_{50}$  von freiem Wirkstoff inkubierten Zellen eine Regulierung des Zelltodes auf mRNA-Ebene zu erkennen.

Die vier Signalwege, die am meisten auf eine toxische Cisplatinkonzentration reagieren, greifen in das Zytoskelett, die Adhäsion, die Immunantwort und die Mitose ein.

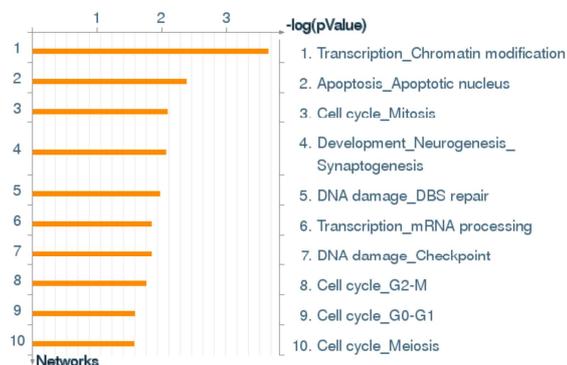


**Abb. 5.11:** Identifizierung der zehn am stärksten regulierten *GeneGO process networks* in chemoresistenten A2780cis-Ovarialkarzinomzellen nach der Behandlung mit der  $EC_{50}$  (11  $\mu\text{mol/L}$ ) an freiem Cisplatin; Abbildung zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer des Instituts für Anthropologie und Humangenetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### 5.2.3 Beeinflussung der Transkription durch Cisplatinliposomen

Die mit Cisplatinliposomen inkubierten A2780cis-Zellen weisen 353 signifikant beeinflusste Gene auf, die bei Zellen, die mit freiem Wirkstoff behandelt wurden, nicht reguliert werden.

Die Transkription dieser Gene zeigt vorwiegend Abläufe, die in allen Zellorganellen sowie im Bereich der Nukleosomen, Chromosomen und des Chromatins lokalisiert sind. Als molekulare Funktion der transkribierten Proteine steht DNA- und Proteinbindung im Vordergrund. Die hauptsächlich regulierten Prozesse sind Nukleosomenneuordnung, Protein-/DNA-Komplexformierung und Chromatinanordnung. Auffällig ist, dass sich sowohl Lokalisation, Funktion als auch Art der Prozesse stark von denen der Resistenzsignatur und der Reaktion auf freien Wirkstoff unterscheiden.



**Abb. 5.12:** Identifizierung der zehn am stärksten regulierten *GeneGO process networks* in chemoresistenten A2780cis-Ovarialkarzinomzellen nach der Behandlung mit der  $EC_{50}$  (11  $\mu\text{mol/L}$ ) an liposomalem Cisplatin; Abbildung zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer des Instituts für Anthropologie und Humangenetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Da neben den Chromatinmodifikationen auch die apoptotischen Prozesse im Bereich des Zellkerns die Signalwege sind, die am meisten in ihrer Transkription beeinflusst sind, wurden in einem nächsten Schritt alle regulierten Gene, die mit p53 in Zusammenhang stehen, aus dem Datensatz extrahiert.

#### **5.2.4 p53-abhängige Unterschiede in der transkriptionellen Antwort**

Betrachtet man die p53-abhängigen Gene, die in den resistenten Ovarialkarzinomzellen beeinflusst werden, sind 89 Gene nach einer Behandlung mit freiem Cisplatin reguliert und 60 Gene nach liposomaler Behandlung.

Die Analyse der Signalwege zeigt dabei für freien Wirkstoff eine Aktivierung von Stressgenen und apoptoseregulierenden Genen. Dazu in Kontrast steht die Aktivierung von Genen, die auf DNA-Stimuli reagieren, und apoptoseregulierenden Genen in Zellen, die mit Cisplatinliposomen inkubiert wurden.

Die zusammengenommenen Erkenntnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die Resistenz der A2780cis-Zelllinie stark mit Prozessen in den Mitochondrien assoziiert ist. Freies Cisplatin hat in diesen Zellen hauptsächlich eine Induktion der Apoptose als Reaktion auf oxidativen Stress zur Folge. Cisplatinliposomen hingegen bewirken eine Hochregulierung von Signalen, die auf DNA-Stress antworten. Als Schlüsselgen für die zur Apoptose führenden Vorgänge wurde p53 identifiziert, das in den hier verwendeten Zellen nicht mutiert ist und Voraussetzung für den Liposomeneffekt sowie die Toxizität des freien Arzneistoffes zu sein scheint.

Die Umgehung der Chemoresistenz durch die Liposomen scheint also auf der Ebene des apoptotischen Geschehens zu erfolgen, da sich die zelluläre Antwort der beiden Behandlungsmethoden signifikant unterscheidet und eine Erhöhung intrazellulärer Platinkonzentrationen als Ursache für die hohe Toxizität der Liposomen in resistenten Zellen ausgeschlossen werden kann (Abschnitt 5.1.3 und 5.1.5).

Diese Erkenntnis bildet nach der Etablierung des Versuchssystems aus Liposomen und Zellmodell (Kapitel 5.1) den weiteren Ausgangspunkt dieser Arbeit. Durch die Transkriptionsanalyse zeigen sich zwar eindeutige Unterschiede in der Aktivierung der intrazellulären Signalwege, die jedoch mit dieser Methode nicht weiter spezifiziert werden können. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Zellversuche wie Analysen der Proteinexpression und Inhibitorstudien mit Schlüsselproteinen des Apoptosesignalwegs

durchgeführt, um die molekularen Mechanismen der Resistenzüberwindung in Ovarialkarzinomzellen durch Cisplatinliposomen aufzuklären.

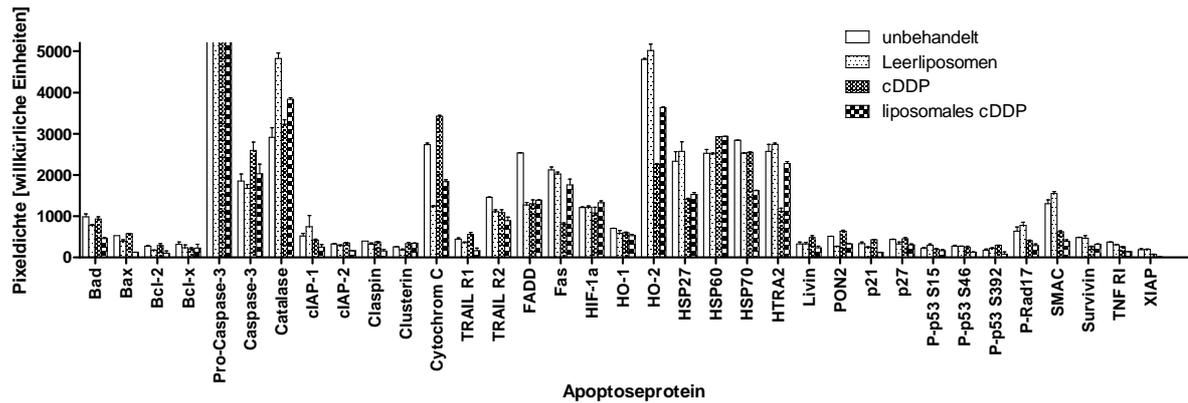
### **5.3 Durch Cisplatinliposomen aktivierte intrazelluläre Signalwege**

Die untersuchte resistente Ovarialkarzinomzelllinie zeigt nach einer Behandlung mit liposomalem Cisplatin im Vergleich zu freiem Arzneistoff wieder ein erhöhtes Ansprechen auf die zytotoxischen Effekte des Cisplatins. Außerdem stellen die *gene array*-Analysen mitochondriale und p53-abhängige Prozesse als Hauptmechanismen der Cisplatinresistenz und der Cisplatineffekte heraus. Da sowohl Mitochondrien als auch das Tumorsuppressorprotein p53 eine Hauptfunktion bei der Apoptose haben, wurden im Folgenden apoptoserelevante Signalwege genauer betrachtet, um einen Einfluss der Cisplatinliposomen abzuklären.

#### **5.3.1 Proteinexpression von apoptoseinduzierenden Proteinen**

Um erste Einblicke in die cisplatininduzierte Apoptose zu erhalten, wurde ein Protein-*array*, der ein breites Spektrum von 33 an der Apoptose beteiligten Proteinen detektiert, mit der resistenten Zelllinie durchgeführt. Die untersuchten Signalwege des *arrays* können dabei grob in Apoptose auf Effektorebene, intrinsische Apoptose, extrinsische Apoptose, Apoptoseinhibition, oxidativen Stress und Zellzyklusarrest eingeteilt werden, wobei einzelne Proteine wie z.B. p53 auch übergreifende Funktionen wahrnehmen. Als Vergleich für eine Beurteilung der Stärke des Effektes und zum Ausschluss von Begleiteffekten wurden ebenfalls unbehandelte Zellen und mit Leerliposomen behandelte Zellen untersucht.

## Ergebnisse und Diskussion



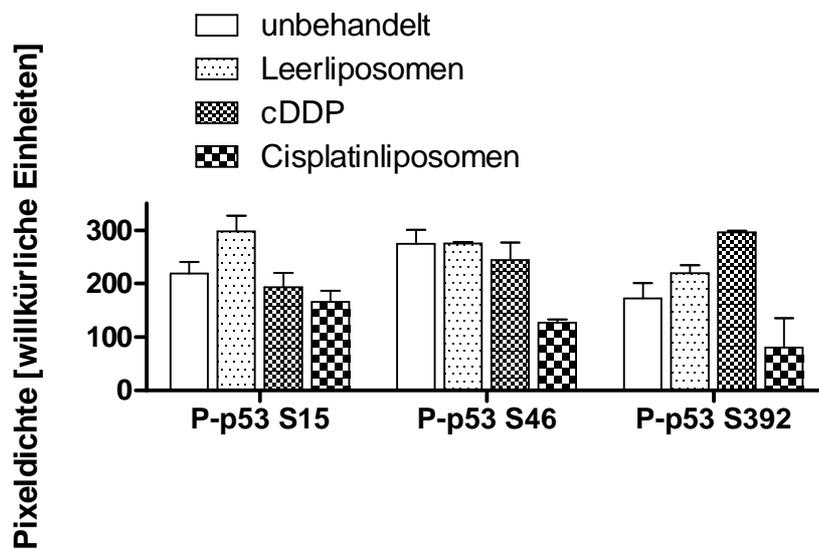
**Abb. 5.13:** Gesamtübersicht über die 33 Proteine des Apoptose-arrays und deren Lumineszenzsignal als Pixeldichte; es wurden Proteinlysate von unbehandelten A2780cis-Zellen (weiß) sowie mit Leerliposomen (gepunktet), freiem Wirkstoff (kleinkariert) und Cisplatinliposomen (großkariert) behandelten A2780cis-Zellen untersucht (Inkubationszeit: 72 h). Pro-Caspase-3 ergab für unbehandelte Zellen das größte Signal mit einer Intensität von 14.000. Zur besseren Übersichtlichkeit werden hier nur Signale bis 5000 dargestellt.

Die am stärksten in den resistenten Zellen exprimierten Apoptoseproteine, unabhängig von der Behandlungsmethode, sind Caspase-3 und Pro-Caspase-3, Catalase, Cytochrom C, FADD, Fas, Hämoxxygenase-2, die HSPs und HTRA2 (Abb. 5.13). Die Regulatorproteine p21, p27 und p53 sowie Proteine der Mitochondrienmembran wie Bad, Bax, Bcl-2 und Bcl-x liegen in deutlich geringerer Menge auf der *array*-Membran gebunden vor.

Dies zeigt unter anderem die starke Multiplizierung des Apoptosesignals, da Proteine, die eine eher initiale Stellung in der Apoptosekaskade innehaben (p53, mitochondriale Membranproteine), im Vergleich in wesentlich geringerer Quantität vorkommen als Proteine näher am Ende des Signalwegs (Cytochrom C, HSPs, Caspase-3). Die relativ hohe Expression der Todesrezeptorproteine, die wie die Mitochondrienproteine am Anfang eines apoptotischen Signals stehen, folgt dieser Argumentation nicht ganz, was auf eine Regulation hindeutet, die nicht nur durch Transkription, sondern auch durch Translokation zur Zellmembran von konstitutiv exprimierten Proteinen vollzogen wird. Daher ist auch generell bei der Bewertung der Ergebnisse zu beachten, dass Expressionsunterschiede der Apoptoseproteine zwar einen deutlichen Anhaltspunkt für die Prävalenz eines Signalwegs geben, jedoch keine absoluten Aussagen über die Aktivität eines einzelnen Proteins erlauben.

### 5.3.1.1 Induktion und Effektorebene der Apoptose

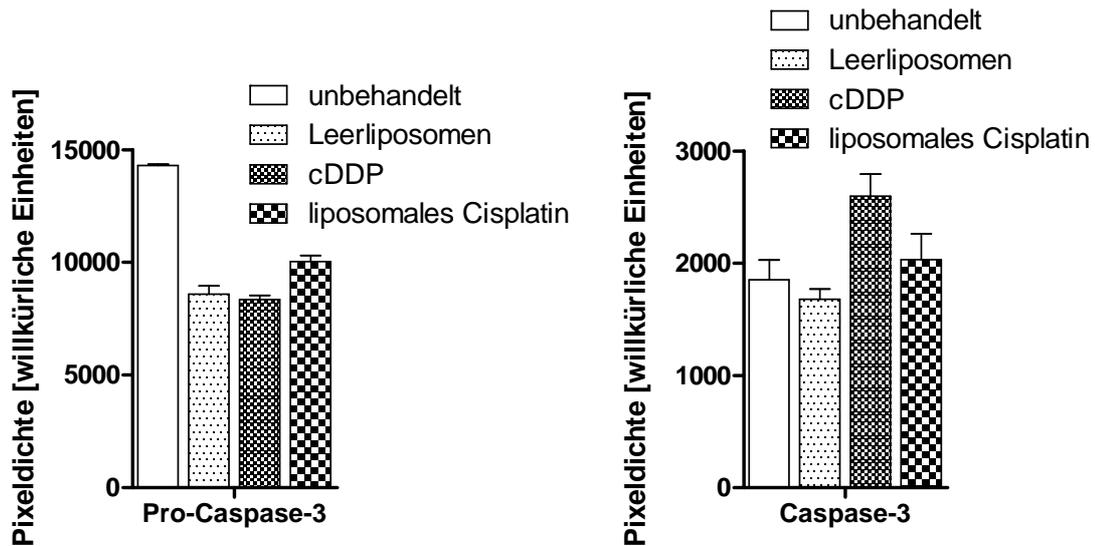
Durch auf dem *array* befindliche Antikörper gegen phosphoryliertes p53 und die aktive Form und Vorläuferform der Caspase-3 können zunächst Start- und Endpunkt der Apoptose für beide Behandlungsmethoden, Liposomen gegenüber freiem Wirkstoff, analysiert werden.



**Abb. 5.14:** Proteinexpression von an Serin 15, 46 oder 392 phosphoryliertem p53 gemessen als Lumineszenzsignal eines sekundär gebundenen Antikörpers in A2780cis-Zellen, die nicht (weiß), mit Leerliposomen (gepunktet), mit freiem Wirkstoff (kleinkariert) oder liposomalem Cisplatin (großkariert) über 72 h behandelt wurden.

Liposomales Cisplatin führt zu einer geringeren Phosphorylierung von p53 als der freie Wirkstoff, die sogar ebenfalls die Phosphorylierung in unbehandelten und mit Leerliposomen behandelten Zellen unterschreitet (Abb. 5.14). Freies Cisplatin unterscheidet sich nicht signifikant im p53-Phosphorylierungsgrad von unbehandelten Zellen, außer in der Phosphorylierung an Serin 392. Dort kann eine gesteigerte Proteinmenge festgestellt werden, die den einzigen Hinweis auf eine Stimulation der Apoptose über p53 darstellt.

Die starke p53-Abhängigkeit der Cisplatintoxizität, wie die Transkriptionsanalyse sie herausstellt (Kapitel 5.2), kann auf Proteinebene nicht deutlich über die Detektion von phosphoryliertem p53 gezeigt werden, insbesondere dadurch, dass die absoluten Werte der Pixeldichte für p53 im Bereich des abgezogenen Blindwertes liegen. Außerdem könnte eine Inkubationszeit von 72 h zu lang sein, um das erste Molekül der Kaskade zu betrachten.



**Abb. 5.15:** Proteinexpression von Pro-Caspase-3 und aktiver Caspase-3 gemessen als Lumineszenzsignal eines sekundär gebundenen Antikörpers in A2780cis-Zellen, die nicht (weiß), mit Leerliposomen (gepunktet), mit freiem Wirkstoff (kleinkariert) oder liposomalem Cisplatin (großkariert) über 72 h behandelt wurden.

Vergleicht man die Expression der aktiven Caspase-3 (Abb. 5.15, rechts), ist gegenüber unbehandelten Zellen für den freien Wirkstoff ein deutlicher Anstieg der Expression zu sehen. Dieser ist für liposomales Cisplatin ebenfalls zu verzeichnen, gerade wenn man die Expression mit der von mit Leerliposomen behandelten Zellen vergleicht.

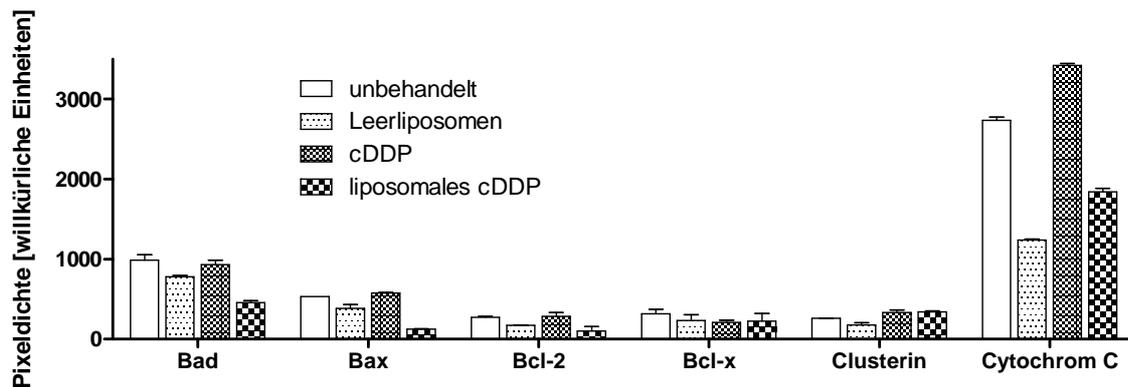
Dies zeigt, dass beide Formulierungen in der Lage sind, auf Effektorebene Apoptose zu induzieren und dass auch andere beobachtete Expressionsunterschiede bei cisplatinbehandelten Zellen (frei oder liposomal) apoptoseinduziert und nicht konstitutiv sind.

Sowohl Leerliposomen als auch beide Cisplatinbehandlungen führen zu einer geringeren Expression der Pro-Caspase-3 (Abb. 5.15, links). Bei den beiden zytotoxischen Formulierungen kann dies auf eine Umwandlung in die aktive Form zurückgeführt werden, während der reine Lipideffekt der Leerliposomen sich nur auf die Pro-Caspase-3 auswirkt, bei der aktiven Form jedoch keine erhöhte Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen sichtbar wird.

Dieser Lipideffekt könnte bei den Cisplatinliposomen auch der Grund für die geringeren absoluten Werte bei der Induktion der Caspase-3-Expression im Vergleich zu freiem Wirkstoff sein (Abb. 5.15, rechts), da die Expressionssteigerung eigentlich vom Grundniveau der Leerliposomen aus erfolgt.

### 5.3.1.2 Intrinsische Apoptose

Der intrinsische Apoptoseweg wird hauptsächlich durch DNA-Schäden über p53 induziert. Dabei liegt der Stimulus im intrazellulären Bereich und wirkt sich dort über die Proteine der äußeren Mitochondrienmembran (Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-x) in Form eines Cytochrom C-Ausstromes aus, der die Formierung des Apoptosomes herbeiführt, dessen Konsequenz letzten Endes eine Caspase-9-Aktivierung ist. Diese leitet dann das Signal auf die Effektorebene an die Caspasen-3,-6 und -7 weiter (Abschnitt 2.2.2.1).



**Abb. 5.16:** Proteinexpression von Apoptoseproteinen, die an der intrinsischen Apoptose beteiligt sind, gemessen als Lumineszenzsignal eines sekundär gebundenen Antikörpers in A2780cis-Zellen, die nicht (weiß), mit Leerliposomen (gepunktet), mit freiem Wirkstoff (kleinkariert) oder liposomalem Cisplatin (großkariert) über 72 h behandelt wurden.

Zunächst fällt auf, dass die Expression der hier gezeigten Apoptoseproteine in Zellen, die mit Leerliposomen behandelt wurden, niedriger ist als in unbehandelten Zellen (Abb. 5.16, gepunkteter Balken). Da die Leerliposomen auch in *assays* zur Zytotoxizität (Abschnitt 5.1.2.3) kein Zellsterben induzierten, ist es nicht verwunderlich, dass sie auch auf dem intrinsischen Apoptoseweg keine Todessignale übermitteln. Die zusätzliche Senkung in der Expression wirkt sich gleichmäßig auf pro- und antiapoptotische Proteine aus. Bezogen auf Cytochrom C scheint das letztlich an die Effektorcaspasen übermittelte Signal durch Leerliposomen auf dem intrinsischen Weg sogar antiapoptotisch zu sein.

Freies Cisplatin (Abb. 5.16, kleinkariert) bewirkt keine Veränderung bei Bad und Bcl-2 im Vergleich zu unbehandelten Zellen, jedoch eine Erhöhung der Expression von Bax und Erniedrigung bei Bcl-x. Dies resultiert in einem erhöhten Bax:Bcl-2-Verhältnis, welches als ausschlaggebend für die weitere Aktivierung der intrinsischen Apoptose gilt.

Aus der Behandlung mit Cisplatinliposomen (Abb. 5.16, großkariert) resultiert eine deutliche Unterexpression der proapoptotischen Proteine Bad und Bax. Diese ist sogar so stark, dass die

zusätzlich eintretende verminderte Bcl-2-Expression auf das Bax:Bcl-2-Verhältnis keine antiapoptotische Konsequenz (Bax:Bcl-2 ~ 1) hat.

Der Gesamteinfluss der verschiedenen Behandlungsmethoden auf die intrinsische Apoptose wird deutlich, wenn man die Cytochrom C-Expression betrachtet, die die zelluläre Antwort auf das Zusammenspiel der gerade beschriebenen mitochondrialen Proteine darstellt. Hier haben beide liposomalen Formulierungen eine starke Unterexpression sogar unter das Niveau der unbehandelten Zellen zur Folge. Der freie Wirkstoff hingegen bewirkt eine höhere Expression von Cytochrom C.

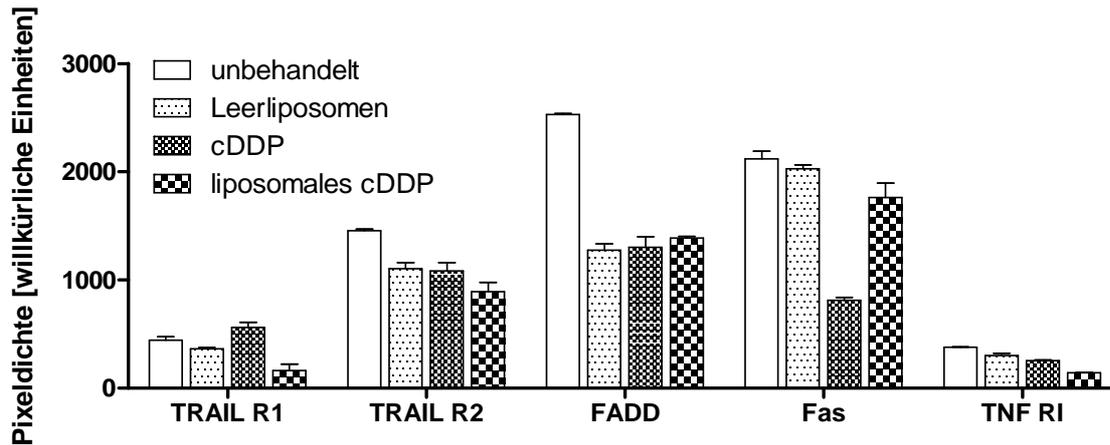
Da Cytochrom C sich direkt auf Caspase-9 und die Formierung des Apoptosomes auswirkt, wird die Unterdrückung des intrinsischen Signals durch Cisplatinliposomen offensichtlich. Dieser Effekt kann auch mit Leerliposomen beobachtet werden. Dies zeigt, die Untoxizität der leeren Liposomen vorausgesetzt (Abschnitt 5.1.2.3), dass die liposomale Formulierung des Wirkstoffes entscheidend für die Beeinflussung des Signalweges ist, die beobachtete Wirksamkeit der cisplatinhaltigen Liposomen jedoch durch das Zytostatikum verursacht wird.

Der freie Arzneistoff erhöht im Einklang mit bisherigen Erkenntnissen (Abschnitt 2.2.2.2) die Cytochrom C-Expression, was die Vermittlung seiner zytotoxischen Wirkung über den intrinsischen Apoptoseweg verdeutlicht.

Die aus Gründen der Vollständigkeit angeführte Expression von Clusterin ist durch Leerliposomen leicht nach unten und mit den beiden cisplatinhaltigen Formulierungen in gleichem Maße nach oben beeinflusst, was jedoch nicht die starke Beeinflussung des Cytochrom C widerspiegelt. Die genaue Funktion des Proteins bei der Apoptose wird diskutiert. Vermutlich inhibiert es die intrinsische Apoptose durch eine Interaktion mit Bax.<sup>299</sup> In den hier verwendeten A2780cis-Zellen scheint es jedoch keinen oder einen nur sehr geringen Einfluss auf die intrinsische Apoptose zu haben.

### **5.3.1.3 Extrinsische Apoptose**

Die extrinsische Apoptose wird durch die Gruppe der Todesliganden wie z.B. FasL und TRAIL ausgelöst, die mit ihren entsprechenden Rezeptoren interagieren. Diese wiederum leiten über ihre Interaktionspartner, Proteine, die DD und DED enthalten, das Signal intrazellulär an Caspase-8 weiter. Die Expression der Liganden ist dabei auch p53-abhängig.



**Abb. 5.17:** Proteinexpression von Apoptoseproteinen, die an der extrinsischen Apoptose beteiligt sind, gemessen als Lumineszenzsignal eines sekundär gebundenen Antikörpers in A2780cis-Zellen, die nicht (weiß), mit Leerliposomen (gepunktet), mit freiem Wirkstoff (kleinkariert) oder liposomalem Cisplatin (großkariert) über 72 h behandelt wurden.

Betrachtet man die TRAIL-Rezeptoren sind sie nach einer Behandlung mit freiem Wirkstoff stärker exprimiert als nach einer Behandlung mit Cisplatinliposomen (Abb. 5.17, links), im Fall des TRAIL R2 jedoch für beide Formulierungen weniger stark als in unbehandelten Zellen. Bei Fas (Abb. 5.17, mittig rechts), einem ebenfalls transmembranären Todesrezeptor, verhält es sich genau umgekehrt. Nach einer liposomalen Behandlung ist mehr als doppelt so viel des Proteins vorhanden wie nach der Inkubation mit freiem Cisplatin, aber auch hier generell weniger als in unbehandelten Zellen.

Dies zeigt den Resistenzmechanismus in Form einer Unterexpression von Fas, wie er für verschiedene Zelltypen beschrieben wurde<sup>300</sup>, der jedoch durch eine liposomale Formulierung fast bis auf das Niveau von unbehandelten Zellen wieder aufgehoben werden kann.

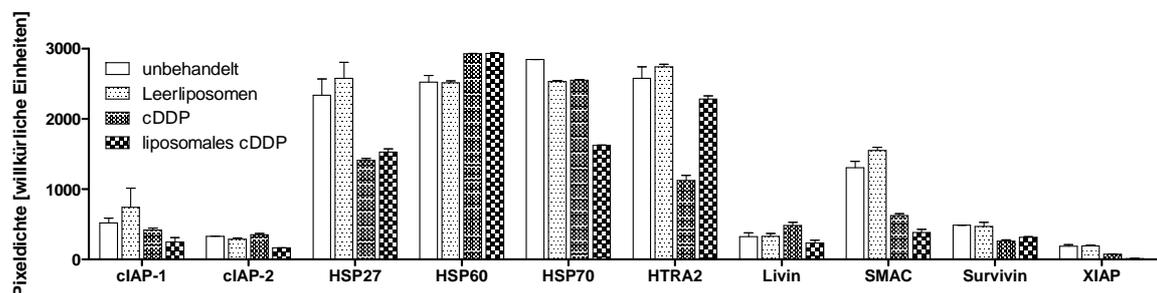
Da FADD (Abb. 5.17, mittig) als Bindungspartner und Vermittler zur Caspase-9 für TRAIL-Rezeptoren und Fas agiert, äußern sich die Unterschiede in der Expression für freien Wirkstoff und Cisplatinliposomen zwar bei den einzelnen Rezeptoren, resultieren jedoch in einer in etwa gleichen FADD-Expression.

Die Leerliposomen regulieren FADD jedoch erstaunlicherweise ebenso stark nach unten wie beide Cisplatinbehandlungen, obwohl es auf die Todesrezeptoren selbst keinen so großen Einfluss hat wie die cisplatinhaltigen Formulierungen. Wie eine reine Lipidformulierung einen so starken Effekt auf ein intrazelluläres Protein haben kann, der jedoch auch mit nicht liposomal eingeschlossenem Wirkstoff auftritt, bleibt dabei unklar. Eventuell handelt es sich bei den Mechanismen, die bei freiem Cisplatin und Cisplatinliposomen zu einer FADD-Unterexpression führen, um grundverschiedene Vorgänge.

Der TNF R1 (Abb. 5.17, rechts) scheint aufgrund seiner geringen Expression bei allen Behandlungsmethoden im quantitativen Vergleich für die Induktion der Apoptose in den A2780cis-Zellen von untergeordneter Bedeutung zu sein. Seine Expression geht nach einer Inkubation mit Cisplatinliposomen im Vergleich zu unbehandelten Zellen etwas stärker zurück als nach der Behandlung mit freiem Wirkstoff. Das Auslösen einer starken Toxizität in resistenten Zellen über TNF R1 ist für beide Formulierungen unwahrscheinlich.

### 5.3.1.4 Inhibition der späten Apoptose

Nach der Initiation des Zelltods hat die Zelle trotz der einhergehenden Signalverstärkung die Möglichkeit, die Apoptosekaskade an verschiedenen Stellen zu unterbrechen (Abschnitt 2.2.2). Auf dem intrinsischen Signalweg kann das Apoptosom durch HSPs inhibiert werden, während auf der Effektorebene die Konsequenzen beider Hauptsignalwege durch IAPs unterbrochen werden können. Die IAPs können wiederum durch die Mitochondrienproteine SMAC und HTRA2 in ihrer Funktion gebremst werden. Es handelt sich also um Inhibitoren der Inhibitoren oder indirekte Agonisten der späten Apoptose.



**Abb. 5.18:** Proteinexpression von physiologischen Apoptoseinhibitoren und deren Inhibitoren gemessen als Lumineszenzsignal eines sekundär gebundenen Antikörpers in A2780cis-Zellen, die nicht (weiß), mit Leerliposomen (gepunktet), mit freiem Wirkstoff (kleinkariert) oder liposomalem Cisplatin (großkariert) über 72 h behandelt wurden.

HSP27 und HSP60 sind nach der Inkubation mit freiem Arzneistoff und liposomalem Cisplatin in etwa gleich reguliert. Bei HSP 27 liegt das Niveau unterhalb der unbehandelten Zellen, bei HSP 60 oberhalb. Für das getestete HSP mit dem höchsten Molekulargewicht, HSP70, zeigt sich ein deutlicher Einfluss der liposomalen Formulierung, indem es um mehr als ein Drittel weniger exprimiert wird als in den resistenten Zellen, die mit freiem Wirkstoff behandelt wurden. Dies erlaubt dem Apoptosom verstärkt Einfluss auf Caspase-9 zu üben. Zudem kann die Caspase in den mit liposomalem Cisplatin beimpften Zellen freier agieren, da dort mehr HTRA2 vorhanden ist (Abb. 5.18, mittig rechts), welches wiederum die IAPs hemmt.

