

# **Beteiligung ATP-abhängiger Transportprozesse an der Resistenz gegenüber Platinkomplexen**

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

vorgelegt von  
VERENA SCHNEIDER  
aus  
Koblenz

Bonn 2012

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

Erstgutachter: Prof. Dr. U. Jaehde  
Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Bendas

Tag der Promotion: 12.07.2012

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2012

Die vorliegende Dissertation wurde am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Jaehde angefertigt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Jaehde möchte ich herzlichst für die ausgezeichnete Betreuung der vorliegenden Doktorarbeit danken. Seine uneingeschränkte Diskussionsbereitschaft, immerwährende Unterstützung und konstruktive Kritik haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Insbesondere das mir von Anfang an entgegengebrachte Vertrauen und die mir gewährten Freiräume habe ich sehr zu schätzen gewusst.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Gerd Bendas für das Interesse an meiner Arbeit und die Bereitschaft sich als Gutachter zur Verfügung zu stellen.

Bei Prof. Dr. Alf Lamprecht und PD. Dr. Harald Enzmann möchte ich mich herzlich für ihre Mitwirkung an der Promotionskommission bedanken.

Prof. Dr. Michael Wiese (Pharmazeutische Chemie II, Universität Bonn) danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des Multiwell-Readers LUMIstar™ Optima zur Messung des intrazellulären ATP-Gehalts und der Geräte für die Proteinexpression. Im Speziellen danke ich Patrick Schmitz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Bendas (Pharmazeutische Chemie II, Universität Bonn) für die Einarbeitung in die Techniken der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse sowie seine Hilfsbereitschaft bei Problemen während der praktischen Arbeit.

Prof. Dr. Michael Famulok und seiner Mitarbeiterin Dr. Anke Bill möchte ich dafür danken, dass ich in den Laboren der Chemischen Biologie der Universität Bonn das VersaDoc™ Imaging System 5000 für die Auswertung der Western Blots nutzen durfte.

Bei Dr. Patricia Marqués-Gallego möchte ich mich für die Durchführung der NMR-Messungen am Leiden Institute of Chemistry bedanken.

Dipl.-Pharm. Michaela Borrmann aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerd Bendas danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Etablierung des ATP-Biolumineszenz-Assays.

Dr. Ralf Axel Hilger vom Universitätsklinikum Essen, Friederike Kanefendt und Hauke Rühls danke ich für die großartige Hilfe bezüglich der Berechnung des Kombinationsindexes.

Mein besonderer Dank gilt Carina Mohn und insbesondere Dr. Anya Kalayda für ihre zuverlässige Unterstützung in theoretischen und in praktischen Fragen sowie die sehr gute und erfolgreiche Zusammenarbeit. Der gute und konstruktive Gedankenaustausch hat mich in meiner Arbeit vorangebracht.

Claudia Spanier, deren Masterarbeit im Fach Arzneimittelforschung von mir mitbetreut wurde, danke ich für die überaus engagierte Mitarbeit im Labor und die erfolgreichen Vorversuche zur Charakterisierung des Einflusses von Sorafenib auf die Platinsensitivität, deren Ergebnisse zum Teil in diese Arbeit einbezogen wurden.

Für das gewissenhafte Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift möchte ich nochmals Dr. Anya Kalayda, Carina Mohn und Friederike Kanefendt sowie Navin Sarin danken.

Meinen Kollegen und Freunden im Arbeitskreis Klinische Pharmazie der Universität Bonn danke ich herzlich für die schöne gemeinsame Zeit, die Hilfsbereitschaft in jeglicher Situation und die freundliche Atmosphäre auch über die Arbeit hinaus.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner lieben Familie und meinen guten Freunden für ihre Geduld und ihr Verständnis sowie ihre unermüdliche Unterstützung und ihren Rückhalt bedanken.

Meiner Familie



---

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Platinkomplexe in der antitumoralen Therapie</b>	<b>1</b>
1.1.1 Entwicklung und klinische Relevanz	1
1.1.2 Wirkungsmechanismus	4
1.1.3 Zelluläre Prozesse nach Platin-DNA-Adduktbildung	7
1.1.4 Zelluläre Signalwege nach Platin-DNA-Adduktbildung	11
1.1.5 Resistenzmechanismen	16
<b>1.2 Rolle von ATP in der Zelle</b>	<b>21</b>
1.2.1 Intrazelluläre Bildung von ATP	21
1.2.2 Inhibitoren der intrazellulären ATP-Synthese	24
1.2.3 ATP-abhängige Transportprozesse	26
1.2.4 Bedeutung von ATP für die Platinsensitivität	28
<b>1.3 Tyrosinkinase-Inhibitoren in der antitumoralen Therapie</b>	<b>30</b>
1.3.1 Familie der Tyrosinkinasen	30
1.3.2 Klinisch eingesetzte Substanzen	32
1.3.3 Wirkungsmechanismus	34
1.3.4 Kombination mit Platinkomplexen	36
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>39</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>41</b>
3.1.1 Antikörper	41
3.1.2 Antitumorale Substanzen	41
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	41
3.1.4 Geräte	44
3.1.5 Hergestellte Lösungen und Puffer	47
3.1.6 Software	53
3.1.7 Verbrauchsmaterialien	53
3.1.8 Zelllinien	55

---

<b>3.2 Zellkultur</b>	<b>55</b>
3.2.1 Auftauen der Zellen	55
3.2.2 Lagerung und Kultivierung der Zellen	56
3.2.3 Test auf Mykoplasmenkontamination	57
3.2.4 Bestimmung der Zellzahl	58
<b>3.3 Bestimmung der Zytotoxizität (MTT-Assay)</b>	<b>58</b>
3.3.1 Grundlagen	58
3.3.2 Versuchsbedingungen	59
3.3.3 Bestimmung des $pEC_{50}$ , $EC_{50}$ -Wertes und des Resistenzfaktors	59
3.3.4 Bestimmung der Vitalität der Zellen	60
<b>3.4 Bestimmung des Kombinationsindex</b>	<b>61</b>
3.4.1 Grundlagen	61
3.4.2 Versuchsbedingungen	63
<b>3.5 Proteinbestimmung (BCA-Assay)</b>	<b>64</b>
3.5.1 Grundlagen	65
3.5.2 Versuchsbedingungen	65
<b>3.6 ATP-Biolumineszenz-Assay</b>	<b>67</b>
3.6.1 Grundlagen	67
3.6.2 Optimierung der Methode	68
3.6.3 Validierung der Methode	69
3.6.4 Versuchsbedingungen	71
3.6.5 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts bezogen auf den Proteingehalt	75
3.6.6 Messung der ATP-Kinetik	77
3.6.7 Versuche mit ATP-Depletion	78
3.6.8 Inkubation mit Ouabain oder Sorafenib	80
<b>3.7 Platin-Analytik (Atomabsorptionsspektrometrie)</b>	<b>81</b>
3.7.1 Grundlagen	81
3.7.2 Versuchsbedingungen	81



---

<b>3.8 Zellinkubationsversuche mit Platinkomplexen</b>	<b>83</b>
3.8.1 Konzentrationsabhängiger Influx von Cisplatin	84
3.8.2 Zeitabhängiger Influx von Cisplatin	85
3.8.3 Efflux von Cisplatin	85
3.8.4 Influx von Carboplatin	87
<b>3.9 Genexpression auf Proteinebene</b>	<b>87</b>
3.9.1 Proteinisolierung	88
3.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	88
3.9.3 Western Blot	90
3.9.4 Immunodetektion	90
3.9.5 Auswertung	93
<b>3.10 <sup>195</sup>Pt-NMR-Spektroskopie</b>	<b>93</b>
<b>3.11 Statistische Datenanalyse</b>	<b>93</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>95</b>
<b>4.1 Charakterisierung der Platinsensitivität unter glucosefreien Bedingungen</b>	<b>95</b>
4.1.1 Zytotoxizität von Cisplatin unter glucosefreien Bedingungen	95
4.1.2 Kumulation von Cisplatin unter glucosefreien Bedingungen	96
<b>4.2 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts</b>	<b>98</b>
4.2.1 Optimierung des ATP-Biolumineszenz-Assays	98
4.2.2 Validierung des ATP-Biolumineszenz-Assays	101
4.2.3 Intrazellulärer ATP-Gehalt	104
4.2.4 Intrazellulärer ATP-Gehalt nach Inkubation mit Cisplatin unter glucosehaltigen Bedingungen	105
4.2.5 Intrazellulärer ATP-Gehalt nach Inkubation mit Cisplatin unter glucosefreien Bedingungen	110
4.2.6 Intrazellulärer ATP-Gehalt nach Inkubation mit ATP-Depletoren	112
<b>4.3 Einfluss von intra- und extrazellulärem ATP auf die Platinsensitivität</b>	<b>122</b>
4.3.1 Einfluss von intrazellulärem ATP auf die Platinkumulation	122
4.3.2 Einfluss von extrazellulärem ATP auf die Platinkumulation	124
4.3.3 Chemische Interaktion von Oligomycin und Cisplatin	128
4.3.4 Einfluss von intrazellulärem ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin	129
4.3.5 Einfluss von intrazellulärem ATP auf den Efflux von Cisplatin	131

---

<b>4.4 Einfluss von Ouabain auf die Platinsensitivität</b>	<b>133</b>
4.4.1 Zytotoxizität von Ouabain	134
4.4.2 Einfluss von Ouabain auf die Platinkumulation	134
4.4.3 Einfluss von Ouabain auf den intrazellulären ATP-Gehalt	140
4.4.4 Einfluss von Ouabain auf die Zytotoxizität von Cisplatin	142
4.4.5 Proteinexpression der Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha_1$	143
<b>4.5 Vergleich des intrazellulären Platingehalts unter Einfluss von Oligomycin und Ouabain</b>	<b>146</b>
<b>4.6 Einfluss von Sorafenib auf die Platinsensitivität</b>	<b>147</b>
4.6.1 Zytotoxizität von Sorafenib	147
4.6.2 Kombination mit Cisplatin	148
4.6.3 Einfluss von Sorafenib auf den intrazellulären ATP-Gehalt	158
4.6.4 Kombination mit Carboplatin	162
<b>5. Diskussion</b>	<b>169</b>
<b>5.1 Optimierung und Teilvalidierung der Methode</b>	<b>169</b>
<b>5.2 Bedeutung von intra- und extrazellulärem ATP für die Platinsensitivität</b>	<b>172</b>
5.2.1 Intrazellulärer ATP-Gehalt	172
5.2.2 Einfluss der ATP-Depletion	175
5.2.3 Einfluss von extrazellulärem ATP	177
<b>5.3 Bedeutung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase für die Platinsensitivität</b>	<b>178</b>
<b>5.4 Bedeutung der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade für die Platinsensitivität</b>	<b>182</b>
<b>5.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse</b>	<b>191</b>
<b>5.6 Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>193</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>195</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>197</b>
<b>Appendix</b>	<b>219</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	= Proteinkinase B (PKB)
AL	Arbeitslösung
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
AP1	Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein 1
Apaf-1	Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP7A	Adenosintriphosphat Alpha-Polypeptid
ATP7B	Adenosintriphosphat Beta-Polypeptid
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and rad-3-related</i>
A2780	Ovarialkarzinomzelllinie
A2780cis	Cisplatinresistente Ovarialkarzinomzelllinie
Bad	<i>Bcl (b-cell lymphoma)-X<sub>L</sub>/Bcl-2 associated death protein</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated x-protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>bicinchoninic acid</i> )
Bcl-X <sub>L</sub>	<i>Bcl-2-like</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcr-Abl	<i>Breakpoint cluster region-cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homologue 1</i>
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
β-Actin	Beta-Actin

---

BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration einer Substanz
c-Abl	<i>Cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homologue 1</i>
Caspase	<i>CysteinyI aspartate-specific proteinase</i>
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CDDP	Cis-Platin(II)-diammin-dichlorid
CI	Kombinationsindex ( <i>combination index</i> )
c-Kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CTR1	Kupfertransporter 1 ( <i>copper transporter 1</i> )
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	D,L-Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EC <sub>50</sub>	Effektive Konzentration (Erklärung s. 3.3.3)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF/R	Epidermaler Wachstumsfaktor/-Rezeptor ( <i>epidermal growth factor/receptor</i> )
ERCC1	<i>Excision repair cross-complementing-1</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
ETC	Elektronentransportkette ( <i>electron transport chain</i> )
FAD <sup>+</sup> /FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
Fas	<i>Fibroblast associated</i>
FasL	Fas-Ligand

---

FDA	<i>Food and drug administration</i>
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
Flt-3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
g	Gravitationsbeschleunigung
G	Guanosin
GIST	Gastrointestinaler Stroma-Tumor
Gl.	Gleichung
GNG	Guanosin-Nukleosid-Guanosin
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
Grb 2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTA	<i>Graphite tube atomizer</i>
HER2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HMG	<i>High-mobility-group</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IC <sub>50</sub>	Inhibitorische Konzentration (Erklärung s. 3.8.1)
IQR	Interquartilsabstand ( <i>interquartile range</i> )
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LLOQ	<i>Lower limit of quantification</i>
LRP	<i>Lung resistance related protein</i>
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase

---

MAPKAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	Mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
MDR1	<i>Multi drug resistance protein 1</i> (= P-Gp)
MEK	<i>Extracellular-signal regulated kinase kinase</i>
MKP 1	MAPK Phosphatase 1
MMR	Mismatch-Reparatur
MRP1	MDR-assoziiertes Protein 1
MRP2	MDR-assoziiertes Protein 2
MSH	MutS homolog
MT	Metallothionein
mtDNA	Mitochondriale DNA
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTP	Mitochondriales Transmembranpotential
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NAD <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH/H <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
n	Stichprobengröße
n.b.	Nicht bestimmt
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NKCC	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> ,2Cl <sup>-</sup> -Kotransporter
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NRTK	Non-Rezeptor-Tyrosinkinase

---

n.s.	Nicht signifikant
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
n.v.	Nicht verfügbar
OAT	Organischer Anionen-Transporter
OCT1 – 3	Organischer Kationen-Transporter 1 – 3
p	p-Wert; Irrtumswahrscheinlichkeit
PAK	p21-aktivierte Kinase
PAP	Probenauftragspuffer
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCA	Perchlorsäure ( <i>perchloric acid</i> )
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF/R	Plättchenstimulierender Wachstumsfaktor/ -Rezeptor ( <i>platelet-derived growth factor/receptor</i> )
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PE	Polyethylen
P-Gp	P-Glykoprotein (s. auch MDR1)
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PKB	Proteinkinase B (s. auch Akt)
PKC	Proteinkinase C
PP	Polypropylen
P-S	Penicillin-Streptomycin
Pt	Platin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p21	Protein 21: cyclinabhängiger Kinase-Inhibitor
p53	Protein 53: Tumorsuppressorprotein 53
p73	Protein 73: Tumorsuppressorprotein 73

QC	Qualitätskontrolle ( <i>quality control</i> )
r	Korrelationskoeffizient
Raf	<i>Rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RE	Relativer Fehler
Ret	<i>Rearranged during transfection</i>
RLU	Relative Lichteinheit ( <i>relative light unit</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPA	<i>Replication protein A</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSD	Relative Standardabweichung
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S	Standardlösung
SAPK	Stressaktivierte Proteinkinase
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SE	Standardfehler ( <i>standard error</i> )
Shc	<i>Src homology collagen</i>
SL	Stammlösung
SLC	<i>Solute carrier</i>
SOC	Speicherabhängige Calcium-Kanäle ( <i>store-operated Ca<sup>2+</sup>-channels</i> )
SOP	Standardarbeitsanweisung ( <i>standard operating procedure</i> )
SOS	<i>Son of sevenless</i>
Src	<i>Sarcoma</i>
s.u.	Siehe unten



---

Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>tris-buffered saline</i> )
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit TWEEN®-20
TCA	Trichloressigsäure ( <i>trichloroacetic acid</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor II H
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton	Triton® X-100
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u.a.	Unter anderem
ULOQ	<i>Upper limit of quantification</i>
VEGF/R	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor/ -Rezeptor ( <i>vascular endothelial growth factor/receptor</i> )
VSOR	<i>Volume-sensitive outwardly-rectifying</i>
W	Wiederfindung
WK	Wachstumskontrolle
Xiap	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
XPA,C,D,F,G	<i>Xeroderma pigmentosum group A,C,D,F,G</i>



# 1. Einleitung

## 1.1 Platinkomplexe in der antitumoralen Therapie

### 1.1.1 Entwicklung und klinische Relevanz

In der heutigen Zeit sind Platinkomplexe immer noch ein fester Bestandteil der Therapie vieler Tumorerkrankungen [1]. Der erste Vertreter dieser Substanzgruppe ist Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin (II), CDDP, s. Abb. 1.1). Bereits kurze Zeit nach der Entdeckung der antitumoralen Eigenschaften dieser Platinverbindung durch B. Rosenberg Ende der sechziger Jahre [2] erfolgte die Zulassung von Cisplatin zur Therapie des Hoden- und Blasenkarzinoms in den Vereinigten Staaten von Amerika durch die FDA (*food and drug administration*).

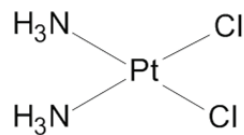


Abb. 1.1: Chemische Struktur von Cisplatin.

Inzwischen gehört Cisplatin zu den effektivsten und häufig verwendeten chemotherapeutischen Substanzen und wird in Verbindung mit anderen Zytostatika unter anderem zur Therapie des Hoden-, Ovarial-, Zervix- und Bronchialkarzinoms, sowie Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs verwendet [3-6]. Der klinische Einsatz wird jedoch durch häufig auftretende, zum Teil schwerwiegende unerwünschte Arzneimittelwirkungen begrenzt. Dazu zählen Emesis, Oto-, Nephro- und Neurotoxizität [6,7]. Während durch eine intensive Hydratationstherapie das Risiko einer Nephrotoxizität reduziert und durch eine antiemetische Prophylaxe entsprechend den evidenzbasierten Leitlinien die Emesis vermieden werden kann [8,9], so zeigen Ergebnisse eines aktuellen Cochrane Reviews, dass bislang keine effektiven Behandlungsstrategien für die Prävention oder Begrenzung der Neurotoxizität existieren [10]. Aus diesem Grund führt diese unerwünschte Wirkung zur Dosislimitation von Cisplatin. Darüber hinaus stellt die zunehmende Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegenüber dieser Platinverbindung während der Therapie ein klinisches Problem dar [11]. Die in der Literatur diskutierten Resistenzmechanismen werden ausführlich in Kapitel 1.1.5 vorgestellt. Die Entstehung einer Resistenz ist die Hauptursache für Therapieversagen oder Mortalität von Patientinnen mit Ovarial-

karzinom. Während die Ansprechrate nach chirurgischer Tumorentfernung auf eine platinbasierte „First-Line Chemotherapie“ (bestehend aus Cisplatin/Carboplatin in Kombination mit Paclitaxel) bei 75 % liegt [12], beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom nur noch 15 – 30 % [13]. Die hohe Mortalität ist einerseits durch eine rasche Tumorprogression zu erklären; die mediane Zeit bis zur Progression beträgt lediglich 18 Monate [13]. Zum anderen ist diese bedingt durch die Resistenzentwicklung der Tumorzellen im Anschluss an die platinhaltige Chemotherapie. Ein Tumor der Ovarien wird als platinresistent klassifiziert, wenn ein Rezidiv innerhalb von sechs Monaten nach Abschluss der Primärtherapie auftritt [14]. Fast alle Patientinnen im fortgeschrittenen Tumorstadium erleiden trotz adjuvanter Chemotherapie ein Rezidiv, wobei mit jedem Rezidiv die Ansprechrate sinkt und die Mortalität steigt [15].

Die Entwicklung einer Cisplatinresistenz und die dosislimitierende Neurotoxizität führten zu der Entwicklung weiterer Platinkomplexe mit geringerer Toxizität und gleichbleibender antitumoraler Wirksamkeit. Ein Vertreter dieser zweiten Generation mit einem günstigeren Nebenwirkungsprofil ist Carboplatin (cis-Diammin(1,1-cyclobutandicarboxylato)platin(II)), s. Abb. 1.2).

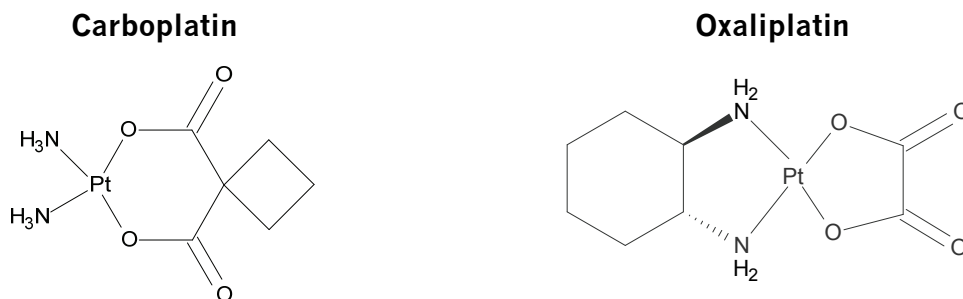


Abb. 1.2: Chemische Struktur von Carboplatin und Oxaliplatin.

Aufgrund der stabileren Cyclobutandicarboxylato-Abgangsgruppe weist Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin eine geringere Reaktivität auf. Dadurch bedingt sind 20- bis 40-fach höhere Konzentrationen von Carboplatin notwendig, um eine äquivalente Menge Platin-DNA-Addukte zu bilden [5]. Trotz der dadurch benötigten höheren Dosen zeigt Carboplatin eine geringer ausgeprägte Nephro- und Neurotoxizität [7,16]. Als dosislimitierende Toxizität ist hier die Myelosuppression anzusehen [16,17]. Die vergleichsweise geringere Toxizität und entsprechende antitumorale Aktivität führte schnell dazu, dass in vielen platinbasierten Therapieregimen Cisplatin durch Carboplatin ersetzt wurde. In Kombination mit Paclitaxel ist Carboplatin das Mittel der

ersten Wahl („First-Line“) zur Therapie des fortgeschrittenen epithelialen Ovarialkarzinoms [3,14]. Verschiedene randomisierte klinische Studien an Ovarialkarzinompatientinnen konnten vergleichbare Überlebensraten für Cisplatin und Carboplatin zeigen [18,19]. Darüber hinaus wird Carboplatin auch zur Behandlung des Bronchial- und Zervixkarzinoms sowie Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs eingesetzt [16,20]. Der Therapieerfolg wird jedoch ebenfalls durch das Auftreten von Resistenz begrenzt. Zudem weist Carboplatin eine Kreuzresistenz zu Cisplatin auf [21]. Aufgrund der hohen initialen Tumoransprechrates ist Carboplatin dennoch derzeitiger Goldstandard in der Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms [22].

Ein weiterer Fortschritt war die Entwicklung von Oxaliplatin ( $[(1R,2R)\text{-}1,2\text{-Cyclohexandiamin-N,N'}[\text{oxalato}(2\text{-})\text{-O,O'}]\text{platin(II)}]$ ), s. Abb. 1.2). Diese Substanz (der dritten Generation) zeichnet sich durch ein abweichendes Wirkungsspektrum und Toxizitätsprofil, d.h. geringer ausgeprägte Nephrotoxizität und Myelosuppression, aus [23]. Sogar in cisplatin- und carboplatinresistenten Tumorzellen zeigte Oxaliplatin anti-tumorale Aktivität [23-25]. Stordal et al. konnten jedoch zeigen, dass cisplatinresistente Tumorzellen zu einem geringen Teil auch resistent gegen Oxaliplatin sind [26]. Die Anwendung von Oxaliplatin in Kombination mit Gemcitabin bei therapierefraktärem Ovarialkarzinom wird derzeit in klinischen Studien getestet [27]. Klinisch wird dieser Platinkomplex in Kombination mit Fluorouracil und Folat (Therapieschema: FOLFOX) zur Therapie des Kolonkarzinoms und metastasierenden Kolorektalkarzinoms eingesetzt [28]. Jedoch ist der limitierende Faktor in der Therapie mit Oxaliplatin die sensorische und motorische Neurotoxizität [4,7,28,28]. Auch eine Resistenzentwicklung der Tumorzellen unter Therapie mit Oxaliplatin wurde berichtet [29].