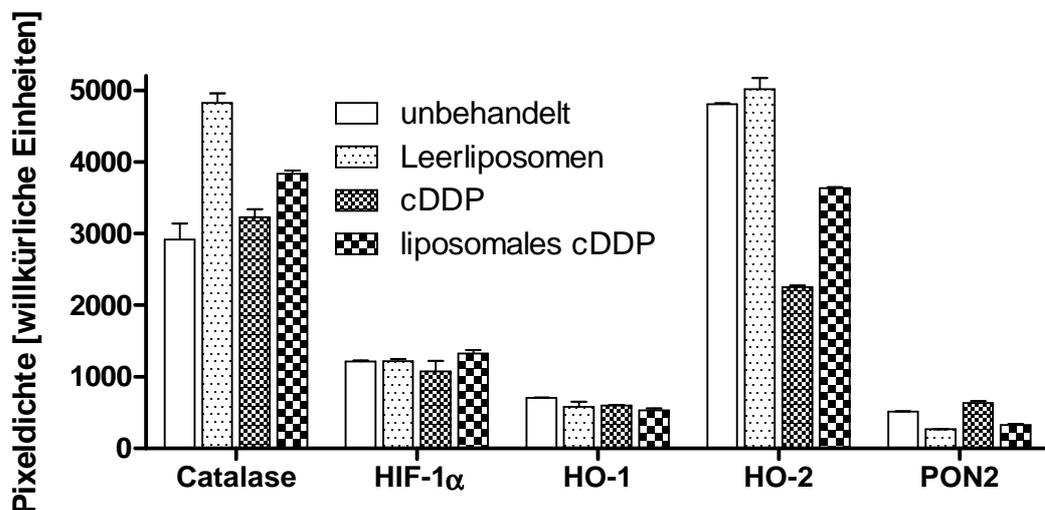
Bei dieser Klasse Apoptoseinhibitoren, die das hier untersuchte cIAP-1, cIAP-2 und XIAP umfasst, verursachen Cisplatinliposomen (Abb. 5.18, großkariert) eine Unterexpression im Vergleich zu freiem Wirkstoff. Dies zeigt sich auch bei Livin, lediglich bei Survivin liegt die Expression der mit freiem Cisplatin behandelten Zellen höher als bei mit Cisplatinliposomen behandelten.

Zusammengenommen ist nach der Behandlung mit Cisplatinliposomen auf Expressionsebene eine Enthemmung der Apoptose zu beobachten.

Die Lipide der Liposomenhülle bewirken im Vergleich zu unbehandelten Zellen keinen ausschlaggebenden Unterschied in der Proteinexpression der oben beschriebenen Proteine.

### 5.3.1.5 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress, wie er durch eine Verarmung an Antioxidantien und die mit einer Cisplatinbehandlung einhergehende Erhöhung der Konzentration an ROS entsteht, kann letztlich ebenfalls zu Apoptose führen (Abschnitt 2.2.3). Damit leistet er, falls aktiviert, einen Beitrag zur Zytotoxizität.



**Abb. 5.19:** Proteinexpression von antioxidativen Proteinen und Hypoxiemarkern gemessen als Lumineszenzsignal eines sekundär gebundenen Antikörpers in A2780cis-Zellen, die nicht (weiß), mit Leerliposomen (gepunktet), mit freiem Wirkstoff (kleinkariert) oder liposomalem Cisplatin (großkariert) über 72 h behandelt wurden.

Die Expression des Hypoxiemarkers HIF-1 $\alpha$  und der Hämoxygenase-1 ist bei keiner der unternommenen Inkubationsmethoden maßgeblich beeinflusst. Die Unterexpression der Hämoxygenase-2 wirkt sich jedoch stärker nach einer Behandlung mit freiem Wirkstoff aus. Dies spricht dafür, dass die so behandelten Zellen weniger imstande sind, oxidativen Stress zu

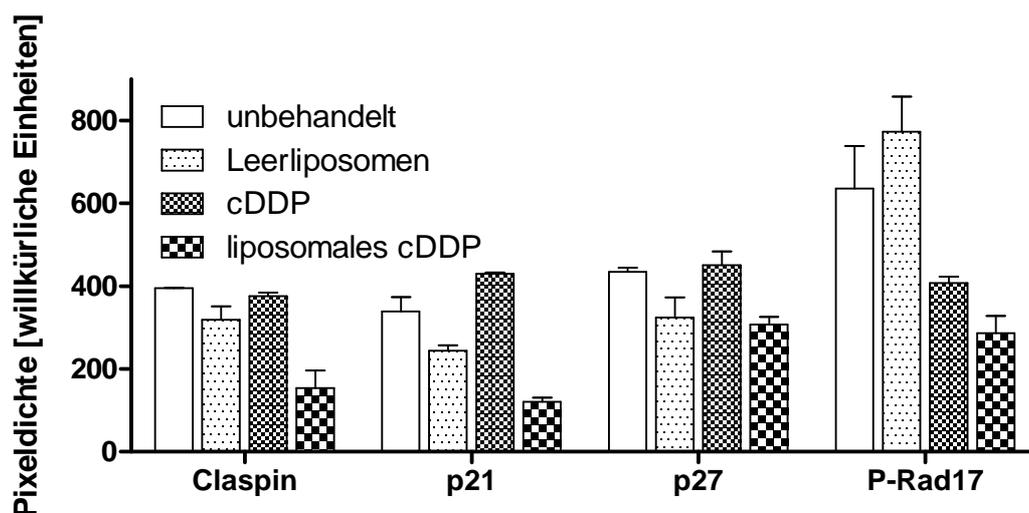
kompensieren, bzw. dass der Beitrag von oxidativem Stress zur Apoptose größer ist (Abb. 5.19).

Das insgesamt in A2780cis-Zellen in wesentlich geringerem Umfang vorhandene, ebenfalls oxidationsprotektive PON-2 ist durch Cisplatinliposomen im Vergleich zu freiem Wirkstoff in seiner Expression zurückgegangen. Von PON-2 kompensierter oxidativer Stress wirkt sich demnach in den liposomal behandelten Zellen stärker aus. Da es sich für die Leerliposomen genauso verhält, scheint es sich um einen Lipideffekt zu handeln.

Einen Lipideffekt sieht man ebenfalls deutlich bei der Catalase, einem Peroxid abbauenden Enzym, dessen Expression in dieser Versuchsreihe durch Leerliposomen und Cisplatinliposomen induzierbar zu sein scheint. Die höhere Expression der Catalase im Vergleich zu unbehandelten Zellen als Reaktion auf beide Cisplatinformulierungen zeigt an, dass die vermehrte Expression in dieser Zelllinie ein Resistenzmechanismus gegen entstehende ROS sein könnte.

### 5.3.1.6 Zellzyklusarrest

In cisplatinbehandelten Zellen kommt es als initiale Reaktion auf das Zytostatikum zunächst über p53-abhängige p21-Aktivierung zum Zellzyklusarrest. Dieser schützt die Zellen unspezifisch gegen Schäden, die durch DNA-bindende Substanzen verursacht werden, und aktiviert sekundär DNA-Reparaturmechanismen (Abschnitt 2.2.3).



**Abb. 5.20:** Expression von zellzyklusregulierenden Proteinen gemessen als Lumineszenzsignal eines sekundär gebundenen Antikörpers in A2780cis-Zellen, die nicht (weiß), mit Leerliposomen (gepunktet), mit freiem Wirkstoff (kleinkariert) oder liposomalem Cisplatin (großkariert) über 72 h behandelt wurden.

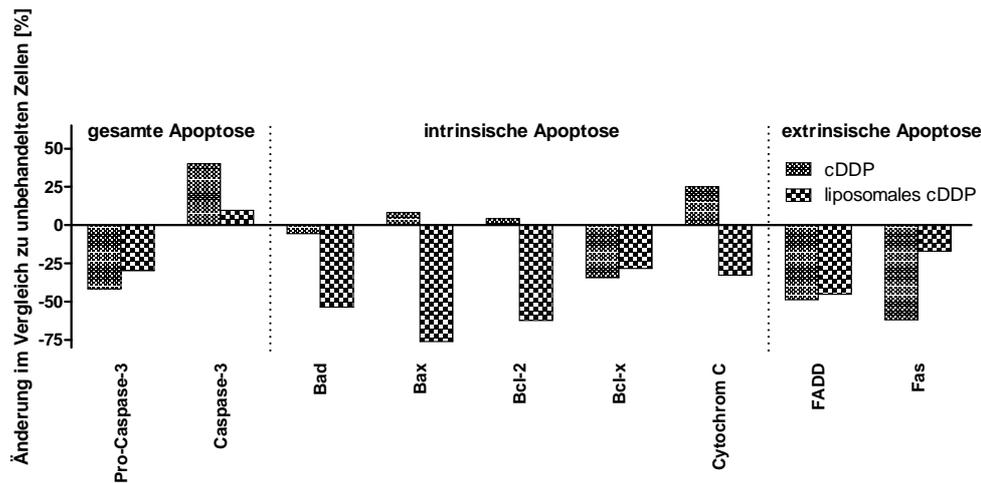
Während freies Cisplatin die Expression von Claspin und der Inhibitoren cyclinabhängiger Kinasen (p21, p27) weitestgehend nicht beeinflusst, wird P-Rad17 nach einer Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen unterexprimiert. Bis auf das in geringerem Umfang vorhandene P-Rad17 zeigen die mit freiem Arzneistoff behandelten Zellen das gleiche Proteinexpressionsmuster, das einen Zellzyklusarrest herbeiführen kann, wie unbehandelte Zellen (Abb. 5.20).

Der liposomal eingeschlossene Wirkstoff verursacht dagegen eine Unterexpression aller hier untersuchten zellzyklusregulierenden Proteine. Da diese sich primär hemmend auf cyclinabhängige Kinasen auswirken, ist die Progression des Zellzyklus in den liposomal mit Cisplatin inkubierten Zellen enthemmt. Durch das geringere Übermitteln von DNA-Reparatur- und Überlebenssignalen, die von den Proteinen des Zellzyklusarrestes übermittelt werden, kommt es indirekt zur Förderung der Apoptose.

Dieser expressionshemmende Liposomeneffekt ist in geringerem Ausmaß auch bei den Leerliposomen zu beobachten, so dass es sich anscheinend auch teilweise um einen Lipideffekt handelt.

Die Ergebnisse des Protein-*arrays* zeigen, dass sowohl freies Cisplatin als auch liposomales Cisplatin unter den gewählten Versuchsbedingungen apoptotisch wirken.

Der freie Wirkstoff verursacht dabei in den resistenten Ovarialkarzinomzellen eine Expressionsantwort, die mit einer Überexpression von Bax und Cytochrom C die Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges repräsentiert (Abb. 5.21, kleinkariert).



**Abb. 5.21:** Relative Expression von Apoptoseproteinen, die am intrinsischen oder extrinsischen Signalweg teilnehmen, sowie der Effektor Caspase-3 im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Zellen wurden über 72 h mit freiem Cisplatin oder Cisplatinliposomen behandelt.

Cisplatinliposomen bewirken bei vergleichbarer Zytotoxizität (Abschnitt 5.1.2.2) eine völlig andere intrazelluläre Antwort. Die Signalproteine des intrinsischen Signalweges sind im Vergleich zu freiem Cisplatin, aber auch zu unbehandelten Zellen (Abb. 5.21, Basislinie) deutlich unterexprimiert. Gleichzeitig ist der Resistenzmechanismus der Unterexpression eines Todesrezeptors deutlich zurückgenommen.

Auch andere an der Apoptose beteiligten Mechanismen bleiben nicht unbeeinflusst. So induziert freies Cisplatin mehr oxidativen Stress. Bei dem durch Cisplatinliposomen verursachten Zelltod kommt es durch den Rückgang und eine zusätzliche Hemmung der inhibitorischen Apoptoseproteine (IAPs) zu einer Entthemmung der späten Apoptose auf Effektorebene. Außerdem ist die Tendenz zum Eintritt in den Zellzyklusarrest geringer als bei freiem Arzneistoff.

Grundsätzlich erfolgt als apoptotische Antwort auf Cisplatin bei den Liposomen ein deutlicher Wechsel vom intrinsischen zum extrinsischen Signalweg. Die Cisplatinliposomen umgehen somit nicht nur zelluläre Aufnahmemechanismen als reine Arzneistofftransporter, sondern auch Resistenzmechanismen, die auf der Modulation von Apoptosesignalwegen beruhen.

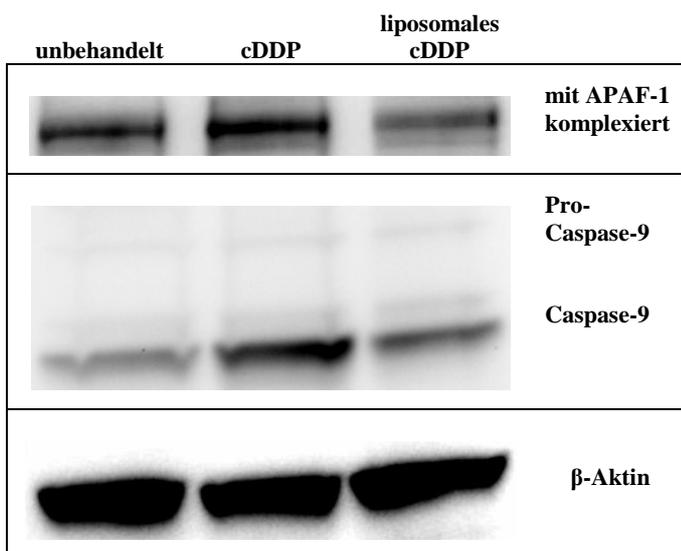
### 5.3.2 Differenzierung des intrinsischen und extrinsischen Signalweges

Da sich durch die Analyse des Protein-arrays eine deutliche Differenzierung der ablaufenden Apoptosewege abzeichnet, die durch die Behandlung mit freiem oder liposomalem Cisplatin

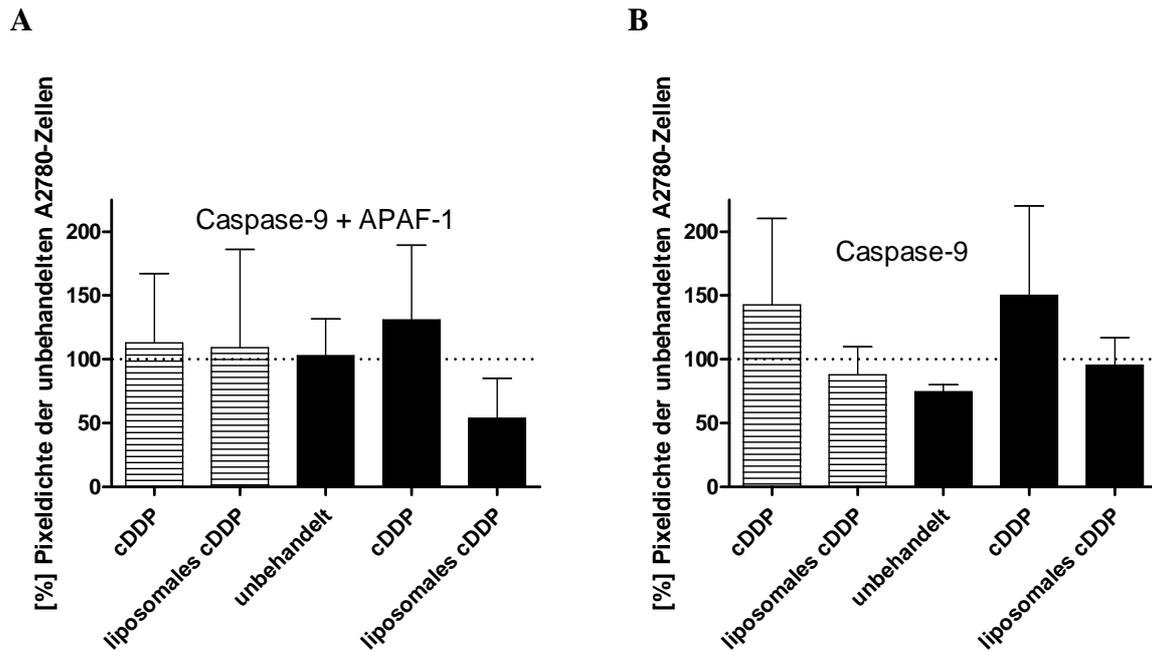
ausgelöst werden, wurden die Caspasen des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges genauer untersucht.

### 5.3.2.1 Expression der Caspasen

Um festzustellen, ob sich die durch den Protein-array gezeigte Expression der Proteine des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges bis hin zur Effektorebene der Caspasen äußert, wurden *western blots* für die Caspasen-8 und -9 durchgeführt.



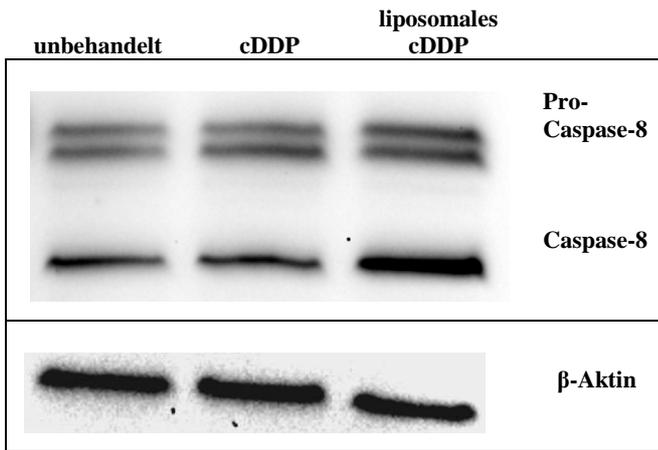
**Abb. 5.22:** Pro-Caspase-9 und Caspase-9-Expression nach Behandlung mit Cisplatin oder liposomalem Cisplatin für 72 h in resistenten Ovarialkarzinomzellen; die Banden mit der geringsten Laufstrecke (oben) stellen mit APAF-1 komplexierte Caspase-9 dar. Exemplarische Abbildung eines einzelnen Versuchs



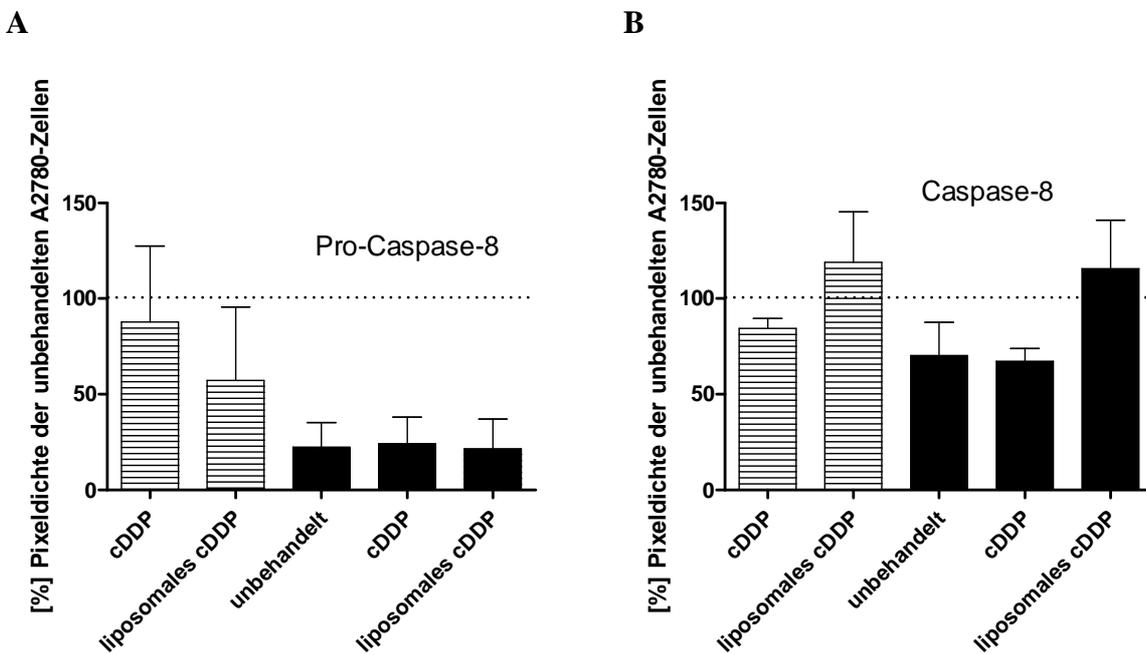
**Abb. 5.23:** Relative Quantifizierung der mit APAF-1 komplexierten Caspase-9 (A) und freien Caspase-9 (B) -Expression drei gleicher Experimente ermittelt durch Auswertung der Pixeldichte (unbehandelte A2780-Zellen = 100 %). Die A2780- (gestreift) und A2780cis-Zellen (schwarz) wurden für 72 h mit der EC<sub>50</sub> Cisplatin als freiem Wirkstoff oder liposomal beimpft

Sowohl der mit APAF-1 komplexierte Teil der Caspase-9 als auch der freie Anteil an Caspase-9 ist in den resistenten Zellen am größten, die mit freiem Wirkstoff behandelt wurden (Abb. 5.22). Die liposomal behandelten resistenten Zellen zeigen im Vergleich zu unbehandelten resistenten Zellen nur eine leichte Erhöhung in der Expression der aktiven Caspase-9, gebunden und ungebunden. Da in allen Versuchen auch in unbehandelten Zellen nur minimale Level der Pro-Caspase-9 detektiert werden konnten, wurden sie nicht weiter ausgewertet. Augenscheinlich gibt es in den A2780cis-Zellen jedoch vermutlich keine Expressionsunterschiede.

Insgesamt zeigen die verschiedenen Ansätze für die komplexierte Caspase-9 ausschließlich bei einer liposomalen Behandlung in resistenten Zellen eine Beeinflussung durch eine Cisplatinbehandlung (Abb. 5.23A). Dort liegt sogar weniger an APAF-1 gebundene Caspase-9 vor als in beiden unbehandelten Zelllinien. Bei der aktiven Caspase-9 wird eine starke Überexpression der Caspase-9 in A2780- und A2780cis-Zellen deutlich, die mit freiem Cisplatin inkubiert wurden (Abb. 5.23B). Bei den Ansätzen mit Cisplatinliposomen ist kein Unterschied zu unbehandelten Zellen festzustellen. Zudem ist in den unbehandelten resistenten Zellen *per se* weniger aktive Caspase-9 vorhanden.



**Abb. 5.24:** Pro-Caspase-8 und Caspase-8-Expression nach Behandlung mit Cisplatin oder liposomalem Cisplatin für 72 h in resistenten Ovarialkarzinomzellen; exemplarische Darstellung eines einzelnen Versuchs



**Abb. 5.25:** Relative Quantifizierung der Pro-Caspase-8 (A) und Caspase-8 (B)-Expression drei gleicher Experimente ermittelt durch Auswertung der Pixeldichte (unbehandelte A2780-Zellen = 100 %); die A2780- (gestreift) und A2780cis-Zellen (schwarz) wurden für 72 h mit der EC<sub>50</sub> Cisplatin als freiem Wirkstoff oder liposomal beimpft.

Während sich die Grundexpression der Pro-Caspase-8, die proteolytisch in die aktive Form der Caspase-8 umgewandelt wird, innerhalb der resistenten Zellen nur wenig unterscheidet, induziert eine Behandlung mit Cisplatinliposomen die Expression der aktiven Caspase-8. Dies ist schon bei den einzelnen *blots* deutlich sichtbar (Abb. 5.24).

Bei der Gesamtanalyse aller durchgeführten *western blots* wird dieses Bild weiter verdeutlicht (Abb. 5.25). Dabei wird die Pro-Caspase-8 in den A2780-Zellen insgesamt deutlich schwächer ausgebildet als in den resistenten A2780cis-Zellen (Abb. 5.25A). Für die aktive Caspase-8 kann in beiden Zelllinien die höchste Expression für liposomal mit Cisplatin behandelte Zellen beobachtet werden (Abb. 5.25B). Diese liegt ca. 20 % über dem Niveau der

unbehandelten A2780-Zellen und innerhalb der resistenten A2780cis-Zellen sogar ca. 40 % über dem Niveau von unbehandelten Zellen.

Bei der Expressionsanalyse der Caspasen des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges wird ergänzend zu den Erkenntnissen des Protein-arrays (Abschnitt 5.3.1) deutlich, dass nach einer Behandlung mit liposomalem Cisplatin auch auf der Effektorebene der Apoptose Proteine des extrinsischen Signalwegs deutlich stärker repräsentiert sind als nach einer Behandlung mit freiem Wirkstoff. Obwohl die Caspase-8 in der resistenten Zelllinie generell weniger exprimiert wird, ist die Induktion der Expression von Caspase-8 durch die Cisplatinliposomen in den resistenten Zellen sogar so ausgeprägt, dass genauso viel Caspase-8 wie in liposomal behandelten A2780-Zellen vorliegt.

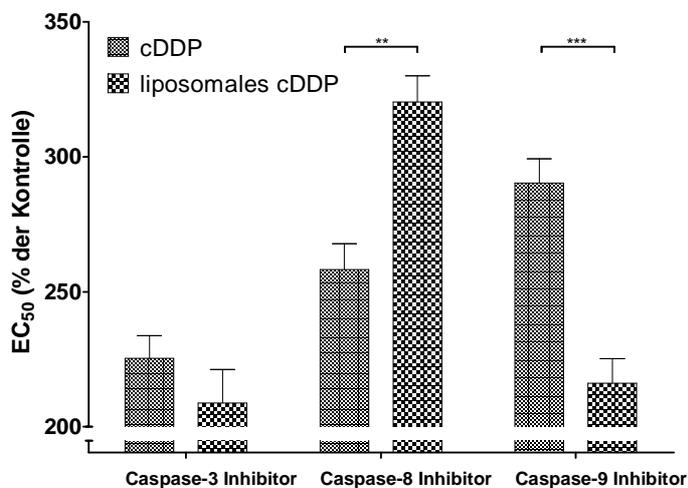
Im Gegensatz dazu ist der intrinsische Signalweg bei freiem Wirkstoff auf Ebene der Proteinlevel stark hochreguliert, während liposomal mit Cisplatin behandelte Zellen sich nur geringfügig von unbehandelten Zellen unterscheiden.

Diese Beobachtungen legen deutlich den Unterschied in der zellulären Reaktion auf eine Cisplatinbehandlung offen, die entweder mit freiem Arzneistoff oder Cisplatinliposomen durchgeführt wird. Von den Initiatormolekülen bis hin zu den Caspasen des intrinsischen und extrinsischen Signalweges zeichnet sich für die Liposomen eine stärkere Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges ab. Der freie Wirkstoff verursacht hingegen in Übereinstimmung mit der Literatur eine Aktivierung von Stresssignalen und intrinsischer Apoptose, die beide bei der Resistenzsignatur der A2780cis Zellen als Gegenregulationsmechanismen auf mRNA-Ebene im Vordergrund stehen (Abschnitt 5.2.1). Diese Verschiebung der Apoptosemechanismen durch Cisplatinliposomen hin zu Signalwegen, die bei der Chemoresistenz eine weniger dominante Rolle spielen, unterstreicht das Potential der liposomalen Formulierung, welches auch auf Proteinebene deutlich über eine reine Transporterfunktion hinausgeht.

### **5.3.2.2 Aktivität der Caspasen**

Die bisher beobachteten Unterschiede in der mRNA- und Proteinexpression einer liposomalen Cisplatinformulierung im Vergleich zu freiem Zytostatikum liefern zwar eindeutige Erkenntnisse darüber, dass je nach Cisplatinformulierung unterschiedliche Prozesse in den resistenten Zellen ablaufen. Tatsächlich ist der Rückschluss von einer mRNA- und Proteinexpression auf die eigentliche Aktivität eines Schlüsselproteins bzw. Signalweges nur bedingt möglich.

Daher wurde die Zytotoxizität der Cisplatinformulierungen unter Einfluss verschiedener Caspaseinhibitoren untersucht. Die peptidischen Inhibitoren aus jeweils vier Aminosäuren sind vom Hersteller so modifiziert worden, dass sie durch ihre N-terminale Z-Schutzgruppe (Benzyloxycarbonyl-), C-terminale FMK-Modifizierung (Fluoromethylketon-) und methylierten sauren Aminosäurereste membrangängig sind und Caspase-8, -9 oder -3 spezifisch hemmen. Die jeweilige Hemmbarkeit ist dabei im Umkehrschluss ein Maß für die Aktivität des Signalweges, der letztlich die Zytotoxizität verursacht.



**Abb. 5.26:** EC<sub>50</sub> von freiem Cisplatin und Cisplatinliposomen in resistenten Ovarialkarzinomzellen (A2780cis) unter Einfluss eines Caspase-3-, -8- oder -9-Inhibitors (50 µmol/L) im Vergleich zu Zellen, die ohne Inhibitor mit freiem Wirkstoff bzw. Cisplatinliposomen behandelt wurden (Kontrolle).

Durch den Caspase-3-Inhibitor lassen sich die bei der Caspase-3 zusammenlaufenden Signalwege der intrinsischen und extrinsischen Apoptose mit beiden Cisplatinformulierungen in ca. gleichem Maße inhibieren (Abb. 5.26). Dabei liegen die EC<sub>50</sub> mehr als doppelt so hoch wie bei nicht mit Inhibitor inkubierten Zellen (= 100 %). Insgesamt lässt sich die Apoptose mit dem Caspase-3-Inhibitor jedoch nicht so stark hemmen wie mit den anderen beiden Caspaseinhibitoren (ca. 250–320 %). Da sie in gleicher Konzentration eingesetzt wurden, ist dies eine Bestätigung dafür, dass sowohl intrinsischer als auch extrinsischer Signalweg bei der Caspase-3 zusammenlaufen und sich das apoptotische Signal addiert. Demzufolge müssten für ein vergleichbares Ausmaß der Apoptosehemmung nur über Caspase-3 höhere Konzentrationen des Inhibitors eingesetzt werden. Eine vergleichbar geringe Wirkung hat lediglich der Caspase-9-Inhibitor in liposomal behandelten Zellen.

Eine Hemmung der extrinsischen Apoptose über Caspase-8 hat einen stärkeren Effekt bei den mit Cisplatinliposomen behandelten Zellen (cDDP: ~ 250 %; liposomales cDDP ~320 %), während die intrinsische Apoptose über Caspase-9 stärker bei A2780cis-Zellen beeinflusst

wird, die mit freiem Wirkstoff behandelt wurden (cDDP: ~ 300 %; liposomales cDDP: ~ 210 %). Dies bestätigt somit auch auf funktioneller Ebene die gefundenen Expressionsunterschiede im extrinsischen bzw. intrinsischen Apoptoseweg nach der Behandlung mit freiem Wirkstoff gegenüber einer Behandlung mit liposomalem Cisplatin. Nach einer Behandlung mit Cisplatinliposomen sind die an der extrinsischen Apoptose beteiligten Proteine also nicht allein in größerer Menge vorhanden, die Überexpression äußert sich zudem zusätzlich in einer erhöhten Aktivität des Signalweges. Genau gegenläufig verhält es sich beim intrinsischen Apoptoseweg. Dieser ist nach einer Behandlung mit freiem Wirkstoff deutlich stärker exprimiert und aktiv.