Die Entwicklung neuer Platinkomplexe wurde daher in den letzten Jahren fortgesetzt, um das Aktivitätsspektrum zu erweitern, die Toxizität zu reduzieren und/oder die zelluläre Resistenz zu umgehen [30]. Klinische Studien der Phase I – III mit neuen Platinkomplexen zeigten jedoch keine signifikanten Vorteile hinsichtlich des Therapieansprechens und der Überlebensrate im Vergleich zu der Therapie mit etablierten Platinkomplexen [4,30].

Aktuell sind in Deutschland die Platinkomplexe Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin zur Therapie verschiedener maligner Tumore zugelassen. Aufgrund der guten anti-tumoralen Wirksamkeit und des breiten Anwendungsbereichs kommt dabei Cisplatin eine große Bedeutung zu. Trotz der langjährigen Erfahrung mit Cisplatin sind die für die Toxizität und Resistenzentstehung verantwortlichen Mechanismen noch nicht

vollständig geklärt [31]. Zudem stimmten die *in vitro* gefundenen Resistenzmechanismen nur teilweise mit den in der klinischen Praxis beobachteten überein [13]. Die weitere Aufklärung der molekularen Resistenz- und Toxizitätsmechanismen *in vitro* und *in vivo* stellt einen entscheidenden Schritt zu einer effektiveren und sicheren Tumorthherapie dar und kann dazu beitragen, pharmakologische Strategien zur Prävention oder Überwindung einer Platinresistenz zu entwickeln. Mit der Kenntnis der zugrundeliegenden Resistenzmechanismen könnten zielgerichtete Therapeutika in Kombination mit Platinkomplexen eingesetzt werden, um die Platinresistenz zu überwinden. In den letzten Jahren wurde insbesondere die Kombination der Tyrosinkinase-Inhibitoren mit Platinverbindungen im Rahmen klinischer Studien getestet (s. Kap. 1.3.4).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf Cisplatin, weshalb im Folgenden die Wirkungs- und Resistenzmechanismen, sowie die zellulären Prozesse und Signalwege nach DNA-Platinierung von Cisplatin im Detail erläutert werden. Da ein Teil der Versuche dieser Arbeit auch mit Carboplatin durchgeführt wurde, wird auf Unterschiede zwischen Cisplatin und Carboplatin an entsprechender Stelle hingewiesen.

## **1.1.2 Wirkungsmechanismus**

### **1.1.2.1 Bioaktivierung**

Cisplatin muss vor der intrazellulären Bindung an die Zielstruktur, die DNA, über die Bildung von reaktiven Aqua-Platinkomplexen aktiviert werden. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Aktivierung sind dabei abhängig von der Chloridkonzentration der Umgebung. Nach intravenöser Applikation zeigt Cisplatin aufgrund des hohen extrazellulären Chloridionengehalts ( $\sim 100$  mM) eine relativ geringe Reaktivität [1]. Dennoch liegt Cisplatin im Plasma zum großen Teil gebunden an Serumproteine (z.B. Albumin) vor. Diese Bindung führt zusätzlich zu einer Inaktivierung des Platinkomplexes [30]. Nach der Aufnahme von Cisplatin in die Zelle (s. Kap. 1.1.5.1) erfolgt der Ligandenaustausch aufgrund der niedrigeren intrazellulären Chloridkonzentration ( $\sim 4 - 20$  mM) [1]. Durch raschen Austausch der Chlorid-Liganden durch Aqua-Liganden entstehen reaktive, positiv geladene und neutrale Mono- und Diaqua-Platinkomplexe, sowie Hydroxokomplexe (s. Abb. 1.3). Diese können nukleophile Substrate binden, sodass Platin-Addukte entstehen. Die Reaktivität der Aqua-Platinkomplexe wird durch einen niedrigen intrazellulären pH-Wert begünstigt [32].

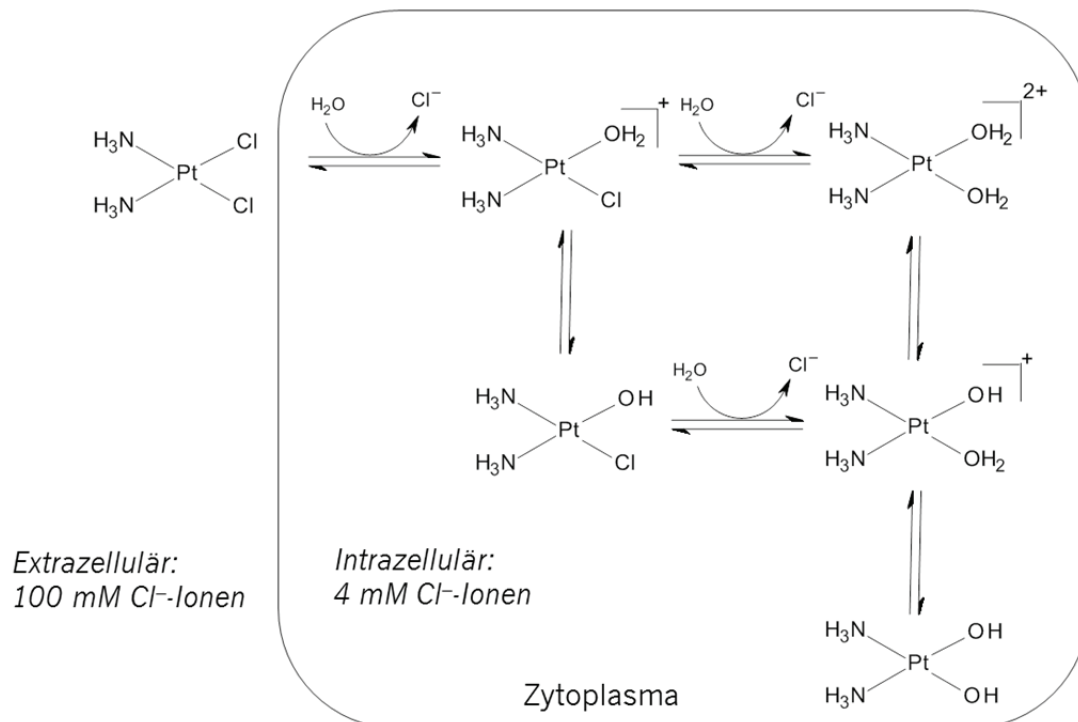


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Bioaktivierung von Cisplatin (modifiziert nach [33]).

Bevorzugte Bindungspartner sind neben der DNA und RNA, Glutathion (GSH), Metallothioneine (MT), Membranphospholipide, Mikrofilamente sowie weitere methionin- und cysteinhaltige Proteine [34]. Die Bindung an GSH und MT trägt wesentlich zur Inaktivierung von Cisplatin in der Zelle bei. Insgesamt gelangt nur 1 % des intrazellulären Platins in den Zellkern und führt dort über die Platinierung der DNA zu einer zytotoxischen Wirkung [24,33].

An dieser Stelle soll kurz erwähnt werden, dass Jennerwein et al. den intrazellulären Chloridgehalt in verschiedenen Tumorzelllinien untersucht haben [35]. Interessanterweise ist dieser in Tumorzellen höher und liegt in einem Bereich von 20 – 55 mM. Salerno et al. stellten zudem eine Verbindung zwischen der intrazellulären Chloridkonzentration und der Cisplatinresistenz her [36]. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte intrazelluläre Chloridkonzentration zu einer verringerten Platinaufnahme führt.

Die Bioaktivierung von Carboplatin verläuft deutlich langsamer. Als hierfür entscheidender Schritt wird der Austausch der Cyclobutandicarboxylato-Abgangsgruppe gesehen. Des Weiteren wird eine Aktivierung durch L-Methionin diskutiert [33].

### 1.1.2.2 Bindung an die DNA

Bevorzugter Angriffspunkt an die DNA ist die N7-Position der Purinbasen Guanin und Adenin aufgrund der hohen Nukleophilie des Imidazolrings. Des Weiteren ist auch eine Reaktion mit dem Stickstoffatom N1 von Adenin oder N3 von Cytosin möglich [37]. Die Bindung von Cisplatin an die DNA führt zur Bildung von DNA-Quervernetzungen (sog. *crosslinks*). Es entstehen DNA-Protein-Addukte, monofunktionale DNA-Addukte und bifunktionale DNA-Addukte (s. Abb. 1.4) [7,38].

Am häufigsten werden Addukte zwischen zwei auf einem Strang benachbarten Guanin-Basen gebildet (*1,2-intrastrand crosslink*; GG: 60 – 65 %). Zu einem geringeren Anteil treten weitere *1,2-* und *1,3-intrastrand crosslinks* (GA: 20 – 25 %; GNG: 2 %) oder Quervernetzungen zwischen zwei DNA-Strängen (*interstrand crosslink*; GG: 2 %) auf. Monoaddukte entstehen durch Bindung eines Mono-Aqua-Platinkomplexes an Guanin (2 %). Allerdings bilden > 90 % der Monoaddukte in einem weiteren Reaktionsschritt *intra-* oder *interstrand crosslinks* aus [5,7]. Für den zytotoxischen Effekt von Cisplatin werden insbesondere die *1,2-GG-intrastrand crosslinks* verantwortlich gemacht [31,39].

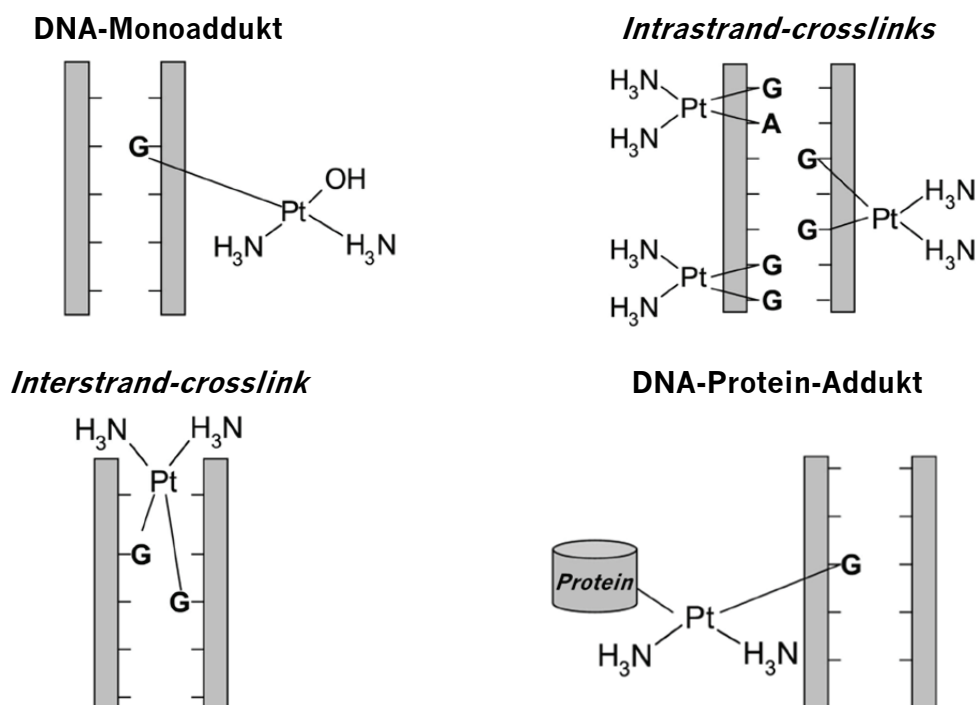


Abb. 1.4: Übersicht der möglichen DNA-Addukte von Cisplatin (modifiziert nach [7]). A: Adenosin, G: Guanosin.

Während die Bindung von Cisplatin an die nukleäre DNA bereits ausführlich in der Literatur beschrieben wurde, so ist bisher wenig über die Rolle der mitochondrialen



DNA (mtDNA) bekannt. Es wurde vielfach berichtet, dass Cisplatin auch an die mtDNA bindet [40-43]. Die Bedeutung der Platinierung der mtDNA für die Platinsensitivität wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert [44,45].

Carboplatin bildet die gleichen Platin-DNA-Addukte wie Cisplatin, wobei höhere Konzentrationen benötigt werden, um den gleichen Platinierungsgrad zu erreichen [5]. Weitere Unterschiede bestehen in der Reaktionsgeschwindigkeit der Adduktbildung (für Carboplatin um den Faktor 10 geringer) und der prozentualen Verteilung der gebildeten Platin-DNA-Addukte [46].

### **1.1.3 Zelluläre Prozesse nach Platin-DNA-Adduktbildung**

Die Bildung von Platin-DNA-Addukten (insbesondere *1,2-GG-intrastrand-crosslinks*) führt zu einer strukturellen Schädigung und Konformationsänderung der DNA-Doppelhelix, wodurch verschiedene zelluläre Prozesse ausgelöst werden. Neben der Inhibition der DNA-Synthese und der Transkription kommt es im weiteren Verlauf zu einem Zellzyklusarrest bzw. zur Apoptose. Diese Prozesse spielen eine entscheidende Rolle für die zytotoxische Wirkung von Cisplatin, aber auch für die Resistenzentwicklung.

#### **1.1.3.1 *Replication bypass* und Hemmung der DNA-Synthese**

Bedingt durch die cisplatininduzierte Änderung der helikalen DNA-Struktur, können sich DNA-Polymerasen nicht mehr an die DNA-Läsion anlagern. Infolgedessen wird die DNA-Synthese im Zellkern gehemmt [24]. Dennoch sind manche DNA-Polymerasen in der Lage, Platin-DNA-Addukte zu übergehen und trotz des Schadens neue DNA zu synthetisieren. Diesen Prozess bezeichnet man als transläsionale DNA-Synthese oder auch *replication bypass*. Dies ermöglicht den Zellen das Durchlaufen der S-Phase des Zellzyklus (DNA-Replikation) [11,47]. Hierbei werden zufällig Nukleotide gegenüber dem platinieren Nukleotid eingebaut. Folglich kommt es in dem neuen DNA-Strang zu einer Basenfehlpaarung (*mismatch*), die von Proteinen des Mismatch-Reparatur (MMR)-Systems erkannt und repariert werden kann (s. Kap. 1.1.3.4).

### 1.1.3.2 Erkennen von DNA-Schäden

Schädigungen der DNA durch Cisplatin können durch verschiedene zelluläre Proteine (*damage recognition*-Proteine) erkannt werden. Die spezifische Bindung dieser Proteine an die gebildeten Platin-DNA-Addukte führt zu Signalen, die entweder zur Reparatur der geschädigten DNA oder zur Apoptose führen [24,34]. Zu diesen Proteinen zählen neben den Reparaturproteinen (s. Kap. 1.1.3.4), Transkriptionsfaktoren, Histonen und Proteinkinasen (ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia and rad3-related*)) auch die Klasse der *high-mobility-group* (HMG)-Proteine. Letztere leisten einen entscheidenden Beitrag zur Vermittlung des zytotoxischen Effektes von Cisplatin. Durch die Bindung verschiedener HMG-Proteine an die Platin-DNA-Addukte werden verschiedene Mechanismen induziert. Ein Mechanismus ist die Hemmung der über das Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)-System vermittelten Reparatur der Platin-DNA-Addukte [7,11]. Zudem sind viele HMG-Proteine Transkriptionsfaktoren und besitzen teilweise eine höhere Affinität zu den Platin-DNA-Addukten als zu ihrer natürlichen Bindungsstelle, dem Promotor bzw. Suppressor. Die Folge der Bindung der Proteine an diese Addukte ist die Hemmung der DNA-Transkription („*transcription factor hijacking*“) [24,47,48].

### 1.1.3.3 Zellzyklusarrest

Nach der Erkennung des cisplatininduzierten DNA-Schadens können die Proteinkinasen ATM und ATR durch Aktivierung und Phosphorylierung weiterer Proteine einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase auslösen. Eine Arretierung des Zellzyklus ermöglicht es der Zelle, die entstandenen DNA-Schäden zu reparieren. Im Gegensatz dazu kann dieser Arrest auch ein Signal der Apoptose nach Cisplatinexposition induzieren [24].

### 1.1.3.4 DNA-Reparatur

Wie bereits erwähnt können verschiedene Reparaturproteine Platin-DNA-Addukte erkennen und an diese binden. Dadurch werden verschiedene Reparaturprozesse eingeleitet. Insgesamt sind fünf DNA-Reparatursysteme bekannt, wobei die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) als wichtigstes Reparatursystem für cisplatininduzierte DNA-Schäden angesehen wird [24,31,34]. Diese umfasst mehrere Schritte, die zum Teil ATP-abhängig sind (s. Abb. 1.5) [48]. Nach Erkennung der geschädigten DNA durch verschiedene Reparaturproteine und Zusammensetzung eines Reparaturkomplexes,

wird das entsprechende DNA-Fragment durch Endonukleasen sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende der DNA-Läsion herausgeschnitten. Nach Entfernen des geschädigten DNA-Fragments ersetzen DNA-Polymerasen den fehlenden Bereich durch Neusynthese der DNA, indem sie den unbeschädigten komplementären Strang als Vorlage nutzen. Anschließend erfolgt die Ligation des synthetisierten Abschnitts durch DNA-Ligasen [48].

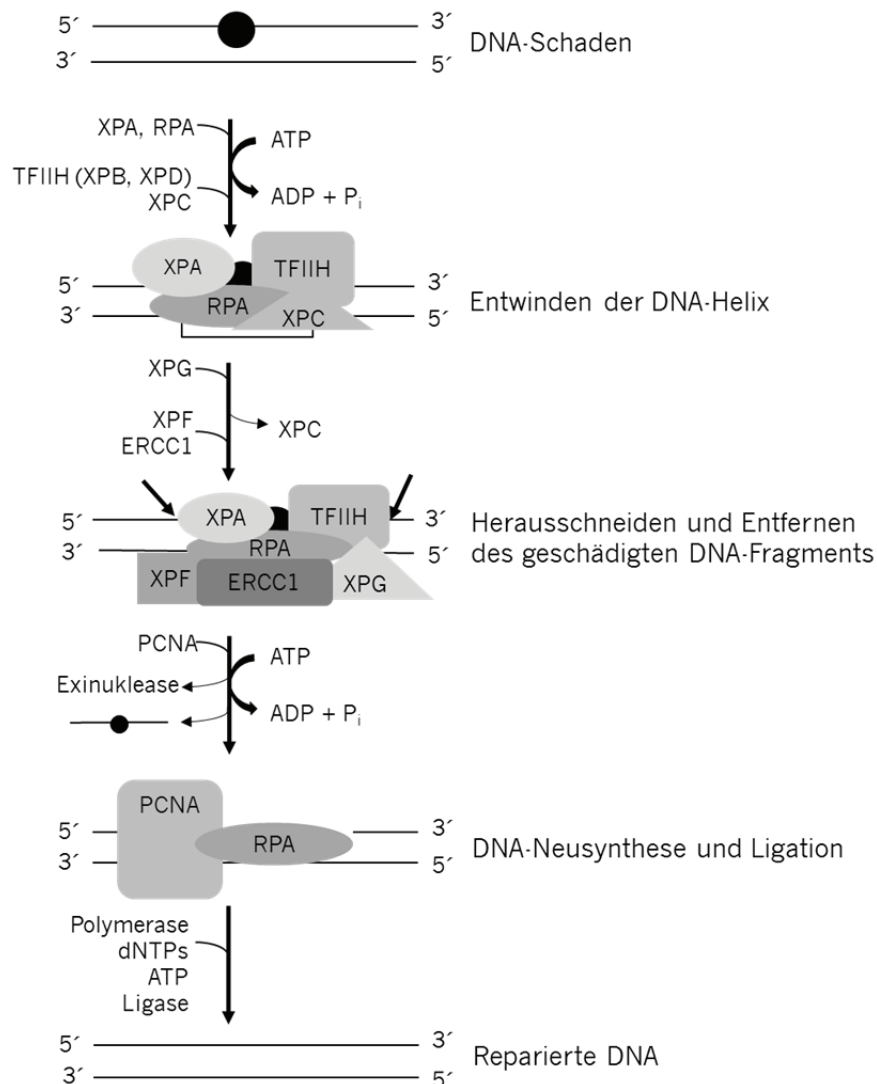


Abb. 1.5: Vereinfachte Darstellung der ATP-abhängigen Schritte der Nukleotid-Exzisionsreparatur (modifiziert nach [48]). dNTP: Desoxy-Nukleotidtriphosphat, ERCC1: Excision repair cross-complementing-1, PCNA: Proliferating cell nuclear antigen, RPA: Replication protein A, TFIIH: Transkriptionsfaktor II H, XPA-XPG: Xeroderma pigmentosum group A – G.

Das postreplikative MMR-System, welches ebenfalls an der Erkennung von Platin-DNA-Addukten beteiligt ist, ist essentiell für die zytotoxische Wirkung von Cisplatin [7,49]. MMR-Proteine (z.B. MSH (MutS homolog) 2) erkennen und reparieren

Mismatch-Paarungen sowie andere DNA-Schäden (Baseninsertionen, -deletionen), die im neu synthetisierten Strang während der DNA-Replikation auftreten [34,50]. Auch dieser Reparaturprozess besteht aus mehreren teilweise ATP-abhängigen Schritten [51-53]. Nach Erkennen der schadhafte Stelle und nachfolgender Bindung der MMR-Proteine an die Basenfehlpaarung, wird das neue gegenüberliegende DNA-Fragment herausgeschnitten, während das Platin-DNA-Addukt auf dem codogenen DNA-Fragment erhalten bleibt. Neue DNA wird synthetisiert, wobei der geschädigte DNA-Strang als Matrize dient (s. Kap. 1.1.3.1, „*Replication bypass*“). Es erfolgt erneut eine Basenfehlpaarung und der gesamte Prozess beginnt von vorne (Modell der „nutzlosen Reparatur“ nach Goldmacher) [47].

Über die Zeit führen diese nutzlosen Reparaturversuche und die nachfolgende DNA-Synthese zu der Bildung von DNA-Lücken und Strangbrüchen, die letztendlich zur Apoptose der Zelle führen. Zusätzlich bewirkt die Bindung der MMR-Proteine an die Platin-DNA-Addukte eine Aktivierung verschiedener Signalwege, die ebenfalls in der Apoptose enden [24]. Des Weiteren wird auch die Anlagerung des NER-Systems behindert [34]. Ein Defekt dieses MMR-Systems wird in Verbindung mit der Resistenz gegenüber Platinverbindungen gebracht [34].

### **1.1.3.5 Apoptose und Nekrose**

Ist das Ausmaß des cisplatininduzierten DNA-Schadens so groß, dass dieser nicht repariert werden kann, wird über verschiedene Wege die Apoptose und/oder Nekrose eingeleitet. Die Art des Zelltodes ist abhängig von der Cisplatinkonzentration [41]. Der nekrotische Zelltod findet nach erheblicher DNA-Schädigung statt und induziert eine Hyperaktivierung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) [54]. PARP verursacht die Depletion von NAD<sup>+</sup> (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid) und ATP, welches die Nekrose auslöst [24]. Die Inhibition von PARP führt zu einer Verstärkung der DNA-schädigenden Wirkung von Cisplatin [55]. An der Induktion der Apoptose sind mehrere Mechanismen beteiligt. Die Apoptose kann sowohl extrinsisch rezeptorvermittelt über das Fas (*fibroblast associated*)/Fas-Ligand (FasL)-System als auch intrinsisch unter Beteiligung der Mitochondrien induziert werden [11].