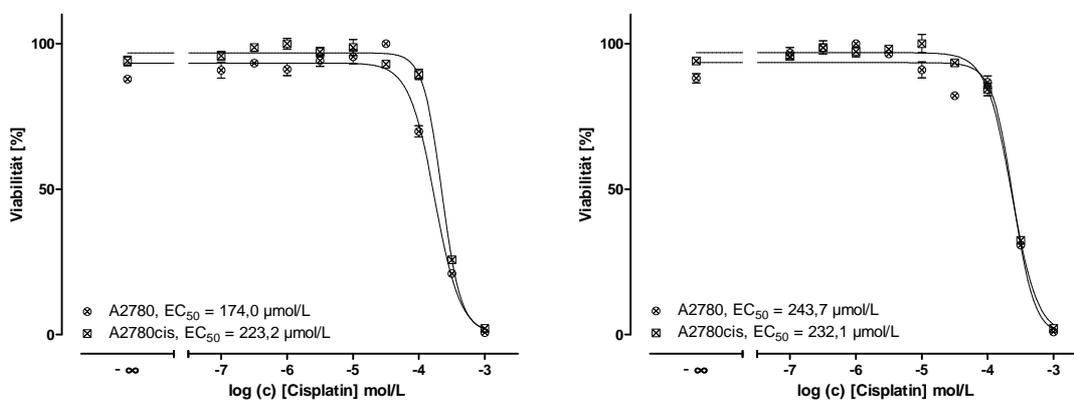
Unter Berücksichtigung, dass die durch freies Cisplatin ausgelöste Zytotoxizität vorwiegend über den intrinsischen Apoptoseweg und assoziierte Kaskaden wie die des oxidativen Stresses vermittelt wird, für die gleichzeitig aber auch die meisten Resistenzmechanismen bekannt sind, erscheint die durch Cisplatinliposomen ausgelöste zytotoxische zelluläre Antwort im Hinblick auf eine gewünschte Resistenzüberwindung als äußerst vorteilhaft.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die verwendeten Cisplatinliposomen in der Lage sind, die Chemoresistenz der A2780cis-Ovarialkarzinomzellen zu überwinden. Dies geschieht jedoch nicht durch den mit Liposomen als reine Arzneistoffträger vorgesehenen Ansatz, bei dem lediglich eine höhere intrazelluläre Arzneistoffkonzentration oder eine höhere Platinierungsrate angestrebt wird. Die *gene array*-Analysen stellen dabei die intrazellulären Signalwege der p53-abhängigen Apoptose als Hauptunterschied in der Reaktion auf die Behandlung mit freiem oder liposomalem Cisplatin heraus. Dabei werden die größten Unterschiede in der Expression der signalgebenden Proteine des intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignalweges offensichtlich. Dies konnte außerdem auch für die Expression der extrinsischen Caspase-8 und intrinsischen Caspase-9 auf der Effektorebene der Apoptose durch *western blotting* gezeigt werden. Durch weitergehende Inhibitorstudien kann festgestellt werden, dass sich eine Behandlung mit Cisplatinliposomen im Vergleich zu einer Behandlung mit freiem Wirkstoff in einer erhöhten Aktivität des extrinsischen und einem Rückgang der Aktivität des intrinsischen Apoptoseweges als Folge aus dem veränderten Expressionsmuster auswirkt. Die Überwindung der Chemoresistenz durch liposomales Cisplatin resultiert somit aus einer Verschiebung des apoptotischen Geschehens hin zu Mechanismen, gegen die in den resistenten Ovarialkarzinomzellen geringere Gegenregulationsmechanismen existieren.

Da es bereits in der klinischen Prüfung etablierte liposomale Cisplatinpräparate gibt, stellt sich die Frage, ob der oben beschriebene Wirkmechanismus auch einen Beitrag zu deren Wirksamkeit leistet.

### 5.3.3 Die Auswirkungen von Lipoplatin™ auf die Chemoresistenz *in vitro*

Das IMP Lipoplatin™ wurde von der Firma Regulon Inc. durch Kontakte zu Herrn Dr. Stavros Kottaridis zur Verfügung gestellt mit dem Ziel, dessen Einfluss auf die Apoptosesignalwege zu untersuchen und mit den in dieser Arbeit verwendeten Liposomen zu vergleichen. Dazu wurden MTT-assays sowie ein Protein-array durchgeführt.



**Abb. 5.27:** Zytotoxizität von Lipoplatin™ in A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 Zellen (links) und 40.000 Zellen (rechts); die Graphen zeigen jeweils exemplarisch einen Versuch in Triplikaten.

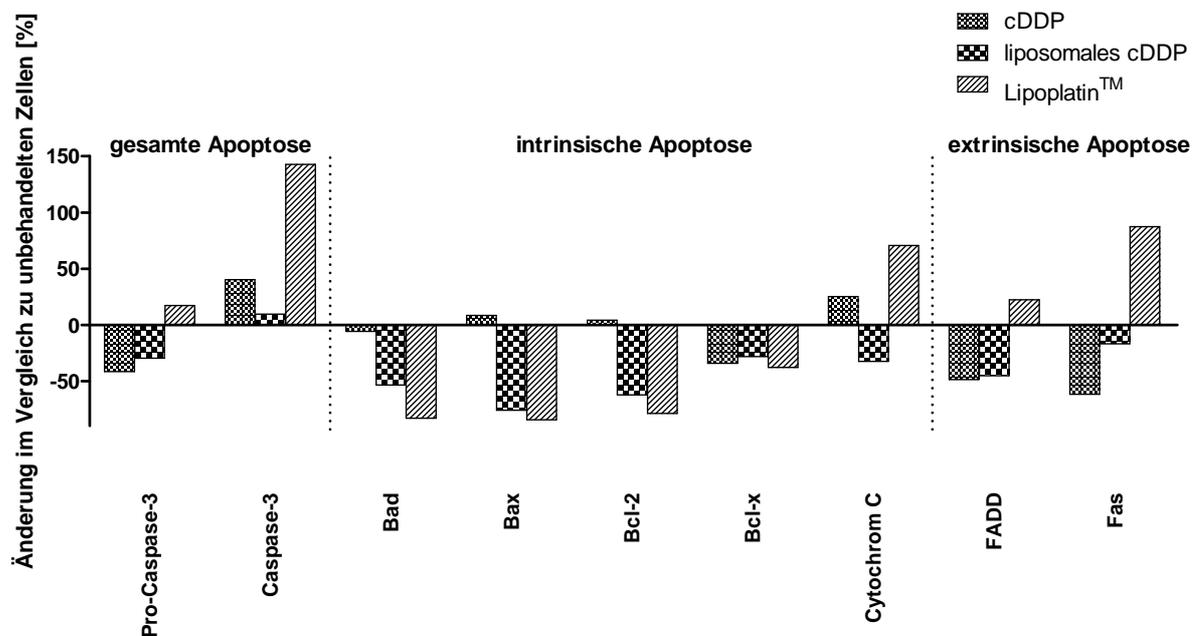
**Tab. 5.9:** Zusammenfassung der Zytotoxizität von freiem Cisplatin und Lipoplatin™ (n = 3) nach 72 h mit den daraus resultierenden Resistenzfaktoren (EC<sub>50</sub> A2780cis / EC<sub>50</sub> A2780)

Formulierung	Zellen/Well	A2780			A2780cis			R <sub>f</sub>
		pEC <sub>50</sub>		EC <sub>50</sub>	pEC <sub>50</sub>		EC <sub>50</sub>	
		MW	SE	[μmol/L]	MW	SE	[μmol/L]	
cDDP	20.000	5,46	0,13	<b>3,47</b>	4,94	0,03	<b>11,48</b>	<b>3,3</b>
	40.000	5,37	0,04	<b>4,27</b>	5,03	0,06	<b>9,33</b>	<b>2,2</b>
Lipoplatin™	20.000	3,60	0,15	<b>251,19</b>	3,47	0,16	<b>338,84</b>	<b>1,3</b>
	40.000	3,49	0,11	<b>323,59</b>	3,51	0,11	<b>309,03</b>	<b>1,0</b>

Obwohl Lipoplatin™ die Präklinik erfolgreich durchlaufen hat und es bereits in mehreren Phase 3 klinischen Studien als dem freien Wirkstoff in Kombination mit anderen Zytostatika weder unterlegen noch überlegen getestet wurde<sup>301,302</sup>, zeigt es in unserem Resistenzmodell mit Konzentrationen um 300 μmol/L eine sehr viel geringere Toxizität in beiden Zelllinien als

der freie Wirkstoff (Tab. 5.9) und die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen (Abschnitt 5.1.2.2). Dabei ist die Effektivität jedoch in beiden Zelllinien annähernd gleich, was sich in Resistenzfaktoren von 1,3 für 20.000 Zellen und 1,0 für 40.000 Zellen äußert (Abb. 5.27; Tab. 5.9). Wie der *in vivo*-Erfolg des Lipoplatins™ demonstriert, kann die geringe *in vitro*-Toxizität jedoch durch die viel selteneren unerwünschten Arzneimittelwirkungen und das günstigere Cisplatin : Lipid-Verhältnis im Vergleich zu den 5 % mPEG-Liposomen (5 % mPEG: ca. 1:99; Lipoplatin™: ca. 9:91) vollständig kompensiert werden.

Die Apoptoseinduktion durch Lipoplatin™ ist der durch 5 % mPEG-Liposomen sehr ähnlich, wie die Proteinexpressionsanalysen zeigen (Abb. 5.28). Die Experimente wurden dabei analog zu den bereits durchgeführten Expressionsanalysen aus Abschnitt 5.3.1 durchgeführt.



**Abb. 5.28:** Relative Expression von Apoptoseproteinen, die am intrinsischen oder extrinsischen Signalweg teilnehmen, und der Effektor Caspase-3 im Vergleich zu unbehandelten Zellen; die Zellen wurden über 72 h mit der  $EC_{50}$  von freiem Cisplatin, Cisplatinliposomen oder Lipoplatin™ behandelt.

Während nach einer Behandlung mit Lipoplatin™ die gesamte Apoptose noch stärker induziert ist, wie das höhere Caspase-3-Niveau sogar im Vergleich zu freiem Wirkstoff zeigt (Abb. 5.28, links), sind die mitochondrialen Apoptoseproteine Bad, Bax, Bcl-2 und Bcl-xL wie bei den 5 % mPEG-Liposomen klar unterexprimiert (Abb. 5.28, mittig). Erstaunlicherweise wird trotzdem nach einer Lipoplatin™-Behandlung mehr Cytochrom C

ausgebildet als nach einer Behandlung mit freiem Cisplatin. Dies könnte an einer sekundären Aktivierung des intrinsischen Signalweges über tBID liegen, welches nach einer Aktivierung des extrinsischen Weges und der Caspase-8 auf die Mitochondrien einwirkt. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass im Gegensatz zu den 5 % mPEG-Liposomen Lipoplatin™ nicht nur in der Lage ist, die auf eine Cisplatinbehandlung reflektorisch eintretende Fas-Unterexpression zu kompensieren, sondern sogar die Expression von Fas und zusätzlich FADD zu induzieren (Abb. 5.28, rechts).

Trotz ihrer sehr geringen Toxizität im Zellmodell weisen die Liposomen des IMP den gleichen molekularen Mechanismus der Apoptoseverschiebung auf, der in dieser Arbeit für eine andere liposomale Formulierung gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse sind erste Hinweise auf eine Übertragbarkeit des Liposomeneffektes auf eine liposomale Formulierung, die neben den in dieser Arbeit verwendeten Lipiden einen Anteil an geladenem DPPG hat.

Die Erkenntnisse in dem verwendeten Resistenzmodell aus A2780- und A2780cis-Ovarialkarzinomzellen, die eine *in vitro* durch Cisplatinexposition provozierte Resistenz besitzen, gaben weitergehend den Anlass, den einschlägigen Effekt der Cisplatinliposomen auf die Chemoresistenz auch in weiteren Zelllinien sowie *in vivo* zu testen.

## 5.4 Übertragbarkeit des Liposomeneffektes

### 5.4.1 Caov-3-Ovarialkarzinomzellen

Um eine Übertragbarkeit der oben beschriebenen Ergebnisse auf andere Tumorzellen zu untersuchen, wurden Untersuchungen an Caov-3-Zellen durchgeführt. Diese stammen aus derselben Tumorentität. Es handelt sich wie bei den A2780-Zellen um humane epitheliale adhärenzte Ovarialkarzinomzellen. Sie wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Kassack vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Dort wurde auch die Chemoresistenz gezüchtet, die in der Zelllinie Caov-3cis resultierte.

Zunächst wurde die Zytotoxizität der Cisplatinliposomen in MTT-assays getestet, um zu zeigen, ob es auch in dieser Zelllinie zu einer Überwindung der Chemoresistenz kommt.

**Tab. 5.10:** Zusammenfassung der Zytotoxizität von freiem Cisplatin und Cisplatinliposomen in allen Versuchen (n = 3) mit 8000 Zellen/Well und die daraus resultierenden Resistenzfaktoren ( $EC_{50}$  Caov-3cis/  $EC_{50}$  Caov-3)

Inkubationszeit	Formulierung	Caov-3		Caov-3cis		$R_f$		
		p $EC_{50}$		EC $_{50}$				
		MW	SE	[ $\mu$ mol/L]	MW		SE	[ $\mu$ mol/L]
72 h	cDDP	5,22	0,07	<b>6,03</b>	5,04	0,02	<b>9,12</b>	<b>1,5</b>
	5 % mPEG	5,20	0,02	<b>6,31</b>	5,03	0,07	<b>9,33</b>	<b>1,5</b>

Die  $EC_{50}$  des freien Wirkstoffes liegt bei den Caov-3-Zellen im Mittel bei 6,03  $\mu$ mol/L und bei den resistenten Caov-3cis-Zellen bei 9,12  $\mu$ mol/L (Tab. 5.10). Damit ist die Resistenz der Caov-3cis-Zellen mit einem Resistenzfaktor von 1,5 wesentlich schwächer ausgeprägt als bei den A2780cis-Zellen ( $R_f$ : 4,2–4,4). Durch eine Behandlung mit Cisplatinliposomen lässt sich auch nach 72 h die  $EC_{50}$  in den resistenten Zellen nicht senken. Sie liegt mit 6,31  $\mu$ mol/L und 9,33  $\mu$ mol/L in genau demselben Bereich wie nach einer Behandlung mit freiem Cisplatin. Der Resistenzfaktor ist mit 1,5 bis auf die erste Nachkommastelle genau gleich.

Die Ursache für diese hohe Diskrepanz der Ergebnisse in den zwei Zelllinien, die zwar aus unterschiedlichen Patienten, aber demselben Tumorgewebe stammen, liegt wahrscheinlich in den mechanistischen Unterschieden der Chemoresistenzen begründet. Aus unseren Untersuchungen im A2780/A2780cis-Resistenzmodell ist bekannt, dass p53 eine zentrale Stellung in der Antwort der Zellen auf sowohl eine Behandlung mit freiem Cisplatin als auch mit liposomalem Cisplatin einnimmt, obwohl beide zellulären Reaktionen völlig unterschiedlicher Natur sind. In Caov-3-Zellen ist p53 jedoch mutiert. Dieser Status bleibt folglich auch nach der Erzeugung einer künstlichen Resistenz *in vitro* vorhanden oder mutiert weiter. A2780-Zellen haben im Kontrast den Wildtyp des p53-Gens, welcher somit eine notwendige Voraussetzung für den Liposomeneffekt zu sein scheint. Über den p53-Status der resistenten A2780cis-Zellen ist wenig bekannt, zumal in einigen Forschungseinrichtungen nicht mit dem kommerziell erhältlichen Typus gearbeitet wird, sondern aus den A2780-Zellen vor Ort eine eigene Resistenz durch Inkubation mit subtoxischen Cisplatinkonzentrationen erzeugt wird. Daher existiert auch eine sehr unterschiedliche Nomenklatur der resistenten Zellen, die zusätzlich eine Vergleichbarkeit mit der hier verwendeten A2780cis-Zelllinie erschwert. Bei den wenigen Mutationsanalysen in der Literatur ist somit unklar, ob es sich um die gleiche Zelllinie handelt, die für diese Untersuchungen herangezogen wurde. Trotz dieser Unklarheiten kann aus jetziger Sicht die Mutation des p53 in den Caov-3-Zellen als der wahrscheinlichste Faktor angesehen werden, der für die fehlende liposomale Sensitivierung angenommen werden kann.

Dadurch dass die Caov-3cis-Zellen nicht mit einer Sensitivierung auf eine Behandlung mit Cisplatinliposomen ansprechen, ergibt sich perspektivisch eine wichtige Konsequenz für eine klinische Behandlung von Patienten mit liposomalem Cisplatin. Hierbei müsste höchstwahrscheinlich, wie es bereits vielfach im Sinne einer personalisierten Chemotherapie durchgeführt wird, der p53-Status im Primärtumor des Patienten ermittelt werden. Liposomales Cisplatin könnte eventuell nur eine Therapieoption sein, wenn im Primärtumor Wildtyp-p53 vorhanden ist.

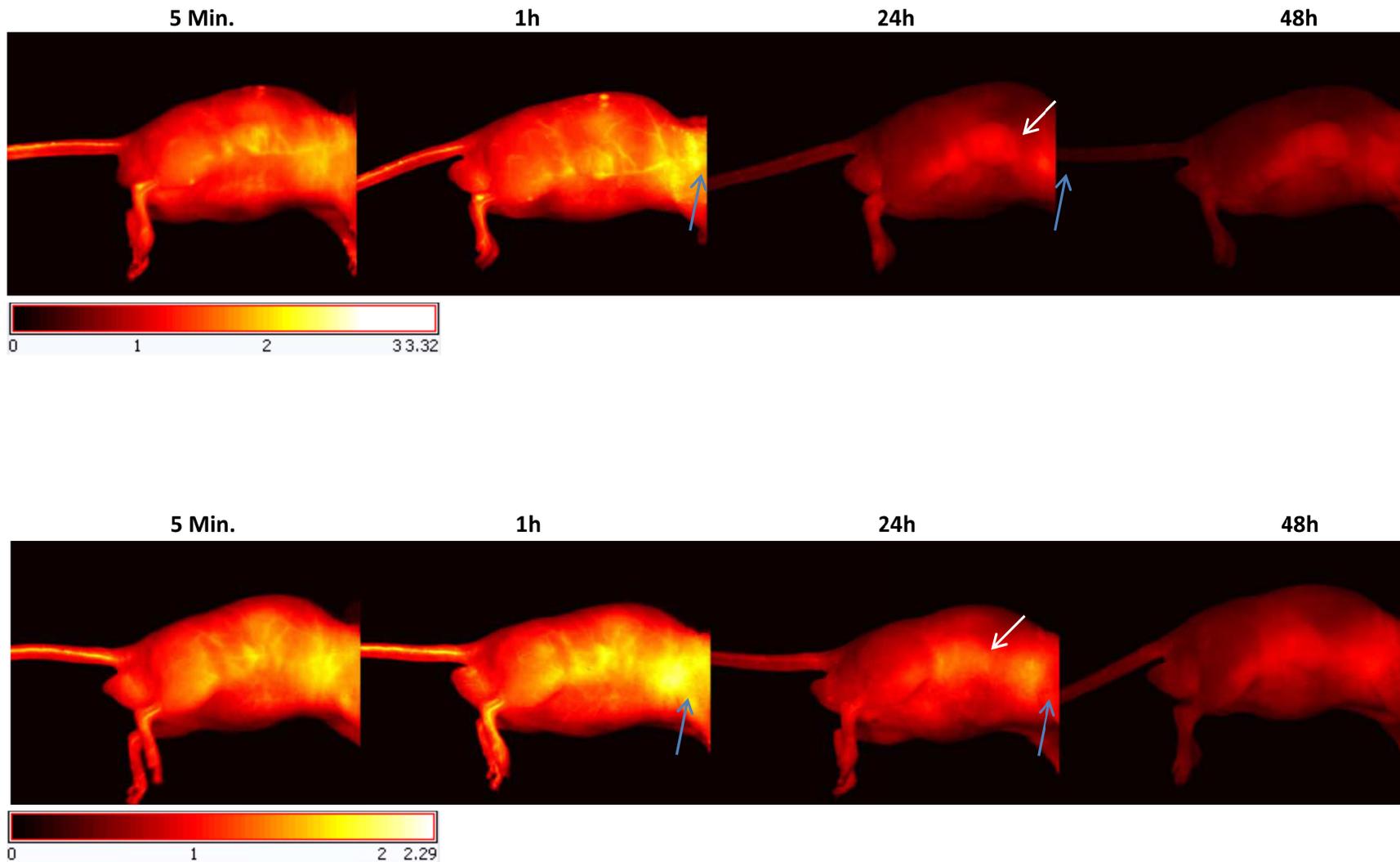
## **5.4.2 Cisplatinliposomen *in vivo***

Wie in Kapitel 4.12 beschrieben wurden die in dieser Arbeit verwendeten Cisplatinliposomen am Uniklinikum Halle (Saale) zusätzlich mittels *in vivo-imaging* untersucht. Alle Arbeiten wurden dort von Herrn Dr. Thomas Müller koordiniert und durchgeführt. Folgend soll ein kurzer Überblick über die daraus erhaltenen vorläufigen Ergebnisse gegeben werden.

Alle Versuche wurden zunächst nur an maximal zwei Mäusen pro Behandlungsmethode durchgeführt. Sie dienten dazu, die Durchführbarkeit einer *in vivo*-Untersuchung mit den in dieser Arbeit verwendeten Liposomen zu beurteilen. Für den Nachweis einer Wirksamkeit müssen perspektivisch Studien mit einer größeren Anzahl an Tieren durchgeführt werden.

### **5.4.2.1 Eignung der Liposomen für *in vivo*-Untersuchungen**

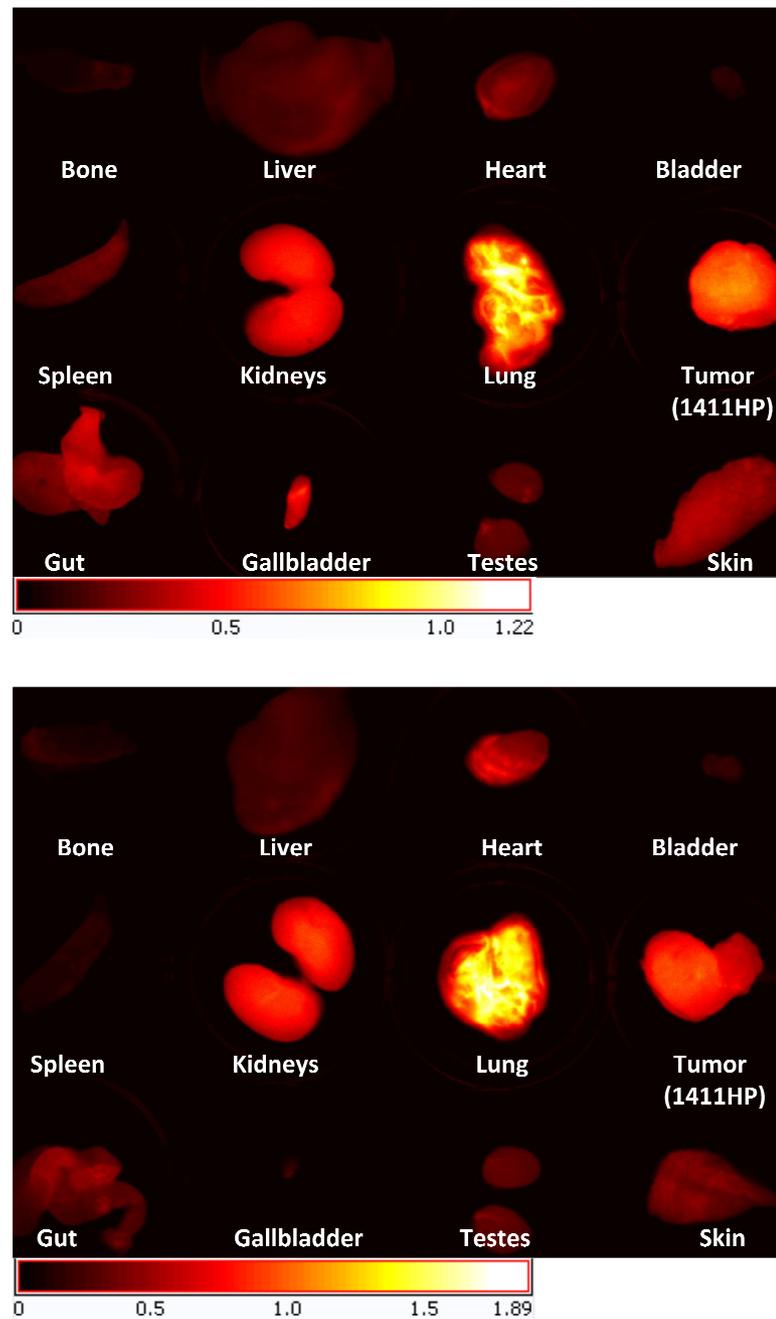
Zunächst wurden 2 % mPEG- und 5 % mPEG-Liposomen ohne Cisplatin injiziert, um den Einfluss des PEG-Gehaltes auf die Verteilung und Tumorakkumulation im Organismus zu betrachten. Hierbei trugen die Mäuse einen Tumor aus 1411HP-Zellen, einem Teratokarzinom der Hoden, da es sich dabei um das bereits etablierte System am Uniklinikum Halle handelte. Dabei wurde eine theoretische Dosierung von 3 mg/kg KG Cisplatin gewählt.



**Abb. 5.1:** Aufnahmen zweier Mäuse am Maestro™ *in vivo* Fluorescence Imaging System 5 min, 1 h, 24 h und 48 h nach der Injektion von DiR-markierten 2% mPEG- (oben) und 5% mPEG-Liposomen (unten) (theoretische Cisplatin-dosierung: 3 mg/kg KG); weißer Pfeil: Tumor, blauer Pfeil: Lunge; die Bilder wurden aufgenommen und zusammengestellt von Frau Anne-Kathrin Heinrich des Instituts für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.

Beide liposomalen Cisplatinformulierungen verteilen sich über die Schwanzvene rasch innerhalb von 5 min im Organismus (Abb. 5.29). Bereits nach 1 h ist eine deutliche Akkumulation der Liposomen in der Lunge (Abb. 5.29, blauer Pfeil) zu beobachten, während die Liposomen noch zirkulieren. Nach 24 h befinden sich die Liposomen zusätzlich zur Lunge zu einem großen Teil im Tumor (Abb. 5.29, weißer Pfeil) und haben den Blutkreislauf größtenteils verlassen. Dieses Akkumulationsverhalten ist auch nach 48 h noch ohne eine weitere Injektion sichtbar.

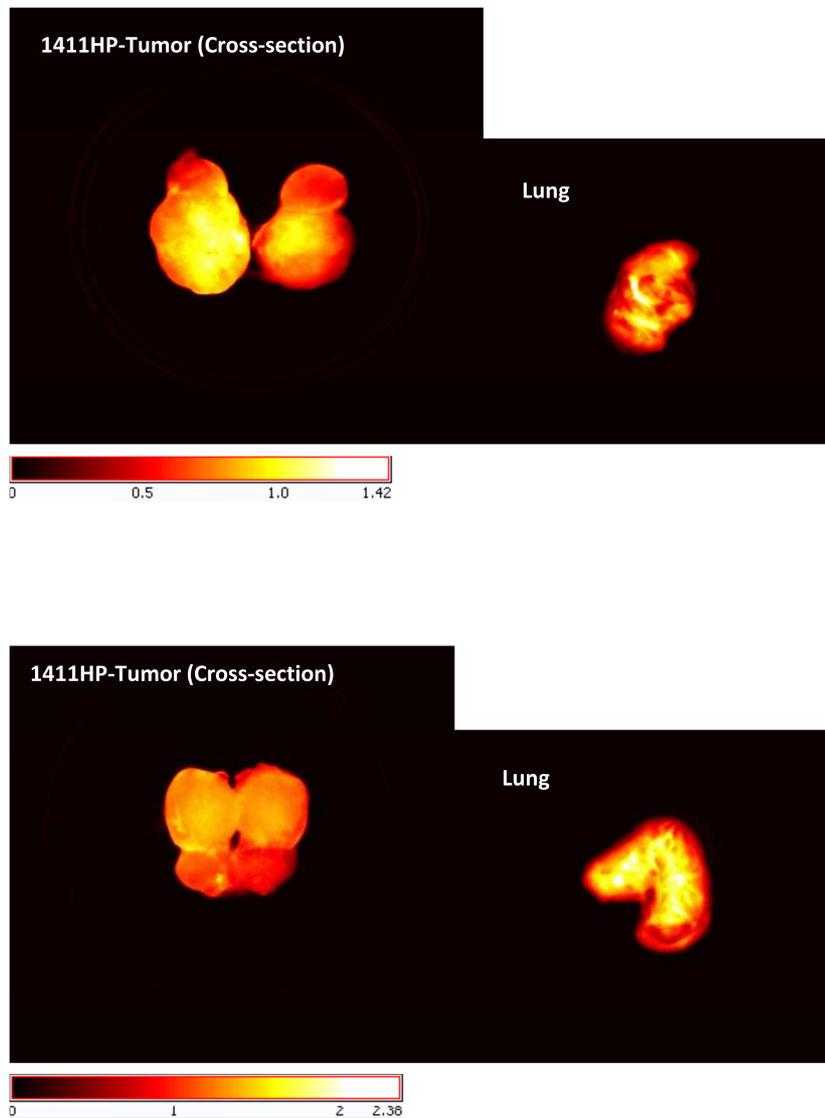
Die Liposomen wurden ein zweites Mal injiziert und nach 24 h die Organe präpariert und mit demselben *imaging*-Verfahren *ex vivo* betrachtet.



**Abb. 5.30:** *Ex vivo*-Aufnahmen der präparierten Organe 24 h nach einer zweiten Injektion von 2 % mPEG- (oben) und 5 % mPEG-Liposomen (unten) (theoretische Cisplatinkonzentration: 3 mg/kg KG); die Bilder wurden aufgenommen und zusammengestellt von Frau Anne-Kathrin Heinrich des Instituts für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.

Auch hier Verhalten sich beide Cisplatinliposomenpräparationen mit 2 % mPEG und 5 % mPEG sehr ähnlich (Abb. 5.30). Das höchste Signal gibt die Lunge, das zweithöchste der 141IHP-Tumor. Weiterhin sind die Liposomen in allen gut durchbluteten Organen zu finden. Da die starke Akkumulation in der Lunge bei cisplatinhaltigen Liposomen perspektivisch unerwünschte Toxizität verursachen kann, wurden die Signale der Lunge und des Tumors

genauer verglichen, um eine eventuelle Überlegenheit einer der beiden Liposomensorten beurteilen zu können.



**Abb. 5.31:** *Ex vivo*-Aufnahmen des Tumorquerschnitts im direkten Vergleich zur Lunge 24 h nach einer zweiten Injektion von 2 % mPEG- (oben) und 5 % mPEG-Liposomen (unten) (theoretische CisplatinKonzentration: 3 mg/kg KG); die Bilder wurden aufgenommen und zusammengestellt von Frau Anne-Kathrin Heinrich des Instituts für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.