Der Fas/FasL-Signalweg ist unabhängig von den Mitochondrien und induziert über eine Aktivierung der Caspase (*cysteiny aspartate-specific proteinase*) 8/Caspase 3-Kaskade die Apoptose. Die Beteiligung dieses Apoptoseweges an der Zytotoxizität von Cisplatin wurde bereits in der Literatur beschrieben [56].

Eine zentrale Rolle in der cisplatininduzierten intrinsischen Apoptose spielt das Tumorsuppressorprotein p53, welches durch verschiedene Signalwege (z.B. MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase)) phosphoryliert und aktiviert werden kann. Vermutlich beteiligte Signaltransduktionswege werden in Kap. 1.1.4 näher erläutert. Abhängig vom Ausmaß des DNA-Schadens führt p53 entweder zum Überleben der Zelle oder zur Apoptose. Letztere ist mitochondrienabhängig und beginnt mit der Umverteilung von cisplatininduziertem Bax (*Bcl (b-cell lymphoma)-2 associated x-protein*) aus dem Zytosol in die Mitochondrien. Dieser Prozess führt zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran, welche von einem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials begleitet wird, und resultiert in der Freisetzung des proapoptotischen Cytochrom-c in das Zytosol der Zelle. In Anwesenheit von Cytochrom-c und ATP aktiviert Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) die Caspase 9 und nachfolgend die Caspase 3 [41]. Dieser Ablauf von Ereignissen führt zur Induktion der Apoptose [34,57].

Ein weiterer intrinsischer Apoptoseweg verläuft über das p53-verwandte Gen p73 [58]. Diese p73-induzierte Apoptose ist zudem abhängig von der Funktion des MMR-Systems [34].

#### **1.1.4 Zelluläre Signalwege nach Platin-DNA-Adduktbildung**

Wie bereits erwähnt, sind viele verschiedene *damage recognition*-Proteine in der Lage Platin-DNA-Addukte zu erkennen. Dies resultiert in einer Aktivierung mehrerer Signalkaskaden und führt schließlich zum Überleben oder zur Apoptose der Zelle [34]. Diskutiert werden verschiedene Signalwege, die auch vielfältig miteinander in Verbindung stehen (s. Abb. 1.6). Insbesondere kommt den Signalwegen der Akt (auch Proteinkinase B (PKB) genannt), der *c-Abl (cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homologue 1)* und der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) eine entscheidende Bedeutung zu [24,59]. Die Rolle dieser Signalwege in der Vermittlung der zytotoxischen Effekte von Cisplatin und deren Kommunikation untereinander ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [24,34].

Seit mehreren Jahren besteht ein zunehmendes Interesse an der cisplatinvermittelten Aktivierung der Signalwege der mitogenaktivierten Proteinkinasen. Die Bedeutung der MAP-Kinasen als Regulatoren der zellulären Antwort auf Cisplatin wird im nächsten Kapitel (s. 1.1.4.1) ausführlicher beschrieben. Da die anderen beteiligten Signalwege

nicht im Fokus dieser Arbeit stehen, werden deren Bedeutung in der Apoptose-Induktion nachfolgend nur kurz erläutert.

Ein möglicherweise durch Cisplatin ausgelöster Signalweg erfolgt über die Aktivierung der nukleären c-Abl-Tyrosinkinase [49]. Diese Kinase wiederum aktiviert und phosphoryliert das p53-verwandte Gen p73, welches die Apoptose induziert [58].

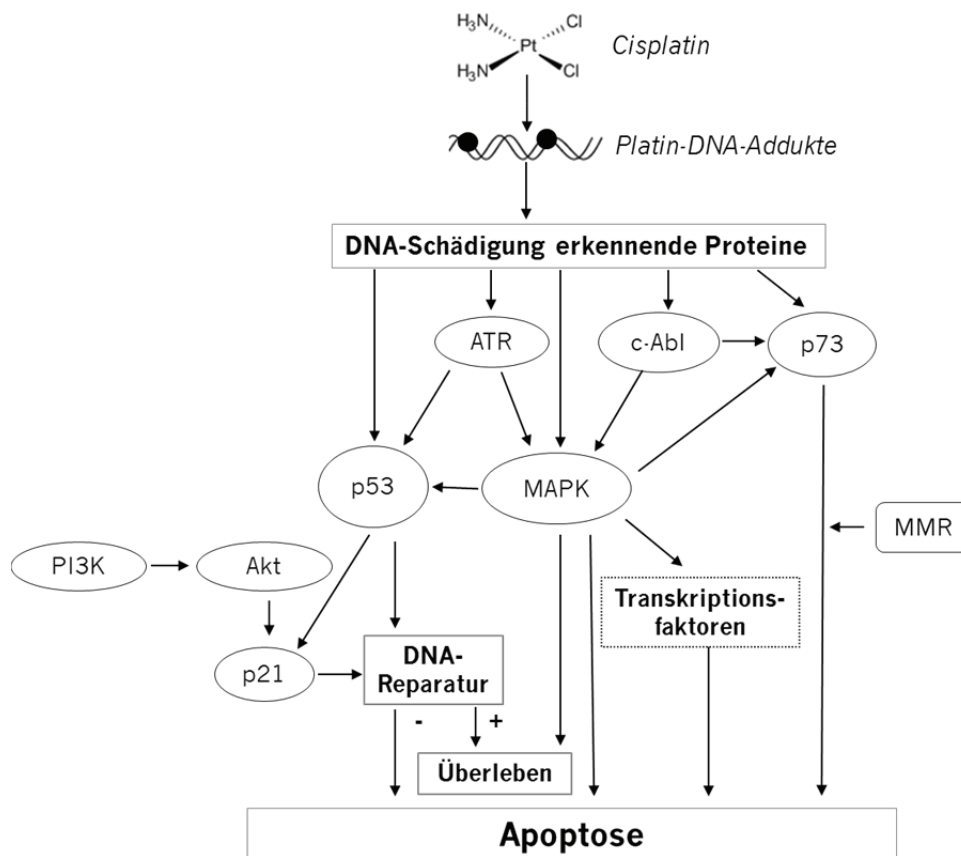


Abb. 1.6: Vereinfachte Übersicht der cisplatininduzierten Signalwege (modifiziert nach [34]).

Der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)/Akt/mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-Signalweg hat eine antiapoptotische Funktion und schützt die Zelle vor der cisplatininduzierten Apoptose [24]. Die Serin/Threonin-Kinase Akt hemmt den apoptotischen Weg durch Phosphorylierung und Modulierung verschiedener Proteine, unter anderem Bad (*Bcl-X<sub>L</sub> (bcl-2-like)/Bcl-2-associated death protein*), Xiap (*X-linked inhibitor of apoptosis*) und NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*).

### 1.1.4.1 Signalwege der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK)

Die Familie der mitogenaktivierten Proteinkinasen ist Teil eines komplexen Netzwerks vieler verschiedener interagierender Proteine, welche an der Weiterleitung von Signalen in den Zellkern beteiligt sind [59]. Sie regulieren neben der Zellproliferation und -differenzierung auch die Apoptose [34]. Mittlerweile sind 14 MAP-Kinasen bekannt, die in sieben Subfamilien eingeteilt werden können [60]. Zu den konventionellen MAPK-Kaskaden zählen unter anderem ERK (*extracellular signal regulated kinase*), JNK (*c-jun N-terminal kinase*) und  $p38^{\text{MAPK}}$  (s. Abb. 1.7). Jede Kaskade besteht aus drei Proteinkinasen (MAPK, MAPKK, MAPKKK), deren Aktivität durch ATP-abhängige Phosphorylierungsschritte reguliert werden kann [61].

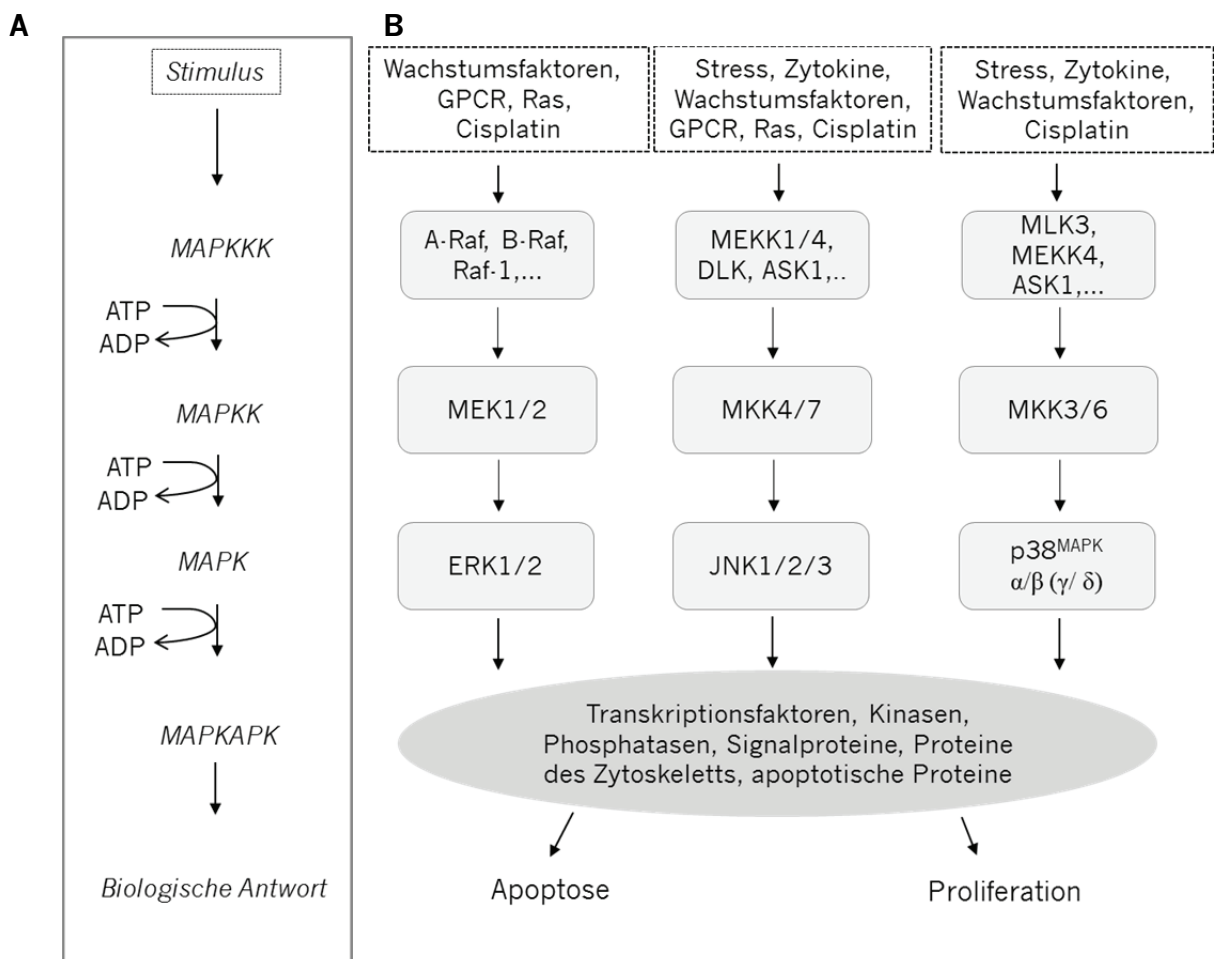


Abb. 1.7: Vereinfachte Darstellung der MAPK-Signalkaskade (modifiziert nach [61,63]). **A:** Allgemeines Prinzip der Signalübertragung über die MAPK. **B:** Übersicht der drei MAPK-Hauptsignalwege. GPCR (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren), MAPK: Mitogenaktivierte Proteinkinase, MAPKAPK: MAPK aktivierte Proteinkinase, MAPKK: MAPK-Kinase, MAPKKK: MAPK-Kinase-Kinase.

Im Gegensatz dazu führt die Dephosphorylierung durch MAPK-Phosphatasen (z.B. MKP 1) zu einer Inaktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinasen [62].

Die einzelnen Signalwege können auf unterschiedliche Weise, z.B. durch Wachstumsfaktor regulierte Rezeptoren (gilt insbesondere für den Raf/MEK/ERK-Signalweg), zellulären Stress oder durch zytoplasmatische Proteine (z.B. ATR, c-Abl, Ras (*rat sarcoma*) oder *damage recognition*-Proteine) stimuliert werden [60,63,64]. Die biologische Antwort wird im Anschluss durch Phosphorylierung weiterer Substrate im Zellkern, Zytoplasma, Zytoskelett oder Zellmembran vermittelt.

Die Beteiligung der Signalwege dieser MAP-Kinasen ist von großer Bedeutung für die Vermittlung der zytotoxischen Effekte von Cisplatin. Alle drei Mitglieder dieser Kinase-Familie werden in Folge einer Exposition mit Cisplatin aktiviert [24,65]. Die Aktivierung der MAPK kann zu gegensätzlichen zellulären Prozessen, nämlich Zellproliferation oder Zelltod, führen [59]. Welches Ereignis nach MAPK-Aktivierung eintritt, ist scheinbar abhängig von der jeweiligen MAPK, vom Zelltyp und dem zellulären Proliferations- und Differenzierungsstatus sowie der Aktivierungsdauer der Kinasen [24,59]. Viele verschiedene zytoplasmatische Proteine, wie z.B. die Proteinkinase C (PKC), Proteine der Ras- und Akt-Familie und c-Abl, werden als Mediatoren der cisplatininduzierten MAPK-Aktivierung angesehen [59]. Nachfolgend werden die einzelnen MAP-Kinasen näher vorgestellt.

#### *ERK1/2 (Extracellular signal regulated kinase 1/2)*

Die Rolle von ERK1 (p44<sup>MAPK</sup>) und ERK2 (p42<sup>MAPK</sup>) in der Vermittlung cisplatin-induzierter Effekte wird in der Literatur kontrovers diskutiert [31]. Cisplatin aktiviert zeit- und dosisabhängig die Kinasen ERK1/2 [65-68]. Jedoch scheint diese Aktivierung zelltypspezifisch zu sein, da manche Zellen keine oder nur eine schwache Aktivierung von ERK nach Exposition mit Cisplatin zeigen [69]. Die cisplatininduzierte Aktivierung von ERK1/2 kann sowohl zum Zelltod als auch zum Überleben der Zelle führen [70]. In verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien, unter anderem auch in der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie A2780, führte die ERK-Aktivierung zum Überleben der Zellen [66,67,71,72]. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung erhöht die Hemmung der „*upstream*“-Kinase MEK die Sensitivität gegenüber der cisplatin-induzierten Apoptose sowohl in cisplatin-sensitiven als auch -resistenten Tumorzellen [66,71]. Mandic et al. konnte diese Beobachtung in einer Melanomzelllinie bestätigen, jedoch trat dieser Effekt in weiteren Melanomzellen nicht auf [73]. Andere



Autoren berichten, dass die cisplatininduzierte Aktivierung des ERK-Signalweges auch zum Zelltod führen kann [65,73-75]. Analog führte eine Hemmung des MEK-ERK-Signalweges zu einer erhöhten Cisplatinresistenz in humanen Zervixkarzinom- und Hepatoblastom-Zellen [76], sowie in myeloischen Leukämiezellen [68].

#### *JNK 1/2/3 (c-jun N-terminale Kinase 1/2/3)*

Diese Kinase, auch als stressaktivierte Proteinkinase (SAPK) bezeichnet, wird ebenfalls infolge einer Exposition mit Cisplatin aktiviert [68,72]. Am häufigsten wird in der Literatur die proapoptotische Bedeutung der cisplatininduzierten JNK-Aktivierung beschrieben [69,77,78]. Im Gegensatz dazu belegen andere Studien, dass diese Aktivierung auch wichtig für das Überleben der Zelle ist [71,79]. Ein kritischer Faktor in der cisplatininduzierten Apoptose ist die Dauer der JNK-Aktivierung [77]. In cisplatinempfindlichen Zellen wird die Aktivität von JNK über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten, wodurch die Apoptose ausgelöst wird. Resistente Zellen zeigen nur eine kurzfristige Aktivierung dieses Signalweges und keine Induktion der Apoptose [80].

#### *p38<sup>MAPK</sup> ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ )*

Cisplatin führt zu einer längerfristigen Aktivierung des p38<sup>MAPK</sup>-Signalweges. Diese Aktivierung scheint nur eine proapoptotische Rolle in verschiedenen Zelllinien zu spielen [77,78,81]. Die Inhibition der cisplatininduzierten p38<sup>MAPK</sup>-Aktivierung resultiert in einem resistenten Phänotyp [81]. Ein kritischer Faktor in der cisplatininduzierten Apoptose ist auch hier die Dauer der Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> [77].

Die Signalwege der MAP-Kinasen leisten demnach einen entscheidenden Beitrag in der Vermittlung der zellulären Effekte von Cisplatin. Die genaue Beteiligung der einzelnen MAPK-Signalwege und „downstream“-Effektoren an der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin ist jedoch noch nicht ausreichend entschlüsselt. Erschwerend kommt hinzu, dass die Signalwege in ein komplexes Netzwerk weiterer Signalproteine integriert sind [82], sodass das Schicksal der Zelle (Apoptose/Überleben) abhängig von der Intensität und/oder Dauer der Aktivierung eines jeden einzelnen Signalweges ist [31].

### 1.1.5 Resistenzmechanismen

Der Erfolg einer platinhaltigen Tumorthherapie wird durch das Auftreten von Chemoresistenz limitiert. Diese können intrinsisch (primär) sein oder durch chronische Exposition mit den Platinkomplexen erworben (sekundär) werden. Verschiedene an der Resistenzentwicklung beteiligte Mechanismen konnten bereits identifiziert werden [31,33,34]. Eine Übersicht möglicher Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin ist in Abb. 1.8 vereinfacht dargestellt. Carboplatin zeigt vergleichbare Resistenzmechanismen [32].

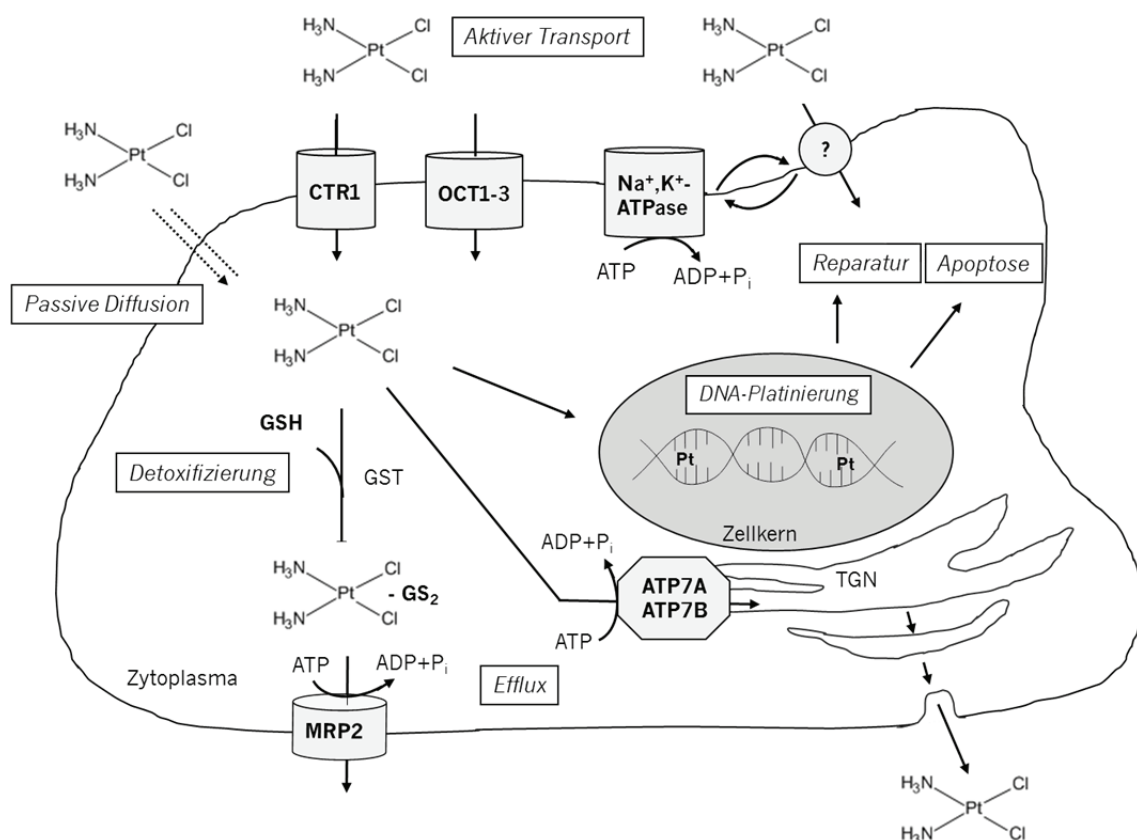


Abb. 1.8: Vereinfachte Übersicht der Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin. Dargestellt sind die Mechanismen der Aufnahme, Detoxifizierung und Ausschleusung von Cisplatin. ATP7A: Adenosintriphosphat Alpha-Polypeptid, ATP7B: Adenosintriphosphat Beta-Polypeptid, CTR1: Kupfertransporter 1, GST: Glutathion-S-Transferase, MRP2: MDR (multi drug resistance)-assoziiertes Protein 2, OCT1 – 3: Organische Kationentransporter 1 – 3, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk.

### 1.1.5.1 Reduzierte Platinkumulation

Ein entscheidender Schritt vor der Bildung der Platin-DNA-Addukte ist die Aufnahme der Platinkomplexe in die Zelle (s. Abb. 1.8). Ein häufig beobachteter Resistenzmechanismus platinresistenter Tumorzellen ist eine Reduktion der zellulären Platinkumulation um ca. 20 – 70 % im Vergleich zu sensitiven Zellen [83]. Diese kann durch eine verminderte Aufnahme von Cisplatin (Influx), durch einen gesteigerten Cisplatin-efflux oder eine Kombination beider Prozesse zustande kommen [84-86]. Am häufigsten ist dieser Kumulationsdefekt bedingt durch einen verringerten Influx von Cisplatin [32,33,87]. Die in dieser Arbeit verwendete Ovarialkarzinomzelllinie A2780cis zeigt ebenfalls eine reduzierte Platinkumulation [88].

Lange Zeit wurde die passive Diffusion durch die Zellmembran als hauptverantwortlicher Aufnahmemechanismus von Cisplatin angesehen [89]. Die Aufnahme ist linear, zeigt weder eine Sättigung bis zum Erreichen der Löslichkeitsgrenze von Cisplatin (3,3 mM) noch kann diese durch strukturelle Analoga inhibiert werden. Mittlerweile geht man von der Beteiligung verschiedener Ionenkanäle, endozytotischer Mechanismen und carriervermittelter sowie ATP-abhängiger Transportprozesse aus [32,33,87]. Diese Erkenntnis wird insbesondere dadurch gestützt, dass die Aufnahme durch verschiedene Substanzen moduliert werden kann [85,90,91]. Erste Hinweise auf ATP-abhängige Transportprozesse erhielt man durch Versuche mit verschiedenen ATP-Depletoren, die in einem verringerten intrazellulären Platingehalt resultierten [91-94]. In diesem Zusammenhang wird häufig die Rolle der ATP-abhängigen  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, die physiologisch den  $\text{Na}^+$ -Gradienten an der Zellmembran aufrechterhält, diskutiert [85,93]. Proteine, die Cisplatin transportieren, scheinen teilweise abhängig von diesem elektrochemischen Gradienten zu sein. Die entsprechenden Transportmechanismen sind jedoch bis heute noch nicht identifiziert [33].

Des Weiteren sind Kupfertransporter an der Regulation des zellulären Transports von Cisplatin in und aus der Zelle beteiligt [95]. Dazu zählt unter anderem der Influxtransporter CTR1, dessen Funktion pH-, temperatur- und  $\text{K}^+$ -Ionenabhängig ist [96]. Die Rolle von CTR1 in der Kumulation von Cisplatin wurde bereits vielfach in der Literatur beschrieben [4,97-100]. Eine erhöhte oder erniedrigte Expression dieses Transporters korrelierte mit dem intrazellulären Platingehalt [98,101]. Die cisplatinresistenten A2780cis-Zellen zeigten eine niedrigere CTR1-Expression [102].

Zusätzlich wird die Beteiligung des organischen Kationentransporters OCT2, des Kupfertransporters CTR2 und eines bislang noch nicht identifizierten Transporters, der spezifisch für die Kumulation von Platinkomplexen in der cis-Konfiguration ist, am Influx von Cisplatin diskutiert [4,103,104].

Weitere Transporter, die die zelluläre Kupferhomöostase aufrechterhalten, werden ebenfalls mit Cisplatinresistenz in Verbindung gebracht. Dazu zählen die intrazellulären P-Typ ATPasen ATP7A und ATP7B. Diese ATP-abhängigen Kupfertransporter sind im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert und tragen zur vesikulären Sequestrierung (insbesondere ATP7A) und dem Transport von Cisplatin aus der Zelle (insbesondere ATP7B) bei [105,106]. Dieser Prozess resultiert in einer geringeren Platin-DNA-Adduktbildung. Cisplatinresistente Tumorzellen zeigen eine Überexpression von ATP7A und ATP7B [95,107,108]. In A2780cis-Zellen scheint jedoch ATP7A eine vorherrschende Rolle in der Cisplatinresistenz zu spielen [109].

Außerdem vermitteln verschiedene ABC (*ATP binding cassette*)-Transporter den Transport von Cisplatin aus der Zelle [4]. Hauptsächlich verantwortlich für den aktiven Efflux von Cisplatin-GSH-Konjugaten ist der ATP-abhängige Effluxtransporter MRP2 [110]. MRP2 spielt eine entscheidende Rolle in der Cisplatinresistenz und ist in verschiedenen cisplatinresistenten Zellen überexprimiert [111]. Weitere Transporter dieser Familie, wie z.B. MDR1 (P-Gp (P-Glykoprotein)), MRP1, LRP (*lung resistance related protein*) und BCRP (*breast cancer resistance protein*) haben eine geringe bzw. keine Bedeutung in der Resistenz gegenüber Cisplatin [33,112,113].

Bis heute ist noch nicht vollständig geklärt, welche Transporter und zu welchem Ausmaß bekannte Transporter an der Kumulation von Cisplatin tatsächlich beteiligt sind und somit die Platinsensitivität *in vitro* und *in vivo* beeinflussen [4].

#### **1.1.5.2 Gesteigerte Inaktivierung durch Glutathion**

In der Zelle binden die reaktiven Aqua-Platinkomplexe neben der nukleären DNA auch an schwefelhaltige Moleküle des Zytoplasmas. Glutathion (GSH) und Metallothioneine (MT) stellen aufgrund der nukleophilen Thiolgruppen bevorzugte Reaktionspartner dar. Insbesondere das Tripeptid Glutathion kann enzymatisch katalysiert unter Beteiligung der Glutathion-S-Transferase (GST) oder direkt mit Cisplatin reagieren. Infolgedessen wird die intrazelluläre Menge des reaktiven Cisplatins reduziert. Es entsteht ein inaktives Cisplatin-GS-Konjugat, welches über den ATP-abhängigen Effluxtransporter MRP2 aus der Zelle transportiert werden kann (s. Abb. 1.8) [114].

Außerdem kann die Bildung von DNA-*crosslinks* verhindert werden, indem Glutathion an die Platin-DNA-Monoaddukte bindet. Erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von GSH wurden in verschiedenen cisplatinresistenten Tumoren beobachtet [11,31], unter anderem auch in den A2780cis-Zellen [88]. Darüber hinaus wurde auch eine gesteigerte Expression von GST und der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase, einem Schlüsselenzym der Glutathion-Synthese, in Zusammenhang mit der Cisplatinresistenz berichtet [115].

### 1.1.5.3 Gesteigerte Reparatur oder Toleranz der Platin-DNA-Addukte

Cisplatininduzierte DNA-Schäden sind wichtige Auslöser für apoptotische Signalwege [31]. Wie bereits zuvor erwähnt, werden die Platin-DNA-Addukte hauptsächlich über das NER-System repariert. Eine gesteigerte Reparaturrate nach Adduktbildung könnte somit die Ausbildung einer Resistenz begünstigen. Beispielsweise konnte in verschiedenen resistenten Tumorzellen eine erhöhte Expression wichtiger NER-Proteine, wie z.B. ERCC1 und XPA, im Vergleich zu sensitiven Zellen gezeigt werden [116,117]. Die Reparaturrate korrelierte jedoch nicht mit dem Resistenzgrad [11,34].

Eine erhöhte Toleranz gegenüber den Platin-DNA-Addukten kann ebenfalls einen resistenten Phänotyp bedingen. Insbesondere ein Defekt oder eine Mutation im MMR-System, welches essentiell für die zytotoxische Wirkung von Cisplatin ist, wird immer wieder mit Cisplatinresistenz in Verbindung gebracht [31]. Eine verringerte Expression verschiedener MMR-Proteine bedingt eine erhöhte Toleranz gegenüber Platin-DNA-Addukten, indem Basenfehlpaarungen nicht durch das MMR-System erkannt werden. Der geschädigte Strang kann somit über den replikativen Bypass repliziert werden, was zu einer hohen Mutationsrate führt. Die daraus folgenden Mutationen begünstigen ebenfalls eine Cisplatinresistenz. Auch eine erhöhte Expression verschiedener DNA-Polymerasen, die an der Translasionssynthese beteiligt sind, wurde mit Cisplatinresistenz assoziiert [31]. Zusätzlich können durch das MMR-System vermittelte Signalwege (wie z.B. p53, p73, c-Abl), die zur Apoptose führen, nicht mehr aktiviert werden [24].

#### 1.1.5.4 Veränderungen der pro- und antiapoptotischen Signaltransduktionswege

Nicht reparierbare DNA-Läsionen, induziert durch Cisplatin, lösen über ein komplexes Signalnetzwerk die Apoptose aus. Veränderungen innerhalb dieser Signalwege können eine potentielle Ursache für die Resistenz gegenüber Cisplatin darstellen. Eine zentrale Rolle in der cisplatininduzierten Apoptose spielt das Tumorsuppressorprotein p53, dessen Funktionsverlust mit Cisplatinresistenz assoziiert ist [24,118]. Auch Veränderungen innerhalb der proapoptotischen Signalwege der MAP-Kinasen können einen Beitrag zur Resistenzentwicklung leisten [59,77]. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass resistente Zellen nur vorübergehend die Signalwege der p38<sup>MAPK</sup> und JNK nach Cisplatinexposition aktivieren [77,78], wodurch die Fas/FasL-vermittelte extrinsische Apoptose limitiert wird [56]. Darüber hinaus zeigen verschiedene resistente Tumorzellen eine erhöhte Aktivität der ERK-Signalkaskade, welche in diesem Fall zu einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit führt [69,71-73].

Auch eine erhöhte Aktivität antiapoptotischer Signalwege (PI3K/Akt/mTOR) oder deren Rezeptortyrosinkinasen (z.B. HER2/neu) kann zur Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin beitragen [31,113,119,120]. Ebenso wurde eine erhöhte Expression antiapoptotischer Proteine, wie z.B. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Xiap, Protein 14-3-3 und Survivin (Inhibitor der Caspase-Aktivierung) oder onkogener Transkriptionsfaktoren (c-Fos, c-Jun, c-Myc) mit Cisplatinresistenz in Verbindung gebracht [7,11,31,32]. c-Fos und c-Jun sind Komponenten des AP1 (Aktivator-Protein)-Transkriptionskomplexes, welcher die Transkription einer Vielzahl von Genen induziert (z.B. ERCC1, MT, GST) [34].

Nach dem heutigen Kenntnisstand ist die Cisplatinresistenz multifaktoriell und ergibt sich aus dem Zusammenwirken verschiedener in diesem Kapitel beschriebener Mechanismen. Eine große Bedeutung kommt dabei der Erforschung der einzelnen verantwortlichen Faktoren und deren Beteiligung an der Resistenzentwicklung zu.

## 1.2 Rolle von ATP in der Zelle

Das Nukleotid Adenosin-5'-triphosphat (ATP, s. Abb. 1.9) ist eine energietragende Verbindung, die man in allen metabolisch aktiven Zellen findet.

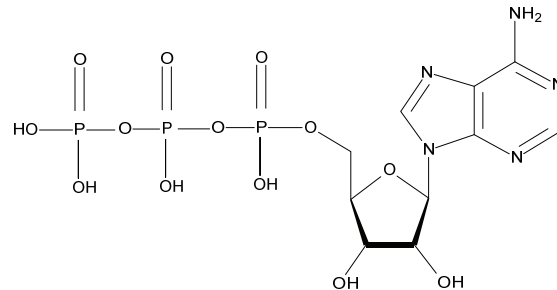


Abb. 1.9: Chemische Struktur von Adenosin-5'-triphosphat (ATP).

ATP spielt eine zentrale Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen, die Energie benötigen. Auf die Biosynthese von Proteinen und DNA/RNA entfällt mit 25 – 30 % der größte Anteil des ATP-Verbrauchs (s. Abb. 1.10). Des Weiteren wird Energie für den aktiven Transport von Substanzen, die Aufrechterhaltung von Ionengradienten, die Zellzyklusprogression, die DNA-Reparatur (s. Kap. 1.1.3.4) oder die Kontrolle von intrazellulären Signaltransduktionswegen (s. Kap. 1.1.4.1) benötigt [121,122]. Zusätzlich bestimmt der intrazelluläre ATP-Gehalt die Art des Zelltodes (Apoptose vs. Nekrose) [123-125].

Proteinsynthese 25 · 30 %	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase 19 – 28 %	Ca <sup>2+</sup> -ATPase 4 – 8 %	Gluconeogenese 7 – 10 %	Harnstoff- Synthese 3 %	Verschiedene 21 · 42 %
------------------------------	--	-------------------------------------	----------------------------	-------------------------------	---------------------------

Abb. 1.10: ATP-Umsatz zellulärer Prozesse in % (modifiziert nach [126]).

### 1.2.1 Intrazelluläre Bildung von ATP

Aerobe Zellen können chemische Energie in Form von ATP sowohl über die mitochondriale Atmungskette, als auch über die Glykolyse generieren. Dabei ist der Energiegewinn über die mitochondriale Atmungskette mit 36 Molekülen ATP/Glucose effektiver als die Glykolyse, bei der nur zwei Moleküle ATP gewonnen werden [125]. Aus diesem Grund wird intrazelluläres ATP in aeroben Zellen überwiegend (> 90 %) über die mitochondriale Atmungskette generiert.

über die Mitochondrien bereitgestellt [126]. Interessanterweise fand O. Warburg Mitte der zwanziger Jahre heraus, dass Tumorzellen eine gesteigerte aerobe Glykolyse aufweisen [127]. Die ATP-Produktion in Tumorzellen erfolgt jedoch nicht ausschließlich über diesen metabolischen Weg. Abhängig vom Zelltyp und dem Nährstoffangebot ist die Glykolyse zu maximal 50 % an der Energiegewinnung in Form von ATP beteiligt [128]. Einige Tumorzellen, unter anderem auch Ovarialkarzinomzellen, beziehen dennoch bis zu 90 – 95 % ihrer Energie über die mitochondriale Atmungskette [129]. Beide Stoffwechselwege sind entsprechend in den Tumorzellen für die ATP-Synthese verantwortlich und werden nachfolgend kurz beschrieben.

Die mitochondriale Atmungskette setzt sich zusammen aus der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Elektronentransportkette (ETC), bestehend aus vier Multienzymkomplexen (Komplex I – IV), und der oxidativen Phosphorylierung, welche die  $F_0F_1$ -ATP-Synthase (Komplex V, ATP-Synthase, F-Typ-ATPase) beinhaltet (s. Abb. 1.11) [130]. Die Elektronentransportkette und die oxidative Phosphorylierung sind über einen Protonengradienten miteinander gekoppelt (chemiosmotische Theorie nach Mitchell, 1961) [131].

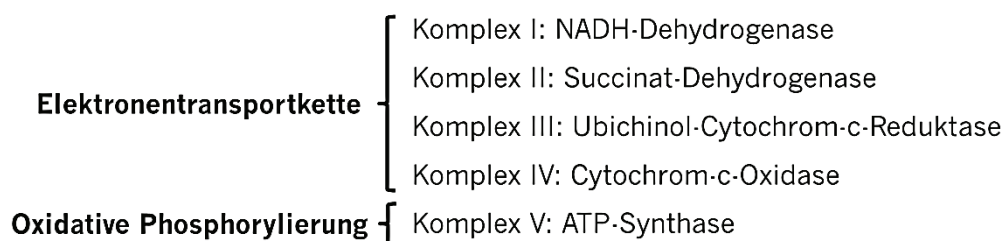


Abb. 1.11: Die fünf Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette.

Ausgehend von den Reduktionsäquivalenten NADH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid) und  $FADH_2$  (Flavin-Adenin-Dinukleotid), die bei der Substratoxidation während des Citratzyklus entstehen, werden Elektronen entlang der vier Enzymkomplexe über Ubichinon (Coenzym Q10) und das hämhaltige Cytochrom-c weitergeleitet (s. Abb. 1.12) [132]. Diese Elektronentransportkette endet in der Übertragung der Elektronen auf den Akzeptor Sauerstoff, welcher mit zwei  $H^+$ -Ionen zu Wasser reagiert. Die Komplexe I, III und IV stellen zusätzlich Protonenpumpen dar [130]. Ein Teil der während der Elektronenübertragung freigesetzten Energie wird von diesen genutzt, um Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zu transportieren (s. Abb. 1.12). Auf diese Weise wird ein elektrochemischer Protonengradient an der inneren Mitochondrienmembran aufrechterhalten. Dieser ist essentiell



für die Synthese von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat ( $P_i$ ). Katalysiert wird diese Reaktion durch die  $F_0F_1$ -ATPase, welche in die zwei Komplexe  $F_0$  und  $F_1$  unterteilt werden kann [133]. Parallel zum Rückstrom der Protonen durch die  $F_0$ -Einheit zurück in die mitochondriale Matrix erfolgt die endergonische Produktion von ATP über den  $F_1$ -Teil dieser F-Typ-ATPase [134,135].

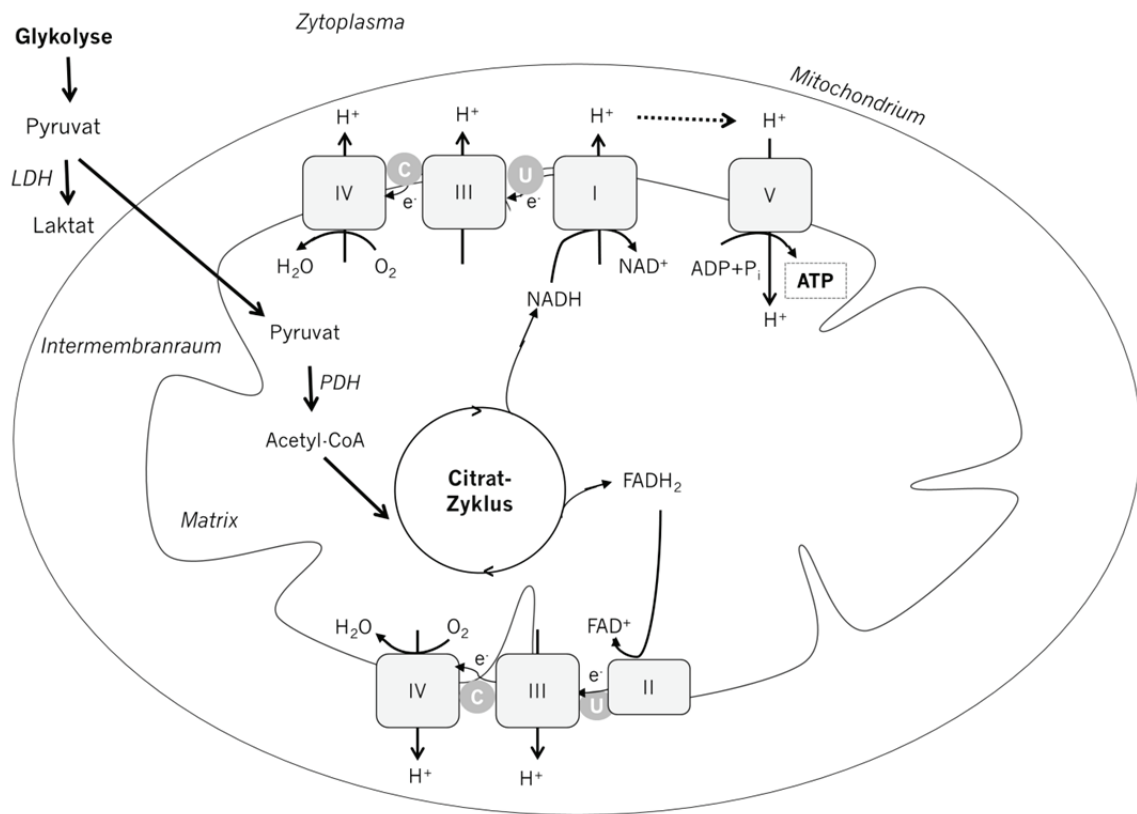
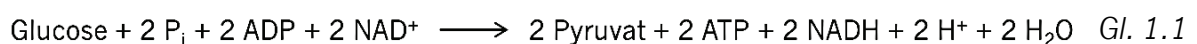


Abb. 1.12: Vereinfachte Darstellung der mitochondrialen Atmungskette (modifiziert nach [127,130]). C: Cytochrom-c,  $e^-$ : Elektronen,  $FAD^+/FADH_2$ : Flavin-Adenin-Dinukleotid, LDH: Laktatdehydrogenase,  $NAD^+/NADH$ : Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, PDH: Pyruvatdehydrogenase, U: Ubichinon.

Während der Glykolyse, welche im Zytosol stattfindet, wird ein Molekül Glukose zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut [125]. Die dabei freigesetzte Energie wird zur Synthese von ATP aus ADP und  $P_i$  genutzt. Die Gesamtgleichung der glykolytischen Reaktion ist in Gleichung 1.1 dargestellt.



Die weitere Verstoffwechslung von Pyruvat ist abhängig vom zellulären Sauerstoffgehalt. Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat über die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat abgebaut, wohingegen unter aeroben Bedingungen unter Katalyse der Pyruvatdehydrogenase (PDH) Acetyl-CoA entsteht, welches anschließend im Citratzyklus zu  $\text{CO}_2$  oxidiert wird [125,127].

### 1.2.2 Inhibitoren der intrazellulären ATP-Synthese

Der intrazelluläre ATP-Gehalt kann sowohl durch Hemmung der Glykolyse, als auch durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette beeinflusst werden. Zu den Inhibitoren der Glykolyse zählen z.B. 2-Deoxyglucose, 3-Bromopyruvat, Iodoacetat und Natriumfluorid, welche verschiedene Enzyme innerhalb des glykolytischen Stoffwechselweges hemmen [136]. Je nach Angriffspunkt in der mitochondrialen Atmungskette unterscheidet man Inhibitoren der Elektronentransportkette oder der oxidativen Phosphorylierung. Zu den letztgenannten zählen auch die Entkoppler, welche den Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran abbauen. Eine Auswahl der metabolischen Inhibitoren ist in Tab. 1.1 zusammengestellt.

Tab. 1.1: Übersicht der Inhibitoren der mitochondrialen ATP-Produktion.

Wirkungsort	Inhibitoren
Komplex I	Rotenon, Amytal
Komplex II	Malonat
Komplex III	Antimycin A
Komplex IV	Cyanid, Natriumazid, Kohlenmonoxid
Komplex V	Oligomycin, Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)
Protonengradient (Entkoppler)	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP), Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP), 2,4-Dinitrophenol (DNP)

Da die mitochondrialen Prozesse des Elektronentransports und der oxidativen Phosphorylierung durch den elektrochemischen Protonengradienten miteinander gekoppelt sind, führt eine Beeinträchtigung der Elektronentransportkette auch zu einer Unterbrechung des Protonengradienten. Dieser ist die treibende Kraft für die

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase, sodass folglich auch die Synthese von ATP gehindert wird. Eine Inhibition der Elektronentransportkette ist jedoch mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verbunden [137,138]. Es ist allgemein bekannt, dass eine übermäßige Produktion von ROS eine entscheidende Rolle in der Induktion der zellulären Apoptose spielt [57,139]. Darüber hinaus wurde ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials mit einer Inhibition der Atmungskettenkomplexe I – IV (z.B. durch Antimycin A, Natriumazid und Rotenon) in Verbindung gebracht [137]. Dies ist ebenfalls ein entscheidender Schritt in der Initiierung der intrinsischen Apoptose [41].

Die in dieser Arbeit verwendeten metabolischen Inhibitoren 2,4-Dinitrophenol (DNP) und Oligomycin werden im Anschluss ausführlicher vorgestellt und deren Strukturformeln in Abb. 1.13 gezeigt.

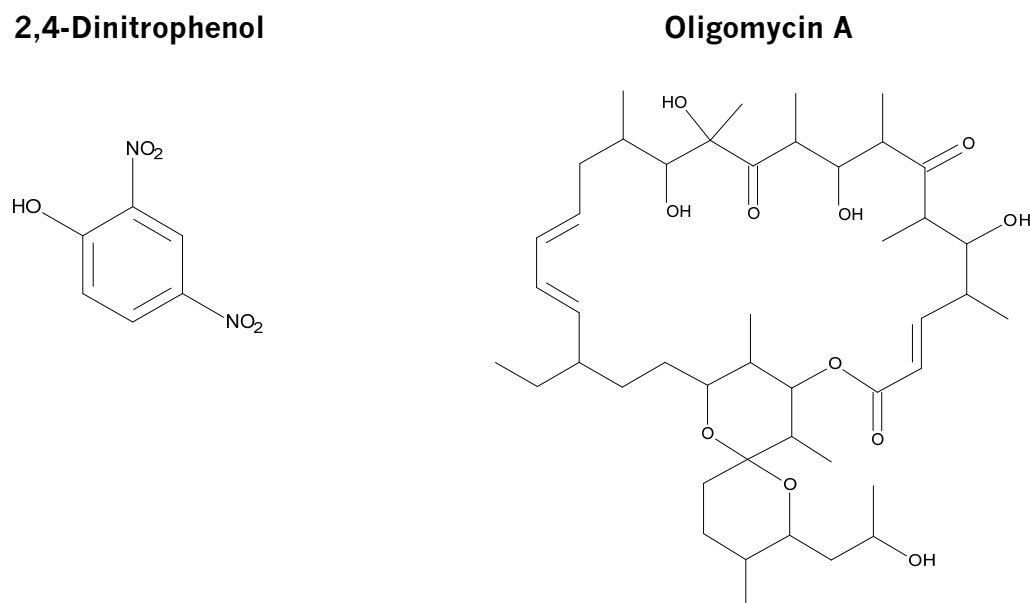


Abb. 1.13: Chemische Strukturen von 2,4-Dinitrophenol und Oligomycin A.