Im direkten Vergleich hat der Tumorquerschnitt eine etwa gleiche (Abb. 5.31, oben) bzw. leicht geringere (Abb. 5.31, unten) Signalintensität als die Lunge. Bei den 2 % mPEG-Liposomen (Abb. 5.31, oben) scheint das Intensitätsverhältnis von Tumor zu Lunge günstiger zu sein, da die 5 % mPEG-Liposomen (Abb. 5.31, unten) in diesem Versuch stärker in der Lunge akkumulieren als die 2 % mPEG-Liposomen. Trotz dieser Tatsache wurden weitere Untersuchungen mit 5 % mPEG-Liposomen durchgeführt, da diese Formulierung

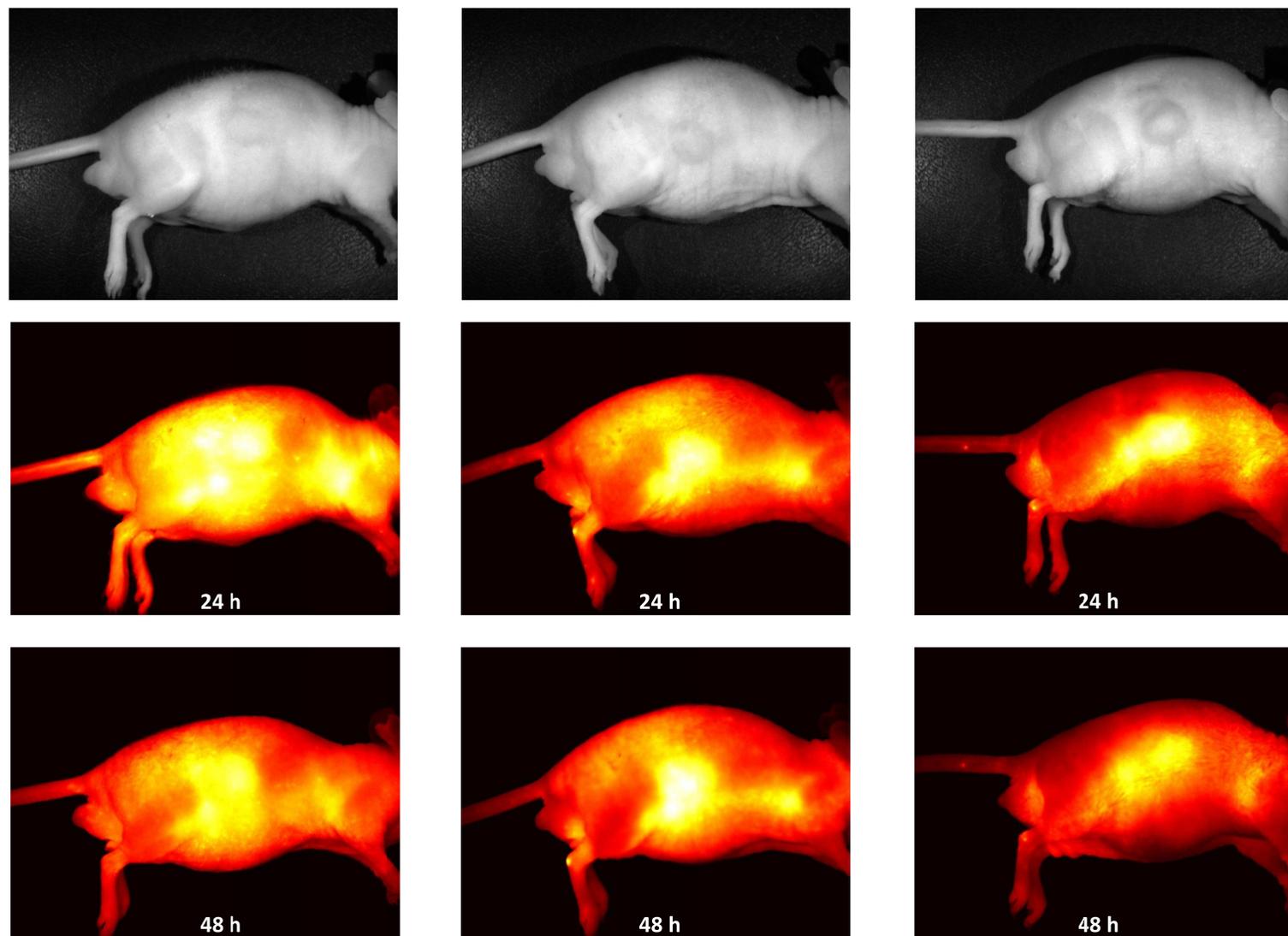
generell etabliert ist und somit eine perspektivische Vergleichbarkeit mit anderen Liposomen anderer Lipidzusammensetzung, jedoch gleichem mPEG-Gehalt gegeben bleibt.

Es wurden außerdem auch Liposomen mit einem mPEG-Gehalt von 7 % untersucht, die sich absolut vergleichbar mit den 5 % mPEG-Liposomen verhielten (Aufnahmen nicht gezeigt).

Aufgrund des geeigneten Verteilungsverhaltens konnte im nächsten Schritt mit cisplatinhaltigen Liposomen weitergearbeitet werden. Diese wurden von Herrn Dr. Thomas Müller in Dosierungen bis zu 12 mg/kg KG eingesetzt, wobei auch nach einer zweiten Injektion trotz erneut starker Lungenakkumulation keine limitierenden akuten Toxizitäten in den Mäusen auftraten.

#### **5.4.2.2 Untersuchungen am A2780/A2780cis-Tumormodell**

Das für die vorangegangenen *in vitro*-Versuche verwendete Resistenzmodell aus A2780- und A2780cis-Zellen wurde am Universitätsklinikum Halle (Saale) von Herrn Dr. Thomas Müller im Rahmen der weiteren Kooperation ebenfalls als Mausmodell etabliert. Um ein Ansteuern des Tumors noch weiter zu induzieren wurden zusätzlich zu den 5 % mPEG-Liposomen holotransferrintargetierte Liposomen mit der gleichen Lipidzusammensetzung untersucht. Beide Formulierungen enthielten dabei Cisplatin und wurden 9 mg/kgKG dosiert.



**Abb. 5.2:** Aufnahmen von drei Mäusen mit A2780- (rechte Spalte) bzw. A2780cis-Tumoren (linke und mittlere Spalte) am Maestro™ *in vivo* Fluorescence Imaging System vor der Injektion (oben, Graustufen), 24 h (mittig) und 48 h (unten) nach der Injektion von DiR-markierten 5% mPEG- (linke Spalte) und holotransferrintargetierten 5% mPEG-Liposomen (mittlere und rechte Spalte) (Cisplatinosierung: 9 mg/kg KG); die Bilder wurden aufgenommen und zusammengestellt von Frau Anne-Kathrin Heinrich des Instituts für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.

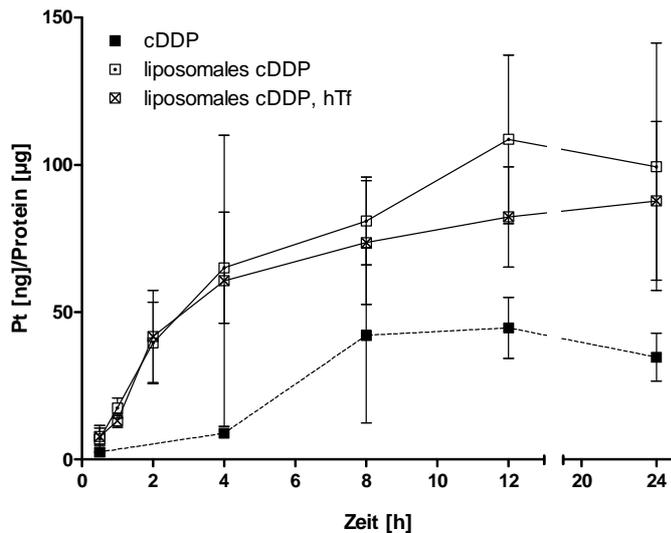
Die Anreicherung beider Liposomenarten im Tumorgewebe zeigt sich erneut deutlich. Dabei ist für den resistenten Tumor aus A2780cis-Zellen mit beiden Liposomensorten eine stärkere Akkumulation zu beobachten als im A2780-Tumor. Dies ist eine sehr günstige Grundvoraussetzung für eine Behandlung mit Liposomen im resistenten Tumor, die additiv mit der molekularen Resistenzüberwindung wirkt. Außerdem befindet sich ein großer Teil der Liposomen wieder in der Lunge.

Im Vergleich der beiden Liposomenformulierungen im Tumor reichern sich nach 24 h *targetierte* und *untargetierte* Liposomen in etwa gleich im Sinne der oben beschriebenen Eigenschaften an (Abb. 5.32, zweite Reihe, linke und mittlere Spalte), nach 48 h zeigt sich jedoch eine deutliche Überlegenheit der *targetierten* Liposomen (Abb. 5.32, dritte Reihe, linke und mittlere Spalte). Während die Konzentration der Cisplatinliposomen ohne Holotransferrintarget von 24 h bis 48 h abnimmt, reichern sich die *targetierten* Liposomen sogar noch weiter im Tumor an.

Dieses Verhalten steht in starkem Kontrast zu den bisherigen Ergebnissen von *in vitro* getesteten holotransferrintargetierten Liposomen.

#### **5.4.2.3 Holotransferrin-targeting *in vitro* vs *in vivo***

Da liposomales *targeting* mit Holotransferrin eine bereits etablierte Methode der Tumorzielsteuerung ist und bekannt ist, dass A2780cis-Zellen den Transferrinrezeptor überexprimieren, wurden schon lange vor Beginn dieser *in vivo*-Untersuchungen holotransferrintargetierte Liposomen untersucht. Für diese konnte jedoch *in vitro* keine Überlegenheit gegenüber nicht *targetierten* Cisplatinliposomen gezeigt werden.



**Abb. 5.33:** Die intrazelluläre Akkumulation von 20 µM Cisplatin nach Behandlung mit freiem Wirkstoff (schwarzes Viereck), 5 % mPEG-Liposomen (Viereck mit Punkt) und holotransferrintargetierten 5 % mPEG-Liposomen (Viereck mit Kreuz) über 24 h in cisplatinresistenten A2780cis-Zellen

Die Platinakkumulation in resistenten Zellen liegt bei einer liposomalen Formulierung (max. ca. 100 ng/µg) deutlich über der Anreicherung von frei appliziertem Wirkstoff (max. ca. 50 ng/µg) (Abb. 5.33). Dabei zeichnet sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen nicht *targetierten* und holotransferrintargetierten Liposomen ab.

Somit spielt eine *Targetierung* mit Holotransferrin keine Rolle für den molekularen Wirkmechanismus der Cisplatinliposomen, der eine Verschiebung des Apoptoseverhaltens zur Folge hat, bringt jedoch bei systemischer Applikation im Organismus einen eindeutigen Zugewinn durch längere und nach 48 h auch stärkere Anreicherung im Tumor. Perspektivisch wäre dieser additive Effekt bei der Entwicklung liposomaler Cisplatinformulierungen zu beachten, da *targetierte* Liposomen zwei Wirkmechanismen effektiv vereinen, indem die durch Holotransferrinkopplung optimierte Arzneistoffträgerfunktion synergistisch durch die Beeinflussung intrazellulärer Signalwege ergänzt wird.

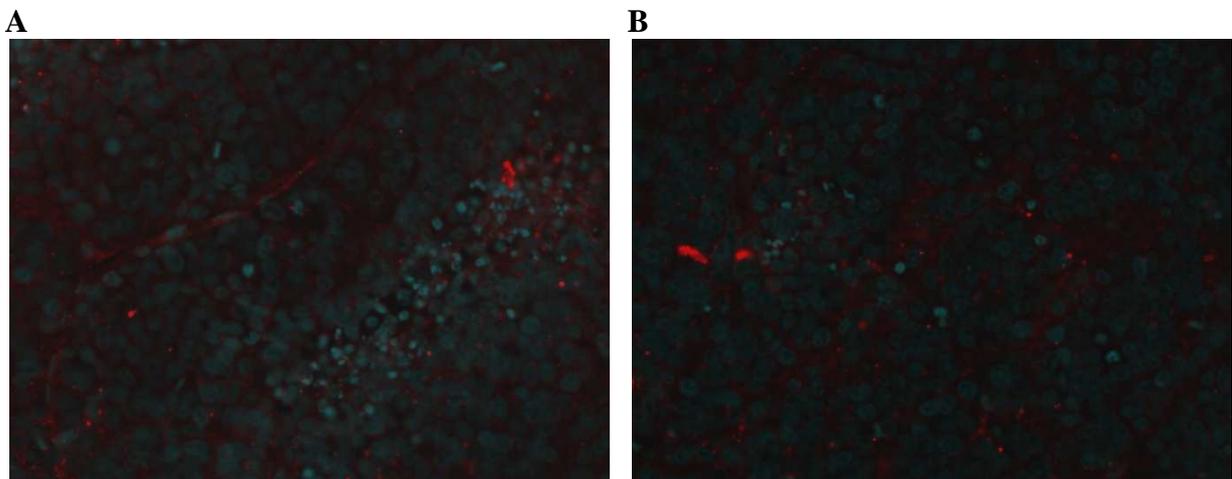
Außerdem unterstreicht das Ergebnis die limitierte Übertragbarkeit des verwendeten zweidimensionalen Zellmodells auf eine Anwendung im dreidimensionalen Tumor, der in einen ganzen Organismus eingebettet ist. Hier spielen neben dem reinen Ansteuern zellulärer Strukturen auch Gegebenheiten wie der intratumoral erhöhte Druck eine Rolle. Dies könnte der entscheidende Unterschied zum Zellmodell sein, da die Akkumulation zunächst für *targetierte* und nicht *targetierte* Liposomen *in vitro* gleich ist. Im Organismus können nicht *targetierte* Liposomen jedoch durch den höheren Druck im Tumor leichter wieder in die Gefäße des stark vaskularisierten Gewebes ausgewaschen werden.

Diese Erkenntnisse zeigen wie die Versuche zum IMP Lipoplatin™, dass ein *in vitro* kaum vorteilhaftes Prinzip *in vivo* einen sehr starken Effekt erreichen kann.

#### 5.4.2.4 Erste Hypothesen zur Tumorwirkung der 5 % mPEG-Liposomen

Trotz der überragenden Verteilungseigenschaften der holotransferrintargetierten Cisplatinliposomen mit 5 % mPEG *in vivo* konnte in darauf folgenden Untersuchungen keine Stagnation des Tumorwachstums oder Verkleinerung der Tumore festgestellt werden. Diese bisher zweimaligen Untersuchungen zum Tumoreffekt sind ebenfalls nur sehr vorläufig und können mit einer Behandlungsgruppe von ein bis zwei Mäusen höchstens Hypothesen generieren, nicht aber Absolutaussagen über einen Tumoreffekt oder sogar eine Wirksamkeit erlauben.

Eine vorläufige Überlegung ist dabei, dass die Freisetzung des Cisplatins aus den Liposomen der stark limitierende Faktor für die endgültige Antitumorwirkung ist. Die Limitationen der Freisetzung sind ein bekanntes Problem bei der Entwicklung liposomaler Wirkstoffe (Abschnitt 2.4.2.3). Dies wird auch durch eine Untersuchung von Tumorschnitten der behandelten Mäuse deutlich (Abb. 5.34).



**Abb. 5.34:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von zwei A2780cis-Tumorquerschnitten nach der Präparation aus Mäusen, die mit holotransferrintargetierten 5 % mPEG-Liposomen (Cisplatindosierung: 9 mg/kg KG) behandelt wurden; abgebildet ist eine Überlagerung, bei der einmal DAPI (blau, Zellkerne) und einmal im NIR (rot, DiR der Cisplatinliposomen) angeregt wurde. Die Aufnahmen wurden von Herrn Dr. Thomas Müller zur Verfügung gestellt.

Zunächst kann man feststellen, dass das in der Maus akquirierte Intensitätssignal nicht vom isolierten Marker (DiR) stammt, der nach Applikation nicht mehr in die Liposomenmembran inkorporiert ist. Man erkennt bei fluorezenzmikroskopischer Betrachtung, dass es sich bei den

angefärbten Strukturen unter Berücksichtigung ihrer Form und Größenverhältnisse um Liposomen handelt (Abb. 5.34). Diese scheinen sich jedoch vorwiegend in Gefäßen (Abb. 5.34A) oder in der Tumormatrix (Abb. 5.34B) zu befinden. Da das Cisplatin selbst nicht markiert wurde, kann nicht beurteilt werden, ob und wie viel Cisplatin sich noch in den sichtbaren rot gefärbten Liposomen befindet und ob dieses in die Tumormatrix oder in die Tumorzellen abgegeben wurde. Es ist ebenfalls eine Agglomeration der Liposomen zu verzeichnen. Dies und die Tatsache, dass die Intrazellularräume im NIR kein Signal geben, können auf eine unzureichende Freisetzung hindeuten.

Eine zweite Erklärung für den nicht eintretenden Tumoreffekt bei diesen Untersuchungen kann eine *in vivo* noch viel stärker als *in vitro* (Resistenzfaktoren zwischen 3,4 und 4,4) ausgeprägte Resistenz darstellen. Zumal auch mit höheren Dosierungen des freien Wirkstoffes kein Effekt am A2780cis-Tumor erkennbar war.

Zusammengenommen verdeutlichen die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Liposomenanwendung ein *in vivo*-geeignetes Verfahren darstellt, die Chemoresistenz der Ovarialkarzinomzellen zu überwinden. Liposomen sind durch ihre Verteilungseigenschaften im Organismus gut geeignet, im Tumor zu akkumulieren, und verursachen gleichzeitig auch in höheren Konzentrationen, die eine Behandlung mit freiem Wirkstoff nicht mehr erlauben würde, keine kurzfristig zu beobachtenden unerwünschten Toxizitäten. Eine Tumoransteuerung durch die Kopplung von Holotransferrin an die Liposomenoberfläche wirkt sich dabei positiv auf das Akkumulationsverhalten im Tumor aus.

Untersuchungen an einem anderen Resistenzmodell haben gezeigt, dass für den liposomalen Effekt der molekularen Resistenzüberwindung ein Tumor mit Zellen, die Wildtyp-p53 besitzen, Voraussetzung ist. Da über den bisher betrachteten Zeitraum auch nach zweimaliger hoch dosierter Behandlung keine Stagnation des Wachstums der resistenten Tumore zu beobachten war, werden auch hier die Grenzen der *in vitro* stark wirksamen liposomalen Cisplatinformulierung deutlich aufgezeigt. Erste Erkenntnisse lassen auf eine unvollständige Freisetzung der Liposomen als Ursache für den geringen Effekt auf den Tumor schließen. Gerade im Vergleich zu den bereits in der Klinik weit fortgeschrittenen Liposomen des IMP Lipoplatin™ wird die problematische Übertragbarkeit des zweidimensionalen Zellmodells auf ein im Organismus eingebettetes Tumorgewebe offensichtlich. Dieses zeigt trotz seines *in vivo*-Erfolges *in vitro* eine wesentliche geringere zytotoxische Aktivität bei Ovarialkarzinomzellen mit und ohne induzierte Chemoresistenz als die im Zuge dieser Arbeit

hergestellten Cisplatinliposomen, jedoch den gleichen apoptoseabhängigen Wirkmechanismus. Daher sollten weitere Untersuchungen darauf abzielen, die Freisetzung der 5 % mPEG-Liposomenformulierung weiter zu verbessern und somit den sehr effektiven Mechanismus der Resistenzumgehung durch eine Beeinflussung der Apoptose auch *in vivo* auszulösen.

Für das weitere Vorgehen dieser Arbeit war die Limitierung der Liposomen, welche eine Unterexpression des intrinsischen Apoptoseweges auf zellulärer Ebene als einen Hauptmechanismus der Chemoresistenz belegen, Anlass, die Chemoresistenz der verwendeten Zelllinie weiterhin zu charakterisieren. Dazu wurden Resistenzphänomene gewählt, die die physiologische Situation eines Tumors mit seiner Anordnung als Gewebe und der Kommunikation mit umliegenden Zellen stärker berücksichtigen.

## 5.5 Einfluss von niedermolekularem Heparin auf die Chemoresistenz

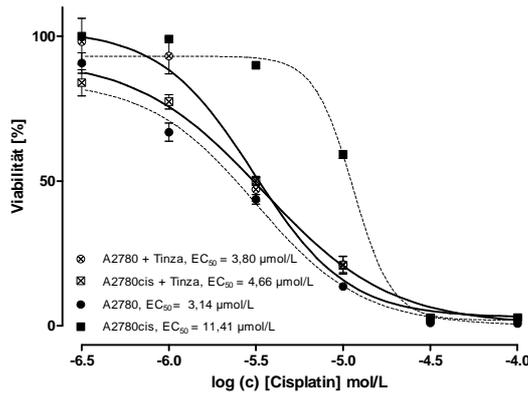
Da es Berichte über die günstigen Auswirkungen einer Heparinisierung von Patienten auf die Chemotherapie gibt und Heparin selbst eine Vielzahl möglicher Interaktionspartner im Tumor und dem umliegenden Gewebe besitzt (Kapitel 2.5), wurden Untersuchungen unternommen, in-wie-weit Heparin sich auch auf die Chemoresistenz auswirkt. Gerade da *targetierte* Liposomen *in vivo* besser akkumulieren, liegt ein Zusammenhang mit dem intratumoral erhöhten Druck nahe<sup>265</sup>, für den zu einem großen Teil heparinbindende VEGFs verantwortlich gemacht werden<sup>303</sup>. Zudem wurde im Zusammenhang mit den Wechselwirkungen von Heparin und Adhäsionsmolekülen, die auch eine Rolle bei der Chemoresistenz spielen können, der Begriff der CAM-DR geprägt.<sup>267</sup>

Dies gab den Anlass die Auswirkungen von Heparin auf die Cisplatinresistenz zu untersuchen, da die Tumoreffekte des Heparins potentiell stärker in Zusammenhang mit der Tumorumgebung stehen als der zelluläre Effekt der Liposomen. Für die Versuche wurde Tinzaparin als größter Vertreter der NMH (6500 Da) gewählt, weil einerseits klinische Studien zum Therapiebenefit hauptsächlich mit NMH existieren und andererseits einzelne Aufklärungsversuche des Mechanismus *in vitro* mit UFH beschrieben sind. So können in ersten Experimenten möglichst viele Eigenschaften der sehr vielseitigen Substanzklasse der Heparine vereint werden.

### 5.5.1 Cisplatintoxizität bei Heparinbehandlung

Zunächst wurde getestet, ob Tinzaparin Einfluss auf die Toxizität von Cisplatin in A2780- und resistenten A2780cis-Zellen und somit die Chemoresistenz hat. Da noch keine Daten zu diesem Sachverhalt existieren, wurden für einen möglichst breiten Ansatz zwei Zellzahlen (20.000 und 40.000 Zellen/Well) und drei Zeitpunkte innerhalb von 72 h gewählt (24 h, 48 h und 72 h). Die Zeitangabe bezieht sich dabei auf die Inkubation mit Cisplatin, die den Zeitpunkt 0 darstellt. Bei vorbehandelten Zellen hat eine 18-stündige Vorinkubation mit 50 µg/mL Tinzaparin bereits stattgefunden.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5.35:** Zytotoxizität von Cisplatin allein und nach Vorinkubation mit 50 µg/mL Tinzaparin in A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 40.000 Zellen; der Graph zeigt jeweils exemplarisch einen Versuch in Triplikaten.

Eine Vorinkubation mit Tinzaparin hat auf die Toxizität des Cisplatin nach 72 h in den A2780-Zellen keinen Einfluss, während es in den resistenten Zellen die Chemoresistenz fast vollständig überwindet (Abb. 3.35).

**Tab. 5.11:** Zusammenfassung der Zytotoxizität von freiem Cisplatin allein (ohne) und mit gleichzeitiger Inkubation (Tinza (gl.)) oder 18 h Vorinkubation (Tinza) von Tinzaparin (50 µg/mL) (n = 3) mit den daraus resultierenden Resistenzfaktoren ( $EC_{50}$  A2780cis /  $EC_{50}$  A2780)

Inkubationszeit	Zusatzbehandlung	Zellen /Well	A2780			A2780cis			$R_f$
			p $EC_{50}$		EC50	p $EC_{50}$		EC50	
			MW	SE	[µmol/L]	MW	SE	[µmol/L]	
24 h	ohne	20.000	4,89	0,22	<b>12,88</b>	4,31	0,21	<b>48,98</b>	<b>3,8</b>
		40.000	4,87	0,10	<b>13,49</b>	4,08	0,17	<b>83,18</b>	<b>6,2</b>
	Tinza (gl.)	20.000	4,76	0,03	<b>17,38</b>	4,50	0,05	<b>50,62</b>	<b>2,9</b>
		40.000	4,72	0,04	<b>19,05</b>	4,36	0,03	<b>43,65</b>	<b>2,3</b>
	Tinza	20.000	5,01	0,37	<b>9,77</b>	4,34	0,07	<b>45,71</b>	<b>4,7</b>
		40.000	4,90	0,33	<b>12,59</b>	4,27	0,17	<b>53,70</b>	<b>4,3</b>
48 h	ohne	20.000	5,36	0,64	<b>4,37</b>	4,83	0,05	<b>14,79</b>	<b>3,4</b>
		40.000	5,30	0,15	<b>5,01</b>	4,81	0,07	<b>15,49</b>	<b>3,1</b>
	Tinza (gl.)	20.000	5,14	0,04	<b>7,24</b>	4,83	0,09	<b>14,79</b>	<b>2,0</b>
		40.000	5,03	0,06	<b>9,33</b>	4,73	0,06	<b>18,62</b>	<b>2,0</b>
	Tinza	20.000	5,39	0,87	<b>4,07</b>	4,66	0,11	<b>21,88</b>	<b>5,4</b>
		40.000	5,32	0,51	<b>4,79</b>	4,76	0,18	<b>17,38</b>	<b>3,6</b>
72 h	ohne	20.000	5,75	0,22	<b>1,78</b>	5,11	0,26	<b>7,76</b>	<b>4,4</b>
		40.000	5,57	0,31	<b>2,69</b>	5,05	0,20	<b>8,91</b>	<b>3,3</b>
	Tinza (gl.)	20.000	5,57	0,05	<b>2,69</b>	4,94	0,22	<b>11,48</b>	<b>4,3</b>
		40.000	5,41	0,07	<b>3,89</b>	5,02	0,05	<b>9,55</b>	<b>2,5</b>
	Tinza	20.000	5,66	0,19	<b>2,19</b>	5,15	0,06	<b>7,08</b>	<b>3,2</b>
		40.000	5,41	0,15	<b>3,89</b>	5,33	0,38	<b>4,68</b>	<b>1,2</b>

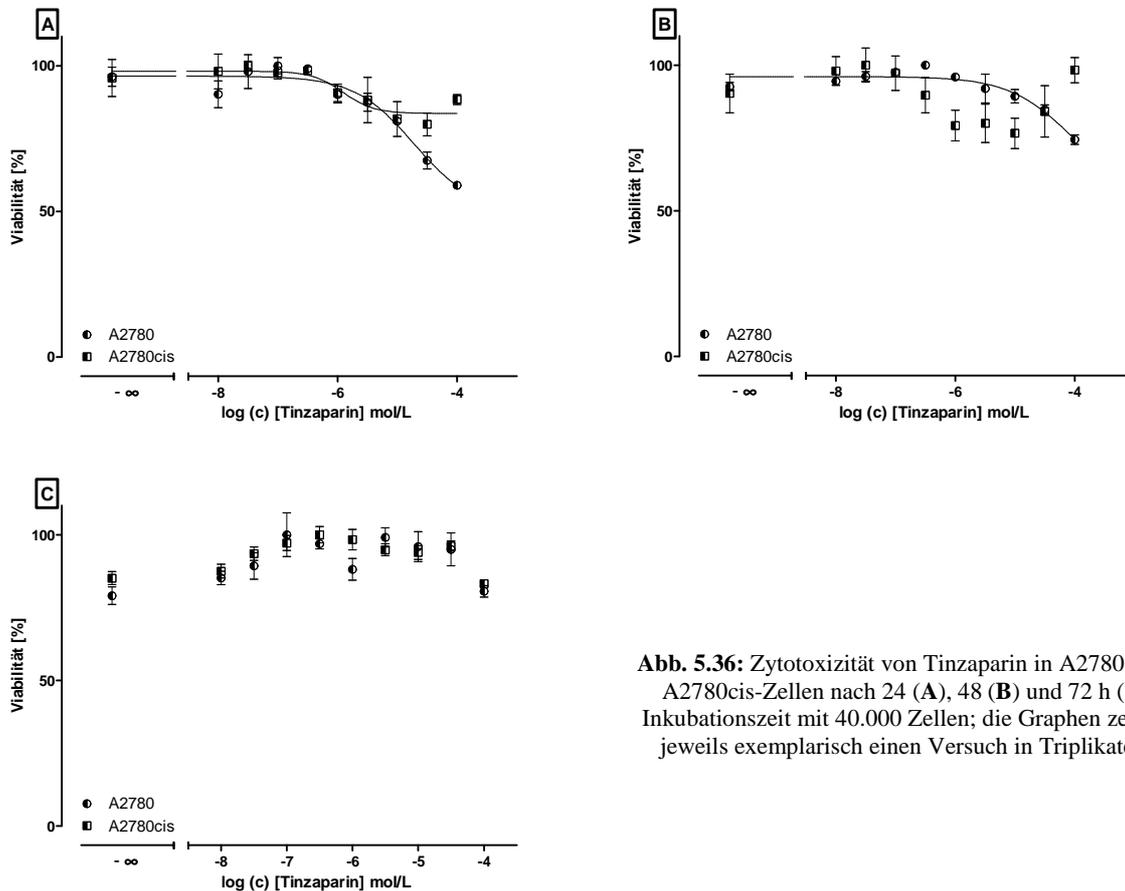
Die  $EC_{50}$  sinken bei allen Behandlungsmethoden mit fortschreitender Zeit und sind für die resistenten Zellen stets höher als für die A2780-Zellen. Sie spiegeln das aus den Versuchen mit Liposomen bekannte typische Verhalten des Resistenzmodells wider. Für beide Tinzaparinbehandlungen ist im Vergleich zu alleinigem Cisplatin kein Muster erkennbar, das durch die unterschiedliche Zellzahl oder den Unterschied der Vorinkubation zur gleichzeitigen Inkubation mit Cisplatin verursacht würde (Tab. 5.11).

Bemerkenswert ist allerdings die starke Zunahme der Platintoxizität in Experimenten nach 72 h bei 40.000 Zellen, die mit Tinzaparin vorinkubiert wurden. Dort liegt ein halbmaximaler Effekt bei 4,68  $\mu\text{mol/L}$  Cisplatin vor, während die anderen beiden Behandlungsmethoden diesen Effekt erst bei einer deutlich höheren Konzentration zwischen 7,76  $\mu\text{mol/L}$  und 11,48  $\mu\text{mol/L}$  zeigen. Die  $EC_{50}$  liegt bei den sensitivierten Zellen fast auf dem Niveau der gleich behandelten A2780-Zellen (3,89  $\mu\text{mol/L}$ ) und resultiert in einem Resistenzfaktor von 1,2 (Tab. 5.11). Der gewählte breite experimentelle Ansatz zeigt dabei, wie limitiert dieser Effekt des Tinzaparin auf das Ansprechen der resistenten Zellen auf Cisplatin ist. Das verzögerte Eintreten des Effektes nach 72 h kann nicht wie bei der liposomalen Formulierung von Cisplatin teilweise auf eine zeitverzögerte Aufnahme zurückgeführt werden, da für das relativ große polyanionische Glykosaminoglykan Tinzaparin ein Überschreiten der Zellmembran sehr unwahrscheinlich ist. Vielmehr handelt es sich wahrscheinlich um eine Aktivierung von Signalkaskaden vom extrazellulären Raum aus, die diese Zeit in Anspruch nehmen. Welcher Art diese Signalwege sind und welche Konsequenz letztlich für die Sensitivierung verantwortlich ist, gilt es aufzuklären. Die Tatsache, dass eine gleichzeitige Inkubation mit Tinzaparin besagte Effekte nicht auslöst, lässt vermuten, dass eine Beeinflussung der Zellen durch das Heparin, die zur Überwindung der Cisplatinresistenz führt, schon vor dem Kontakt mit dem Zytostatikum erfolgt sein muss, um die Zellen zu sensitivieren. So können außerdem direkte Wechselwirkungen zwischen Tinzaparin und Cisplatin wie eine veränderte Komplexierung des Platinzentralatoms oder Ligandenaustausch hin zu einer in resistenten Zellen wirksameren Form, wie es bei der Entwicklung der neueren Platinanaloge vorgenommen wurde, ausgeschlossen werden.

Eine weitere Voraussetzung für die Sensitivierung ist die höhere Zellzahl von 40.000 Zellen/Well. Dies deutet auf eine Beeinflussung von Resistenzmechanismen hin, die bei einer höheren Konfluenz der Zellen bzw. im Gewebeverband eine Rolle spielen. Vorstellbar sind Veränderungen bei der Signalweiterleitung über Zell-Zell-Kontakte oder bei Adhäsionsvorgängen (CAM-DR).

### 5.5.2 Toxizität des Tinzaparins

Um einen toxischen Effekt des Tinzaparins selbst auszuschließen, wurde dieser ebenfalls mittels MTT-*assays* überprüft.