DNP ist eine schwache Säure (pKa-Wert: 4,09) und liegt an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran aufgrund der hohen H<sup>+</sup>-Konzentration protoniert vor. Dies ermöglicht der Substanz die Passage durch die lipophile innere Mitochondrienmembran. Im Matrixraum ist der pH-Wert höher, sodass dort eine Deprotonierung von Dinitrophenol zu Dinitrophenolat stattfindet. Dieser DNP-vermittelte Protonentransport resultiert in einer Zerstörung des an der inneren Mitochondrienmembran aufgebauten Protonengradienten und führt dadurch bedingt zu einer Hemmung der ATP-Synthese [131].

Das Makrolid-Antibiotikum Oligomycin ist ein spezifischer Inhibitor der mitochondrialen  $F_0F_1$ -ATPase. Oligomycin liegt als Gemisch verschiedener strukturell ähnlicher Substanzen (Oligomycin A – D) vor, wobei für die Isomere A und B die effektivste Hemmung der  $F_0F_1$ -ATPase beschrieben wurde [140]. Oligomycin vermittelt seine Wirkung durch Bindung an die  $F_0$ -Untereinheit der ATPase, wodurch der Protonenfluss unterbrochen wird. Im Gegensatz zu anderen metabolischen Inhibitoren beeinflusst Oligomycin weder das mitochondriale Transmembranpotential (MTP) noch induziert es die Bildung von ROS [137,138,141-143].

Neben der Inhibition der  $F_0F_1$ -ATPase zeigt Oligomycin auch einen hemmenden Effekt auf verschiedene in der Plasmamembran lokalisierten P-Typ-ATPasen. Jedoch sind zur Hemmung der  $Na^+,K^+$ -ATPase (s. Kap. 1.2.3) und der speicherabhängigen Calcium-Kanäle (*store-operated  $Ca^{2+}$ -channels*, SOC) 10 – 100-fach höhere Oligomycin-konzentrationen im Vergleich zur Inhibition der  $F_0F_1$ -ATPase ( $< 0,04 \mu M$ ) notwendig [144,145].

### 1.2.3 ATP-abhängige Transportprozesse

Verschiedene energieabhängige ATPasen sind am Transport von Ionen und Substanzen durch biologische Membranen beteiligt. Die Energie stammt dabei aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und  $P_i$ . Zu den ATPasen zählen neben der mitochondrialen F-Typ-ATPase  $F_0F_1$ -ATPase, der V-Typ-ATPase  $H^+$ -ATPase, auch die membranständigen P-Typ-ATPasen  $Na^+,K^+$ -ATPase und  $Ca^{2+}$ -ATPase sowie die intrazellulären P-Typ-ATPasen ATP7A und ATP7B. Ferner gehören auch die Efflux-transporter der ABC-Familie (z.B. P-Gp, MRP2) zu den ATPasen [146,147]. Einige dieser Transportproteine wurden bereits mit Cisplatinresistenz in Verbindung gebracht (s. Kap. 1.1.5.1). Wie in Abb. 1.10 gezeigt, ist die ubiquitär vorkommende  $Na^+,K^+$ -ATPase für einen bedeutsamen Anteil (19 – 28 %) des gesamten ATP-Verbrauchs der Zelle verantwortlich [126,148]. Dieses Transmembranprotein ist in der Plasmamembran lokalisiert und katalysiert den Antiport von 3  $Na^+$ -Ionen aus der Zelle und den Influx von 2  $K^+$ -Ionen in die Zelle unter Verbrauch von 1 Molekül ATP (s. Abb. 1.14) [149]. Es resultiert ein elektrochemischer Ionengradient an der Plasmamembran, welcher essentiell für verschiedene zelluläre Prozesse ist. Unter anderem liefert dieser Gradient Energie für sekundäre aktive Transportprozesse von Nährstoffen (Glucose, Aminosäuren) und Ionen ( $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ) durch die Zellmembran und ist

verantwortlich für die Regulation des Zellvolumens, der Ionenhomöostase und des Membranpotentials [150,151].

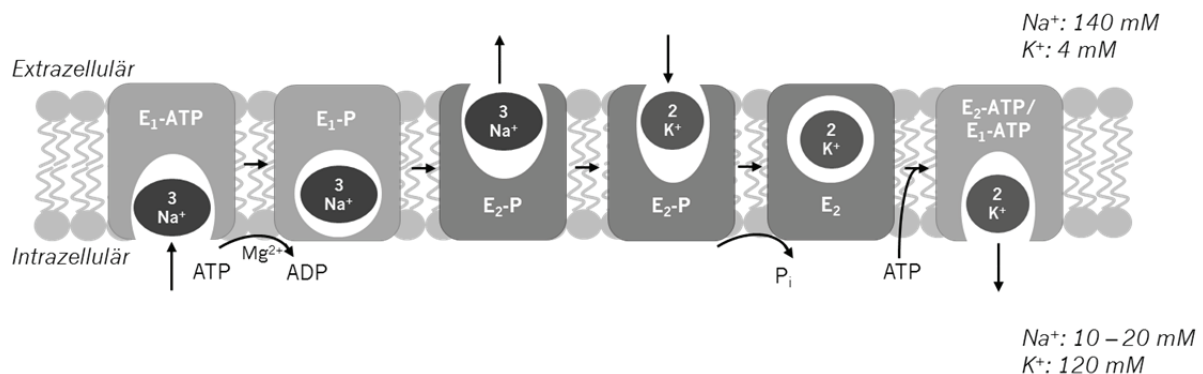


Abb. 1.14: Vereinfachter Transportmechanismus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase nach dem Post-Albers-Schema (modifiziert nach [147]). Die Konformation E<sub>1</sub> weist eine hohe Affinität für ATP und Na<sup>+</sup>-Ionen auf. Die Bindung von intrazellulärem Na<sup>+</sup> induziert die Phosphorylierung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup> (E<sub>1</sub>-P). Die Phosphorylierung resultiert in einer Konformationsänderung des Enzyms (E<sub>2</sub>-P), wodurch die Ionen durch die Membran transportiert werden. Die Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle gelangt an die Membranaußenseite und Na<sup>+</sup> wird aus der Zelle freigesetzt. Infolge einer Affinitätsänderung binden nun extrazelluläre K<sup>+</sup>-Ionen an diese Bindungsstelle. Es folgt die Dephosphorylierung und die Bindung von ATP, was ebenfalls mit einer Konformationsänderung verbunden ist (E<sub>1</sub>-ATP). Diese führt wiederum zur Freisetzung von Kalium in das Zytosol.

Auch die zelluläre Aufnahme von Cisplatin scheint mit der Aktivität der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase verbunden zu sein [85,152,153]. Die heterodimere Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase besteht aus den Untereinheiten α und β, die in verschiedenen Isoformen vorliegen [151]. Die α<sub>1</sub>-Isoform (110 kDa), zusammengesetzt aus zehn Transmembransegmenten, ist in fast allen Zellen exprimiert. Sie ist die katalytisch aktive Untereinheit und beinhaltet die ATP-Bindungsdomäne, die Phosphorylierungsdomäne und die Bindungsstellen für Kationen (K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>) sowie für weitere Liganden [148]. Die β-Untereinheit (55 kDa) ist für die Stabilisierung der α-Untereinheit verantwortlich und entscheidend für die korrekte Konformation und Aktivität der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase [150,154].

Das Cardenolid Ouabain (g-Strophanthin, s. Abb. 1.15) gehört zur Gruppe der herz-wirksamen Glykoside und ist ein spezifischer Inhibitor der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α-Untereinheit (IC<sub>50</sub>: 10 nM) [155]. Ouabain bindet mit hoher Affinität zwischen den Transmembransegmenten der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, wenn sich diese in der E<sub>2</sub>-P-Konformation befindet. Es entsteht ein stabiler Enzym-Ouabain-Komplex. Der Zugang und die Bindung von K<sup>+</sup>-Ionen an die Bindungsstelle ist blockiert [156,157]. Dies führt zu einer Unterbrechung des elektrochemischen Gradienten an der Plasmamembran.

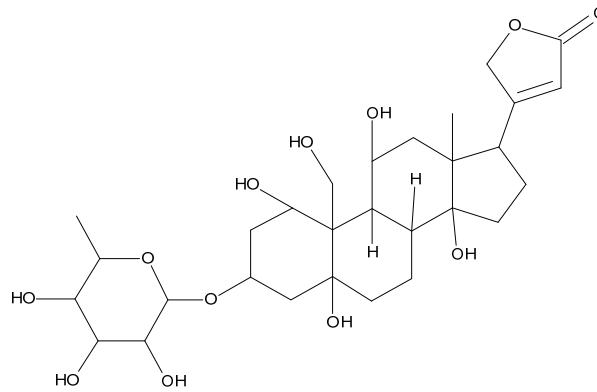


Abb. 1.15: Chemische Struktur von Ouabain.

Interessanterweise führt die ouabaininduzierte Hemmung der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase zu einer Aktivierung verschiedener zellulärer Signalwege (insbesondere Ras/Raf/MEK/ERK und PI3K/Akt/mTOR). Diese Aktivierung scheint über zelluläre Protein- und Lipidkinasen (z.B. PKC, PI3K, Src (*sarcoma*)) sowie Membranrezeptoren (z.B. EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)) vermittelt zu werden [158-161]. In den letzten Jahren konnte in einigen Studien an Tumorzelllinien gezeigt werden, dass Ouabain über verschiedene Signalwege (MAPK, PI3K, Src), durch Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder vermehrte ROS-Produktion die Apoptose induziert. Die exakten Mechanismen sind jedoch noch ungeklärt [161-164].

Auch der F-Typ-ATPase-Inhibitor Oligomycin hemmt die Aktivität der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, indem er von der extrazellulären Seite an die  $\text{E}_1\text{-P}$ -Konformation der  $\alpha$ -Untereinheit bindet. Dabei wird zum einen die Affinität der unphosphorylierten ATPase ( $\text{E}_1$ ) gegenüber  $\text{Na}^+$ -Ionen erhöht und zum anderen erfolgt eine Okklusion der transmembranär gebundenen  $\text{Na}^+$ -Ionen. Die Konformationsänderung von  $\text{E}_1\text{-P}$  zu  $\text{E}_2\text{-P}$  wird verhindert und folglich der Ionentransport von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  durch die Membran unterbunden [144,165].

#### 1.2.4 Bedeutung von ATP für die Platinsensitivität

In den letzten Jahren wurde vermehrt der Einsatz von extrazellulärem ATP in der Therapie maligner Erkrankungen untersucht [166,167]. Mehrere *In-vitro*-Studien zeigten, dass die zusätzliche Gabe von ATP die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber einer konventionellen Chemotherapie (z.B. Cisplatin, Etoposid oder Fluorouracil) erhöht [168-172]. Dabei wird die Beteiligung mehrerer Mechanismen

diskutiert. Einerseits wurde berichtet, dass extrazelluläres ATP die intrazelluläre Glutathionkonzentration in murinen Tumorzellen reduziert [173-175]. Andererseits erhöht ATP die Membranpermeabilität selektiv in Tumorzellen [176], was zu einer verstärkten passiven Diffusion und zellulären Kumulation antitumorale Substanzen, unter anderem auch Cisplatin führt [168-170,172,177]. Welche Mechanismen dieser Permeabilitätserhöhung zugrunde liegen, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass durch Interaktion von extrazellulärem ATP mit membranständigen purinergen Rezeptoren unspezifische Kationenkanäle geöffnet werden. Durch diese erfolgt ein Einstrom von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle sowie ein  $\text{K}^+$ -Ausstrom aus der Zelle. Diese Ionenströme bewirken eine Reduktion des Membranpotentials, was zu einer erhöhten Membranpermeabilität führt [166,178,179]. Antitumorale Substanzen gelangen vermehrt über passive Diffusion durch die Plasmamembran in die Zelle. Swennen et al. diskutieren, dass die erhöhte Aufnahme von Cisplatin auf eine Interaktion von extrazellulärem ATP mit cisplatintransportierenden Proteinen zurückzuführen ist [172]. Darüber hinaus wirkt ATP selbst antiproliferativ oder zytotoxisch. Diese Effekte wurden in einer Vielzahl von Tumorzelllinien beschrieben [180-184]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bislang noch ungeklärt. Diskutiert wird der durch Adenosin induzierte „*pyrimidine starvation effect*“ [180,181,185]. Extrazelluläres ATP wird durch membranständige ATPasen und 5'-Nukleotidasen zu Adenosin abgebaut [167]. Nach Aufnahme in die Zelle hemmt Adenosin die Bildung von Pyrimidin-Nukleotiden und in Folge die DNA-Synthese. Auch die Aktivierung membrangebundener purinerner Rezeptoren durch ATP (P2-Rezeptoren) oder Adenosin (P1-Rezeptoren) scheint an der Vermittlung der zytotoxischen Wirkung beteiligt zu sein [167,182,184]. Beschrieben wird auch eine antiproliferative Wirkung durch Akkumulation der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus [183,186].

Da in platinresistenten Zellen häufig eine reduzierte zelluläre Platinaufnahme und ein erhöhter GSH-Gehalt (gesteigerte Inaktivierung von Platinkomplexen) beobachtet werden [11,31-33,87,88], könnte die zusätzliche Gabe von ATP zu einer platinhaltigen Chemotherapie einen wichtigen Beitrag zur Überwindung der Platinresistenz leisten. Studien, die die Kombination von ATP und Cisplatin an Tumorzelllinien untersuchen, sind limitiert. In verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien erhöhte ATP, unter anderem bedingt durch eine gesteigerte zelluläre Aufnahme von Cisplatin, die Cisplatinsensitivität [171,172]. Im Gegensatz dazu zeigte ATP in dem Ovarialkarzinomzelllinienpaar A2780/A2780cis keinen Einfluss auf die Zytotoxizität und

Kumulation von Cisplatin [187]. Die Autoren diskutieren, dass Adenosin, welches durch den Abbau von ATP entstanden ist, in die Zelle aufgenommen wird und intrazellulär die Bildung von ATP erhöht [173,185]. Wie bereits erwähnt, ist ATP eine wichtige Energiequelle für die Aktivität verschiedener Effluxtransporter (MRP2, ATP7A und ATPB). Eine mögliche Erklärung ist, dass ATP sowohl die zelluläre Aufnahme, als auch den Efflux von Cisplatin erhöht, was in einem unveränderten Netto-Cisplatingehalt in der Zelle resultiert. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten verschiedene Autoren zeigen, dass eine Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts zu einem erhöhten Platingehalt in der Zelle führt [86,188]. Umgekehrt wurde auch berichtet, dass verschiedene metabolische Inhibitoren, die eine Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts bedingen, zu einer verminderten Kumulation von Platinkomplexen führen [91-94]. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen diverser Studien die ETC-Inhibitoren Antimycin A (Inhibitor von Komplex III) oder Natriumazid (u.a. Inhibitor von Komplex IV) in glucosefreiem Medium eingesetzt. Es ist jedoch bekannt, dass Inhibitoren der Elektronentransportkette die Produktion von ROS induzieren, die zur Apoptose führen [138]. Weitere Kumulationsversuche wurden unter Einfluss von Oligomycin, einem Inhibitor der oxidativen Phosphorylierung, in glucosehaltigem Medium durchgeführt. Da die Zellen ATP auch über die Glykolyse gewinnen können [125], scheinen diese Depletionsbedingungen aber nicht geeignet.

### **1.3 Tyrosinkinase-Inhibitoren in der antitumoralen Therapie**

#### **1.3.1 Familie der Tyrosinkinasen**

Tyrosinkinasen sind zentrale Signalproteine, die an der Regulation verschiedener überlebenswichtiger Prozesse der Zelle beteiligt sind. Dazu gehören beispielsweise die Zellproliferation und -differenzierung, sowie antiapoptotische Signalwege. Es handelt sich hierbei um Enzyme aus der Familie der Proteinkinasen, welche spezifisch die  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP auf die Hydroxygruppe der Aminosäure Tyrosin verschiedener Zielproteine übertragen und somit deren Aktivität regulieren [189]. Diese Proteinphosphorylierung ist ein entscheidender Mechanismus innerhalb zellulärer Signaltransduktionswege. Über eine Reihe hintereinander geschalteter Proteinkinasen werden somit Signale in den Zellkern weitergeleitet [189]. Dort wird durch Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren die Expression von



Genen, die für die Regulation wichtiger zellulärer Funktionen entscheidend sind, beeinflusst [190].

Die Tyrosinkinase können in zwei Klassen unterteilt werden: transmembranäre Rezeptor-Tyrosinkinase (z.B. Rezeptoren des epidermalen (EGF), plättchenstimulierenden (PDGF) und vaskulären endothelialen (VEGF) Wachstumsfaktors) und intrazelluläre Non-Rezeptor-Tyrosinkinase (Src, Bcr-Abl (*breakpoint cluster region-cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homologue 1*), FAK (*focal adhesion kinase*), JAK (*janus kinase*) [191]. Die Bindung von extrazellulären Signalmolekülen an die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) resultiert in einer nachfolgenden Aktivierung (Phosphorylierung) der intrazellulären Ras/Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionskaskade, die zu Zellproliferation oder -differenzierung führt [192,193]. An dieser intrazellulären Kaskade sind zu einem großen Teil die Non-Rezeptor-Tyrosinkinase (NRTK) beteiligt. Diese sind hauptsächlich im Zytoplasma oder im Zellkern lokalisiert [192]. Bis heute wurden bereits 56 Rezeptor-Tyrosinkinase und 32 Non-Rezeptor-Tyrosinkinase identifiziert. Diese lassen sich in 19 (RTK) bzw. 11 (NRTK) Subfamilien unterteilen [193]. Dysregulationen (z.B. Mutation und/oder Überexpression) der beteiligten Tyrosinkinase-Rezeptoren (z.B. EGFR, VEGFR) und/oder intrazellulären Signaltransduktoren (z.B. Ras oder Raf) führen zu einer konstitutiven Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalweges in verschiedenen Tumorzellen, u. a. in Ovarialkarzinomzelllinien [63,194,195]. Diese dauerhafte Aktivierung führt zu unkontrolliertem Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung und spielt somit eine entscheidende Rolle in der Tumorphogenese [195]. Aus diesem Grund etablierten sich Tyrosinkinase-Inhibitoren in den letzten Jahren zu einer klinisch relevanten Behandlungsstrategie für die Therapie verschiedener maligner Erkrankungen [191]. Diese Substanzklasse hemmt gezielt Moleküle und Signalwege, die spezifisch für die Tumorzelle sind. Sie werden deshalb auch als „zielgerichtete“ Arzneistoffe (sog. *targeted drugs*) bezeichnet. Zu diesen gehören neben den monoklonalen Antikörpern, die gegen die extrazelluläre Domäne der Rezeptor-Tyrosinkinase gerichtet sind, auch die sogenannten niedermolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren (häufig auch als *small molecules* bezeichnet). Diese binden spezifisch an die intrazelluläre ATP-Bindungsdomäne der Tyrosinkinase [191]. Während die monoklonalen Antikörper intravenös verabreicht werden müssen, können die Tyrosinkinase-Inhibitoren peroral appliziert werden. Die zielgerichteten Therapeutika zeichnen sich durch eine tumorselektive Wirkung und ein anderes Nebenwirkungsprofil, verglichen mit der Standardchemotherapie, aus [193].

### 1.3.2 Klinisch eingesetzte Substanzen

In der Onkologie gewinnen die Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) zunehmend an Bedeutung und stellen inzwischen eine vielversprechende Therapieoption für hämatologische sowie solide Tumorerkrankungen dar [63]. Eingesetzt werden vor allem Inhibitoren der Rezeptor-Tyrosinkinasen (insbesondere EGFR, PDGFR und VEGFR) sowie der intrazellulären Kinasen (z.B. Raf, Bcr-Abl). Der erste in die Klinik eingeführte Vertreter dieser Substanzklasse ist der niedermolekulare Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib. Der bemerkenswerte Erfolg von Imatinib in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (CML), mit einer Ansprechrate von bis zu 90 % [193], führte zur Entwicklung weiterer Tyrosinkinase-Inhibitoren. Bis heute sind zehn Tyrosinkinase-Inhibitoren für die Therapie unterschiedlicher maligner Erkrankungen zugelassen. Einen Überblick über die verschiedenen TKI, deren Zielproteine und in der EU zugelassene Indikationen gibt Tab. 1.2 [196-204]. Weitere Indikationen für die bereits zugelassenen Arzneistoffe und eine Vielzahl neuer zielgerichteter Therapeutika werden derzeit im Rahmen präklinischer und klinischer Studien getestet [193].

Da Sorafenib in dieser Arbeit einen Schwerpunkt darstellt, werden dessen Wirkungsmechanismus und klinischer Einsatz in Kombination mit Platinkomplexen in den nachfolgenden Kapiteln im Detail erläutert.

Sorafenib (4-{4-[3-(4-Chlor-3-trifluormethylphenyl)ureido]phenoxy}-pyridin-2-carbonsäuremethanilamid, s. Abb. 1.16), ein Biaryl-Harnstoff-Derivat, ist ein peroral bioverfügbarer Multikinase-Inhibitor mit proliferationshemmenden, apoptoseinduzierenden und antiangiogenetischen Eigenschaften [205].

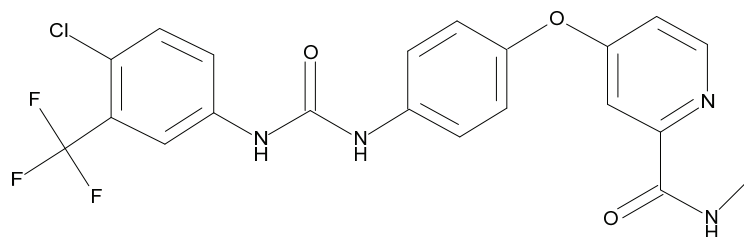


Abb. 1.16: Chemische Struktur von Sorafenib.

Die zweimal tägliche Gabe von jeweils 400 mg Sorafenib ist im Allgemeinen gut verträglich [206,207]. Zu den sehr häufig auftretenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen, mit jedoch geringem Schweregrad, zählen das Hand-Fuß-Syndrom (23 %), Hautausschlag (26 %), Diarrhö (55 %) und Hypertonie (35 %) [198,208,209]. In der

EU ist Sorafenib seit 2006 zur Monotherapie des Leberzellkarzinoms und zur Second-Line-Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen [210].

Tab. 1.2: Übersicht über klinisch eingesetzte Tyrosinkinase-Inhibitoren.