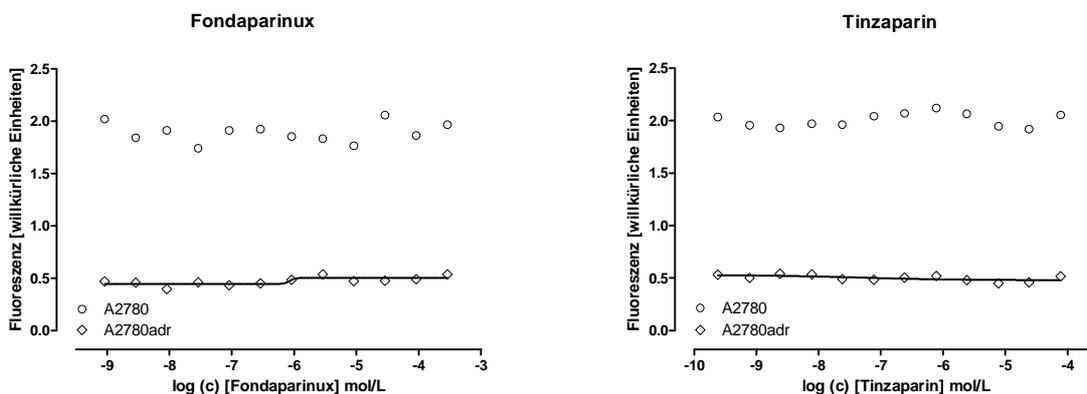
**Abb. 5.36:** Zytotoxizität von Tinzaparin in A2780- und A2780cis-Zellen nach 24 (A), 48 (B) und 72 h (C) Inkubationszeit mit 40.000 Zellen; die Graphen zeigen jeweils exemplarisch einen Versuch in Triplikaten.

Die Versuche wurden mit jeweils 20.000 und 40.000 Zellen/Well für die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h durchgeführt ( $n = 3$ ). Bei keinem Zeitpunkt, keiner Zellzahl oder Konzentration war eine Toxizität von Tinzaparin festzustellen. Wie an den exemplarisch dargestellten Graphen (Abb. 5.36) deutlich wird, konnte keine  $EC_{50}$  ermittelt werden. Bei der in Versuchen mit Cisplatin eingesetzte Konzentration von  $7,69 \mu\text{mol/L}$  ( $= 50 \mu\text{g/mL}$ ) unterscheiden sich die tinzaparinbehandelten Zellen nicht signifikant von unbehandelten Zellen. Daher kann ein synergistischer Toxizitätseffekt des NMH, der sich mit der Cisplatintoxizität addiert, ausgeschlossen werden.

### 5.5.3 Effluxresistenzen

#### 5.5.3.1 Überprüfung des beschriebenen MDR-Effektes von UFH

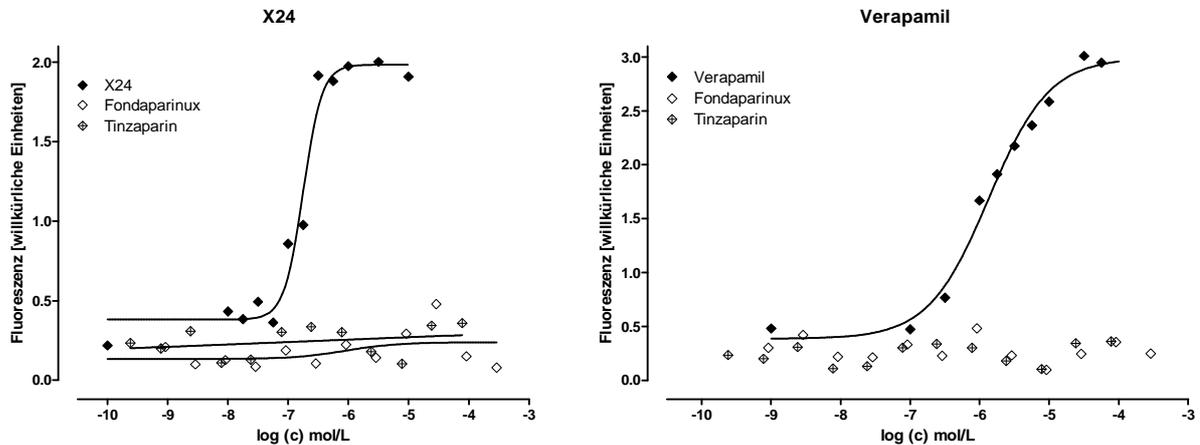
Es existieren einzelne Untersuchungen des Einflusses von UFH auf eine MDR-abhängige Chemoresistenz, die bei Doxorubicin und anderen Substraten großen Einfluss hat, für eine Cisplatinresistenz jedoch eine untergeordnete Rolle spielt (Abschnitt 2.1.2). Dabei hat UFH eine inhibierende Wirkung auf den Efflux von Arzneistoffen über P-GP. Durch Calcein-AM und Rhodamin123-assays konnte überprüft werden, ob das in dieser Arbeit verwendete Tinzaparin ebenfalls ein Inhibitor von MDR-Transportern ist. Im Hinblick auf weitere potentiell notwendige Versuche wurden auch doxorubicinresistente A2780adr-Zellen untersucht, die P-GP überexprimieren und zusammen mit den A2780-Zellen ein Resistenzmodell für MDR-abhängige Chemoresistenz darstellen. Außerdem wurde neben Tinzaparin auch Fondaparinux untersucht, um bei einer eventuellen MDR-Inhibition erste Hinweise auf eine Strukturabhängigkeit des Effektes zu erhalten.



**Abb. 5.37:** Calcein(-AM)-Efflux (Substratkonzentration:  $0,3 \mu\text{mol/L}$ ) aus A2780-Zellen und A2780adr-Zellen ( $27.000$  Zellen/Well) in Medium  $3$  h nach der Inkubation mit einer Verdünnungsreihe von Fondaparinux (links) oder Tinzaparin (rechts); gezeigt ist ein Einzelversuche aus einer Versuchsreihe mit  $n = 3$ .

Für den getesteten Konzentrationsbereich, der bei Fondaparinux zwischen  $2,9 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  und  $9,2 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$  und bei Tinzaparin zwischen  $7,7 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  und  $2,4 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$  liegt, konnte in allen Experimenten keine Inhibition des Calcein(-AM)-Effluxes in Form eines Anstiegs der intrazellulären Fluoreszenz festgestellt werden. Die Hintergrundfluoreszenz ist dabei in A2780adr-Zellen niedriger als in A2780-Zellen (Abb. 5.37).

Um diese Erkenntnisse abzusichern wurden an den A2780adr-Zellen die bekannten P-GP-Inhibitoren X24 und Verapamil im direkten Vergleich zu Fondaparinux und Tinzaparin getestet.



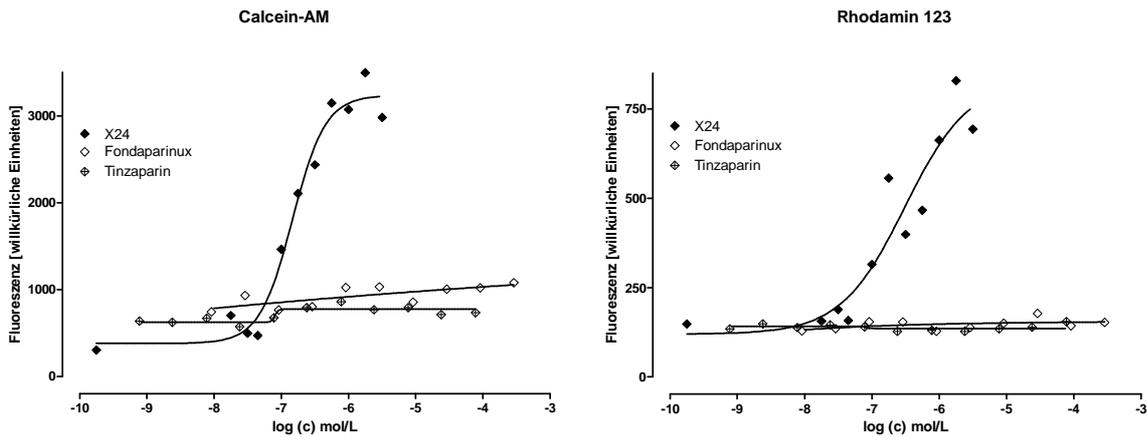
**Abb. 5.38:** Calcein(-AM)-Efflux (Substratkonzentration: 0,3  $\mu\text{mol/L}$ ) aus A2780adr-Zellen (27.000 Zellen/Well) in Medium 3 h nach der Inkubation mit einer Verdünnungsreihe von Fondaparinux oder Tinzaparin im Vergleich zu den etablierten Inhibitoren X24 (links) und Verapamil (rechts); gezeigt ist ein Einzelversuche aus einer Versuchsreihe mit  $n = 3$ .

**Tab. 5.12:** Zusammenfassung der  $\text{IC}_{50}$  der P-GP-Inhibitoren in allen Versuchen ( $n = 3$ )

A2780adr					
Inhibitor	Inkubationszeit	Bedingung	$\text{pIC}_{50}$		$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]
			MW	SE	
X24	1 h	KHP	6,66	0,06	<b>0,22</b>
	3 h	Medium	6,48	0,10	<b>0,33</b>
Verapamil	1 h	KHP	6,13	0,07	<b>0,74</b>
	3 h	Medium	6,01	0,07	<b>0,98</b>

Der direkte Vergleich mit den im mikro- bzw. nanomolaren Bereich wirksamen Inhibitoren X24 und Verapamil (Tab. 5.12) bestätigt, dass im experimentellen Ansatz eine P-GP-Inhibition möglich ist, jedoch im untersuchten Konzentrationsbereich weder bei Tinzaparin noch Fondaparinux eintritt (Abb. 5.38).

Auch durchflusszytometrische Untersuchungen, die neben dem Calcein(-AM)- auch den Rhodamin123-Efflux betrachteten, zeigen keine inhibitorischen Eigenschaften von Fondaparinux und Tinzaparin (Abb. 5.39 und Tab. 5.13).



**Abb. 5.39:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Calcein(-AM)- (links) und Rhodamin 123-Akkumulation (Substratkonzentration jeweils 0,3  $\mu\text{mol/L}$ ) in A2780adr-Zellen (100.000 Zellen/Well) in Medium (Calcein-AM) oder KHP-Puffer (Rhodamin 123) 15 min (Calcein-AM) bzw. 1 h (Rhodamin 123) nach der Inkubation mit Verdünnungsreihen von Fondaparinux und Tinzaparin. Gezeigt ist jeweils ein Einzelversuche aus einer Versuchsreihe mit  $n = 3$ .

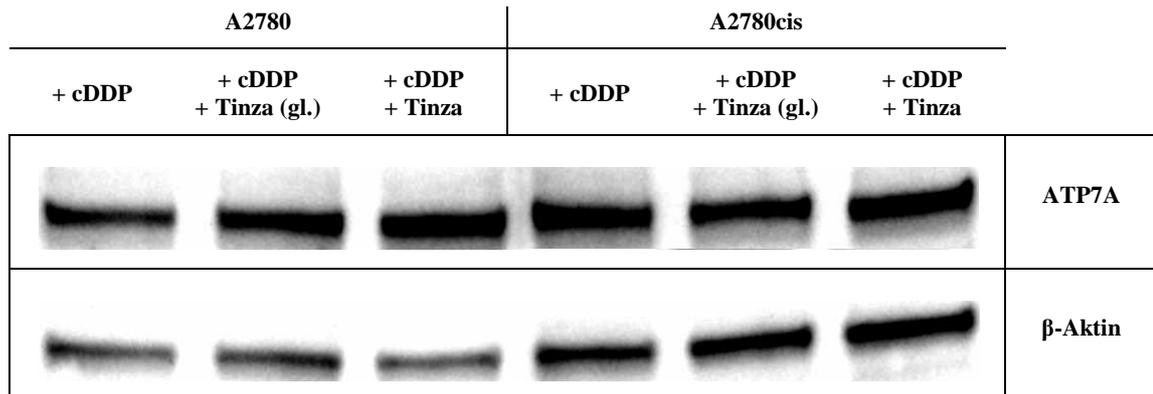
**Tab. 5.13:** Zusammenfassung der  $\text{IC}_{50}$  der P-GP-Inhibitoren in allen durchflusszytometrischen Versuchen ( $n = 3$ )

<b>A2780adr</b>					
Inhibitor	Inkubationszeit	Detektion	pIC <sub>50</sub>		IC <sub>50</sub>
			MW	SE	[ $\mu\text{mol/L}$ ]
X24	15 min	Calcein-AM	6,83	0,07	<b>0,15</b>
	1 h	Rhodamin 123	6,51	0,36	<b>0,31</b>

Die Ergebnisse der Effluxuntersuchungen zeigen deutlich, dass die Sensitivierung der Ovarialkarzinomzellen nicht auf einem Mechanismus beruht, der mit der MDR assoziiert ist. Die höchsten getesteten Konzentrationen liegen mit  $2,9 \times 10^{-4}$  mol/L (Fondaparinux) und  $7,7 \times 10^{-5}$  mol/L (Tinzaparin) zehnfach über der in Versuchen eingesetzten Tinzaparinmenge von  $50 \mu\text{g/mL}$  ( $7,7 \times 10^{-6}$  mol/L). Die vereinzelt berichtete Beeinflussung der MDR durch UFH muss somit in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen als Mechanismus des sensitivierenden Effekts der NMH abgelehnt werden.

### 5.5.3.2 Einfluss auf den ATP7A-Efflux

Da der sensitivierende Effekt des Tinzaparin nicht mit einem verminderten MDR-assoziierten Efflux in Zusammenhang steht, wurde der ebenfalls ATP-abhängige Hauptmechanismus des Platineffluxes über ATP7A getestet.



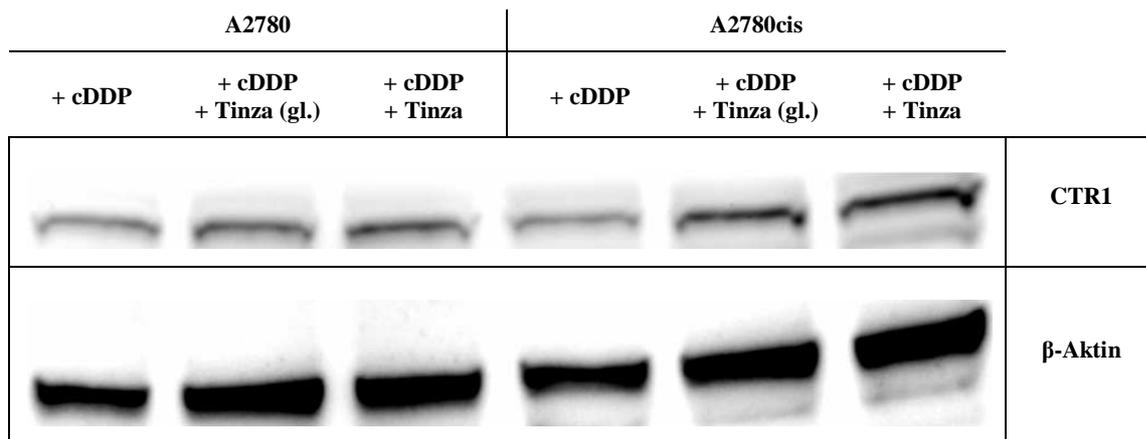
**Abb. 5.40:** ATP7A-Expression nach Behandlung mit 2  $\mu\text{mol/L}$  Cisplatin für 72 h ohne, mit gleichzeitiger Inkubation oder mit Vorinkubation von Tinzaparin in A2780-Zellen und A2780cis-Zellen; exemplarische Darstellung eines einzelnen Versuchs

Sowohl in resistenten als auch nicht resistenten A2780-Ovarialkarzinomzellen wird die Expression von ATP7A durch eine Tinzaparingabe zusätzlich zu Cisplatin über 72 h nicht beeinflusst (Abb. 5.40). Es gibt weder einen Unterschied zwischen mit Tinzaparin behandelten Zellen und unbehandelten Zellen, noch einen Unterschied zwischen einer gleichzeitigen Inkubation und Vorinkubation. Bezogen auf die  $\beta$ -Aktinbanden ist in der A2780-Zelllinie wahrscheinlich generell mehr ATP7A vorhanden. Dies widerspricht dem Vorhandensein einer Effluxresistenz über ATP7A in den resistenten Zellen. Da sich jedoch keine Beeinflussung durch Tinzaparin zeigte, wurde der Versuch nicht wiederholt und Aussagen zur allgemeinen Expression des Proteins sind vorläufig.

Die Überwindung einer Effluxresistenz durch Tinzaparin über prominente mit Chemoresistenz assoziierte Effluxtransporter wie P-GP oder ATP7A scheint damit höchst unwahrscheinlich. Daher wurde im nächsten Schritt überprüft, ob eine *pre-target* Resistenz über den Influx überwunden wird.

#### 5.5.4 Influxresistenz

Wie bei den Cisplatinliposomen wurde auch für die Behandlung mit Cisplatin und Tinzaparin die Expression von CTR1 untersucht (Abschnitt 5.1.4.1). Der Transporter ist hier sogar entscheidender, da er nicht wie bei liposomalem Cisplatin, welches den Transporter durch endozytotische Aufnahme umgeht, neben der passiven Diffusion der Hauptaufnahmemechanismus des frei vorliegenden Wirkstoffes in die Zelle ist.

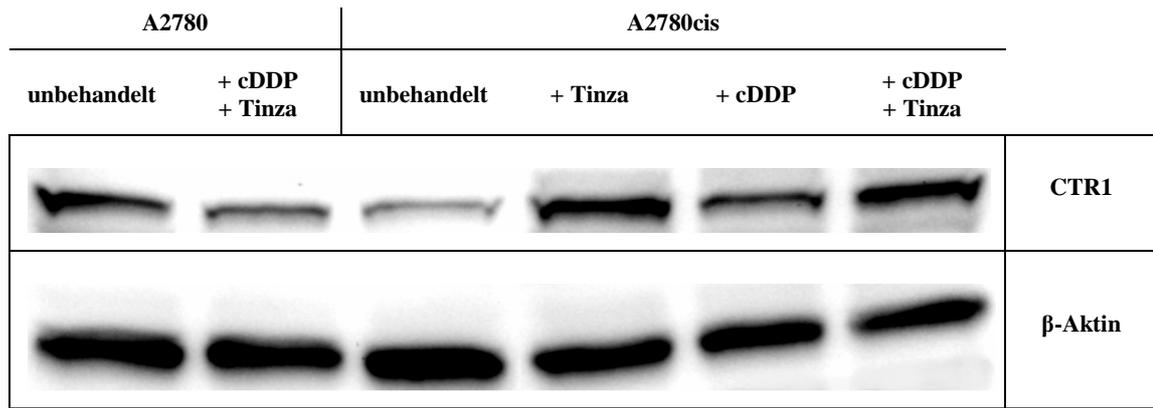


**Abb. 5.41:** CTR1-Expression nach Behandlung mit 2  $\mu\text{mol/L}$  Cisplatin für 72 h ohne, mit gleichzeitiger Inkubation oder mit Vorinkubation von Tinzaparin (50  $\mu\text{g/mL}$ ) in A2780-Zellen und A2780cis-Zellen; exemplarische Darstellung eines einzelnen Versuchs

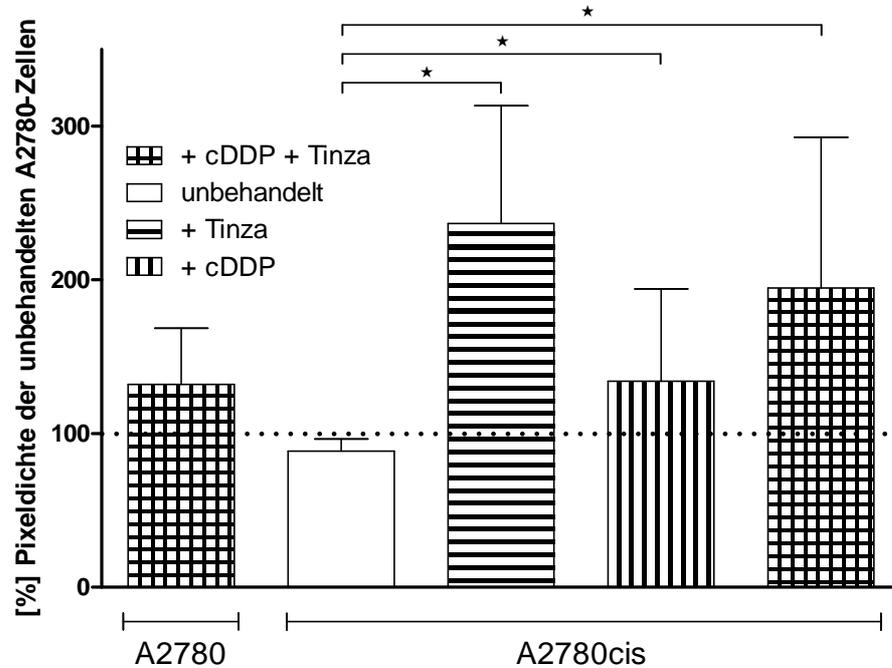
Während in den nicht resistenten A2780-Zellen die Expression von CTR1 unter Zugabe von Tinzaparin nahezu unbeeinflusst bleibt, ist in den resistenten Zellen eine deutliche Zunahme zu beobachten (Abb. 5.41; A2780cis, cDDP + Tinza (gl.) und cDDP + Tinza). Die Überexpression des Transporters ist dabei unabhängig von der Tatsache, ob das NMH gleichzeitig mit Cisplatin zu den Zellen gegeben wird oder eine Vorinkubation über Nacht stattfindet. Wie schon bei den Experimenten mit liposomalem Cisplatin beobachtet liegt die Expression der nur mit Cisplatin behandelten resistenten A2780cis-Zellen unter der der nicht resistenten Zellen (A2780, cDDP gegenüber A2780cis, cDDP).

Dieser erste Versuch zur Ermittlung des Effektes von Tinzaparin auf Influxtransporter zeigt, dass Tinzaparin anscheinend einen Einfluss auf die Expression des Kupfer- und Cisplatintransporters hat. Dies könnte durch eine erhöhte zelluläre Aufnahme ein Grund für die sensitivierende Wirkung des NMH sein.

Als nächster Schritt galt es zu zeigen, ob die Induktion der Expression von CTR1 reproduzierbar ist und ob es sich um einen Kombinationseffekt mit Cisplatin oder einen alleinigen Effekt des Tinzaparin handelt. Durch einen veränderten Versuchsaufbau konnte dies überprüft und in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt werden. Da die Expression des Transporters bei beiden Tinzaparin behandelten Ansätzen der resistenten Zellen beeinflusst wird, die sensitivierende Wirkung (Abschnitt 5.5.1) jedoch nur bei den vorinkubierten Zellen auftritt, wurden im Folgenden nur letztere untersucht.



**Abb. 5.42:** CTR1-Expression in unbehandelten und mit Cisplatin (2 mmol/L) und Tinzaparin (50 µg/mL) behandelten A2780-Zellen, sowie unbehandelten, mit Tinzaparin (50 µg/mL) behandelten, mit Cisplatin behandelten und mit beidem behandelten A2780cis-Zellen; exemplarische Darstellung eines einzelnen Versuchs



**Abb. 5.43:** Relative Quantifizierung der CTR1-Expression (n = 3) ermittelt durch Auswertung der Pixeldichte (unbehandelte A2780-Zellen = 100 %); die Zellen wurden nicht behandelt oder für 72 h mit 2 µmol/L Cisplatin beimpft. Tinzaparin wurde zu 50 µg/mL mit Cisplatin kombiniert oder alleine eingesetzt.

Die unbehandelten resistenten Zellen exprimieren weniger CTR1 als die unbehandelten A2780-Zellen (Abb. 5.43, weißer Balken). Dies zeigt wie bei den Versuchen mit liposomalem Cisplatin, dass die negative Regulierung des Transporters Teil der im Zellmodell vorliegenden Resistenz ist (Abschnitt 5.1.4.1). Die Auswirkung des Tinzaparins auf die Expression von CTR1 ist dabei ein alleiniger Effekt des NMH unabhängig von der Cisplatinbehandlung. Die Expression steigt in den nur mit Tinzaparin inkubierten A2780cis-

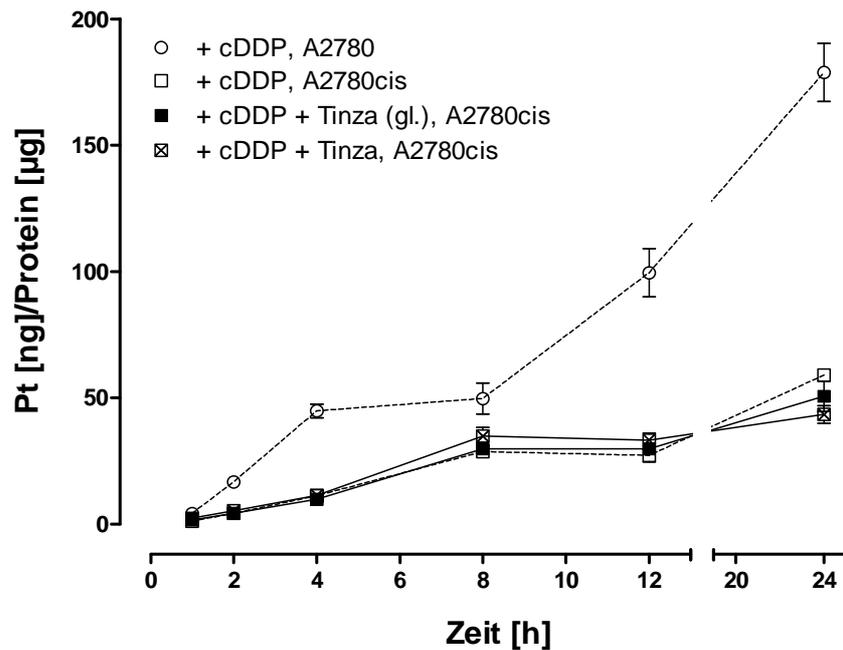
Zellen auf über 200 % der Expression in unbehandelten Zellen an (Abb. 5.43, quergestreifter Balken). Auch bei Kombination mit dem Zytostatikum ist der Effekt signifikant zu beobachten (Abb. 5.43, kariertes Balken). Die alleinige Inkubation der resistenten Zellen mit Cisplatin bewirkt in dieser Versuchsreihe zusammengenommen eine scheinbare Erhöhung der CTR1-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen, die sich in den Einzelversuchen jedoch unterscheidet (Abb. 5.42). Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Verglichen mit den Ergebnissen vorheriger Versuche, bei denen Cisplatin allein ebenfalls keine signifikante Änderung in der CTR1-Expression, aber mit der Tendenz zur Unterexpression zeigt (Abb. 5.7), hat der reine Wirkstoff höchstwahrscheinlich im Gegensatz zu Tinzaparin alleine oder in Kombination keine Auswirkungen.

Hier wird deutlich, dass das NMH eine gravierende Überexpression des Influxtransporters verursacht. Diese Antwort tritt im Zeitrahmen von ca. 90 h (~ 18 h Vorinkubation + 72 h Inkubation) auf. Bei einer darauf folgenden Cisplatininkubation trifft der Wirkstoff auf eine resistente Zelle, bei der mehr als doppelt so viel des Aufnahmesystems zur Verfügung steht. Gleichzeitig hat er ebenfalls eine deutlich gesteigerte Toxizität, wenn die Zellen mit Tinzaparin behandelt wurden.

### **5.5.5 Zelluläre Aufnahme nach NMH-Behandlung**

An dieser Stelle gilt es abzuklären, ob die intrazellulären Platinkonzentrationen als Folge auf den vermehrt ausgebildeten Influxtransporter ansteigen.

Durch die mehr als doppelt so hohe Expression des CTR1-Influxtransporters in den resistenten Zellen als Folge auf eine Inkubation mit Tinzaparin sind damit einhergehend höhere intrazelluläre Platinkonzentrationen zu erwarten, die die Sensitivierung funktionell erklären. Daher wurde die Cisplatin Aufnahme unter dem Einfluss des NMH untersucht.



**Abb. 5.44:** Intrazelluläre Akkumulation von 20 µmol/L Cisplatin über 24 h in resistenten A2780cis-Zellen unter dem Einfluss einer gleichzeitigen Inkubation oder Vorinkubation mit 50 µg/mL Tinzaparin (durchgezogene Linie) im Vergleich zu einer alleinigen Cisplatinbehandlung in A2780- und A2780cis-Zellen (gestrichelte Linie)

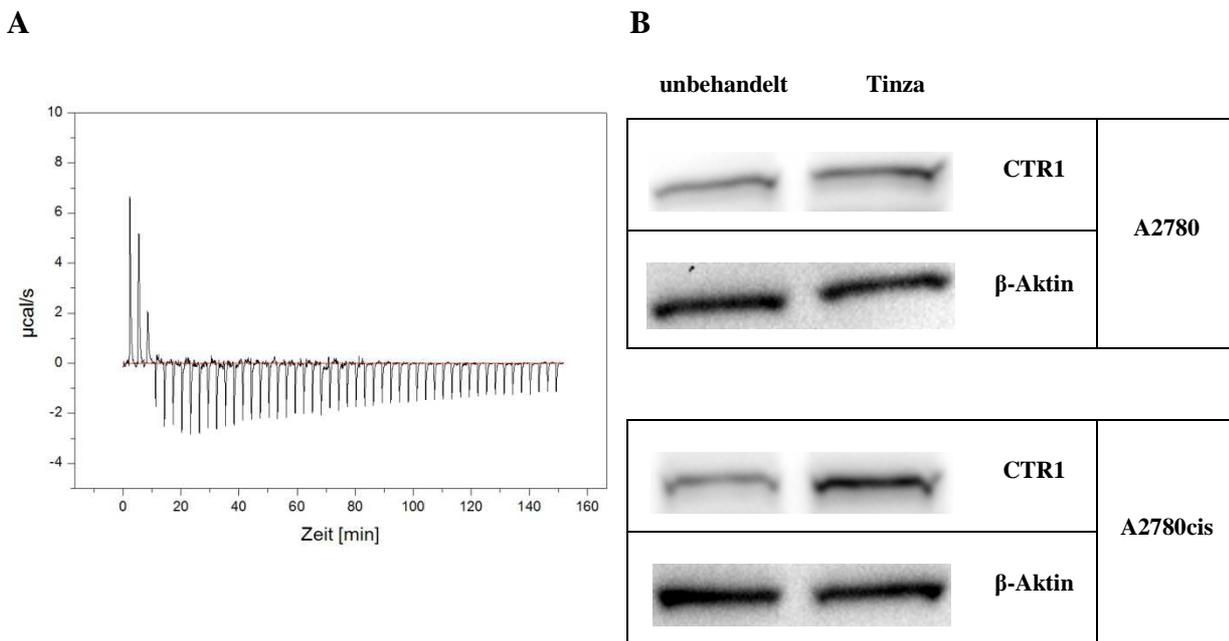
Die intrazellulären Platinkonzentrationen nach einer gleichzeitigen Tinzaparininkubation und Tinzaparinvorinkubation unterscheiden sich auch nach 24 h erstaunlicherweise nicht von den Konzentrationen in resistenten Zellen, die nur mit Cisplatin behandelt wurden (Abb. 5.44, Vierecke). Sie liegen ebenfalls deutlich unter dem Niveau von Cisplatin allein in nicht resistenten Zellen (Abb. 5.44, Kreise).

Dies steht in starkem Kontrast zu der Influxtransporterexpression und verdeutlicht, dass die starke Beeinflussung von CTR1 durch Tinzaparin sich nicht funktionell niederschlägt. Eine Erhöhung der intrazellulären Zytostatikakonzentration kann somit nicht der entscheidende Mechanismus der Sensitivierung der resistenten Zellen sein. Zum einen korreliert eine erhöhte Proteinexpression nicht zwangsläufig mit einer höheren Aktivität, zum anderen kann bei der verwendeten Lysemethode nicht zwischen internalisiertem und membranständigem Transporter unterschieden werden. Eine reine Überwindung von *pre-target* Resistenz durch NMH ist somit unwahrscheinlich, zumal der Effluxtransporter ATP7A unbeeinflusst exprimiert wird.

### 5.5.6 Mögliche Ursachen der Sensitivierung

Durch die Experimente zum Einfluss von NMH auf die Chemoresistenz der A2780-/A2780cis-Zelllinie zeigt sich, dass Tinzaparin in der Lage ist resistente Ovarialkarzinomzellen für Cisplatin zu sensitivieren, so dass der Wirkstoff annähernd gleiche Toxizität erreicht wie in nicht resistenten Zellen. Voraussetzungen dafür sind zum einen eine Vorbehandlung der Zellen für ca. 18 h sowie eine hinreichende Zelldichte von in diesem Fall 40.000 Zellen/Well. Während der untersuchte Effluxtransporter in seiner Expression nicht verändert wird, induziert Tinzaparin eine starke Überexpression des Influxtransporters CTR1, der einen der Hauptaufnahmewege von Cisplatin darstellt.

Als mögliche Ursache liegt zunächst eine Bindung bzw. Komplexierung von zweiwertigem Kupfer an Tinzaparin nahe, wie sie für Heparin als polyanionisches Polysaccharid schon in der Literatur beschrieben ist.<sup>304</sup> Als Reaktion auf eine Kupferdepletion würde die Zelle kompensatorisch den Transporter verstärkt exprimieren. Eine Bindung konnte mittels isothermaler Titrationskalorimetrie gezeigt werden (Abb. 5.45A).



**Abb. 5.45:** **A:** Repräsentative isothermale kalorimetrische Titration von Tinzaparin (0,05 mmol/L) mit Kupfersulfat-pentahydrat (30 mmol/L) mit 50 Einzelinjektionen als Heizleistung pro Zeit; **B:** CTR1-Expression von unbehandelten und mit 50 µg/mL Tinzaparin behandelten A2780- und A2780cis-Zellen; exemplarische Darstellung eines einzelnen Versuchs

Bei den ersten drei Injektionen ist jeweils ein endothermer Ausschlag der Titration zu beobachten, welche von exothermen Peaks abnehmender Intensität bis zum Ende der Titration gefolgt werden und die endothermalen Peaks sichtbar überlappen (Abb. 5.45A). Der

endotherme Vorgang, der eine Bindung von Tinzaparin an Kupfer oder eine Konformationsänderung darstellen kann, erreicht sein Ende bei der achten Injektion, nach der ein Stoffmengenverhältnis von Kupfer zu Tinzaparin von ca. 13:1 vorliegt. Auf welche chemischen Vorgänge die endothermen und exothermen Ausschläge zurückzuführen sind, wurde nicht weiter untersucht. Tatsache ist jedoch, dass eine Interaktion von Tinzaparin und Kupfer stattfindet, da bei Gegenproben mit den Einzelsubstanzen keine Ausschläge zu verzeichnen waren (Graphen nicht gezeigt). Dabei erscheint eine Komplexbildung am wahrscheinlichsten.

Trotz dieser Erkenntnisse kann eine Kupferdepletion nicht die alleinige Ursache für eine Überexpression des CTR1 sein, weil diese nur bei den resistenten Zellen zu beobachten ist (Abb. 5.45B). Die nicht resistenten Zellen reagieren hingegen nicht verstärkt auf eine Tinzaparininkubation bzw. einen damit einhergehenden Kupferentzug. Eine sekundäre Entwicklung des Rückkopplungsmechanismus aufgrund von Mutationen in lediglich den A2780cis-Zellen ist aufgrund der physiologischen Funktion des Transporters zur Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase auch in nicht entarteten Zellen eher unwahrscheinlich.

Außerdem trägt eine potentielle Kupferdepletion in keinem Fall zur Überwindung der Chemoresistenz bei, da wie in vorigem Abschnitt beschrieben die intrazellulären Platinkonzentrationen trotz einer erhöhten CTR1-Expression jeglicher Ursache nicht beeinflusst werden.

Es scheinen somit schon vor Zugabe der eigentlich toxischen Substanz durch das Tinzaparin Veränderungen in der Zelle bewirkt zu werden, die in ihrer Konsequenz die Chemoresistenz beeinflussen. Da der Weg einer Expressionserhöhung des Influxtransporters, der durch das extrazellulär vorliegende NMH angestoßen wird, nur über eine Signalübertragung von außen nach innen zum Zellkern laufen kann und sich von dort aus durch Transkription/Translation entsprechender DNA-Abschnitte/mRNA als Proteinexpression in der Zellmembran äußert, ist die herbeigeführte Expressionsänderung vielmehr ein Anzeiger dafür, dass Tinzaparin in der Lage ist, Einfluss auf intrazellulär ablaufende Kaskaden und die Genexpression zu haben. Diese sind vermutlich die eigentliche Ursache für die Überwindung der Chemoresistenz der A2780cis-Zellen.

## 5.6 Veränderungen auf Transkriptionsebene durch Tinzaparin

Um oben beschriebene These zu überprüfen, dass durch Tinzaparin bedingte Expressionsänderungen ein Indikator für eine Beeinflussung der Genexpression sind, wurde wie für die liposomale Cisplatinformulierung mRNA extrahiert und an der Universität Düsseldorf ein *gene array*-Experiment durchgeführt (Kapitel 4.11 und 5.2). Dabei wurde die bereits ermittelte Resistenzsignatur des Zellmodells mit einer Behandlung der resistenten Zellen mit Tinzaparin verglichen. Die Untersuchung der isolierten RNA sowie die Auswertung der Daten wurde erneut von Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer durchgeführt.



**Abb. 5.46:** Anzahl der regulierten Gene; links, schwarz: Durch Tinzaparin beeinflusste Gene in resistenten Zellen; links, grau: Gene der Resistenzsignatur; mittig: Teilweise übereinstimmende bei beiden Vergleichen regulierte Gene; rechts: Übereinstimmende bei beiden Vergleichen regulierte Gene

Die Expressionsanalyse zeigt, dass in Tinzaparin behandelten resistenten A2780-Zellen 2978 Gene in ihrer Expression (*cut off 2*) durch die Behandlung mit dem NMH beeinflusst werden (Abb. 5.46, links, schwarzer Balken). Dabei handelt es sich um eine unerwartet hohe Anzahl, die verdeutlicht, wie massiv sich das Genexpressionsmuster durch eine Behandlung mit dem NMH verändert. Zum Vergleich liegen in unbehandelten resistenten Zellen im Vergleich zu unbehandelten A2780-Zellen 1114 Gene positiv oder negativ reguliert vor, die somit sehr wahrscheinlich mit der Chemoresistenz assoziiert sind (Abb. 5.46, links, grauer Balken). Zur weiteren Eingrenzung, welche durch Tinzaparin beeinflussten Gene gleichzeitig mit der Chemoresistenz in Zusammenhang stehen, wurden diese 1114 Gene der Resistenzsignatur mit den veränderten Genen nach einer Tinzaparinbehandlung verglichen. Dabei stellt sich heraus, dass 375 Gene übereinstimmen, es sich also um Resistenzgene handelt, die direkt nur durch eine Inkubation der Zellen mit Tinzaparin in ihrer Expression moduliert werden (Abb. 5.46, rechts).

Dies verdeutlicht, dass das NMH eine deutlich größere intrazelluläre Antwort herbeiführt als lediglich eine Überexpression des Influxtransporters CTR1. Es ist dadurch höchstwahrscheinlich, dass die Überwindung der Cisplatinresistenz der A2780cis-Zellen über eines oder verschiedene dieser 375 Gene und deren Proteine vermittelt wird. Es wird zudem offensichtlich, dass das Tinzaparin weit über die thromboseassoziierten günstigen

Tumorwirkungen hinaus eine „Umprogrammierung“ der resistenten Zelle bewirkt, bei der die Sensitivität gegenüber Cisplatin zunimmt. Welcher Art diese „Umprogrammierung“ ist und welche die direkten Wechselwirkungspartner des Tinzaparin sind, die sensitivierende Signale in die Zelle senden, die letztlich zur Expression oder Repression von Proteinen führen, die eine effektive Wirkung des Cisplatin ermöglichen und somit die Chemoresistenz überwinden, gilt es festzustellen.

Erste Erkenntnisse deuten auf eine proteoglykanvermittelte Sensitivierung hin, deren Aufklärung Gegenstand nachfolgender aktueller Arbeiten ist. Dabei gilt es konkrete Wechselwirkungspartner des Tinzaparins zu finden und intrazelluläre Apoptose- bzw. Resistenzsignalwege zu identifizieren, die den in dieser Arbeit herausgearbeiteten Effekt ausüben. Außerdem stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit auf andere Heparine oder Heparinderivate, Zelllinien und *in vivo*-Bedingungen.



## 6 Zusammenfassung

Diese Arbeit bestätigt die Erkenntnisse aus vorangegangenen Forschungsergebnissen, dass die verwendeten cisplatinhaltigen Liposomen ein geeignetes System sind, um die Chemoresistenz der A2780cis-Zelllinie effektiv zu umgehen. Dies basiert erstaunlicherweise nicht auf einer reinen Transportfunktion der Liposomen, wie sie schon vielfach beschrieben ist, sondern auf einem liposomenspezifischen Wirkmechanismus des eingeschlossenen Cisplatin. Dabei wird der intrinsische Apoptosesignalweg umgangen und die Ausübung des zytotoxischen Effektes des Cisplatin auf den extrinsischen Signalweg verlagert. Da hier gezeigt werden konnte, dass die Chemoresistenz der Ovarialkarzinomzellen zu einem großen Teil auf Veränderungen im intrinsischen Signalweg beruht, wirkt liposomales Cisplatin auf dem extrinsischen Weg mit der gleichen Effizienz wie freier Wirkstoff in nicht resistenten Zellen. Dieser Effekt zeigt sich deutlich auf der Ebene der Transkription, Proteinexpression und Funktionalität der Effektorcaspasen des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges.

*In vivo* haben die Cisplatinliposomen gute Verteilungseigenschaften, die durch eine *Targetierung* mit Holotransferrin noch weiter verbessert werden kann. Doch trotz einer hohen Anreicherung im Tumorgewebe und nicht nachweisbarer kurzfristiger systemischer Toxizität kann eine Stagnation oder Verkleinerung der Tumore nicht nachgewiesen werden. Diesem liegt vermutlich eine Freisetzungproblematik aus den Liposomen zugrunde, da für *in vivo* wirksame Liposomen (Lipoplatin™) über die Expression von Apoptoseproteinen ein vergleichbarer Wirkmechanismus in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Eine weitere Limitierung der liposomalen Formulierung stellt die p53-Abhängigkeit dar, die durch Genexpressionsanalysen und den Vergleich mit einer p53-mutierten Zelllinie herausgearbeitet werden konnte.

Durch Untersuchungen mit dem NMH Tinzaparin konnte ebenfalls ein Teil der Chemoresistenz im vorliegenden Zellmodell aufgezeigt werden, der im Gewebeverband eine größere Rolle spielt als die Umgehung von Apoptosewegen. Das NMH bewirkt dabei eine Sensitivierung der resistenten Zellen, welche nach 72 h bei einer größeren Zellzahl in ihrem Ausmaß mit dem Liposomeneffekt vergleichbar ist. Es konnte hier zum ersten Mal der starke Effekt von Tinzaparin auf den Influxtransporter CTR1 gezeigt werden, der als Konsequenz auf eine Vorinkubation mit dem Antikoagulans in resistenten Zellen stark überexprimiert wird. Erstaunlicherweise sind nicht gesteigerte intrazelluläre Platinkonzentrationen die Ursache für die Überwindung der Resistenz. Auch ein Zusammenhang mit dem

Cisplatinefflux und MDR-Phänomenen kann erfolgreich ausgeschlossen werden. Vielmehr ist die starke Regulierung des Influxtransporters die Folge einer ganzen Reihe durch Tinzaparin ausgelöster Prozesse, die sich auch in der Transkription von Genen widerspiegelt. Hierbei können vorläufig 375 Gene identifiziert werden, die durch Tinzaparin beeinflusst werden und mit der Chemoresistenz des Zellsystems assoziiert sind.

Wenn es gelänge Tinzaparin und auch andere Vertreter der niedermolekularen Heparin als *sensitizer* zu charakterisieren, würde dies den klinischen Erfolg einer Behandlung mit Heparinen während einer Chemotherapie bestätigen. Neben der protektiven Wirkung gegenüber thromboembolischen und metastatischen Ereignissen könnten auch andere Faktoren als Wirkmechanismen herausgestellt werden und somit eine Perspektive für die Behandlung von Krebspatienten darstellen, die neben einem erhöhten Thromboserisiko auch resistente Tumore aufweisen. Dabei wäre es zudem interessant, herauszuarbeiten, ob die beiden Wirkmechanismen der Cisplatinliposomen und des niedermolekularen Heparins sich bei gleichzeitiger Anwendung synergistisch verhalten und der sensitivierende Effekt noch verstärkt werden kann.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA. Cancer J. Clin.***65**, 5–29 (2015).
2. Forman, D., Bray, F., Brewster, D., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., Pineros, M., Steliarova-Foucher, E., Swaminathan, R. & Ferlay, J. *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X. IARC Scientific Publication No. 164*. unter: <http://ci5.iarc.fr/CI5I-X/old/vol10%5CCI5vol10.pdf> (abgerufen am 24.07.2015)
3. Lowe, K. A., Chia, V. M., Taylor, A., O'Malley, C., Kelsh, M., Mohamed, M., Mowat, F. S. & Goff, B. An international assessment of ovarian cancer incidence and mortality. *Gynecol. Oncol.***130**, 107–114 (2013).
4. Brucks, J. A. Ovarian cancer. The most lethal gynecologic malignancy. *Nurs. Clin. North Am.***27**, 835–845 (1992).
5. Kurman, R. J. & Shih, I.-M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.***34**, 433–443 (2010).
6. Cho, K. R. & Shih, I.-M. Ovarian cancer. *Annu. Rev. Pathol.***4**, 287–313 (2009).
7. Stewart, L. & Advanced Ovarian Cancer Trialists Group. Chemotherapy for advanced ovarian cancer. Advanced Ovarian Cancer Trialists Group. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001418 (2000). doi:10.1002/14651858.CD001418
8. Fung-Kee-Fung, M., Oliver, T., Elit, L., Oza, A., Hirte, H. W. & Bryson, P. Optimal chemotherapy treatment for women with recurrent ovarian cancer. *Curr. Oncol. Tor. Ont***14**, 195–208 (2007).
9. Davis, A., Tinker, A. V. & Friedlander, M. 'Platinum resistant' ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit? *Gynecol. Oncol.***133**, 624–631 (2014).
10. Soussi, T. & Wiman, K. G. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ.* (2015). doi:10.1038/cdd.2015.53
11. Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene***31**, 1869–1883 (2012).
12. Krieger, M. L., Eckstein, N., Schneider, V., Koch, M., Royer, H.-D., Jaehde, U. & Bendas, G. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. *Int. J. Pharm.***389**, 10–17 (2010).
13. Rosenberg, B., Van Camp, L. & Krigas, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature***205**, 698–699 (1965).
14. Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J. E. & Mansour, V. H. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature***222**, 385–386 (1969).

15. Peyrone, M. Ueber die Einwirkung von Ammoniak auf Platinchlorür. *Ann. Chem. Pharm.***55**, 205–213 (1845).
16. Kauffman, G. B., Pentimalli, R., Doldi, S. & Hall, M. D. Michele Peyrone (1813-1883), Discoverer of Cisplatin. *Platin. Met. Rev.***54**, 250–256 (2010).
17. Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer***7**, 573–584 (2007).
18. Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E., Rücker, G., Schirmeister, T., Scriba, G. K. E., Stahl-Biskup, E., Troschütz, R., Seitz, G. & Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. *Arzneibuch-Kommentar*. (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2015).
19. Williams, C. J. & Whitehouse, J. M. Cis-platinum: a new anticancer agent. *Br. Med. J.***1**, 1689–1691 (1979).
20. Harrap, K. R. Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. *Cancer Treat. Rev.***12 Suppl A**, 21–33 (1985).
21. Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J. & Cvitkovic, E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol. Cancer Ther.***1**, 227–235 (2002).
22. Gordon, A. N., Tonda, M., Sun, S., Rackoff, W. & Doxil Study 30-49 Investigators. Long-term survival advantage for women treated with pegylated liposomal doxorubicin compared with topotecan in a phase 3 randomized study of recurrent and refractory epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.***95**, 1–8 (2004).
23. Townsend, D. M., Shen, H., Staros, A. L., Gaté, L. & Tew, K. D. Efficacy of a glutathione S-transferase pi-activated prodrug in platinum-resistant ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Ther.***1**, 1089–1095 (2002).
24. Plumb, J. A., Strathdee, G., Sludden, J., Kaye, S. B. & Brown, R. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res.***60**, 6039–6044 (2000).
25. Collins, I. & Workman, P. New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat. Chem. Biol.***2**, 689–700 (2006).
26. Coluccia, M. & Natile, G. Trans-platinum complexes in cancer therapy. *Anticancer Agents Med. Chem.***7**, 111–123 (2007).
27. Tacka, K. A., Szalda, D., Souid, A.-K., Goodisman, J. & Dabrowiak, J. C. Experimental and theoretical studies on the pharmacodynamics of cisplatin in jurkat cells. *Chem. Res. Toxicol.***17**, 1434–1444 (2004).
28. Yotsuyanagi, T., Usami, M., Noda, Y. & Nagata, M. Computational consideration of cisplatin hydrolysis and acid dissociation in aqueous media: effect of total drug concentrations. *Int. J. Pharm.***246**, 95–104 (2002).
29. Appleton, T. G., Hall, J. R., Ralph, S. F. & Thompson, C. S. M. NMR study of acid-base equilibria and other reactions of ammineplatinum complexes with aqua and hydroxo ligands. *Inorg. Chem.***28**, 1989–1993 (1989).

30. Stauber, T. & Jentsch, T. J. Chloride in vesicular trafficking and function. *Annu. Rev. Physiol.***75**, 453–477 (2013).
31. Damaghi, M., Wojtkowiak, J. W. & Gillies, R. J. pH sensing and regulation in cancer. *Front. Physiol.***4**, 370 (2013).
32. More, S. S., Akil, O., Ianculescu, A. G., Geier, E. G., Lustig, L. R. & Giacomini, K. M. Role of the copper transporter, CTR1, in platinum-induced ototoxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***30**, 9500–9509 (2010).
33. Harrach, S. & Ciarimboli, G. Role of transporters in the distribution of platinum-based drugs. *Front. Pharmacol.***6**, 85 (2015).
34. Puig, S., Lee, J., Lau, M. & Thiele, D. J. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.***277**, 26021–26030 (2002).
35. Abada, P. & Howell, S. B. Regulation of Cisplatin cytotoxicity by Cu influx transporters. *Met.-Based Drugs***2010**, 317581 (2010).
36. Kuo, M. T., Fu, S., Savaraj, N. & Chen, H. H. W. Role of the human high-affinity copper transporter in copper homeostasis regulation and cisplatin sensitivity in cancer chemotherapy. *Cancer Res.***72**, 4616–4621 (2012).
37. Howell, S. B., Safaei, R., Larson, C. A. & Sailor, M. J. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol. Pharmacol.***77**, 887–894 (2010).
38. Sinani, D., Adle, D. J., Kim, H. & Lee, J. Distinct mechanisms for Ctr1-mediated copper and cisplatin transport. *J. Biol. Chem.***282**, 26775–26785 (2007).
39. Burger, H., Zoumaro-Djayoon, A., Boersma, A. W. M., Helleman, J., Berns, E. M. J. J., Mathijssen, R. H. J., Loos, W. J. & Wiemer, E. a. C. Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2). *Br. J. Pharmacol.***159**, 898–908 (2010).
40. Wensing, K. U. & Ciarimboli, G. Saving ears and kidneys from cisplatin. *Anticancer Res.***33**, 4183–4188 (2013).
41. Ahmed, Z., Deyama, Y., Yoshimura, Y. & Suzuki, K. Cisplatin sensitivity of oral squamous carcinoma cells is regulated by Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity rather than copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B. *Cancer Chemother. Pharmacol.***63**, 643–650 (2009).
42. Schneider, V., Krieger, M. L., Bendas, G., Jaehde, U. & Kalayda, G. V. Contribution of intracellular ATP to cisplatin resistance of tumor cells. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.***18**, 165–174 (2013).
43. Inesi, G., Pilankatta, R. & Tadini-Buoninsegni, F. Biochemical characterization of P-type copper ATPases. *Biochem. J.***463**, 167–176 (2014).
44. Polishchuk, R. & Lutsenko, S. Golgi in copper homeostasis: a view from the membrane trafficking field. *Histochem. Cell Biol.***140**, 285–295 (2013).

45. Borst, P., Evers, R., Kool, M. & Wijnholds, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.***92**, 1295–1302 (2000).
46. Xing, L., Hu, Y. & Lai, Y. Advancement of structure-activity relationship of multidrug resistance-associated protein 2 interactions. *AAPS J.***11**, 406–413 (2009).
47. Chen, H. H. W. & Kuo, M. T. Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met.-Based Drugs***2010**, (2010).
48. el-Khateeb, M., Appleton, T. G., Gahan, L. R., Charles, B. G., Berners-Price, S. J. & Bolton, A. M. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. *J. Inorg. Biochem.***77**, 13–21 (1999).
49. Ramachandran, S., Temple, B. R., Chaney, S. G. & Dokholyan, N. V. Structural basis for the sequence-dependent effects of platinum-DNA adducts. *Nucleic Acids Res.***37**, 2434–2448 (2009).
50. Dasari, S. & Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.***740**, 364–378 (2014).
51. Eastman, A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol. Ther.***34**, 155–166 (1987).
52. Marques, M. P. M., Gianolio, D., Cibir, G., Tomkinson, J., Parker, S. F., Valero, R., Pedro Lopes, R. & Batista de Carvalho, L. A. E. A molecular view of cisplatin's mode of action: interplay with DNA bases and acquired resistance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *PCCP***17**, 5155–5171 (2015).
53. Wu, Y., Pradhan, P., Havener, J., Boysen, G., Swenberg, J. A., Campbell, S. L. & Chaney, S. G. NMR solution structure of an oxaliplatin 1,2-d(GG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex. *J. Mol. Biol.***341**, 1251–1269 (2004).
54. Donahue, B. A., Augot, M., Bellon, S. F., Treiber, D. K., Toney, J. H., Lippard, S. J. & Essigmann, J. M. Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry (Mosc.)***29**, 5872–5880 (1990).
55. Fink, D., Aebi, S. & Howell, S. B. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***4**, 1–6 (1998).
56. Chaney, S. G. & Vaisman, A. Specificity of platinum-DNA adduct repair. *J. Inorg. Biochem.***77**, 71–81 (1999).
57. 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. U. S. A.***91**, 10394–10398 (1994).
58. Jordan, P. & Carmo-Fonseca, M. Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA in vivo. *Nucleic Acids Res.***26**, 2831–2836 (1998).

- 
59. Damia, G., Filiberti, L., Vikhanskaya, F., Carrassa, L., Taya, Y., D'incalci, M. & Broggin, M. Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia N. Y.* **N3**, 10–16 (2001).
  60. Zhao, H. & Piwnica-Worms, H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4129–4139 (2001).
  61. Alarcon-Vargas, D. & Ronai, Z. 'ev. p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis* **23**, 541–547 (2002).
  62. Jayaraman, L., Moorthy, N. C., Murthy, K. G., Manley, J. L., Bustin, M. & Prives, C. High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. *Genes Dev.* **12**, 462–472 (1998).
  63. Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C. & Perez, J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol. Pharmacol.* **59**, 657–663 (2001).
  64. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
  65. Giampietri, C., Starace, D., Petrunaro, S., Filippini, A. & Ziparo, E. Necroptosis: molecular signalling and translational implications. *Int. J. Cell Biol.* **2014**, 490275 (2014).
  66. Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.-Y., Lin, L.-T., Siegelin, M. D., Fimognari, C., Kumar, N. B., Dou, Q. P., Yang, H., Samadi, A. K., Russo, G. L., Spagnuolo, C., Ray, S. K., Chakrabarti, M., Morre, J. D., Coley, H. M., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S. S., Helferich, W. G., Yang, X., Boosani, C. S., Guha, G., Bhakta, D., Ciriolo, M. R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S. I., Keith, W. N., Bilsland, A., Halicka, D., Nowsheen, S. & Azmi, A. S. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin. Cancer Biol.* (2015). doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.001
  67. Carew, J. S., Kelly, K. R. & Nawrocki, S. T. Autophagy as a target for cancer therapy: new developments. *Cancer Manag. Res.* **4**, 357–365 (2012).
  68. Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 741–752 (2007).
  69. Chao, D. T. & Korsmeyer, S. J. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 395–419 (1998).
  70. Chao, D. T. & Korsmeyer, S. J. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 395–419 (1998).
  71. Rolland, S. G. & Conradt, B. New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 852–858 (2010).
  72. Del Bello, B., Valentini, M. A., Zunino, F., Comporti, M. & Maellaro, E. Cleavage of Bcl-2 in oxidant- and cisplatin-induced apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* **20**, 4591–4595 (2001).

73. Billen, L. P., Shamas-Din, A. & Andrews, D. W. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene***27 Suppl 1**, S93–104 (2008).
74. Kantari, C. & Walczak, H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta***1813**, 558–563 (2011).
75. Olsson, M., Vakifahmetoglu, H., Abruzzo, P. M., Högstrand, K., Grandien, A. & Zhivotovsky, B. DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene***28**, 1949–1959 (2009).
76. Yuan, S. & Akey, C. W. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Struct. Lond. Engl. 1993***21**, 501–515 (2013).
77. Kuida, K. Caspase-9. *Int. J. Biochem. Cell Biol.***32**, 121–124 (2000).
78. Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M. & Green, D. R. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.***2**, 469–475 (2000).
79. Budhidarmo, R. & Day, C. L. IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.***39**, 80–90 (2015).
80. Pruefer, F. G., Lizarraga, F., Maldonado, V. & Melendez-Zajgla, J. Participation of Omi Htra2 serine-protease activity in the apoptosis induced by cisplatin on SW480 colon cancer cells. *J. Chemother. Florence Italy***20**, 348–354 (2008).
81. Sessler, T., Healy, S., Samali, A. & Szegezdi, E. Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. *Pharmacol. Ther.***140**, 186–199 (2013).
82. Roos, W., Baumgartner, M. & Kaina, B. Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene***23**, 359–367 (2004).
83. Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M. & Krammer, P. H. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.***188**, 2033–2045 (1998).
84. Park, H. H., Lo, Y.-C., Lin, S.-C., Wang, L., Yang, J. K. & Wu, H. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.***25**, 561–586 (2007).
85. Salomoni, P. & Khelifi, A. F. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol.***16**, 97–104 (2006).
86. Mahmood, Z. & Shukla, Y. Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp. Cell Res.***316**, 887–899 (2010).
87. Dickens, L. S., Powley, I. R., Hughes, M. A. & MacFarlane, M. The ‘complexities’ of life and death: death receptor signalling platforms. *Exp. Cell Res.***318**, 1269–1277 (2012).

88. Schleich, K., Krammer, P. H. & Lavrik, I. N. The chains of death: a new view on caspase-8 activation at the DISC. *Cell Cycle Georget. Tex***12**, 193–194 (2013).
89. Safa, A. R. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp. Oncol.***34**, 176–184 (2012).
90. Salvesen, G. S. & Walsh, C. M. Functions of caspase 8: the identified and the mysterious. *Semin. Immunol.***26**, 246–252 (2014).
91. Siakavellas, S. I., Sfikakis, P. P. & Bamias, G. The TL1A/DR3/DcR3 pathway in autoimmune rheumatic diseases. *Semin. Arthritis Rheum.* (2015). doi:10.1016/j.semarthrit.2015.02.007
92. Saitoh, T., Nakayama, M., Nakano, H., Yagita, H., Yamamoto, N. & Yamaoka, S. TWEAK induces NF-kappaB2 p100 processing and long lasting NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.***278**, 36005–36012 (2003).
93. Winkles, J. A., Tran, N. L. & Berens, M. E. TWEAK and Fn14: new molecular targets for cancer therapy? *Cancer Lett.***235**, 11–17 (2006).
94. Kuang, J., He, G., Huang, Z., Khokhar, A. R. & Siddik, Z. H. Bimodal effects of 1R,2R-diaminocyclohexane(trans-diacetato)(dichloro)platinum(IV) on cell cycle checkpoints. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***7**, 3629–3639 (2001).
95. Shapiro, G. I., Edwards, C. D., Ewen, M. E. & Rollins, B. J. p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.***18**, 378–387 (1998).
96. Delmastro, D. A., Li, J., Vaisman, A., Solle, M. & Chaney, S. G. DNA damage inducible-gene expression following platinum treatment in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.***39**, 245–253 (1997).
97. Wang, X., Martindale, J. L. & Holbrook, N. J. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.***275**, 39435–39443 (2000).
98. Dent, P. & Grant, S. Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***7**, 775–783 (2001).
99. Persons, D. L., Yazlovitskaya, E. M. & Pelling, J. C. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J. Biol. Chem.***275**, 35778–35785 (2000).
100. Gong, J. G., Costanzo, A., Yang, H. Q., Melino, G., Kaelin, W. G., Levrero, M. & Wang, J. Y. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature***399**, 806–809 (1999).
101. Pines, A., Kelstrup, C. D., Vrouwe, M. G., Puigvert, J. C., Typas, D., Misovic, B., de Groot, A., von Stechow, L., van de Water, B., Danen, E. H. J., Vrieling, H., Mullenders, L. H. F. & Olsen, J. V. Global phosphoproteome profiling reveals unanticipated networks responsive to cisplatin treatment of embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.***31**, 4964–4977 (2011).

102. Miyajima, A., Nakashima, J., Yoshioka, K., Tachibana, M., Tazaki, H. & Murai, M. Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br. J. Cancer***76**, 206–210 (1997).
103. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene***22**, 7265–7279 (2003).
104. Rafii, A., Mirshahi, P., Poupot, M., Faussat, A.-M., Simon, A., Ducros, E., Mery, E., Couderc, B., Lis, R., Capdet, J., Bergalet, J., Querleu, D., Dagonnet, F., Fournié, J.-J., Marie, J.-P., Pujade-Lauraine, E., Favre, G., Soria, J. & Mirshahi, M. Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS One***3**, e3894 (2008).
105. Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., Castedo, M. & Kroemer, G. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.***5**, e1257 (2014).
106. Loh, S. Y., Mistry, P., Kelland, L. R., Abel, G. & Harrap, K. R. Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum (II) and (IV) ammine/amine complexes. *Br. J. Cancer***66**, 1109–1115 (1992).
107. Jandial, D. D., Farshchi-Heydari, S., Larson, C. A., Elliott, G. I., Wrasidlo, W. J. & Howell, S. B. Enhanced delivery of cisplatin to intraperitoneal ovarian carcinomas mediated by the effects of bortezomib on the human copper transporter 1. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***15**, 553–560 (2009).
108. More, S. S., Akil, O., Ianculescu, A. G., Geier, E. G., Lustig, L. R. & Giacomini, K. M. Role of the copper transporter, CTR1, in platinum-induced ototoxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.***30**, 9500–9509 (2010).
109. Ishida, S., McCormick, F., Smith-McCune, K. & Hanahan, D. Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. *Cancer Cell***17**, 574–583 (2010).
110. Holzer, A. K. & Howell, S. B. The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Res.***66**, 10944–10952 (2006).
111. Gately, D. P. & Howell, S. B. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br. J. Cancer***67**, 1171–1176 (1993).
112. Kelland, L. R. Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs***59 Suppl 4**, 1–8; discussion 37–38 (2000).
113. Kalayda, G. V., Wagner, C. H., Buss, I., Reedijk, J. & Jaehde, U. Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer***8**, 175 (2008).
114. Rabik, C. A., Maryon, E. B., Kasza, K., Shafer, J. T., Bartnik, C. M. & Dolan, M. E. Role of copper transporters in resistance to platinating agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.***64**, 133–142 (2009).