Arzneistoff (Handelsname)	Jahr der EU-Zulassung	Zugelassene Indikation	Zielprotein/e
Imatinib (Glivec®)	2001	CML, GIST	Bcr-Abl, c-Kit, PDGFR
Erlotinib (Tarceva®)	2005	Metastasierendes NSCLC, Pankreaskarzinom	EGFR
Dasatinib (Sprycel®)	2006	CML, Akute lymphatische Leukämie	Bcr-Abl, c-Kit, PDGFR- $\beta$ , Src
Sorafenib (Nexavar®)	2006	Leberzellkarzinom und fortgeschrittenes RCC	B- und C-Raf, c-Kit, Flt-3, p38 $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , VEGFR (2 und 3)
Sunitinib (Sutent®)	2006	GIST, fortgeschrittenes, metastasierendes RCC, pankreatische, neuro- endokrine Tumoren	c-Kit, Flt-3, PDGFR- $\alpha/\beta$ , VEGFR (1 – 3)
Nilotinib (Tasigna®)	2007	CML	Bcr-Abl, c-Kit, PDGFR
Lapatinib (Tyverb®)	2008	Mammakarzinom	EGFR, HER2/neu
Gefitinib (Iressa®)	2009	Metastasierendes, fort- geschrittenes NSCLC	EGFR
Pazopanib (Votrient®)	2010	Fortgeschrittenes RCC	c-Kit, PDGFR- $\alpha/\beta$ , VEGFR (1 – 3)
Vandetanib (Caprelsa®)	2012	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	VEGFR 2, EGFR, Ret
Vemurafenib (Zelboraf®)	2012	Nicht resezierbares oder metastasiertes Melanom	B-Raf

*Bcr-Abl: Breakpoint cluster region-cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homologue 1, c-Kit: Stammzellfaktor-Rezeptor, EGFR: Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, Flt-3: FMS-like tyrosine kinase 3, GIST: Gastrointestinaler Stroma-Tumor, HER2/neu: Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2, NSCLC: Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, PDGFR: Plättchen-stimulierender Wachstumsfaktor-Rezeptor, RCC: Nierenzellkarzinom, Ret: Rearranged during transfection, Src: sarcoma, VEGFR: Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor.*

Im Rahmen klinischer Studien wird derzeit der Einsatz von Sorafenib als Monotherapie oder in Kombination mit anderen zytotoxischen Substanzen zur Behandlung weiterer Tumorentitäten, wie z.B. des malignen Melanoms, des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC), Thyroid- und Pankreaskarzinoms untersucht [205,209]. Aufgrund der Tatsache, dass Ovarialkarzinomzellen verstärkt die Wachstumsfaktor-Rezeptoren VEGFR/PDGFR exprimieren und eine erhöhte C-Raf-Expression mit einer verminderten Überlebensrate von Ovarialkarzinompatientinnen einhergeht [194,211,212], scheint der Multikinase-Inhibitor Sorafenib auch eine vielversprechende Behandlungsoption für das Ovarialkarzinom zu sein. Ergebnisse einer Phase-II-Studie unterstützen den Einsatz von Sorafenib als Monotherapie bei rezidivierendem Ovarialkarzinom jedoch nicht [213]. Sorafenib wird aber derzeit intensiv in Kombination mit verschiedenen antitumoralen Substanzen zur Behandlung des Ovarialkarzinoms in klinischen Studien getestet [214-218].

### 1.3.3 Wirkungsmechanismus

Wie zuvor erwähnt, ist Sorafenib ein Multikinase-Inhibitor. Sorafenib vermittelt seine antitumorale Wirkung über eine Hemmung verschiedener Rezeptoren und zytosolischer Proteine mit Kinase-Aktivität, die bedeutend für die Tumorzellproliferation und Angiogenese sind. Auch zeigt Sorafenib in verschiedenen Tumorzelllinien apoptoseinduzierende Effekte über eine Downregulation antiapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie [219]. Darüber hinaus wird als weitere Ursache für die zytotoxische und antiproliferative Wirkung von Sorafenib in verschiedenen Zelllinien die Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion und eine daraus resultierende Reduktion des zellulären ATP-Gehalts angesehen [220,221]. Ursprünglich wurde Sorafenib als potenter Inhibitor des onkogenen MAP-Kinase-Signalweges (s. auch Kap. 1.1.4.1) durch spezifische Hemmung der Kinase C-Raf (oder Raf-1) entwickelt. Es stellte sich jedoch heraus, dass weitere Isoformen der intrazellulären Serin/Threonin-Kinase Raf, die Wildtyp- und die mutierte B-Raf-Isoform, ebenfalls durch Sorafenibkonzentrationen im nanomolaren Bereich inhibiert werden [222]. Sorafenib ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor der Raf-Kinasen, der durch Interaktion mit der ATP-Bindungstasche innerhalb dieser Kinasen deren Phosphorylierung und Aktivierung verhindert [223]. Darüber hinaus konnte kristallographisch gezeigt werden, dass Sorafenib die B-Raf-Kinase in ihrer inaktiven Konformation durch Interaktion mit der sogenannten „DGF-out“ allosterischen Bindungstasche stabilisiert [224,225]. Die Raf-

Kinasen sind bedeutende Kinasen innerhalb des MAPK-Signalweges, der eine entscheidende Rolle in der Regulation der Zellproliferation und des Überlebens der Zelle spielt [226,227]. In verschiedenen Tumorzelllinien führte Sorafenib zu einer reduzierten Phosphorylierung der Raf-„*downstream*“-Effektoren MEK und ERK [222].

Zusätzlich werden Rezeptortyrosinkinasen (RTK), die extrazelluläre Signale über den MAPK-Signalweg ins Zellinnere weiterleiten, mit ähnlicher Potenz inhibiert. Auch hier interagiert Sorafenib mit der intrazellulären ATP-Bindungsstelle der Kinase-Domäne, was in einer Hemmung der Autophosphorylierung der RTK resultiert [228]. Zu diesen RTK zählen unter anderem die proangiogenetischen Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-1 – 3, PDGFR- $\beta$  und FGFR-1 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-1) sowie weitere RTK (Flt-3, c-Kit und Ret) [222,227]. Die Angiogenese stellt einen bedeutenden Mechanismus für das Zellwachstum und die Metastasenbildung dar, und somit auch für die Tumorprogression. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) sowie sein zugehöriger Rezeptor VEGFR, der auf der Zelloberfläche von Endothelzellen exprimiert wird. Auch der Wachstumsrezeptor PDGFR, der in Perizyten lokalisiert ist, und FGFR-1 leisten einen wichtigen Beitrag in der Vermittlung angiogenetischer Effekte [209]. Die Aktivität dieser RTK ist wichtig für die Neubildung und Stabilisierung von Blutgefäßen [205]. Während die antiangiogenetischen Eigenschaften von Sorafenib über die Rezeptor-Tyrosinkinasen FGFR-1, PDGFR und VEGFR vermittelt werden, sind die antiproliferativen Eigenschaften von Sorafenib überwiegend auf die Inhibition der Raf-Kinase und der nachfolgenden Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges zurückzuführen [195]. Dieser Signalweg ist auch für die Cisplatinsensitivität von Bedeutung (s. Kap. 1.1.4.1). Eine schematische Darstellung des über Rezeptortyrosinkinasen aktivierten Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges zeigt Abb. 1.17.

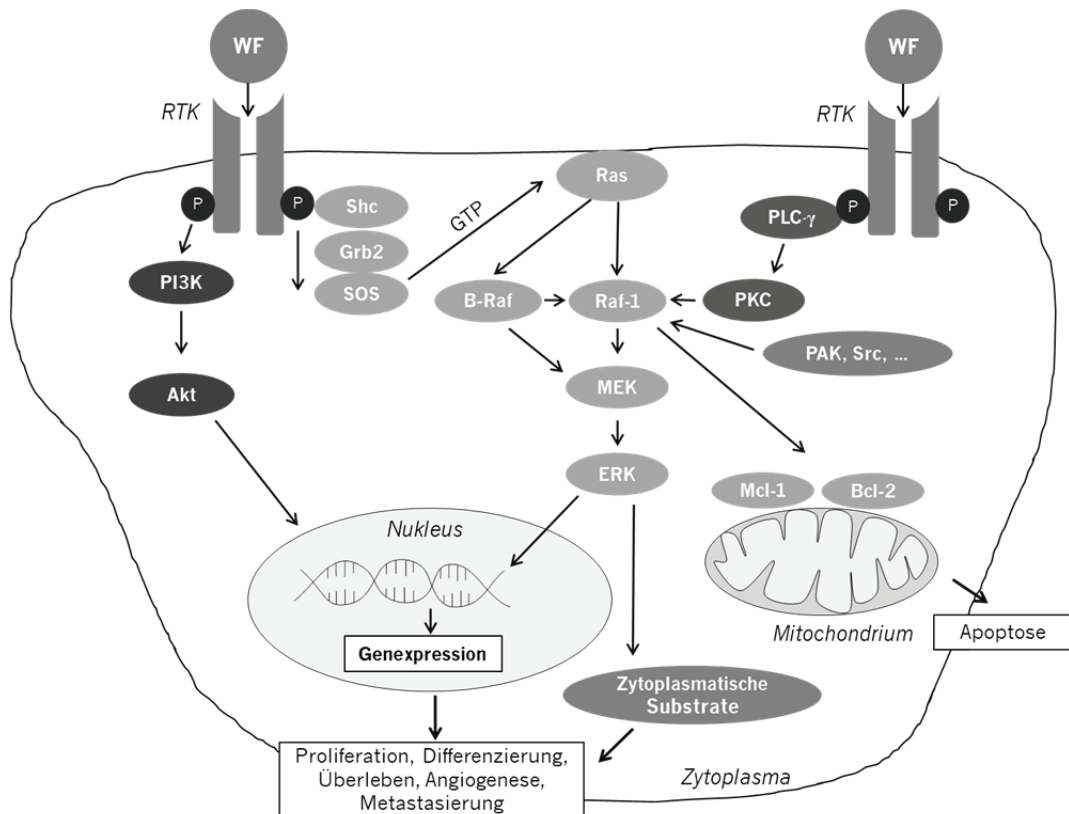


Abb. 1.17: Schematische Darstellung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges.

Verschiedene Signalwege, wie der Raf/MEK/ERK-, PI3K- oder der PKC-Signalweg, werden durch RTK aktiviert und leiten extrazelluläre Signale durch Phosphorylierung intrazellulärer Kinasen in den Zellkern weiter. Die Aktivierung erfolgt durch Bindung eines Wachstumsfaktors (WF) an die spezifische RTK. Dies bewirkt die Autophosphorylierung der RTK und die Anlagerung verschiedener Adaptorproteine (Shc (Src homology collagen), Grb 2 (growth factor receptor-bound protein 2)) an die zytoplasmatische Kinase-Domäne. Das membrangebundene G-Protein Ras wird durch den GDP/GTP-Austauschfaktor SOS (son of sevenless) in seine aktive Form überführt und aktiviert im Anschluss die Kinase Raf-1. Diese kann auch über B-Raf, PKC sowie weitere Kinasen (PAK (p21-aktivierte Kinase) und Src) aktiviert werden. Nachfolgend aktiviert Raf-1 verschiedene „downstream“-Effektor-Proteine (MEK, ERK) durch Phosphorylierung und interagiert mit antiapoptotischen Proteinen (z.B. Bcl-2 und Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1)), die an der Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Aktives ERK induziert die Phosphorylierung verschiedener zytoplasmatischer Substrate und nukleärer Zielstrukturen. Diese Phosphorylierungskaskade dient der Regulation essentieller Zellfunktionen.

### 1.3.4 Kombination mit Platinkomplexen

Der klinische Einsatz der Platinkomplexe in der antitumoralen Therapie ist durch Entwicklung von Resistenz gegenüber diesen Substanzen limitiert. In diesem Zusammenhang konnte in verschiedenen Tumorzelllinien eine erhöhte Aktivität des

Raf/MEK/ERK-Signalweges beobachtet werden [63,194,195]. Mit der Einführung des Multikinase-Inhibitors Sorafenib, welcher gezielt an verschiedenen Stellen dieser Signalkaskade eingreift, eröffnen sich neue Behandlungsstrategien zur Resistenzüberwindung und Steigerung der therapeutischen Effektivität. Insbesondere die Kombination von Sorafenib mit klassischen Chemotherapeutika bewies sich in klinischen Studien als vielversprechender Therapieansatz [229]. Darüber hinaus hat Sorafenib aufgrund seiner apoptoseinduzierenden Eigenschaften das Potential, die Zytotoxizität antitumoraler Substanzen zu erhöhen [229]. Die effektive Dosis jeder einzelnen Substanz in der Kombination kann somit bei gleichbleibender Wirksamkeit reduziert und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dosislimitierender Toxizität verringert werden. Ergebnisse mehrerer Phase-I-Studien an unterschiedlichen soliden Tumoren zeigen, dass die Kombination von Sorafenib mit einer platinhaltigen Standardchemotherapie, bestehend aus entweder Carboplatin, Cisplatin oder Oxaliplatin, sicher und gut verträglich ist [230-233]. Die in diesen Studien beobachtete Tumoransprechratescheint erfolgversprechend und führte zur weiteren klinischen Testung dieser Kombinationstherapie an größeren Patientenkollektiven. Kürzlich veröffentlichte Scagliotti et al. Ergebnisse einer multizentrischen Phase-III-Studie an Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) im fortgeschrittenem Stadium. In dieser Studie bestand das Therapieregime aus Carboplatin/Paclitaxel mit bzw. ohne Sorafenib. Ein Behandlungszyklus umfasste dabei insgesamt 21 Tage. Die intravenöse Applikation von Carboplatin und Paclitaxel erfolgte an Tag 1; die perorale Applikation von 400 mg Sorafenib (2 x täglich) an den Tagen 2 – 19. Im Anschluss folgte eine zweitägige Behandlungspause (Tag 20 – 21) [234].

Die zusätzliche Gabe von Sorafenib zu der platinhaltigen Chemotherapie zeigte jedoch keinen zusätzlichen Nutzen im Vergleich zu der alleinigen Gabe von Carboplatin/Paclitaxel. Vielmehr wurde anhand der Studienergebnisse deutlich, dass NSCLC-Patienten mit dem histologischen Subtyp Plattenepithelkarzinom nach Gabe von Sorafenib ein kürzeres medianes Gesamtüberleben aufweisen [234]. Weitere klinische Studien (Phase II – III), die das gleiche Therapieregime prüften, berichten ähnliche Ergebnisse für andere Tumorarten, einschließlich dem fortgeschrittenen malignen Melanom und dem Ovarialkarzinom [214,235]. Auch hier führte die zusätzliche Gabe von Sorafenib zu keiner signifikanten Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit bzw. der progressionsfreien Überlebenszeit. In der Phase-II-Studie zeigten zwei Patientinnen mit Ovarialkarzinom im fortgeschrittenen Stadium sogar

eine Progression der Tumorerkrankung [214]. Bis heute sind die Gründe für die unerwartet negativen Studienergebnisse unbekannt. Es wurde vermutet, dass Sorafenib die Pharmakokinetik der Platinverbindungen (Carboplatin, Oxaliplatin) bzw. Paclitaxel verändert [234]. Jedoch konnte diese Vermutung in verschiedenen Phase-I-Studien nicht bestätigt werden. Bei gleichzeitiger Applikation der drei antitumoralen Substanzen wurden keine relevanten pharmakokinetischen Interaktionen ermittelt [230,233]. Allerdings gibt es Hinweise in der Literatur, dass Sorafenib auf zellulärer Ebene mit Platinverbindungen interagiert. In einer präklinischen Studie an verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien untersuchten Heim et al. den Einfluss von Sorafenib auf die Zytotoxizität, Kumulation und DNA-Adduktbildung von Cisplatin oder Oxaliplatin unter Verwendung verschiedener Inkubationsschemata (Prä-, Koinkubation und nachfolgende Inkubation) [236]. Für beide Platinverbindungen führte eine Koinkubation mit Sorafenib zu einer signifikanten Reduktion des intrazellulären Platingehalts (60 – 65 %) und einer verringerten Platin-DNA-Adduktbildung (65 – 75 %). Die zugrunde liegenden Mechanismen für diese Interaktion sind jedoch noch nicht identifiziert [236]. Es wäre folglich interessant zu untersuchen, ob die in dieser *In-vitro*-Studie beobachteten Effekte auch in anderen Tumorzelllinien, insbesondere der in den Phase-II-III-Studien untersuchten Tumorarten Ovarialkarzinom, NSCLC (Plattenepithel- und Adenokarzinom) und Melanom, auftreten.



## 2. Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits erwähnt, ist eine verminderte Aufnahme der Platinkomplexe in die Zelle ein häufig beobachteter Resistenzmechanismus. Während bis vor kurzem noch angenommen wurde, dass Platinkomplexe hauptsächlich durch passive Diffusion in die Tumorzelle gelangen, wird heute vermehrt die Beteiligung von ATP-abhängigen Transportprozessen diskutiert. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass eine Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts zu einer verminderten Kumulation von Platinkomplexen in verschiedenen Tumorzelllinien führt [91-94]. Umgekehrt erhöht extrazelluläres ATP die Platinaufnahme in Lungenkarzinomzellen [172]. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in der cisplatinempfindlichen Ovarialkarzinomzelllinie A2780 und deren resistenter Variante A2780cis beobachtet werden [187].

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von intra- und extrazellulärem ATP in der Cisplatinempfindlichkeit des Ovarialkarzinomzelllinienpaares A2780/A2780cis näher zu charakterisieren. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag insbesondere auf der Beteiligung ATP-abhängiger Prozesse, wie beispielsweise von Transportmechanismen und zellulären Signalwegen, an der zellulären Kumulation von Platinverbindungen. Dazu wurden spezifische Inhibitoren dieser Prozesse eingesetzt. Ein besseres Verständnis dieser zellulären Mechanismen kann einen entscheidenden Beitrag zur Entwicklung von Strategien zur Resistenzüberwindung und somit einer effektiveren Tumorthherapie leisten.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden folgende Experimente durchgeführt:

- Quantifizierung des intrazellulären ATP-Gehalts in den Zelllinien A2780 und A2780cis mittels ATP-Biolumineszenz-Assay
- Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts nach Inkubation mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen
- Charakterisierung der Platinsensitivität unter glucosefreien Bedingungen (Zytotoxizität, Kumulation)
- Untersuchung der Zytotoxizität und der zellulären Aufnahme von Cisplatin bei reduziertem intrazellulärem ATP (Kumulation und Efflux)
- Untersuchung der zellulären Aufnahme von Cisplatin unter Einfluss von extrazellulärem ATP (Kumulation)
- Untersuchung der Zytotoxizität und der zellulären Aufnahme von Cisplatin unter Einfluss von Ouabain, einem spezifischen Inhibitor der ATP-abhängigen  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

- Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts unter Einfluss von Ouabain
- Untersuchung der Proteinexpression der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase
- Untersuchung der Zytotoxizität und der zellulären Aufnahme von Cisplatin unter Einfluss des Multikinase-Inhibitors Sorafenib, der die Aktivierung des ATP-abhängigen Raf/MEK/ERK-Signalweges hemmt
- Untersuchung der zellulären Aufnahme von Carboplatin unter Einfluss des Multikinase-Inhibitors Sorafenib
- Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts unter Einfluss von Sorafenib
- Charakterisierung der Interaktion zwischen Sorafenib und Cisplatin bzw. Carboplatin

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Antikörper

###### Primäre Antikörper

Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha_1$ (goat polyclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Beta ( $\beta$ )-Actin (mouse monoclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

###### Sekundäre Antikörper

Anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-goat IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt

##### 3.1.2 Antitumorale Substanzen

Carboplatin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Cisplatin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Sorafenibtosylat	Selleckchem Chemicals LL, Houston, USA

##### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 30 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Argon 4.6	Air Product, Hattingen

ATP	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
ATP Determination Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
enthält:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ATP-Lösung [5 mM]</li> <li>• Luciferase, firefly [5 mg/mL]</li> <li>• D-Luciferin [10 mM]</li> <li>• D,L-Dithiothreitol (DTT) [0,1 mM]</li> <li>• Reaktionspuffer, 20 x</li> </ul>	
BCA Protein Assay Kit (Novagen®)	Merck KGaA, Darmstadt
enthält:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kupfersulfat 4 %</li> <li>• BSA-Protein Standard 2 mg/mL</li> <li>• BCA-Lösung (Bicinchoninsäure, BCA), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Natriumtartrat)</li> </ul>	
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Casy®ton, isotone Salzlösung	Schärfe System, Reutlingen
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
2,4-Dinitrophenol (97 %)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
D,L-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Elektrophoresepuffer, 10 x	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
enthält:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 mM Tris</li> <li>• 192 mM Glycin</li> <li>• 0,1 % SDS</li> </ul>	
Ethanol 96 – 100 % (V/V)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

---

Formaldehyd 37 % (V/V)	Riedel de Haën AG, Seelze
Fluoromount®-Mounting Medium	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Glycerol 100 % (V/V)	Applichem GmbH, Darmstadt
Glycin	Grüssing GmbH, Filsum
Helium	Praxair GmbH, Oevel
Immersionsöl, fluoreszenzfrei	Applichem GmbH, Darmstadt
Isopropanol 100 % (V/V)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Leupeptin-Hemisulfat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
L-Glutamin-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-di-phenyl-2H-tetrazoliumbromid)	Applichem GmbH, Darmstadt
Natriumazid	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Grüssing GmbH, Filsum
Natriumorthovanadat	Applichem GmbH, Darmstadt
Natronlauge [0,1 M]	Riedel de Haën AG, Seelze
Natronlauge [1 M]	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem GmbH, Darmstadt
Oligomycin (≥ 60 % Oligomycin A)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ouabainoctahydrat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Penicillin-Streptomycin (P-S)-Lösung [10.000 I.E./mL – 10 mg/mL]	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Pepstatin A	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Pierce ECL Western Blotting Substrat enthält:	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luminol/Enhancer</li> <li>• Peroxide-Buffer (stable)</li> </ul>	
Protein-Marker (Roti®-Mark, vorgefärbt)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PURELAB® Plus-Wasser	ELGA Berkefeld GmbH, Celle
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
RPMI-1640 Medium – ohne Glucose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Salpetersäure 65 % (V/V), Suprapur®	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure [0,1 M]	Grüssing GmbH, Filsum
Salzsäure [1 M]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin)	Applichem GmbH, Darmstadt
Tergitol® NP40-Lösung (Polyethylenglycol (40)-nonylphenoether)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	Applichem GmbH, Darmstadt
Triton® X-100 (Triton)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA-Lösung [0,5 g Schweinetrypsin, 0,2 g EDTA]	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
TWEEN®-20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Applichem GmbH, Darmstadt

### 3.1.4 Geräte

Accu-jet® Pipettierhelfer	Brand GmbH & Co., Wertheim
Beckman Microfuge® Lite	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
Begasungsbrutschrank Thermo	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Casy®1-Zellzähler, Modell TT	Schärfe System, Reutlingen
Einkanal-Pipetten (10 – 1000 µL)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

---

Finnpipette® <ul style="list-style-type: none"><li>• 10 – 100 µL</li><li>• 100 – 1000 µL</li></ul>	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Handystep® Mehrfachdispenser	Brand GmbH & Co., Wertheim
Inversmikroskop Axiovert® 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kern 770 Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Kern EW Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Kompaktschüttler KS 15 control	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Laminar-Air-Flow Werkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Magnetrührer RMH71	Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter
MT Classic AB135-S Analysenwaage	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Multiwell-Reader LUMIstar™ Optima	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Multiwell-Reader Multiskan EX®	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Nikon A1 Eclipse Ti Konfokalmikroskop	Nikon Instruments Europe B.V., Kingston, UK
pH-Meter inoLab® pH level 2	WTW GmbH, Weilheim
Probenmischer GLW L46	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Reinstwasseranlage PURELAB® Plus	ELGA LabWater, Celle
Schüttelinkubator Unimax® 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Transferpipette® S, Einkanalpipetten <ul style="list-style-type: none"><li>• 0,5 – 10 µL</li><li>• 10 – 100 µL</li><li>• 100 – 1000 µL</li></ul>	Brand GmbH & Co., Wertheim