115. Katagiri, H., Nakayama, K., Rahman, M. T., Rahman, M., Katagiri, A., Ishibashi, T., Ishikawa, M., Iida, K., Nakayama, S., Otsuki, Y. & Miyazaki, K. Is ATP7B a predictive marker in patients with ovarian carcinoma treated with platinum-taxane combination chemotherapy? *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.***23**, 60–64 (2013).
116. Rolland, D., Raharijaona, M., Barbarat, A., Houlgatte, R. & Thieblemont, C. Inhibition of GST-pi nuclear transfer increases mantle cell lymphoma sensitivity to cisplatin, cytarabine, gemcitabine, bortezomib and doxorubicin. *Anticancer Res.***30**, 3951–3957 (2010).
117. Yan, X., Pan, L., Yuan, Y., Lang, J. & Mao, N. Identification of platinum-resistance associated proteins through proteomic analysis of human ovarian cancer cells and their platinum-resistant sublines. *J. Proteome Res.***6**, 772–780 (2007).
118. Ishikawa, T. & Ali-Osman, F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J. Biol. Chem.***268**, 20116–20125 (1993).
119. Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., van Eijk, M. J., Juijn, J. A., Baas, F. & Borst, P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.***57**, 3537–3547 (1997).
120. Vandier, D., Calvez, V., Massade, L., Gouyette, A., Mickley, L., Fojo, T. & Rixe, O. Transactivation of the metallothionein promoter in cisplatin-resistant cancer cells: a specific gene therapy strategy. *J. Natl. Cancer Inst.***92**, 642–647 (2000).
121. Ahmad, A., Robinson, A. R., Duensing, A., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Weisberg, D. B., Hasty, P., Hoeijmakers, J. H. J. & Niedernhofer, L. J. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.***28**, 5082–5092 (2008).
122. Shuck, S. C., Short, E. A. & Turchi, J. J. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res.***18**, 64–72 (2008).
123. Shachar, S., Ziv, O., Avkin, S., Adar, S., Wittschieben, J., Reissner, T., Chaney, S., Friedberg, E. C., Wang, Z., Carell, T., Geacintov, N. & Livneh, Z. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J.***28**, 383–393 (2009).
124. Muggia, F. & Safra, T. ‘BRCAness’ and its implications for platinum action in gynecologic cancer. *Anticancer Res.***34**, 551–556 (2014).
125. Yang, Z., Schumaker, L. M., Egorin, M. J., Zuhowski, E. G., Guo, Z. & Cullen, K. J. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***12**, 5817–5825 (2006).

126. Li, Q., Yu, J. J., Mu, C., Yunbham, M. K., Slavsky, D., Cross, C. L., Bostick-Bruton, F. & Reed, E. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.***20**, 645–652 (2000).
127. Roos, W. P., Tsaalbi-Shtylik, A., Tsaryk, R., Güvercin, F., de Wind, N. & Kaina, B. The translesion polymerase Rev3L in the tolerance of alkylating anticancer drugs. *Mol. Pharmacol.***76**, 927–934 (2009).
128. Yang, L., Shi, T., Liu, F., Ren, C., Wang, Z., Li, Y., Tu, X., Yang, G. & Cheng, X. REV3L, a promising target in regulating the chemosensitivity of cervical cancer cells. *PloS One***10**, e0120334 (2015).
129. Venkitaraman, A. R. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science***343**, 1470–1475 (2014).
130. Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J. & Helleday, T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature***434**, 913–917 (2005).
131. Wu, Q. & Vasquez, K. M. Human MLH1 protein participates in genomic damage checkpoint signaling in response to DNA interstrand crosslinks, while MSH2 functions in DNA repair. *PLoS Genet.***4**, e1000189 (2008).
132. Helleman, J., van Staveren, I. L., Dinjens, W. N. M., van Kuijk, P. F., Ritstier, K., Ewing, P. C., van der Burg, M. E. L., Stoter, G. & Berns, E. M. J. J. Mismatch repair and treatment resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer***6**, 201 (2006).
133. Samimi, G., Fink, D., Varki, N. M., Husain, A., Hoskins, W. J., Alberts, D. S. & Howell, S. B. Analysis of MLH1 and MSH2 expression in ovarian cancer before and after platinum drug-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***6**, 1415–1421 (2000).
134. Tajeddine, N., Galluzzi, L., Kepp, O., Hangen, E., Morselli, E., Senovilla, L., Araujo, N., Pinna, G., Larochette, N., Zamzami, N., Modjtahedi, N., Harel-Bellan, A. & Kroemer, G. Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death. *Oncogene***27**, 4221–4232 (2008).
135. Sinicrope, F. A. & Sargent, D. J. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***18**, 1506–1512 (2012).
136. Welsh, P. L., Owens, K. N. & King, M. C. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet. TIG***16**, 69–74 (2000).
137. Kirschner, K. & Melton, D. W. Multiple roles of the ERCC1-XPF endonuclease in DNA repair and resistance to anticancer drugs. *Anticancer Res.***30**, 3223–3232 (2010).
138. Jennerwein, M. M., Eastman, A. & Khokhar, A. R. The role of DNA repair in resistance of L1210 cells to isomeric 1,2-diaminocyclohexaneplatinum complexes and ultraviolet irradiation. *Mutat. Res.***254**, 89–96 (1991).

139. Metzinger, D. S., Taylor, D. D. & Gerdel-Taylor, C. Induction of p53 and drug resistance following treatment with cisplatin or paclitaxel in ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett.***236**, 302–308 (2006).
140. Soussi, T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.***910**, 121–137; discussion 137–139 (2000).
141. Kandioler, D., Schoppmann, S. F., Zwrtek, R., Kappel, S., Wolf, B., Mittlböck, M., Kühner, I., Hejna, M., Pluschnig, U., Ba-Ssalamah, A., Wrba, F. & Zacherl, J. The biomarker TP53 divides patients with neoadjuvantly treated esophageal cancer into 2 subgroups with markedly different outcomes. A p53 Research Group study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.***148**, 2280–2286 (2014).
142. Gadducci, A., Di Cristofano, C., Zavaglia, M., Giusti, L., Menicagli, M., Cosio, S., Naccarato, A. G., Genazzani, A. R., Bevilacqua, G. & Cavazzana, A. O. P53 gene status in patients with advanced serous epithelial ovarian cancer in relation to response to paclitaxel- plus platinum-based chemotherapy and long-term clinical outcome. *Anticancer Res.***26**, 687–693 (2006).
143. Righetti, S. C., Della Torre, G., Pilotti, S., Ménard, S., Ottone, F., Colnaghi, M. I., Pierotti, M. A., Lavarino, C., Cornarotti, M., Oriana, S., Böhm, S., Bresciani, G. L., Spatti, G. & Zunino, F. A comparative study of p53 gene mutations, protein accumulation, and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Res.***56**, 689–693 (1996).
144. Persons, D. L., Yazlovitskaya, E. M. & Pelling, J. C. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J. Biol. Chem.***275**, 35778–35785 (2000).
145. Grossi, V., Peserico, A., Tezil, T. & Simone, C. p38 $\alpha$  MAPK pathway: a key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World J. Gastroenterol. WJG***20**, 9744–9758 (2014).
146. Sui, X., Kong, N., Ye, L., Han, W., Zhou, J., Zhang, Q., He, C. & Pan, H. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.***344**, 174–179 (2014).
147. Brozovic, A., Fritz, G., Christmann, M., Zisowsky, J., Jaehde, U., Osmak, M. & Kaina, B. Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer***112**, 974–985 (2004).
148. Hayakawa, J., Ohmichi, M., Kurachi, H., Kanda, Y., Hisamoto, K., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Kanzaki, T. & Murata, Y. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res.***60**, 5988–5994 (2000).

149. Castedo, M., Coquelle, A., Vivet, S., Vitale, I., Kauffmann, A., Dessen, P., Pequignot, M. O., Casares, N., Valent, A., Mouhamad, S., Schmitt, E., Modjtahedi, N., Vainchenker, W., Zitvogel, L., Lazar, V., Garrido, C. & Kroemer, G. Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J.***25**, 2584–2595 (2006).
150. Delbridge, A. R. D. & Strasser, A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.***22**, 1071–1080 (2015).
151. Spierings, D. C. J., de Vries, E. G. E., Timens, W., Groen, H. J. M., Boezen, H. M. & de Jong, S. Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***9**, 3397–3405 (2003).
152. Spierings, D. C. J., de Vries, E. G. E., Vellenga, E. & de Jong, S. Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ.***10**, 808–822 (2003).
153. Wang, P., Song, J. H., Song, D. K., Zhang, J. & Hao, C. Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. *Cell. Signal.***18**, 1528–1535 (2006).
154. Liu, J., Uematsu, H., Tsuchida, N. & Ikeda, M.-A. Association of caspase-8 mutation with chemoresistance to cisplatin in HOC313 head and neck squamous cell carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***390**, 989–994 (2009).
155. Janson, V., Johansson, A. & Grankvist, K. Resistance to caspase-8 and -9 fragments in a malignant pleural mesothelioma cell line with acquired cisplatin-resistance. *Cell Death Dis.***1**, e78 (2010).
156. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. & Kumar, S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.***22**, 526–539 (2015).
157. Obexer, P. & Ausserlechner, M. J. X-linked inhibitor of apoptosis protein - a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy. *Front. Oncol.***4**, 197 (2014).
158. Gąsowska-Bodnar, A., Bodnar, L., Dąbek, A., Cichowicz, M., Jerzak, M., Cierniak, S., Kozłowski, W. & Baranowski, W. Survivin expression as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.***24**, 687–696 (2014).
159. Ryan, B. M., O'Donovan, N. & Duffy, M. J. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.***35**, 553–562 (2009).
160. Kelly, R. J., Thomas, A., Rajan, A., Chun, G., Lopez-Chavez, A., Szabo, E., Spencer, S., Carter, C. A., Guha, U., Khozin, S., Poondru, S., Van Sant, C., Keating, A., Steinberg, S. M., Figg, W. & Giaccone, G. A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.***24**, 2601–2606 (2013).

161. Zhao, W.-J., Deng, B.-Y., Wang, X.-M., Miao, Y. & Wang, J.-N. XIAP associated factor 1 (XAF1) represses expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and regulates invasion, cell cycle, apoptosis, and cisplatin sensitivity of ovarian carcinoma cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP***16**, 2453–2458 (2015).
162. Han, H., Landreneau, R. J., Santucci, T. S., Tung, M. Y., Macherey, R. S., Shackney, S. E., Sturgis, C. D., Raab, S. S. & Silverman, J. F. Prognostic value of immunohistochemical expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in stage I non-small-cell lung cancer. *Hum. Pathol.***33**, 105–110 (2002).
163. Calikusu, Z., Yildirim, Y., Akcali, Z., Sakalli, H., Bal, N., Unal, I. & Ozyilkan, O. The effect of HER2 expression on cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR***28**, 97 (2009).
164. Hayakawa, J., Ohmichi, M., Kurachi, H., Kanda, Y., Hisamoto, K., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Kanzaki, T. & Murata, Y. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res.***60**, 5988–5994 (2000).
165. Deng, X., Ewton, D. Z. & Friedman, E. Mirk/Dyrk1B maintains the viability of quiescent pancreatic cancer cells by reducing levels of reactive oxygen species. *Cancer Res.***69**, 3317–3324 (2009).
166. Hu, J. & Friedman, E. Depleting Mirk Kinase Increases Cisplatin Toxicity in Ovarian Cancer Cells. *Genes Cancer***1**, 803–811 (2010).
167. Brüning, A. & Jückstock, J. Misfolded proteins: from little villains to little helpers in the fight against cancer. *Front. Oncol.***5**, 47 (2015).
168. Lamoureux, F., Thomas, C., Yin, M.-J., Fazli, L., Zoubeidi, A. & Gleave, M. E. Suppression of heat shock protein 27 using OGX-427 induces endoplasmic reticulum stress and potentiates heat shock protein 90 inhibitors to delay castrate-resistant prostate cancer. *Eur. Urol.***66**, 145–155 (2014).
169. Katsogiannou, M., Andrieu, C. & Rocchi, P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Front. Genet.***5**, 346 (2014).
170. Shen, D.-W. & Gottesman, M. M. RAB8 enhances TMEM205-mediated cisplatin resistance. *Pharm. Res.***29**, 643–650 (2012).
171. Yang, H.-Z., Ma, Y., Zhou, Y., Xu, L.-M., Chen, X.-J., Ding, W.-B. & Zou, H.-B. Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment. *Cancer Lett.***361**, 128–136 (2015).
172. Köberle, B., Tomicic, M. T., Usanova, S. & Kaina, B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta***1806**, 172–182 (2010).
173. Williams, P. D., Cheon, S., Havaleshko, D. M., Jeong, H., Cheng, F., Theodorescu, D. & Lee, J. K. Concordant gene expression signatures predict clinical outcomes of cancer patients undergoing systemic therapy. *Cancer Res.***69**, 8302–8309 (2009).

- 
174. McKeage, M. J. New-generation platinum drugs in the treatment of cisplatin-resistant cancers. *Expert Opin. Investig. Drugs***14**, 1033–1046 (2005).
175. Pujade-Lauraine, E., Wagner, U., Aavall-Lundqvist, E., Gebiski, V., Heywood, M., Vasey, P. A., Volgger, B., Vergote, I., Pignata, S., Ferrero, A., Sehouli, J., Lortholary, A., Kristensen, G., Jackisch, C., Joly, F., Brown, C., Le Fur, N. & du Bois, A. Pegylated liposomal Doxorubicin and Carboplatin compared with Paclitaxel and Carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.***28**, 3323–3329 (2010).
176. Ferrandina, G., Corrado, G., Licameli, A., Lorusso, D., Fuoco, G., Pisconti, S. & Scambia, G. Pegylated liposomal doxorubicin in the management of ovarian cancer. *Ther. Clin. Risk Manag.***6**, 463–483 (2010).
177. Stathopoulos, G. P. Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation. *Anticancer. Drugs***21**, 732–736 (2010).
178. Stathopoulos, G. P., Antoniou, D., Dimitroulis, J., Stathopoulos, J., Marosis, K. & Michalopoulou, P. Comparison of liposomal cisplatin versus cisplatin in non-squamous cell non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (2011). doi:10.1007/s00280-011-1572-5
179. Seetharamu, N., Kim, E., Hochster, H., Martin, F. & Muggia, F. Phase II study of liposomal cisplatin (SPI-77) in platinum-sensitive recurrences of ovarian cancer. *Anticancer Res.***30**, 541–545 (2010).
180. Puri, A., Loomis, K., Smith, B., Lee, J.-H., Yavlovich, A., Heldman, E. & Blumenthal, R. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.***26**, 523–580 (2009).
181. Liu, D., He, C., Wang, A. Z. & Lin, W. Application of liposomal technologies for delivery of platinum analogs in oncology. *Int. J. Nanomedicine***8**, 3309–3319 (2013).
182. Bozzuto, G. & Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine***10**, 975–999 (2015).
183. Puri, A., Loomis, K., Smith, B., Lee, J.-H., Yavlovich, A., Heldman, E. & Blumenthal, R. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.***26**, 523–580 (2009).
184. Dragovich, T., Mendelson, D., Kurtin, S., Richardson, K., Von Hoff, D. & Hoos, A. A Phase 2 trial of the liposomal DACH platinum L-NDDP in patients with therapy-refractory advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.***58**, 759–764 (2006).
185. White, S. C., Lorigan, P., Margison, G. P., Margison, J. M., Martin, F., Thatcher, N., Anderson, H. & Ranson, M. Phase II study of SPI-77 (sterically stabilised liposomal cisplatin) in advanced non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer***95**, 822–828 (2006).
186. Stathopoulos, G. P. & Boulikas, T. Lipoplatin formulation review article. *J. Drug Deliv.***2012**, 581363 (2012).

187. de Jonge, M. J. A., Slingerland, M., Loos, W. J., Wiemer, E. A. C., Burger, H., Mathijssen, R. H. J., Kroep, J. R., den Hollander, M. A. G., van der Biessen, D., Lam, M.-H., Verweij, J. & Gelderblom, H. Early cessation of the clinical development of LiPlaCis, a liposomal cisplatin formulation. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990**46**, 3016–3021 (2010).
188. Nardin, A., Lefebvre, M.-L., Labroquère, K., Faure, O. & Abastado, J.-P. Liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine: Targeting and activating macrophages for adjuvant treatment of osteosarcoma. *Curr. Cancer Drug Targets***6**, 123–133 (2006).
189. Aurora, T. S., Li, W., Cummins, H. Z. & Haines, T. H. Preparation and characterization of monodisperse unilamellar phospholipid vesicles with selected diameters of from 300 to 600 nm. *Biochim. Biophys. Acta***820**, 250–258 (1985).
190. Blok, M. C., van der Neut-Kok, E. C., van Deenen, L. L. & de Gier, J. The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta***406**, 187–196 (1975).
191. Elorza, B., Elorza, M. A., Sainz, M. C. & Chantres, J. R. Comparison of particle size and encapsulation parameters of three liposomal preparations. *J. Microencapsul.***10**, 237–248 (1993).
192. Simões, S., Moreira, J. N., Fonseca, C., Düzgüneş, N. & de Lima, M. C. P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv. Drug Deliv. Rev.***56**, 947–965 (2004).
193. Maruyama, K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2010). doi:10.1016/j.addr.2010.09.003
194. Tsukahara, J., Mukaiyama, K., Okuda, S., Narita, S. & Tokuda, H. Dissection of LolB function--lipoprotein binding, membrane targeting and incorporation of lipoproteins into lipid bilayers. *FEBS J.***276**, 4496–4504 (2009).
195. Sugiyama, I. & Sadzuka, Y. Correlation of fixed aqueous layer thickness around PEG-modified liposomes with in vivo efficacy of antitumor agent-containing liposomes. *Curr. Drug Discov. Technol.***8**, 357–366 (2011).
196. Allen, T. M. & Hansen, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim. Biophys. Acta***1068**, 133–141 (1991).
197. Harashima, H., Hiraiwa, T., Ochi, Y. & Kiwada, H. Size dependent liposome degradation in blood: in vivo/in vitro correlation by kinetic modeling. *J. Drug Target.***3**, 253–261 (1995).
198. Gradoni, L., Davidson, R. N., Orsini, S., Betto, P. & Giambenedetti, M. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) against *Leishmania infantum* and tissue distribution in mice. *J. Drug Target.***1**, 311–316 (1993).
199. Stapleton, S., Milosevic, M., Allen, C., Zheng, J., Dunne, M., Yeung, I. & Jaffray, D. A. A mathematical model of the enhanced permeability and retention effect for liposome transport in solid tumors. *PLoS One***8**, e81157 (2013).

200. Onoue, S., Yamada, S. & Chan, H.-K. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int. J. Nanomedicine***9**, 1025–1037 (2014).
201. Huth, U. S., Schubert, R. & Peschka-Süss, R. Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.***110**, 490–504 (2006).
202. Kunisawa, J., Nakagawa, S. & Mayumi, T. Pharmacotherapy by intracellular delivery of drugs using fusogenic liposomes: application to vaccine development. *Adv. Drug Deliv. Rev.***52**, 177–186 (2001).
203. Pacheco, P., White, D. & Sulchek, T. Effects of microparticle size and Fc density on macrophage phagocytosis. *PloS One***8**, e60989 (2013).
204. Brewer, J. M., Pollock, K. G. J., Tetley, L. & Russell, D. G. Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950***173**, 6143–6150 (2004).
205. Liu, A. P., Aguet, F., Danuser, G. & Schmid, S. L. Local clustering of transferrin receptors promotes clathrin-coated pit initiation. *J. Cell Biol.***191**, 1381–1393 (2010).
206. Saftig P. in *Fabry Dis. Perspect. 5 Years FOS* (Oxford PharmaGenesis, 2006). unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=fabry%20disease%20saftig> (abgerufen am 11.08.2015)
207. Calzolari, A., Oliviero, I., Deaglio, S., Mariani, G., Biffoni, M., Sposi, N. M., Malavasi, F., Peschle, C. & Testa, U. Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines. *Blood Cells. Mol. Dis.***39**, 82–91 (2007).
208. Sugyo, A., Tsuji, A. B., Sudo, H., Okada, M., Koizumi, M., Satoh, H., Kurosawa, G., Kurosawa, Y. & Saga, T. Evaluation of Efficacy of Radioimmunotherapy with 90Y-Labeled Fully Human Anti-Transferrin Receptor Monoclonal Antibody in Pancreatic Cancer Mouse Models. *PloS One***10**, e0123761 (2015).
209. Du, W., Fan, Y., He, B., Zheng, N., Yuan, L., Dai, W., Zhang, H., Wang, X., Wang, J., Zhang, X. & Zhang, Q. Bionano interactions of mcf-7 breast tumor cells with a transferrin receptor targeted nanoparticle. *Mol. Pharm.***12**, 1467–1476 (2015).
210. Jølck, R. I., Feldborg, L. N., Andersen, S., Moghimi, S. M. & Andresen, T. L. Engineering Liposomes and Nanoparticles for Biological Targeting. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* (2010). doi:10.1007/10\_2010\_92
211. Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H. & Harashima, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.***58**, 32–45 (2006).
212. Pelkmans, L. & Helenius, A. Endocytosis via caveolae. *Traffic Cph. Den.***3**, 311–320 (2002).
213. Parton, R. G. & Richards, A. A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic Cph. Den.***4**, 724–738 (2003).

214. Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R. & Langer, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.***2**, 751–760 (2007).
215. Goldenring, J. R. Recycling endosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.***35**, 117–122 (2015).
216. Eloy, J. O., Claro de Souza, M., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J. & Marchetti, J. M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces***123**, 345–363 (2014).
217. Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwala, A. & Amiji, M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.***126**, 187–204 (2008).
218. Deshpande, P. P., Biswas, S. & Torchilin, V. P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomed.***8**, 1509–1528 (2013).
219. Yu, Y., Wang, Z.-H., Zhang, L., Yao, H.-J., Zhang, Y., Li, R.-J., Ju, R.-J., Wang, X.-X., Zhou, J., Li, N. & Lu, W.-L. Mitochondrial targeting topotecan-loaded liposomes for treating drug-resistant breast cancer and inhibiting invasive metastases of melanoma. *Biomaterials***33**, 1808–1820 (2012).
220. De Miguel, D., Basáñez, G., Sánchez, D., Malo, P. G., Marzo, I., Larrad, L., Naval, J., Pardo, J., Anel, A. & Martínez-Lostao, L. Liposomes decorated with Apo2L/TRAIL overcome chemoresistance of human hematologic tumor cells. *Mol. Pharm.***10**, 893–904 (2013).
221. Shi, C., Gao, F., Gao, X. & Liu, Y. A novel anti-VEGF165 monoclonal antibody-conjugated liposomal nanocarrier system: physical characterization and cellular uptake evaluation in vitro and in vivo. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie***69**, 191–200 (2015).
222. Fiszer-Kierzkowska, A., Vydra, N., Wysocka-Wycisk, A., Kronekova, Z., Jarząb, M., Lisowska, K. M. & Krawczyk, Z. Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Mol. Biol.***12**, 27 (2011).
223. Noble, S. & Pasi, J. Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. *Br. J. Cancer***102 Suppl 1**, S2–9 (2010).
224. Han, X., Guo, B., Li, Y. & Zhu, B. Tissue factor in tumor microenvironment: a systematic review. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol***7**, 54 (2014).
225. Falanga, A., Marchetti, M. & Russo, L. The mechanisms of cancer-associated thrombosis. *Thromb. Res.***135 Suppl 1**, S8–S11 (2015).
226. Ben-Aharon, I., Stemmer, S. M., Leibovici, L., Shpilberg, O., Sulkes, A. & Gafter-Gvili, A. Low molecular weight heparin (LMWH) for primary thrombo-prophylaxis in patients with solid malignancies - systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol. Stockh. Swed.***53**, 1230–1237 (2014).
227. Harter, K., Levine, M. & Henderson, S. O. Anticoagulation drug therapy: a review. *West. J. Emerg. Med.***16**, 11–17 (2015).

- 
228. Gresham, C., Levine, M. & Ruha, A.-M. Case files of the Medical Toxicology Fellowship at Banner Good Samaritan Medical Center in Phoenix, AZ: a non-warfarin anticoagulant overdose. *J. Med. Toxicol. Off. J. Am. Coll. Med. Toxicol.***5**, 242–249 (2009).
229. Johnson, E. A. & Mulloy, B. The molecular-weight range of mucosal-heparin preparations. *Carbohydr. Res.***51**, 119–127 (1976).
230. Linhardt, R. J., Dordick, J. S., Deangelis, P. L. & Liu, J. Enzymatic synthesis of glycosaminoglycan heparin. *Semin. Thromb. Hemost.***33**, 453–465 (2007).
231. Casu, B., Naggi, A. & Torri, G. Re-visiting the structure of heparin. *Carbohydr. Res.***403**, 60–68 (2015).
232. Gray, E., Mulloy, B. & Barrowcliffe, T. W. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb. Haemost.***99**, 807–818 (2008).
233. Barrowcliffe, T. W. & Thomas, D. P. Anticoagulant activities of heparin and fragments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.***556**, 132–145 (1989).
234. Lane, D. A., Denton, J., Flynn, A. M., Thunberg, L. & Lindahl, U. Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. *Biochem. J.***218**, 725–732 (1984).
235. Petitou, M. & van Boeckel, C. A. A. A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angew. Chem. Int. Ed Engl.***43**, 3118–3133 (2004).
236. Hettiarachchi(1), R. J. K., Smorenburg(2, S. M., 3), Ginsberg(4), J., Levine(4), M., Prins(1), M. H. & Büller(2), H. R. Do Heparins Do More than Just Treat Thrombosis? The Influence of Heparins on Cancer Spread. *Thromb Haemost***82**, 947–952 (1999).
237. Akl, E. A., Kahale, L., Neumann, I., Barba, M., Sperati, F., Terrenato, I., Muti, P. & Schünemann, H. Anticoagulation for the initial treatment of venous thromboembolism in patients with cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.***6**, CD006649 (2014).
238. Kakkar, A. K., Levine, M. N., Kadziola, Z., Lemoine, N. R., Low, V., Patel, H. K., Rustin, G., Thomas, M., Quigley, M. & Williamson, R. C. N. Low Molecular Weight Heparin, Therapy With Dalteparin, and Survival in Advanced Cancer: The Fragmin Advanced Malignancy Outcome Study (FAMOUS). *J. Clin. Oncol.***22**, 1944–1948 (2004).
239. Klerk, C. P. W., Smorenburg, S. M., Otten, H.-M., Lensing, A. W. A., Prins, M. H., Piovella, F., Prandoni, P., Bos, M. M. E. M., Richel, D. J., Tienhoven, G. van & Büller, H. R. The Effect of Low Molecular Weight Heparin on Survival in Patients With Advanced Malignancy. *J. Clin. Oncol.***23**, 2130–2135 (2005).
240. Sideras, K., Schaefer, P. L., Okuno, S. H., Sloan, J. A., Kutteh, L., Fitch, T. R., Dakhil, S. R., Levitt, R., Alberts, S. R., Morton, R. F., Rowland, K. M., Novotny, P. J. & Loprinzi, C. L. Low-Molecular-Weight Heparin in Patients With Advanced Cancer: A Phase 3 Clinical Trial. *Mayo Clin. Proc.***81**, 758–767 (2006).

- 
241. Akl, E. A., Kahale, L. A., Ballout, R. A., Barba, M., Yosunico, V. E. D., van Doormaal, F. F., Middeldorp, S., Bryant, A. & Schünemann, H. Parenteral anticoagulation in ambulatory patients with cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.***12**, CD006652 (2014).
242. Gil-Bernabé, A. M., Lucotti, S. & Muschel, R. J. Coagulation and metastasis: what does the experimental literature tell us? *Br. J. Haematol.***162**, 433–441 (2013).
243. Bendas, G. & Borsig, L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int. J. Cell Biol.* 676–731 (2012). doi:10.1155/2012/676731
244. Gerber, U., Hoß, S. G., Shteingauz, A., Jüngel, E., Jakubzig, B., Ilan, N., Blaheta, R., Schlesinger, M., Vlodaysky, I. & Bendas, G. Latent heparanase facilitates VLA-4-mediated melanoma cell binding and emerges as a relevant target of heparin in the interference with metastatic progression. *Semin. Thromb. Hemost.***41**, 244–254 (2015).
245. Nadir, Y. & Brenner, B. Heparanase multiple effects in cancer. *Thromb. Res.***133 Suppl 2**, S90–94 (2014).
246. Purushothaman, A., Babitz, S. K. & Sanderson, R. D. Heparanase enhances the insulin receptor signaling pathway to activate extracellular signal-regulated kinase in multiple myeloma. *J. Biol. Chem.***287**, 41288–41296 (2012).
247. Ramani, V. C., Purushothaman, A., Stewart, M. D., Thompson, C. A., Vlodaysky, I., Au, J. L.-S. & Sanderson, R. D. The heparanase/syndecan-1 axis in cancer: mechanisms and therapies. *FEBS J.***280**, 2294–2306 (2013).
248. Casu, B., Vlodaysky, I. & Sanderson, R. D. Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.***36**, 195–203 (2008).
249. Borsig, L. Antimetastatic activities of modified heparins: selectin inhibition by heparin attenuates metastasis. *Semin. Thromb. Hemost.***33**, 540–546 (2007).
250. Laubli, H. & Borsig, L. Heparins attenuate cancer metastasis: are selectins the link? *Cancer Invest.***27**, 474–481 (2009).
251. Seguin, L., Desgrosellier, J. S., Weis, S. M. & Cheresch, D. A. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol.***25**, 234–240 (2015).
252. Schlesinger, M., Roblek, M., Ortmann, K., Naggi, A., Torri, G., Borsig, L. & Bendas, G. The role of VLA-4 binding for experimental melanoma metastasis and its inhibition by heparin. *Thromb. Res.***133**, 855–862 (2014).
253. Schlesinger, M., Schmitz, P., Zeisig, R., Naggi, A., Torri, G., Casu, B. & Bendas, G. The inhibition of the integrin VLA-4 in MV3 melanoma cell binding by non-anticoagulant heparin derivatives. *Thromb. Res.***129**, 603–610 (2012).
254. Ma, Q., Tobu, M., Schultz, C., Jeske, W., Hoppensteadt, D., Walenga, J., Cornelli, U., Lee, J., Linhardt, R., Hanin, I. & Fareed, J. Molecular weight dependent tissue factor pathway inhibitor release by heparin and heparin oligosaccharides. *Thromb. Res.***119**, 653–661 (2007).

- 
255. Fernandez, P. M. & Rickles, F. R. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr. Opin. Hematol.***9**, 401–406 (2002).
256. Holroyd, E. W., White, T. A., Pan, S. & Simari, R. D. Tissue factor pathway inhibitor as a multifunctional mediator of vascular structure. *Front. Biosci. Elite Ed.***4**, 392–400 (2012).
257. Stavik, B., Tinholt, M., Sletten, M., Skretting, G., Sandset, P. M. & Iversen, N. TFPI $\alpha$  and TFPI $\beta$  are expressed at the surface of breast cancer cells and inhibit TF-FVIIa activity. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol***6**, 5 (2013).
258. Mousa, S. A. & Mohamed, S. Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thromb. Haemost.***92**, 627–633 (2004).
259. Singh, A. & Settleman, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene***29**, 4741–4751 (2010).
260. Lebeau, B., Chastang, C., Brechot, J. M., Capron, F., Dautzenberg, B., Delaisements, C., Mornet, M., Brun, J., Hurdebourcq, J. P. & Lemarie, E. Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. ‘Petites Cellules’ Group. *Cancer***74**, 38–45 (1994).
261. Altinbas, M., Coskun, H. S., Er, O., Ozkan, M., Eser, B., Unal, A., Cetin, M. & Soyuer, S. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. *J. Thromb. Haemost. JTH***2**, 1266–1271 (2004).
262. Lebeau, B., Baud, M., Masanes, M.-J., Febvre, M., Mokhtari, T. & Chouaid, C. Optimization of small-cell lung cancer chemotherapy with heparin: a comprehensive retrospective study of 239 patients treated in a single specialized center. *Chemotherapy***57**, 253–258 (2011).
263. Icli, F., Akbulut, H., Utkan, G., Yalcin, B., Dincol, D., Isikdogan, A., Demirkazik, A., Onur, H., Cay, F. & Büyükcelik, A. Low molecular weight heparin (LMWH) increases the efficacy of cisplatin plus gemcitabine combination in advanced pancreatic cancer. *J. Surg. Oncol.***95**, 507–512 (2007).
264. Phillips, P. G., Yalcin, M., Cui, H., Abdel-Nabi, H., Sajjad, M., Bernacki, R., Veith, J. & Mousa, S. A. Increased tumor uptake of chemotherapeutics and improved chemoresponse by novel non-anticoagulant low molecular weight heparin. *Anticancer Res.***31**, 411–419 (2011).
265. Kirtane, A. R., Kalscheuer, S. M. & Panyam, J. Exploiting nanotechnology to overcome tumor drug resistance: Challenges and opportunities. *Adv. Drug Deliv. Rev.***65**, 1731–1747 (2013).
266. Eke, I. & Cordes, N. Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer. *Semin. Cancer Biol.***31**, 65–75 (2015).
267. Shishido, S., Bönig, H. & Kim, Y.-M. Role of integrin  $\alpha$ 4 in drug resistance of leukemia. *Front. Oncol.***4**, 99 (2014).

268. Phillips, P. G., Yalcin, M., Cui, H., Abdel-Nabi, H., Sajjad, M., Bernacki, R., Veith, J. & Mousa, S. A. Increased tumor uptake of chemotherapeutics and improved chemoresponse by novel non-anticoagulant low molecular weight heparin. *Anticancer Res.***31**, 411–419 (2011).
269. Niu, Q., Wang, W., Li, Y., Ruden, D. M., Wang, F., Li, Y., Wang, F., Song, J. & Zheng, K. Low molecular weight heparin ablates lung cancer cisplatin-resistance by inducing proteasome-mediated ABCG2 protein degradation. *PloS One***7**, e41035 (2012).
270. Yoh, K., Ishii, G., Yokose, T., Minegishi, Y., Tsuta, K., Goto, K., Nishiwaki, Y., Kodama, T., Suga, M. & Ochiai, A. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***10**, 1691–1697 (2004).
271. Avanti Polar Lipids unter: <http://www.avantilipids.com/> (abgerufen am 24.09.2015)
272. Bendas, G., Krause, A., Bakowsky, U., Vogel, J. & Rothe, U. Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int. J. Pharm.***181**, 79–93 (1999).
273. Ostrowsky, N. Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids***64**, 45–56 (1993).
274. Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.***83**, 346–356 (1977).
275. BARTLETT, G. R. Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids. *J. Biol. Chem.***234**, 469–471 (1959).
276. Tibben, M. M., Rademaker-Lakhai, J. M., Rice, J. R., Stewart, D. R., Schellens, J. H. M. & Beijnen, J. H. Determination of total platinum in plasma and plasma ultrafiltrate, from subjects dosed with the platinum-containing N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer AP5280, by use of graphite-furnace Zeeman atomic-absorption spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.***373**, 233–236 (2002).
277. Golingo, R. P., Shumlak, U. & Den Hartog, D. J. Note: Zeeman splitting measurements in a high-temperature plasma. *Rev. Sci. Instrum.***81**, 126104 (2010).
278. Varian SpectrAA 220/880 Zeeman brochure - Varian-Zeeman-Effect.pdf. unter: <http://web.colby.edu/ch332public/files/2012/02/Varian-Zeeman-Effect.pdf> (abgerufen am 01.06.2015)
279. Food and Drug Administration. Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, May 2001. unter: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf> (abgerufen am 25.06.2015)
280. CASY - Cell counter & Analyser SYstem Model TT Technical Handbook. unter: [http://www.ninolab.dk/fileadmin/Ninolab/pdf/innovatis/casy\\_tt\\_eng.pdf](http://www.ninolab.dk/fileadmin/Ninolab/pdf/innovatis/casy_tt_eng.pdf) (abgerufen am 24.09.2015)
281. Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit - ary009.pdf. unter: <http://www.rndsystems.com/pdf/ary009.pdf> (abgerufen am 24.09.2015)

- 
282. Walker, J. M. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ***32**, 5–8 (1994).
283. Andrews, P. A., Velury, S., Mann, S. C. & Howell, S. B. cis-Diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.***48**, 68–73 (1988).
284. Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L. & Facchini, A. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.***8**, 1131–1135 (2001).
285. Forster, S., Thumser, A. E., Hood, S. R. & Plant, N. Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in in vitro drug transport assays. *PLoS One***7**, e33253 (2012).
286. Choudhuri, S. & Klaassen, C. D. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. J. Toxicol.***25**, 231–259 (2006).
287. Mueller, H., Kassack, M. U. & Wiese, M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol. Screen. Off. J. Soc. Biomol. Screen.***9**, 506–515 (2004).
288. Berridge, M. V. & Tan, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.***303**, 474–482 (1993).
289. Berridge, M. V., Herst, P. M. & Tan, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.***11**, 127–152 (2005).
290. Draczkowski, P., Matosiuk, D. & Jozwiak, K. Isothermal titration calorimetry in membrane protein research. *J. Pharm. Biomed. Anal.***87**, 313–325 (2014).
291. RNeasy Plus Mini Kit - QIAGEN. *RNeasy Plus Mini Kit*unter: <https://www.qiagen.com/de/products/catalog/sample-technologies/rna-sample-technologies/total-rna/rneasy-plus-mini-kit/#resources> (abgerufen am 24.09.2015)
292. Royer-Pokora, B., Busch, M., Beier, M., Duhme, C., de Torres, C., Mora, J., Brandt, A. & Royer, H.-D. Wilms tumor cells with WT1 mutations have characteristic features of mesenchymal stem cells and express molecular markers of paraxial mesoderm. *Hum. Mol. Genet.***19**, 1651–1668 (2010).
293. Leblond, F., Davis, S. C., Valdés, P. A. & Pogue, B. W. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *J. Photochem. Photobiol.* **B98**, 77–94 (2010).
294. Caysa, H. *Untersuchungen zum Monitoring von Tumorxenograftmodellen mittels nicht-invasivem in vivo Multispektral-Fluoreszenzimaging.* (Universitäts- und Landesbibliothek Sachsen-Anhalt, 2013).

- 
295. Hamelers, I. H. L., Staffhorst, R. W. H. M., Voortman, J., de Kruijff, B., Reedijk, J., van Bergen en Henegouwen, P. M. P. & de Kroon, A. I. P. M. High cytotoxicity of cisplatin nanocapsules in ovarian carcinoma cells depends on uptake by caveolae-mediated endocytosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 1259–1268 (2009).
296. Ramachandran, S., Quist, A. P., Kumar, S. & Lal, R. Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy: AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake, and toxicity. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **22**, 8156–8162 (2006).
297. Carvalho Júnior, A. D., Vieira, F. P., Melo, V. J. de, Lopes, M. T. P., Silveira, J. N., Ramaldes, G. A., Garnier-Suillerot, A., Pereira-Maia, E. C. & Oliveira, M. C. de. Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* **40**, 1149–1157 (2007).
298. Koch, M., Krieger, M. L., Stölting, D., Brenner, N., Beier, M., Jaehde, U., Wiese, M., Royer, H.-D. & Bendas, G. Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 1077–1090 (2013).
299. Zhang, H., Kim, J. K., Edwards, C. A., Xu, Z., Taichman, R. & Wang, C.-Y. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat. Cell Biol.* **7**, 909–915 (2005).
300. Wu, W., Wang, H., Guo, W., Yang, K., Zhao, Y., Jiang, Y. & He, P. Up-regulation of fas reverses cisplatin resistance of human small cell lung cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **29**, 49 (2010).
301. Casagrande, N., Celegato, M., Borghese, C., Mongiat, M., Colombatti, A. & Aldinucci, D. Preclinical activity of the liposomal cisplatin lipoplatin in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 5496–5506 (2014).
302. Boulikas, T. Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert Opin. Investig. Drugs* **18**, 1197–1218 (2009).
303. Breen, E. C. VEGF in biological control. *J. Cell. Biochem.* **102**, 1358–1367 (2007).
304. Rudd, T. R., Skidmore, M. A., Guimond, S. E., Guerrini, M., Cosentino, C., Edge, R., Brown, A., Clarke, D. T., Torri, G., Turnbull, J. E., Nichols, R. J., Fernig, D. G. & Yates, E. A. Site-specific interactions of copper(II) ions with heparin revealed with complementary (SRCD, NMR, FTIR and EPR) spectroscopic techniques. *Carbohydr. Res.* **343**, 2184–2193 (2008).



## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abb. 2.1:</b> Struktur des Cisplatin und Transplatin .....	4
<b>Abb. 2.2:</b> Hydrolyse- und Protolyseverhalten von Cisplatin in wässrigem Milieu .....	5
<b>Abb. 2.3:</b> Das intrazelluläre Konzentrationsgleichgewicht von Cisplatin und seinen Hydrolyseformen .....	6
<b>Abb. 2.4:</b> Isolierte Darstellung der Bindung eines Cisplatin-Aquakomplexes an Guanosinphosphat.....	8
<b>Abb. 2.5:</b> Schematische Darstellung der möglichen Cisplatin-DNA-Addukte .....	9
<b>Abb. 2.6:</b> Vergleich zwischen Nekrose und Apoptose .....	10
<b>Abb. 2.7:</b> Gesamtübersicht über den intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweg .....	12
<b>Abb. 2.8:</b> Übersicht über die BH-Domänen einiger Vertreter der Bcl-2-Familie .....	13
<b>Abb. 2.9:</b> Proteindomänen des extrinsischen Apoptosesignalweges.....	15
<b>Abb. 2.10:</b> Aktivierung primär apoptoseunabhängiger Signalwege durch Cisplatin induzierte DNA-Schäden.....	17
<b>Abb. 2.11:</b> <i>Pre-target</i> Resistenzmechanismen .....	19
<b>Abb. 2.12:</b> <i>On-target</i> Resistenzmechanismen .....	21
<b>Abb. 2.13:</b> <i>Post-target</i> Resistenzmechanismen .....	22
<b>Abb. 2.14:</b> Antiapoptotische Mechanismen der cisplatininduzierten Chemoresistenz und mögliche Angriffspunkte einer Chemosensitivierung .....	25
<b>Abb. 2.15:</b> Schematischer Querschnitt durch ein <i>targetiertes</i> Liposom.....	30
<b>Abb. 2.16:</b> Übersicht über passives und aktives <i>targeting</i> mittels Cisplatinliposomen .....	33
<b>Abb. 2.17:</b> Struktur des Heparins .....	37
<b>Abb. 2.18:</b> Vereinfachte Darstellung der enzymatischen und nicht enzymatischen Heparanaseeffekte.....	39
<b>Abb. 2.19:</b> Schematische Übersicht über selektin-/integrinvermittelte Tumorzellinteraktionen mit Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten.....	40
<b>Abb. 4.1:</b> Struktur des Lipidankers.....	69
<b>Abb. 4.2:</b> Struktur des rot-blauen Biuret-Komplexes.....	71
<b>Abb. 4.3:</b> Schematische Darstellung des Pipettierschemas einer 6 Well-Platte für Cisplatin- <i>uptake</i> -Untersuchungen .....	77

<b>Abb. 4.4:</b> Schematische Darstellung des Pipettierschemas einer 96 Well-Platte für den MTT-assay .....	78
<b>Abb. 4.5:</b> Struktur des violetten BCA-Komplexes.....	79
<b>Abb. 4.6:</b> Pipettierschema des BCA-assays .....	80
<b>Abb. 4.7:</b> Intrazelluläre Metabolisierung des Calcein-AM durch Esterasen .....	83
<b>Abb. 4.8:</b> Intrazelluläre Metabolisierung des Rhodamin 123 durch Esterasen.....	84
<b>Abb. 4.9:</b> Ablauf der von Rettich-Peroxidase katalysierten Luminol-Reaktion .....	88
<b>Abb. 4.10:</b> Reduktion von MTT.....	90
<b>Abb. 4.11:</b> Skizze der angelegten Kreisflächen zur Bestimmung der Pixeldichte und den drei unterschiedlichen Typen von Messpunkten auf einer Nitrozellulosemembran des Apoptose-arrays.....	95
<b>Abb. 4.12:</b> Ermittlung des Netto-Mittelwertes.....	96
<b>Abb. 4.13:</b> Ermittlung des korrigierten Mittelwertes .....	96
<b>Abb. 4.14:</b> Ermittlung der Expressionsänderung der Proben.....	97
<b>Abb. 5.1:</b> Zytotoxizität des freien Cisplatins in A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h...107	
<b>Abb. 5.2:</b> Zytotoxizität des freien Cisplatins in A2780- und A2780cis-Zellen nach 24, 48 und 72 h.....	108
<b>Abb. 5.3:</b> Zytotoxizität der Cisplatinliposomen in A2780- und A2780cis-Zellen nach 24, 48 und 72 h.....	109
<b>Abb. 5.4:</b> Zytotoxizität der Leerliposomen nach 72 h .....	111
<b>Abb. 5.5:</b> Die intrazelluläre Akkumulation von 20 µmol/L Cisplatin nach Behandlung mit freiem Wirkstoff und Cisplatinliposomen .....	112
<b>Abb. 5.6:</b> Die intrazelluläre Akkumulation von 20 µmol/L Cisplatin in mit freiem Wirkstoff oder Cisplatinliposomen behandelten A2780- und resistenten A2780cis-Ovarialkarzinomzellen ach 24 h.....	113
<b>Abb. 5.7:</b> CTR1-Expression nach Behandlung mit Cisplatin oder liposomalem Cisplatin.115	
<b>Abb. 5.8:</b> Zytotoxizität von Kupfersulfat-pentahydrat in A2780- und A2780cis-Zellen ...	116
<b>Abb. 5.9:</b> DNA-Platinierung von cisplatinresistenten A2780- und A2780cis-Zellen nach der Behandlung mit 20 µmol/L freiem oder liposomalem Cisplatin .....	118
<b>Abb. 5.10:</b> Identifizierung der zehn am stärksten regulierten <i>GeneGO process networks</i> in chemoresistenten A2780cis-Ovarialkarzinomzellen.....	121
<b>Abb. 5.11:</b> Identifizierung der zehn am stärksten regulierten <i>GeneGO process networks</i> in chemoresistenten A2780cis-Ovarialkarzinomzellen nach der Behandlung mit der EC <sub>50</sub> an freiem Cisplatin.....	122

<b>Abb. 5.12:</b> Identifizierung der zehn am stärksten regulierten <i>GeneGO process networks</i> in chemoresistenten A2780cis-Ovarialkarzinomzellen nach der Behandlung mit der EC <sub>50</sub> an liposomalem Cisplatin .....	122
<b>Abb. 5.13:</b> Gesamtübersicht über die 33 Proteine des Apoptose-arrays und deren Lumineszenzsignal als Pixeldichte .....	125
<b>Abb. 5.14:</b> Proteinexpression von an Serin 15, 46 oder 392 phosphoryliertem p53 .....	126
<b>Abb. 5.15:</b> Proteinexpression von Pro-Caspase-3 und aktiver Caspase-3.....	127
<b>Abb. 5.16:</b> Proteinexpression von Apoptoseproteinen, die an der intrinsischen Apoptose beteiligt sind.....	128
<b>Abb. 5.17:</b> Proteinexpression von Apoptoseproteinen, die an der extrinsischen Apoptose beteiligt sind.....	130
<b>Abb. 5.18:</b> Proteinexpression von physiologischen Apoptoseinhibitoren und deren Inhibitoren.....	131
<b>Abb. 5.19:</b> Proteinexpression von antioxidativen Proteinen und Hypoxiemarkern .....	132
<b>Abb. 5.20:</b> Expression von zellzyklusregulierenden Proteinen .....	134
<b>Abb. 5.21:</b> Relative Expression von Apoptoseproteinen.....	135
<b>Abb. 5.22:</b> Pro-Caspase-9- und Caspase-9-Expression nach Behandlung mit Cisplatin oder liposomalem Cisplatin .....	136
<b>Abb. 5.23:</b> Relative Quantifizierung der mit APAF-1 komplexierten Caspase-9- und freien Caspase-9-Expression .....	137
<b>Abb. 5.24:</b> Pro-Caspase-8- und Caspase-8-Expression nach Behandlung mit Cisplatin oder liposomalem Cisplatin .....	138
<b>Abb. 5.25:</b> Relative Quantifizierung der Pro-Caspase-8- und Caspase-8-Expression .....	138
<b>Abb. 5.26:</b> EC <sub>50</sub> von freiem Cisplatin und Cisplatinliposomen in resistenten Ovarialkarzinomzellen unter Einfluss eines Caspase-3-, -8- oder -9-Inhibitors .	140
<b>Abb. 5.27:</b> Zytotoxizität von Lipoplatin™ in A2780- und A2780cis-Zellen.....	142
<b>Abb. 5.28:</b> Relative Expression von Apoptoseproteinen als Reaktion auf Lipoplatin™ .....	143
<b>Abb. 5.29:</b> Aufnahmen zweier Mäuse am Maestro™ <i>in vivo</i> Fluorescence Imaging System 5 min, 1 h, 24 h und 48 h nach der Injektion von DiR-markierten Liposomen .....	147
<b>Abb. 5.30:</b> <i>Ex vivo</i> -Aufnahmen der präparierten Organe 24 h nach einer zweiten Injektion von DiR-markierten Liposomen.....	149
<b>Abb. 5.31:</b> <i>Ex vivo</i> -Aufnahmen des Tumorquerschnitts im direkten Vergleich zur Lunge 24 h nach einer zweiten Injektion von DiR-markierten Liposomen.....	150

<b>Abb. 5.32:</b> Aufnahmen von drei Mäusen mit A2780- bzw. A2780cis-Tumoren am Maestro™ <i>in vivo</i> Fluorescence Imaging System vor der Injektion, 24 h und 48 h nach der Injektion von DiR-markierten Liposomen .....	152
<b>Abb. 5.33:</b> Die intrazelluläre Akkumulation von 20 µM Cisplatin nach Behandlung mit freiem Wirkstoff und <i>targetierten</i> Cisplatinliposomen .....	154
<b>Abb. 5.34:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von zwei A2780cis-Tumorquerschnitten nach der Präparation aus Mäusen, die mit Liposomen behandelt wurden. ....	155
<b>Abb. 5.35:</b> Zytotoxizität von Cisplatin allein und nach Vorinkubation mit 50 µg/mL Tinzaparin .....	159
<b>Abb. 5.36:</b> Zytotoxizität von Tinzaparin in A2780- und A2780cis-Zellen nach 24, 48 und 72 h.....	161
<b>Abb. 5.37:</b> Calcein(-AM)-Efflux aus A2780-Zellen und A2780adr-Zellen in Medium 3 h nach der Inkubation mit einer Verdünnungsreihe von Fondaparinux oder Tinzaparin .....	162
<b>Abb. 5.38:</b> Calcein(-AM)-Efflux aus A2780adr-Zellen in Medium 3 h nach der Inkubation mit einer Verdünnungsreihe von Fondaparinux und Tinzaparin im Vergleich zu etablierten Inhibitoren.....	163
<b>Abb. 5.39:</b> Durchflusszytometrische Bestimmung der Calcein(-AM)- und Rhodamin 123-Akkumulation in A2780adr-Zellen.....	164
<b>Abb. 5.40:</b> ATP7A-Expression nach Behandlung mit 2 µmol/L Cisplatin für 72 h ohne, mit gleichzeitiger Inkubation oder mit Vorinkubation von Tinzaparin .....	165
<b>Abb. 5.41:</b> CTR1-Expression nach Behandlung mit 2 µmol/L Cisplatin für 72 h ohne, mit gleichzeitiger Inkubation oder mit Vorinkubation von Tinzaparin .....	166
<b>Abb. 5.42:</b> CTR1-Expression in unbehandelten und mit Cisplatin und/oder Tinzaparin behandelten A2780- und A2780cis-Zellen .....	167
<b>Abb. 5.43:</b> Relative Quantifizierung der CTR1-Expression .....	167
<b>Abb. 5.44:</b> Intrazelluläre Akkumulation von 20 µM Cisplatin über 24 h in resistenten A2780cis-Zellen unter dem Einfluss einer gleichzeitigen Inkubation oder Vorinkubation mit 50 µg/mL Tinzaparin.....	169
<b>Abb. 5.45:</b> Repräsentative isothermale kalorimetrische Titration von Tinzaparin mit Kupfersulfat-pentahydrat und CTR1-Expression von unbehandelten und mit 50 µg/mL Tinzaparin behandelten A2780- und A2780cis-Zellen.....	170
<b>Abb. 5.46:</b> Anzahl der durch Tinzaparin regulierten Gene in resistenten A2780cis-Zellen..	172

<b>Tab. 2.1:</b> Übersicht über die von der FDA zugelassenen und in der klinischen Prüfung befindlichen liposomalen Wirkstoffformulierungen .....	26
<b>Tab. 4.1:</b> Informationen zu den verwendeten Substanzen .....	45
<b>Tab. 4.2:</b> Informationen zu den verwendeten Lipiden .....	47
<b>Tab. 4.3:</b> Strukturen der verwendeten Lipide .....	48
<b>Tab. 4.4:</b> Informationen zu den verwendeten Antikörpern .....	49
<b>Tab. 4.5:</b> Informationen zu den verwendeten Caspaseinhibitoren.....	50
<b>Tab. 4.6:</b> Informationen zu den verwendeten Fertigarzneimitteln.....	50
<b>Tab. 4.7:</b> Informationen zu den hergestellten Substanzlösungen.....	51
<b>Tab. 4.8:</b> Informationen zu den hergestellten Antikörperverdünnungen.....	54
<b>Tab. 4.9:</b> Informationen zu den verwendeten Lipidstammlösungen.....	56
<b>Tab. 4.10:</b> Informationen zu den verwendeten Puffern und Lösungen.....	56
<b>Tab. 4.11:</b> Informationen zu den hergestellten Liposomendispersionen .....	60
<b>Tab. 4.12:</b> Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	62
<b>Tab. 4.13:</b> Informationen zu den verwendeten Geräten.....	63
<b>Tab. 4.14:</b> Informationen zu der verwendeten Software.....	67
<b>Tab. 4.15:</b> Parameter des Graphitofens im Verlauf einer Messung mit dem Spektrometer SpectrAA <sup>®</sup> Zeeman 220 .....	73
<b>Tab. 4.16:</b> Behandlungsschemata der einzelnen Inkubationsansätze für das <i>western blotting</i> .....	85
<b>Tab. 4.17:</b> Behandlungsschemata der einzelnen Inkubationsansätze für MTT- <i>assays</i> .....	89
<b>Tab. 4.18:</b> Parameter einer Messung am Titrationskalorimeter.....	92
<b>Tab. 4.19:</b> Versuchsbedingungen der isothermalen Titration .....	93
<b>Tab. 4.20:</b> Behandlungsschemata der einzelnen Inkubationsansätze für Protein- <i>arrays</i> .....	94
<b>Tab. 5.1:</b> Liposomengröße, Polydispersitätsindex, Lipidgehalt und Cisplatingehalt der Cisplatinliposomen und Leerliposomen .....	102
<b>Tab. 5.2:</b> Durchschnittlicher Lipidgehalt ermittelt aus dem Phosphatgehalt der Phospholipide und der daraus resultierende Lipidverlust.....	103
<b>Tab. 5.3:</b> Kopplungskonstanten der holotransferringekoppelten Liposomen als Maß für die Kopplungseffizienz.....	104
<b>Tab. 5.4:</b> Einschussrate der vier hauptsächlich untersuchten Cisplatinliposomen .....	106
<b>Tab. 5.5:</b> Zusammenfassung der Zytotoxizität von freiem Cisplatin nach 72 h .....	107
<b>Tab. 5.6:</b> Zusammenfassung der Zytotoxizität von freiem Cisplatin und Cisplatinliposomen .....	110

---

<b>Tab. 5.7:</b> Jeweils niedrigste EC <sub>50</sub> eines Einzelversuchs mit Leerliposomen.....	111
<b>Tab. 5.8:</b> Zusammenfassung der Zytotoxizität von Kupfersulfat-pentahydrat.....	116
<b>Tab. 5.9:</b> Zusammenfassung der Zytotoxizität von freiem Cisplatin und Lipoplatin™ nach 72 h .....	142
<b>Tab. 5.10:</b> Zusammenfassung der Zytotoxizität von freiem Cisplatin und Cisplatinliposomen in Caov-3- und Caov-3cis-Zellen.....	145
<b>Tab. 5.11:</b> Zusammenfassung der Zytotoxizität von freiem Cisplatin allein und mit gleichzeitiger Inkubation oder 18 h Vorinkubation von Tinzaparin .....	159
<b>Tab. 5.12::</b> Zusammenfassung der IC <sub>50</sub> der P-GP-Inhibitoren .....	163
<b>Tab. 5.13:</b> Zusammenfassung der IC <sub>50</sub> der P-GP-Inhibitoren in allen durchflusszytometrischen Versuchen.....	164

## 8.2 Publikationsliste

### Wissenschaftliche Originalarbeiten

Pfankuchen, D. B.\*, Stölting, D. P.\*, Schlesinger, M., Royer, H.-D. & Bendas, G.  
Low molecular weight heparin tinzaparin antagonizes cisplatin resistance of ovarian cancer cells.

*Biochem. Pharmacol.***97**, 147–157 (2015).

Stölting, D. P., Borrmann, M., Koch, M., Wiese, M., Royer, H.-D. & Bendas, G.  
How liposomal Cisplatin overcomes chemoresistance in ovarian tumour cells.

*Anticancer Res.***34**, 525–530 (2014).

Stölting, D. P., Koch, M., Wiese, M., Royer, H.-D. & Bendas, G.

Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of A2780 ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway.

*Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.***52**, 78–81 (2014).

Stölting, D. P., Jaehde, U., Wiese, M. & Bendas, G.

Are low molecular weight heparins able to sensitize chemoresistant tumor cells?

*Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.***51**, 70–73 (2013).

Koch, M., Krieger, M. L., Stölting, D., Brenner, N., Beier, M., Jaehde, U., Wiese, M., Royer, H.-D. & Bendas, G.

Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling.

*Biochem. Pharmacol.***85**, 1077–1090 (2013).

(\*gleichberechtigte Erstautoren)

**Posterbeiträge**

Stölting, D. P., Borrmann, M. L., Koch, M., Wiese, M., Royer, H.-D., Bendas, G.

How liposomal cisplatin overcomes chemoresistance in ovarian tumour cells.

9<sup>TH</sup> International Conference of Anticancer Research, Porto Carras (Griechenland), Oktober 2014

Pfankuchen, D. B., Stölting, D. P., Krieger, M. L., Royer, H.-D., Bendas, G.

Novel strategies to overcome the cisplatin resistance of tumor cells - Liposomes & LMWH as promising modulators

DPhG Jahrestagung, Frankfurt, September 2014

Pfankuchen, D. B., Stölting, D. P., Bendas, G.

Chemosensitizing effects of low molecular weight heparin on cisplatin-resistant ovarian cancer cells

CESAR Jahrestagung, Bonn, Juni 2014

Stölting, D. P., Koch, M., Pfankuchen, D. B., Royer, H.-D., Bendas, G.

Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway: Molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling

DPhG Jahrestagung, Freiburg, Oktober 2013

Stölting, D. P., Koch, M., Krieger, M. L., Wiese, M., Royer, H.-D., Bendas, G.

Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway: Molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling

CESAR Jahrestagung, Tübingen, Juni 2013

Stölting, D. P., Koch, M., Krieger, M. L., Wiese, M., Royer, H.-D., Bendas, G.

Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway: Molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling

6<sup>TH</sup> Mildred Scheel Cancer Conference, Königswinter, Juni 2013

Stölting, D. P., Jaehde, U., Wiese, M., Bendas, G.

Are low molecular weight heparins able to sensitize chemoresistant tumor cells?

CESAR Jahrestagung, Essen, Juni 2012

Stölting, D. P., Krieger, M. L., Jaehde, U., and Bendas, G.

pH-sensitive cisplatin liposomes as a tool for bypassing chemoresistance in ovarian cancer cells

DPhG Jahrestagung, Braunschweig, Oktober 2010

## **Vorträge**

Stölting, D. P.

Mechanisms of cisplatin chemoresistance – Liposomes as promising modulators

22<sup>ND</sup> Mountain / Sea Liposome Workshop, Ameland (Niederlande), September 2012

Stölting, D. P.

pH-sensitive cisplatin liposomes as a tool for bypassing chemoresistance of ovarian cancer cells

21<sup>ST</sup> Mountain / Sea Liposome Workshop, Oberjoch, März 2011

### 8.3 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerd Bendas für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Besonders hat seine stete Bereitschaft zur Diskussion und Weiterentwicklung meiner Forschung diese Arbeit maßgeblich ermöglicht. Auch für die kurzen Wege und das unkomplizierte Arbeitsklima bedanke ich mich sehr. Es hat mir viel Freude bereitet.

Prof. Dr. Ulrich Jaehde danke ich sehr für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens, außerdem für die hervorragende Zusammenarbeit mit ihm und seinem Arbeitskreis.

Prof. Dr. Alf Lamprecht und Prof. Dr. Albert Haas danke ich für ihre direkte und freundliche Bereitschaft zur Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Dr. Thomas Müller danke ich für die netten Telefonate und Treffen sowie die vielen Mühen, die den kleinen *in vivo*-Ausblick dieser Arbeit ermöglichten. In diesem Zusammenhang danke ich auch Anne-Kathrin Heinrich für die Durchführung der damit verbundenen Versuche und Aufnahme von Fluoreszenzbildern.

PD Dr. Hans-Dieter Royer danke ich für die Durchführung und Auswertung der *gene array*-Analysen. Seine Bereitschaft zum persönlichen Gespräch und sein Engagement für die gemeinsame Forschungsarbeit haben wertvolle Ansätze für die experimentellen Labortätigkeiten dieser Arbeit geliefert.

Bei Prof. Dr. Matthias Kassack bedanke ich mich für das Überlassen der Caov-3-Zelllinien, bei Prof. Dr. Wiese und Martina Lebbing-Neuber für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung der MDR-Transporter.

Michaela Borrmann möchte ich für den reibungslosen Datenaustausch im Bereich unserer aufeinander aufbauenden Themen danken. Auch den anderen alten und neuen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bendas danke ich für das kommunikative und freundschaftliche Miteinander.

Dr. Ralf Mayer danke ich für die gute Ausbildung im Bereich der Ausbildung von Studenten. Seine pragmatische und persönliche Art im Umgang mit seinem Team und den Studenten war sehr bereichernd. In diesem Sinne möchte ich mich auch bei meinen Assistentenkollegen/-innen, die mit mir gemeinsam das Praktikum Arzneimittelanalytik betreut haben, bedanken. Es war stets eine offene und freundliche Atmosphäre.

Bei Dr. Marion Kottwitz bedanke ich mich für die Möglichkeit zu meiner Nebentätigkeit in der Gürzenich-Apotheke in Köln. Die Ausübung des Apothekerberufs hat mir neben der Forschungstätigkeit immer Freude bereitet und die Aufrechterhaltung des Kontaktes zu meinem angestammten Beruf ermöglicht. Auch bei allen Mitgliedern des Apothekenteams, die meine Entwicklung vom Praktischen Jahr an mit Interesse verfolgt haben, danke ich dafür.

Mein sehr persönlicher Dank gilt als Erstes meinen lieben Eltern, Gudrun und Uwe Stölting, die mich, seit ich denken kann, immer unterstützt und ermutigt haben und denen ich auch neben meiner Ausbildung so viel verdanke.

Dies gilt auch für meinen besten Freund Daniel Pfankuchen, der für mich in allen entscheidenden Situationen da war und hoffentlich immer sein wird.

Dr. Corinna Bringmann und David Hirzel danke ich für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit und ihre wertvolle Freundschaft. Außerdem bedanke ich mich bei allen Freunden aus Kinder- und Jugendtagen in Koblenz und dem Studium in Bonn, die mir bis jetzt die Treue gehalten und mich mit ihrer Teilnahme unterstützt haben.