Transferpette®-12 electronic, Mehrkanalpipetten	Brand GmbH & Co., Wertheim
<ul style="list-style-type: none"><li>• 10 – 100 µL</li><li>• 30 – 300 µL</li></ul>	
Ultraschallbad Sonorex® Super RK 103 H	Bandelin, Berlin
VoluMate® Pipetten	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
<ul style="list-style-type: none"><li>• 100 – 1000 µL</li><li>• 20 – 200 µL</li></ul>	
Wasserbad MGW Lauda RM6	Werk Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Universal 32R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

### **Atomabsorptionsspektrometrie**

Autosampler PSD 100	Varian, Darmstadt
Graphitrohratomisator GTA 100	Varian, Darmstadt
Spektrometer SpectrAA® Zeeman 220	Varian, Darmstadt

### **Western Blot**

VersaDoc™ Imaging System 5000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Blotting-Apparatur Mini-Protean® II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophorese-Apparatur Mini-Protean® II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermo EC Dual Mode Electrophoresis Power Supply	E-C Apparatus Corporation, Milford, USA



### 3.1.5 Hergestellte Lösungen und Puffer

#### ATP-Biolumineszenz-Assay

##### Triton-Lösung [10 %]

Triton <sup>®</sup> -X 100	15 mL
PURELAB <sup>®</sup> Plus-Wasser, steril	ad 150 mL

##### Triton-Lösung [1 %]

Triton-Lösung [10 %]	100 mL
PURELAB <sup>®</sup> Plus-Wasser, steril	ad 1000 mL

##### ATP-Arbeitslösung 1 [500 µM]

ATP-Lösung (5 mM)	100 µL
PURELAB <sup>®</sup> Plus-Wasser, steril	ad 1,0 mL

##### ATP-Arbeitslösung 2 [100 µM]

ATP-Arbeitslösung 1	200 µL
PURELAB <sup>®</sup> Plus-Wasser, steril	ad 1,0 mL

#### Platin-Analytik

##### Cisplatin-Stammlösung

[1 mg/mL Platin]

Cisplatin	15,4 mg
PURELAB <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 10,0 mL

##### Cisplatin-Arbeitslösung 1 (AL 1)

[10 µg/mL Platin]

Cisplatin-Stammlösung	100 µL
PURELAB <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 10,0 mL

## Cisplatin-Arbeitslösung 2 (AL 2)

[1 µg/mL Platin]

Cisplatin-AL 1	1 mL
PURELAB® Plus-Wasser	ad 10,0 mL

## Cisplatin-Arbeitslösung 3 (AL 3)

[0,1 µg/mL Platin]

Cisplatin-AL 2	1 mL
PURELAB® Plus-Wasser	ad 10,0 mL

## Salpetersäure [6,5 %]

Salpetersäure 65 %	100 mL
PURELAB® Plus-Wasser	ad 1000 mL

## Triton-Lösung [1 %]

Triton®-X 100	10 mL
PURELAB® Plus-Wasser	ad 1000 mL

**Zellkultur**

## DAPI-Stammlösung [1 mg/mL]

4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	1,0 mg
Methanol	ad 1,0 mL

## DAPI-Arbeitslösung [5 µg/mL]

DAPI-Stammlösung	5,0 µL
PURELAB® Plus-Wasser	ad 1,0 mL

## PBS-Pufferlösung

Natriumchlorid	8,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	1,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2 g
Kaliumchlorid	0,2 g
PURELAB® Plus-Wasser	ad 1000,0 mL

pH-Wert auf 7,4 einstellen

## Zellkulturmedium – glucosehaltig\*

RPMI-1640	500 mL
Fetales Kälberserum	50 mL
L-Glutamin-Lösung (s. Kap. 3.1.3)	7,5 mL
Penicillin-Streptomycin-Lösung (s. Kap. 3.1.3)	5 mL

## Zellkulturmedium – glucosefrei

RPMI-1640 – ohne Glucose	500 mL
Fetales Kälberserum	50 mL
L-Glutamin-Lösung (s. Kap. 3.1.3)	7,5 mL
Penicillin-Streptomycin-Lösung (s. Kap. 3.1.3)	5 mL

\* In dieser Arbeit wurden Zellkulturmedien unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet. Wenn im Nachfolgenden von Nährmedium gesprochen wird, ist damit das glucosehaltige Zellkulturmedium gemeint.

**MTT-Assay**

## MTT-Lösung [5 mg/mL]

MTT	5,0 mg
PBS-Puffer	ad 10,0 mL

**Lösungen zur Inkubation**

## ATP-Stammlösung [1 mM]\*

ATP	5,51 mg
PURELAB® Plus-Wasser	ad 10,0 mL

\* Laut Produktinformation ist eine wässrige ATP-Lösung bei 0 °C über eine Woche stabil.

## Carboplatin-Stammlösung [5 mM]

Carboplatin	18,57 mg
PURELAB® Plus-Wasser	ad 10,0 mL

## Cisplatin-Stammlösung [5 mM]

Cisplatin	15,00 mg
Natriumchlorid-Lösung [0,9 %] (s. unten)	ad 10,0 mL

## DNP-Stammlösung [150 mM]

DNP	276,17 mg
Ethanol	ad 10,0 mL

## Natriumchlorid-Lösung [0,9 %]

Natriumchlorid	9 g
PURELAB® Plus-Wasser	ad 1000 mL

## Oligomycin-Stammlösung [5 mM]

Oligomycin	39,55 mg
Ethanol	ad 10,0 mL

## Sorafenib-Stammlösung [10 mM]

Sorafenibtosylat	63,70 mg
DMSO	ad 10,0 mL

## Proteinisierung

### Leupeptin-Lösung [5 mg/mL]

Leupeptin	50 mg
PURELAB® Plus-Wasser	ad 10 mL

### Lysis-Puffer für die Proteinisierung

Tergitol® NP-40	10 mL
Tris-Base (pH 8)	2,423 g
NaCl	8,006 g
Glycerol	100 mL
EDTA	0,584 g
Aktiviertes Natriumvanadat [10 mM]*	100 mL
PURELAB® Plus-Wasser	ad 1000,0 mL

\*  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  zu 10 mM in PURELAB® Plus-Wasser lösen; pH-Wert auf 10 einstellen und die Lösung bis zur Klarheit kochen. Nach dem Abkühlen der Lösung den pH-Wert erneut auf 10 einstellen.

### Pepstatin A-Lösung [2 mg/mL]

Pepstatin A	20 mg
DMSO	ad 10 mL

## SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

### APS-Lösung [10 %]

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	100 mg
PURELAB® Plus-Wasser	ad 1000 µL

### DTT-Lösung [3,2 M]

D,L-Dithiothreitol (DTT)	49,4 mg
PURELAB® Plus-Wasser	ad 100 µL

### Elektrophoresepuffer, 1 x

Elektrophoresepuffer, 10 x (s. Kap. 3.1.3)	100 mL
PURELAB® Plus-Wasser	ad 1000,0 mL

### Probenauftragspuffer (PAP)

Sammelgel-Puffer (s. unten)	1,75 mL
Glycerol	1,5 mL
SDS-Lösung (s. unten)	5 mL
Bromphenolblau-Stammlösung*	1,25 mL

\* Zugabe von Bromphenolblau zu einer Mischung aus 10 mL PURELAB® Plus-Wasser und 10 µL Ethanol, bis die Lösung gesättigt ist.

### Sammelgel-Puffer (pH 6,8)

Tris-Base	12,11 g
PURELAB® Plus-Wasser	ad 100,0 mL
	pH-Wert auf 6,8 einstellen

### SDS-Lösung [10 %, m/V]

SDS	1,0 g
PURELAB® Plus-Wasser	ad 10,0 mL

### Trenngel-Puffer (pH 8,8)

Tris-Base	12,11 g
PURELAB® Plus-Wasser	ad 100,0 mL
	pH-Wert auf 8,8 einstellen

## Western Blot

### Blockierungslösung

Milchpulver	5 g
TBS-T-Lösung (Herstellung s. unten)	ad 100 mL

### TBS-Puffer, 10 x

Natriumchlorid	40 g
Tris-Base	6,06 g
PURELAB® Plus-Wasser	ad 500,0 mL
	pH-Wert auf 7,3 einstellen

## TBS-Puffer, 1 x

TBS-Puffer, 10 x	10 mL
PURELAB® Plus-Wasser	ad 100,0 mL

## TBS-T-Lösung

TBS-Puffer, 10 x	80 mL
PURELAB® Plus-Wasser	720 mL
TWEEN®-20	1,600 mL

## Transferpuffer

Glycin	14,4 g
Tris-Base	3 g
PURELAB® Plus-Wasser	ad 1000 mL

pH-Wert auf 8,2 – 8,4 einstellen

**3.1.6 Software**

Accelrys Draw 4.0	Accelrys. Inc., SD, USA
Ascent Software (für Multiskan EX®)	Thermo Electron Inc., Dreieich
GraphPad PRISM®, Version 4.00	GraphPad Software Inc., SD, USA
Microsoft® Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
OPTIMA (für LUMIstar™), Version 2.20	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Software Quantity One® – 4.6.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SpectrAA® 220, Version 2.20	Varian, Darmstadt

**3.1.7 Verbrauchsmaterialien**

Blottingpapier (Cellulose), 7 x 10 cm	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Casy®tube-Plastikröhrchen	Schärfe System, Reutlingen
Deckgläser, 24 x 50 mm	Marienfeld GmbH, Lauda Königshofen
Einmalspritze, 10 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

---

Gewebekulturflaschen (25, 75, 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Graphitrohre, pyrolytisch beschichtet	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Handystep <sup>®</sup> PD Tips, lose	Brand GmbH & Co., Wertheim
Kryovials	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
MultiFlex <sup>®</sup> tips (0,5 – 200 µL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Multiwell-Platte (steril), 96 Wells, weiß	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Multiwell-Platte (steril), 6 Wells	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Multiwell-Platte (steril), 96 Wells, klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Multiwell-Platte (unsteril), 96 Wells, klar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Objektträger (Mattrand), 75 x 25 mm	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co., Wertheim
Petrischale (steril), 92 x 16 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Platin-Hohlkathodenlampe (UltraAA <sup>®</sup> - Lampe)	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
PE-Probengefäße konisch, 2 mL	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
PP-Reaktionsgefäße (0,5 ,1,5 , 2 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten (5, 10, 25 mL), steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterilfilter aus Celluloseacetat, 0,22 µM	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugenröhre (15 , 50 mL), steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht



### 3.1.8 Zelllinien

Als *In-vitro*-Testsystem wurde die gegenüber Cisplatin sensitive humane Ovarialkarzinomzelllinie A2780 sowie deren cisplatinresistenter Variante A2780cis verwendet. Diese adhären Ten Tumorzelllinien, die als Monolayer kultiviert werden, wurden aus einem ovarialen Adenokarzinom einer nicht vorbehandelten Patientin etabliert. Die cisplatinresistenten A2780cis-Zellen wurden durch chronische Exposition der A2780-Zellen mit steigenden Cisplatinkonzentrationen erhalten [237,238].

Die Zelllinien stammen von der European Collection of Cell Cultures, Health Protection Agency (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire, UK (Cat. No. 93112519 [A2780] und 93112517 [A2780cis]).

Vor, während und nach jeder Versuchsreihe wurde die Zytotoxizität mit Hilfe des MTT-Assays ermittelt, um die Platinresistenz der A2780cis-Zellen sicherzustellen.

## 3.2 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit den humanen Tumorzelllinien wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen durch Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, Hefen und Pilzen zu vermeiden. Hierfür wurden die Zellkulturexperimente unter einer Laminar-Air-Flow-Werkbank durchgeführt. Durch das Erstellen von internen Standardarbeitsanweisungen (*standard operating procedures*, SOP) wurde ein einheitliches Vorgehen in der Zellkultur, eine Gewährleistung der Qualität und somit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse sichergestellt.

### 3.2.1 Auftauen der Zellen

Die dauerhafte Lagerung der Tumorzelllinien erfolgte bei ca.  $-160\text{ °C}$  in der Gasphase des Stickstofftanks. Dazu wurden die Zellen in Einfriermedium (Mischung aus fetalem Kälberserum (FKS) und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) in spezielle Kryovials gefüllt. Der Zusatz von DMSO diente als Gefrierschutzmittel. Da die eingesetzte DMSO-Konzentration im aufgetauten Zustand toxisch für die Zellen ist, sollte der Auftauprozess der Zellen zügig erfolgen, um eine Beeinträchtigung der Vitalität der Zellen zu verhindern. Nach der Entnahme der Kryovials aus dem Stickstofftank wurden

die Zellen durch wiederholte Zugabe von Zellkulturmedium, welches auf 37 °C vorgewärmt wurde, aufgetaut. Die erhaltene Zellsuspension wurde in eine Zentrifugenröhre überführt und der DMSO-haltige Überstand nach dem Zentrifugieren verworfen. Die Zellen wurden anschließend in frischem Zellkulturmedium resuspendiert, ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Um nicht angeheftete und abgestorbene Zellen zu entfernen, wurde am nächsten Tag das Zellkulturmedium durch frisches Nährmedium ersetzt. Neu aufgetaute Tumorzellen wurden mit Passage 0 gekennzeichnet und maximal über zehn Passagen verwendet, da es mit der Zeit zu Veränderungen des Genexpressionsprofils und Verlust der Resistenz kommen kann.

### 3.2.2 Lagerung und Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen im Inkubator unter Standardbedingungen (37 °C, 80 – 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt). Als Nährmedium diente RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)-1640 Medium, dem 10 % FKS, 5 % Penicillin-Streptomycin- und 7,5 % L-Glutamin-Lösung (Herstellung s. 3.1.5) zugesetzt wurde. Um die Sterilität des Zellkulturmediums zu gewährleisten, wurde nach jeder Herstellung ein Aliquot des Mediums drei Tage im Brutschrank inkubiert und erst nach visuellem Ausschluss mikrobiologischer Verunreinigungen verwendet.

Das Zellkulturmedium enthält lebenswichtige Nährstoffe, die für das Wachstum und die Vitalität der Zellen von großer Bedeutung sind. Da die Zellen abhängig von ihrer Anzahl und metabolischen Aktivität Inhaltsstoffe im Medium verbrauchen und Abfallprodukte aus dem zellulären Stoffwechsel in das Medium abgeben, sollte dieses in regelmäßigen Abständen erneuert werden. Auf diese Weise wird eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen gewährleistet. Dazu wurde alle zwei bis drei Tage das verbrauchte Zellkulturmedium durch eine sterile Pasteurpipette abgesaugt und durch neues, auf 37 °C vorgewärmtes Nährmedium ersetzt.

Die Kontrolle des Wachstums, der Morphologie und der Vitalität der Zellen erfolgte lichtmikroskopisch. War der Zellmonolayer zu mehr als 80 % konfluent, so wurden die adhärennten Zellen abgelöst und verdünnt in eine neue Zellkulturflasche ausgesät, um den Zellen wieder optimale Wachstumsbedingungen zu ermöglichen. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Subkultivieren, Splitten oder Passagieren der Zellen. Das

Ablösen der Zellen erfolgte enzymatisch mit Hilfe einer Trypsin-EDTA-Lösung. EDTA dient als Komplexbildner für zweiwertige Kationen, die für die Stabilisierung der Zelladhäsionsmoleküle verantwortlich sind. Hierzu wurde zunächst das alte Nährmedium entfernt und die Zellen anschließend mit PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen, um tote Zellen, trypsininhibierende Substanzen sowie  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen zu entfernen, die sich negativ auf die Ablösung der Zellen auswirken können. Nach Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen für kurze Zeit (ca. 2 min) im Brutschrank inkubiert und durch vorsichtiges Anschlagen seitlich auf die Zellkulturflasche geprüft, ob sich die Zellen vollständig vom Boden abgelöst haben. Eine längere Einwirkzeit der Enzymlösung wurde vermieden, da dies zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen führen kann. Die Zugabe von serumhaltigem Medium beendete zum einen die Enzymreaktion, und zum anderen konnten die Zellen hiermit vom Flaschenboden gespült werden. Die erhaltene Zellsuspension wurde in eine Zentrifugenröhre überführt und zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Nährmedium resuspendiert. In Suspension wurden die Zellen entweder in eine neue Zellkulturflasche zur weiteren Kultivierung überführt oder für Versuche verwendet.

### **3.2.3 Test auf Mykoplasmenkontamination**

Mykoplasmen sind kleine (zwischen 0,22 und 2  $\mu\text{m}$ ) wandlose Bakterien, die auf bestimmten Nährböden und auch auf Zellen wachsen können. Eine Kontamination mit Mykoplasmen ist lichtmikroskopisch nicht sichtbar, kann jedoch zu genetischen Veränderungen und Absterben der Zellkultur führen. Die Zelllinien wurden daher routinemäßig nach dem Auftauen und nach Beenden der Versuchsreihe auf eine mögliche Mykoplasmeninfektion getestet. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid), welcher sowohl an die zelluläre DNA als auch die mykoplasmathe DNA bindet. Der Nachweis wurde analog der internen SOP „Nachweis von Mykoplasmen mit DAPI oder Hoechst 33258“ durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen über drei Tage ohne Mediumwechsel in einem Medium ohne Zusatz von Antibiotika auf einem Objektträger kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS-Puffer wurden die Zellen mit Methanol fixiert und anschließend bei Raumtemperatur 5 min mit DAPI in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Herstellung s. 3.1.5) inkubiert. Die Mykoplasmen sind bei positivem Nachweis als kleine Punkte um den Kern der Zelle verteilt zu erkennen.

Im Verlauf der Versuche wurde mit Hilfe des konfokalen Fluoreszenzmikroskops keine Kontamination der Zellen durch Mykoplasmen nachgewiesen.

### **3.2.4 Bestimmung der Zellzahl**

Die Konzentration der Zellen in einer Zellsuspension wurde mit dem CASY®1-Zellzählgerät bestimmt, welches auf dem Prinzip eines Impedanzmessverfahrens basiert. Nach dem Subkultivieren der Zellen wurden 20 µL der Zellsuspension mit steril filtrierter CASY®ton-Lösung verdünnt (1:500) und mit dem Zellzählgerät vermessen. Neben der Zellzahl wurden mit dieser Methode auch das Zellvolumen und der Zelldurchmesser bestimmt. Die Darstellung einer Größenverteilung der Zellen ermöglichte gleichzeitig die Bestimmung der Vitalität der Zellen. Zelltrümmer und abgestorbene Zellen finden sich im unteren µm-Bereich; Zellagglomerate im oberen µm-Bereich. Der Messgrößenbereich für die Zellzahlbestimmung der verwendeten Tumorzellen wurde aus diesem Grund auf 8 – 40 µm festgelegt.

## **3.3 Bestimmung der Zytotoxizität (MTT-Assay)**

### **3.3.1 Grundlagen**

Die Bestimmung der Zytotoxizität der verwendeten Substanzen allein oder in Kombination erfolgte mit Hilfe des MTT-Assays, der auf einer kolorimetrischen Bestimmung beruht. Dieser wurde an unserem Institut durch Dr. H. Müller etabliert und optimiert [239]. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wird durch mitochondriale Dehydrogenasen noch lebender Zellen zum violetten Formazansalz reduziert, dessen Farbintensität nach Lösung in DMSO photometrisch bestimmt werden kann [240]. Die Menge des gebildeten Farbstoffs ist dabei proportional zur Zellvitalität.

### 3.3.2 Versuchsbedingungen

Nach erfolgter Bestimmung der Zellzahl (s. Kap. 3.2.4) wurden 10.000 Zellen/Well suspendiert in Nährmedium in sterile 96-Well-Platten ausgesät und über Nacht anheften gelassen. Als Verdunstungsschutz wurde in die äußeren Wells PBS-Puffer pipettiert. Am nächsten Tag erfolgte die Beimpfung der Zellen mit steigenden Konzentrationen der jeweiligen Substanz allein oder in Kombination mit einer fixen Konzentration einer anderen Substanz. Der Wachstumskontrolle wurde lediglich das Lösungsmittel, welches für die Verdünnungen verwendet wurde, zugesetzt. Falls erforderlich, wurde das Nährmedium gegen glucosefreies Medium ausgetauscht. Alle Konzentrationen wurden als Triplikat vermessen. Nach dem Hinzupipettieren der Substanzen wurden die Platten für 71 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden in jedes Well 20 µL einer frisch hergestellten MTT-Lösung (Herstellung s. 3.1.5) pipettiert und die Platte für eine weitere Stunde im Inkubator inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium durch vorsichtiges Ausschlagen der 96-Well-Platte auf Zellstoff entfernt. Durch Zugabe von DMSO wurden die Zellen lysiert und die gebildeten violetten Formazankristalle in Lösung gebracht.

Die Messung der Absorption erfolgte UV-spektrometrisch mit Hilfe des Multiwell-Readers Multiskan EX<sup>®</sup> bei einer Wellenlänge von 570 und 690 nm. Um eine Verfälschung der Werte durch Zellbestandteile und Proteine zu verhindern, wurden die Werte der Hintergrundabsorption bei 690 nm zur Korrektur von den Werten bei 570 nm abgezogen.

### 3.3.3 Bestimmung des pEC<sub>50</sub>-, EC<sub>50</sub>-Wertes und des Resistenzfaktors

Ziel dieser Versuche war die Bestimmung der pEC<sub>50</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte der eingesetzten einzelnen Substanzen sowie Kombinationen der Substanzen. Beim pEC<sub>50</sub>-Wert handelt es sich um den negativen dekadischen Logarithmus des EC<sub>50</sub>-Wertes ( $pEC_{50} = -\log EC_{50}$ ). Dieser ist definiert als diejenige Konzentration der zu testenden Substanz, bei deren Einsatz die Hälfte der Zellen abstirbt. Da die logarithmierten EC<sub>50</sub>-Werte als normalverteilt angesehen werden können [241], werden für die spätere statistische Auswertung mittels Student's t-Test die pEC<sub>50</sub>-Werte herangezogen.

Die EC<sub>50</sub>-Werte der getesteten Substanzen wurden aus den erhaltenen sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Kurven mit der Software GraphPad PRISM<sup>®</sup> Version 4.00 mittels nichtlinearer Regression (*sigmoidal dose-response, bottom > 0, variable slope*) bestimmt.

Zur Visualisierung in der Konzentrations-Effekt-Kurve wurde für die Wachstumskontrolle eine um zwei log-Einheiten geringere Konzentration als die kleinste zugegebene Konzentration angenommen.

Aus den  $EC_{50}$ -Werten lässt sich der Resistenzfaktor für die verwendeten Platinverbindungen (Cisplatin und Carboplatin) berechnen. Der Resistenzfaktor, der auch als Resistenzgrad bezeichnet wird, gibt das Verhältnis der  $EC_{50}$ -Werte der cisplatinresistenten A2780cis- und der sensitiven A2780-Zelllinie an und kann nach folgender Gleichung (s. Gl. 3.1) berechnet werden.

$$\text{Resistenzfaktor} = \frac{EC_{50} \text{ (resistent)}}{EC_{50} \text{ (sensitiv)}} \quad \text{Gl. 3.1}$$

### 3.3.4 Bestimmung der Vitalität der Zellen

Da mit Hilfe des MTT-Assays die mitochondriale Aktivität noch lebender Zellen als Endpunkt erfasst werden kann, eignet sich dieser neben der Bestimmung der Zytotoxizität auch zur Bestimmung der Vitalität der Tumorzellen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen und -zeiten. Als Grenzwert wurde hierbei eine Zellvitalität von mindestens 80 % im relativen Vergleich zu der unter Standardbedingungen kultivierten Wachstumskontrolle festgelegt. Lagen die berechneten Werte unter 80 %, so wurden diese Bedingungen nicht für weitere Versuche verwendet.

Im Rahmen der Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Platinkumulation war der Einsatz von Ouabain- und Sorafenibkonzentrationen oberhalb des  $EC_{50}$ -wertes der jeweiligen Substanz notwendig. Um zytotoxische Effekte bei der Bestimmung des intrazellulären Platingehalts auszuschließen, wurde analog zu dem im Platinkumulationsversuch untersuchten Zeitraum eine Vitalitätsbestimmung durchgeführt. 10.000 Zellen/Well wurden hierzu in eine 96-Well-Platte ausgesät und nach der Adhäsion der Zellen über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Substanz über eine bestimmte Zeit bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  inkubiert. Danach wurde das substanzhaltige Medium durch Nährmedium ersetzt und die Zellen bis zu 72 h inkubiert. Eine Stunde vor Ende der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe der MTT-Lösung und die UV-spektrometrische Auswertung wie in Kap. 3.3.2 beschrieben.

Des Weiteren wurden Vitalitätsbestimmungen durchgeführt, um den Einfluss von Oligomycin, Ouabain oder Sorafenib auf die Zytotoxizität von Cisplatin näher zu charakterisieren. Dazu wurden 20.000 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht im Inkubator anheften gelassen. Am nächsten Morgen erfolgte die Inkubation mit der entsprechenden Substanz allein oder in Kombination mit Cisplatin und Cisplatin allein analog der Bedingungen des Influxversuchs. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die MTT-Lösung für eine halbe Stunde zugegeben und die Platte wie in Kap. 3.3.2 beschrieben ausgewertet.

In beiden beschriebenen Versuchen wurden die gemessenen Absorptionswerte der unter Standardbedingungen kultivierten Zellen gleich 100 % gesetzt und die Absorptionswerte der behandelten Zellen relativ auf diese bezogen. Lagen die berechneten Werte unter 80 %, so wurden diese Werte nicht in die Auswertung einbezogen.

## **3.4 Bestimmung des Kombinationsindex**

### **3.4.1 Grundlagen**

Um den pharmakologischen Effekt einer Kombination des Tyrosinkinase-Inhibitors Sorafenib mit Cisplatin oder Carboplatin zu charakterisieren, wurde eine Kombinationsanalyse der zu testenden Substanzen in Analogie zum MTT-Assay durchgeführt. Zur Beurteilung, ob ein antagonistischer oder synergistischer Effekt vorliegt, wurde der Kombinationsindex (*combination index*, CI) berechnet [242]. Dieser wurde 1984 von Chou und Talalay eingeführt und seitdem häufig zur quantitativen Auswertung von Kombinationseffekten von Platinverbindungen und verschiedenen antitumoralen Substanzen herangezogen [243-245]. Neben den Konzentrations-Effekt-Kurven der beiden Einzelsubstanzen allein benötigt man zur Berechnung des CI auch die Konzentrations-Effekt-Kurven der Substanzen in verschiedenen Mischungsverhältnissen. Dazu wird eine konstante Konzentration einer Substanz mit variablen Konzentrationen der anderen zu testenden Substanz kombiniert.

Grundlage für die Berechnung des Kombinationsindexes ist die Unterscheidung von sich exklusiv und nicht-exklusiv beeinflussenden Substanzen. Nach der Definition von Chou haben sich exklusiv beeinflussende Substanzen den gleichen Wirkungsmechanismus bzw. das gleiche Target, wohingegen die sich nicht-exklusiv

beeinflussenden Substanzen unterschiedliche Wirkungsmechanismen aufzeigen, bzw. unabhängig voneinander wirken [246].

Für exklusive Substanzen gilt für die Berechnung des Kombinationsindex folgende Gleichung [242]:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} \quad \text{Gl. 3.2}$$

(D)<sub>1</sub>: Konzentration der Testsubstanz 1 in der Kombination mit Testsubstanz 2, bei deren Einsatz die Hälfte der Zellen abstirbt

(D)<sub>2</sub>: Konzentration der Testsubstanz 2 in der Kombination mit Testsubstanz 1, bei deren Einsatz die Hälfte der Zellen abstirbt

(D<sub>x</sub>)<sub>1</sub>: Ermittelte EC<sub>50</sub>-Wert der Testsubstanz 1 allein

(D<sub>x</sub>)<sub>2</sub>: Ermittelte EC<sub>50</sub>-Wert der Testsubstanz 2 allein

Für die Berechnung des Kombinationsindex von nicht-exklusiven Substanzen erweitert sich die Gleichung um einen weiteren Term:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} + \frac{(D)_1 \times (D)_2}{(D_x)_1 \times (D_x)_2} \quad \text{Gl. 3.3}$$

Je nach ermitteltem Wert für den Kombinationsindex kann das Ausmaß der pharmakologischen Interaktion ausgedrückt in Antagonismus bzw. Synergismus abgeschätzt werden (s. Tab. 3.1).

Der genaue Mechanismus der pharmakologischen Interaktion von Sorafenib mit den Platinkomplexen ist nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft noch unklar. Auch wenn beide Substanzgruppen über unterschiedliche Targets ihre antitumorale Wirkung vermitteln (nicht-exklusive Substanzen), kann dennoch eine Abhängigkeit beider Wirkungsmechanismen nicht ausgeschlossen werden. Da Gl. 3.2 (sich exklusive Substanzen) als Goldstandard für die Berechnung des Kombinationsindex angesehen wird [246], wurde diese auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Nach Ergebnissen einer Isobologramm-Analyse von Heim et al. war für diese Kombination ein antagonistischer Effekt zu erwarten [236]. Nach Gl. 3.2 führt die Berechnung des Kombinationsindex eher zu einer Unterschätzung eines möglichen Antagonismus.



Betragen die ermittelten Kombinationsindices weniger als 1,1, so ist der Kombinationsindex erneut nach Gl. 3.3 zu berechnen und das Ergebnis dieser Berechnung bei der Interpretation zu berücksichtigen.

Tab. 3.1: Charakterisierung der Interaktion abhängig vom CI; modifiziert nach Chou [246].

Bereich des CI	Beschreibung der Interaktion
< 0,9	Synergismus
0,9 – 1,1	Additivität
1,1 – 1,2	Schwacher Antagonismus
1,2 – 1,45	Moderater Antagonismus
1,45 – 3,3	Antagonismus
3,3 – 10	Stark ausgeprägter Antagonismus
> 10	Sehr stark ausgeprägter Antagonismus

### 3.4.2 Versuchsbedingungen

Um die pharmakologische Interaktion des Tyrosinkinase-Inhibitors Sorafenib mit Cisplatin bzw. Carboplatin zu beschreiben, wurden Kombinationsversuche von Sorafenib mit jeweils einem der beiden Platinkomplexe durchgeführt. Die Durchführung und die UV-spektrometrische Auswertung dieser Analyse erfolgten analog zu dem in Kap. 3.3.2 beschriebenen MTT-Assay. Jedoch diente hier als Wachstumskontrolle neben dem verwendeten Lösungsmittel der Verdünnungsreihe der Testsubstanz 1 (d.h. entweder Carboplatin, Cisplatin oder Sorafenib), die fixe Konzentration des jeweiligen Kombinationspartners (Testsubstanz 2). Diese wurden zusammen in ein Well pipettiert. Die fixen Konzentrationen wurden in einem Bereich von 0 – 120 % der jeweiligen  $EC_{50}$ -Werte der Einzelsubstanzen eingesetzt und können Tab. 3.2 entnommen werden. Die Inkubation erfolgte über 72 h.

Aus den erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven wurden mit der Software GraphPad PRISM® Version 4.00 mittels nichtlinearer Regression (*sigmoidal dose response curve, bottom > 0, variable slope*) die  $EC_{50}$ -Werte der getesteten Substanzen allein und in Kombination bestimmt. Aus den berechneten Werten wurde anschließend der Kombinationsindex für die jeweilige Kombination nach Gl. 3.2 bestimmt. Die

graphische Darstellung der ermittelten Kombinationsindices erfolgte in einem Box-Whisker-Plot. Die mittleren 50 % der Werte liegen innerhalb der Box, welche durch das untere und obere Quartil begrenzt wird. Die Whisker repräsentieren den minimalen bzw. maximalen Wert der Versuchsreihe.

Tab. 3.2: Fixe Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] der eingesetzten Substanzen in A2780- und A2780cis-Zellen.

Konzentration [% der EC <sub>50</sub> ]	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] (A2780/A2780cis)		
	Carboplatin	Cisplatin	Sorafenib
2,5	0,67/3,34	0,05/0,38	0,06/0,08
10	2,69/13,37	0,22/1,54	0,24/0,31
20	5,38/26,75	0,43/3,07	0,48/0,62
40	10,77/53,49	0,86/6,14	0,96/1,24
60	16,15/80,24	1,29/9,21	1,44/1,87
70	n.b.	n.b./10,75	n.b.
80	21,54/106,99	1,72/12,28	1,92/2,49
81	n.b.	1,75/n.b.	n.b.
90	n.b.	n.b./13,82	n.b.
100 ( $\triangleq$ EC <sub>50</sub> )	26,92/133,74	2,15/15,35	2,40/3,11
105	n.b.	2,25/n.b.	n.b.
120	32,31/160,48	2,58/18,42	2,88/3,73

n.b.: nicht bestimmt

### 3.5 Proteinbestimmung (BCA-Assay)

Bei Zellkulturexperimenten wurden die Ergebnisse, wie z.B. der intrazelluläre Platin- und ATP-Gehalt, auf den zellulären Proteingehalt bezogen, da aufgrund unterschiedlicher Wachstumseigenschaften der sensitiven und resistenten Zellen eine Vergleichbarkeit hinsichtlich der Zellzahl nicht vorausgesetzt werden konnte. Auch für die Analyse der Genexpression auf Proteinebene (s. Kap. 3.9) ist die Bestimmung der

Proteinkonzentration essentiell, um eine konstante Proteinmenge in die Geltaschen auftragen zu können.

### **3.5.1 Grundlagen**

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA (Bicinchoninsäure)-Assay (BCA Protein Assay Kit (Novagen®), Merck KGaA, Darmstadt) nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers bestimmt [247]. Dieser Assay wurde bereits nach den FDA-Richtlinien von unserer Arbeitsgruppe optimiert und teilvalidiert [248]. Die zugrunde liegende Reaktion beruht auf der Biuret-Reaktion. Dabei werden  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch bestimmte Aminosäuren (Cystin, Cystein, Tryptophan, Tyrosin) im alkalischen Milieu zu  $\text{Cu}^+$  reduziert. Zwei Moleküle BCA reagieren mit dem reduzierten Kupfer unter Bildung eines violett gefärbten Chelatkomplexes, dessen Farbintensität photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden kann. Die Menge des gebildeten Farbstoffs ist dabei proportional zum Proteingehalt. Anhand eines parallel vermessenen Standards und einer entsprechenden Kalibrierkurve kann der Proteingehalt einer Probe quantifiziert werden.

### **3.5.2 Versuchsbedingungen**

#### **3.5.2.1 Standardlösungen und Qualitätskontrollproben**

Auf jeder 96-Well-Platte wurden sechs Standardlösungen (S1 – S6) in entsprechender Konzentration in Dreifachbestimmung für die Erstellung einer Kalibriergerade mitvermessen. Diese wurden durch Verdünnung mit sterilem PURELAB® Plus-Wasser aus dem mitgelieferten BSA (bovines Serumalbumin)-Protein-Standard (2 mg/mL) des BCA Protein Assay Kits entsprechend Tab. 3.3 hergestellt.

Zur Qualitätssicherung der Probenmessung dienten Qualitätskontrollproben (QC) in drei Konzentrationen, die den gesamten Kalibrierbereich abdeckten. Diese wurden aus einer von der Herstellung der Standardlösungen differierenden Charge des BSA-Protein-Standards hergestellt und mittels einer Doppelbestimmung vermessen (s. Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Herstellung der Standardlösungen (S) und Qualitätskontrollproben (QC) für den BCA-Assay.

	<b>BSA-Protein-Standard [<math>\mu\text{L}</math>]</b>	<b>PURELAB® Plus-Wasser [<math>\mu\text{L}</math>]</b>
S1 [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	50	1950
S2 [75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	75	1925
S3 [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	100	1900
S4 [200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	200	1800
S5 [300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	300	1700
S6 [400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	400	1600
QC1 [150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	150	1850
QC2 [250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	250	1750
QC3 [350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	350	1650

### 3.5.2.2 Probenaufarbeitung

Zellproben, Standardlösungen und Qualitätskontrollproben wurden in gleicher Weise aufgearbeitet, sodass identische experimentelle Bedingungen gegeben waren. Die aus den Versuchen gewonnene und bis zur Aufarbeitung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefrorene Zellprobe (20  $\mu\text{L}$  Proteinlysat) wurde aufgetaut. Jeweils 40  $\mu\text{L}$  der Standardlösungen und der Qualitätskontrollproben wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die Zellproben wurden mit 10  $\mu\text{L}$  1 M NaOH versetzt, die Standardlösungen und Qualitätskontrollproben mit jeweils 20  $\mu\text{L}$  1 M NaOH. Anschließend wurden die Zellen für 30 min in einem Ultraschallbad bei Raumtemperatur lysiert. Durch Zugabe der gleichen Menge 1 M HCl (äquimolar zu 1 M NaOH) wurden die Lösungen neutralisiert. Um in den Bereich der Kalibriergerade (50 – 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) zu gelangen, wurde jede Probe mit einem entsprechenden Volumen PURELAB® Plus-Wasser verdünnt. Nach sorgfältigem Mischen wurden 20  $\mu\text{L}$  jeder Lösung auf eine unsterile 96-Well-Platte pipettiert. Neben einer Doppelbestimmung der Proben wurden die Standards in einer Dreifachbestimmung und die Qualitätskontrollproben entsprechend der Zellproben vermessen. Mit einer Transferpette® wurden anschließend 200  $\mu\text{L}$  der frisch hergestellten BCA-Arbeitslösung (1 Teil Kupfersulfat 4 %, 50 Teile BCA-Lösung) hinzupipettiert und die

Platte eine Stunde lang bei 60 °C inkubiert. Dabei entstand ein violett gefärbter Chelatkomplex, dessen Farbintensität nach Abkühlen der Platte mit Hilfe des Multiwell-Readers Multiskan EX<sup>®</sup> bei 570 nm vermessen wurde. Aus den bei der Mehrfachbestimmung erhaltenen Mittelwerten wurde mit der Software Microsoft<sup>®</sup> Excel mittels linearer Regression (gewichtet 1/x) eine Kalibriergerade erstellt, die anschließend zur Berechnung des Proteingehalts der Qualitätskontroll- und Zellproben diente.

### 3.5.2.3 Qualitätssicherung

Auf jeder 96-Well-Platte wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Die Kalibrierung wurde akzeptiert, wenn folgende Kriterien erfüllt waren [249]:

- Abweichung der Residuen  $\leq 15 \%$ , am LLOQ (*lower limit of quantification*)  $\leq 20 \%$ , vom nominalen Wert
- Mindestens vier von sechs Standards, einschließlich des LLOQ- und des ULOQ (*upper limit of quantification*)-Standards mussten die obengenannten Kriterien erfüllen
- Korrelationskoeffizient  $r \geq 0,99$  (lineare Regression, gewichtet 1/x)

Zudem wurden auf jeder 96-Well-Platte drei Qualitätskontrollproben mittels einer Doppelbestimmung vermessen. Die berechneten Konzentrationen von mindestens zwei der drei Qualitätskontrollen je Platte sollten dabei nicht mehr als  $\pm 15 \%$  vom nominalen Wert abweichen.

## 3.6 ATP-Biolumineszenz-Assay

### 3.6.1 Grundlagen

Die Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts in den A2780- bzw. A2780cis-Zellen erfolgte mit Hilfe eines ATP-Biolumineszenz-Assays (*ATP Determination Kit*, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) analog der Gebrauchsanweisung des Herstellers [250]. Dieser Assay wurde bereits von Dr. H. Müller an unserem Institut unter Verwendung des Multiwell-Readers LUMIstar<sup>™</sup> Optima etabliert [251]. In Zusammenarbeit mit Dipl.-

Pharm. M. Borrmann (Arbeitskreis Prof. Dr. G. Bendas, Dissertation in Vorbereitung) wurde die bestehende Methode angepasst und optimiert.

Der ATP-Biolumineszenz-Assay beruht auf der durch das Enzym Luciferase katalysierten Reaktion zwischen ATP und D-Luciferin (s. Abb. 3.1), bei der neben Oxyluciferin in Gegenwart von Sauerstoff und  $Mg^{2+}$ -Ionen Energie in Form von Licht freigesetzt wird. Das emittierte Licht kann als Signal mit einem Luminometer bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden. Das Signal ist dabei proportional zu der in der Zelle befindlichen ATP-Menge [252,253]. Das Ergebnis wird als relative Lichteinheit (RLU) angegeben. Anhand parallel vermessener Standardlösungen und einer entsprechenden Kalibrierkurve kann der ATP-Gehalt einer Probe in Bezug auf den zellulären Gesamtproteingehalt quantifiziert werden. Mit dieser sehr empfindlichen Methode können bereits ATP-Konzentrationen im picomolaren Bereich detektiert werden.

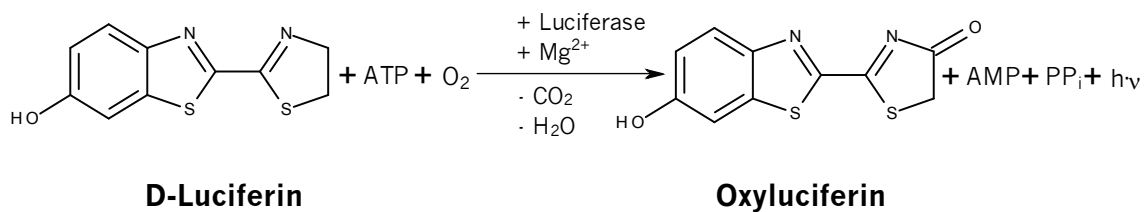


Abb. 3.1: Umwandlung von D-Luciferin zu Oxyluciferin in Gegenwart von ATP.

### 3.6.2 Optimierung der Methode

Voraussetzung für die quantitative Bestimmung von ATP mittels der Biolumineszenz-Methode ist die vollständige Lyse der Zellmembran und die dadurch bedingte Freisetzung von intrazellulärem ATP. Nur extrazellulär vorliegendes ATP kann als Cofaktor die Energie für die enzymatische Reaktion liefern. Nach der Methode von Dr. H. Müller wurden hierzu die sich noch im Medium befindenden Zellen mit einem tritonhaltigen Lyseagensatz (Tritonkonzentration: 10 %) versetzt und 15 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> lysiert [251]. In unserer Versuchsreihe wurde als Lyseagensatz ebenfalls 10 %ige Triton-Lösung verwendet, welches analog dieser Methode zu den in Medium befindlichen Zellen pipettiert wurde [254]. Eine stetige Abnahme der Lumineszenz im Verlauf der Messung im Reader (s. Kap. 4.2.1), machte eine Optimierung der Lysebedingungen erforderlich. Da möglicherweise im Serum enthaltene Enzyme die

Lumineszenz beeinflussen können, wurde in einem neuen Versuchsansatz die Lumineszenz der Zellen in PBS-Puffer, Nährmedium mit FKS und Nährmedium mit inaktiviertem FKS untersucht. Die Inaktivierung des FKS wurde durch 30-minütiges Erhitzen auf 60 °C erreicht und sollte die enthaltenen Serumbestandteile wie z.B. Enzyme und Wachstumsfaktoren inaktivieren. Zunächst wurden die Zellen in Nährmedium ausgesät und nach Adhäsion der Zellen über Nacht dieses durch die obengenannten Medien bzw. PBS-Puffer ausgetauscht. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 10 %iger Triton-Lösung, sodass eine Endkonzentration von 1 % Triton resultierte. Die Anwendung der optimierten Methode wird in Kap. 3.6.4 beschrieben.

### 3.6.3 Validierung der Methode

Da diese Methode bereits von Dr. H. Müller etabliert wurde und es sich bei dem *ATP Determination Kit* der Firma Invitrogen um ein kommerzielles Kit handelt, wurde auf eine vollständige Validierung verzichtet [251]. Lediglich die Linearität, Präzision, Richtigkeit und Wiederfindung der optimierten Methode wurden nach den FDA-Richtlinien überprüft [249]. Die Nachweisgrenze wurde von der Firma mit 0,1 pmol ATP angegeben [250]. Die Linearität der Methode, die den Zusammenhang zwischen ATP-Konzentration und gemessener Lumineszenz zeigt, wurde mittels linearer Regression (ungewichtet) ermittelt. Zur Erstellung der Kalibriergerade wurden sechs verschiedene Standardkonzentrationen (S1 – S6) verwendet. Diese wurden aus der ATP-Arbeitslösung 2 (ATP-AL 2, Herstellung s. 3.1.5) durch Verdünnung mit sterilem PURELAB® Plus-Wasser analog Tab. 3.4 hergestellt, aliquotiert und anschließend bei –20 °C gelagert. Die Stabilität der ATP-Lösung wurde von der Firma Invitrogen unter diesen Lagerbedingungen mit mehr als einem halben Jahr angegeben [250].

Zur Beurteilung der linearen Regression wurden die Validierungskriterien der FDA für bioanalytische Methoden herangezogen [249]:

- Korrelationskoeffizient  $r \geq 0,99$  (lineare Regression, ungewichtet)
- Abweichung der Residuen  $\leq 15 \%$ , am LLOQ  $\leq 20 \%$ , vom nominalen Wert

Darüber hinaus wurde die Präzision (Within-day- und Between-day-Präzision) und die Richtigkeit (Within-day- und Between-day-Richtigkeit) der modifizierten Methode bestimmt. Zur Ermittlung der Präzision und Richtigkeit wurden drei Qualitätskontroll-

proben (3  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$ ) unabhängig von den Standardlösungen und aus einer anderen Charge der ATP-Lösung (5 mM) entsprechend Tab. 3.4 hergestellt.

Tab. 3.4: Herstellung der Standardlösungen (S) und Qualitätskontrollproben (QC) für den ATP-Assay.

	<b>ATP-AL 2 (100 <math>\mu\text{M}</math>) [<math>\mu\text{L}</math>]</b>	<b>PURELAB<sup>®</sup> Plus-Wasser [<math>\mu\text{L}</math>]</b>
S1 [1 $\mu\text{M}$ ]	5	495
S2 [2 $\mu\text{M}$ ]	10	490
S3 [5 $\mu\text{M}$ ]	25	475
S4 [15 $\mu\text{M}$ ]	75	425
S5 [25 $\mu\text{M}$ ]	125	375
S6 [50 $\mu\text{M}$ ]	250	250
QC1 [3 $\mu\text{M}$ ]	15	485
QC2 [20 $\mu\text{M}$ ]	100	400
QC3 [40 $\mu\text{M}$ ]	200	300

Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie den gesamten Kalibrierbereich abdeckten. Für die Bestimmung der Methodenpräzision (Within-day-Präzision) wurden drei Qualitätskontrollproben mit unterschiedlicher Konzentration fünfmal jeweils unabhängig voneinander hergestellt und vermessen. Die Vergleichspräzision (Between-day-Präzision) wurde durch Vermessen der gleichen Qualitätskontrollproben an fünf aufeinander folgenden Tagen bestimmt. Um zu vermeiden, dass wiederholte Einfrier-Auftau-Vorgänge Einfluss auf die Stabilität der Proben haben, wurden die Qualitätskontrollproben aliquotiert und bis zur Vermessung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Aus den gemessenen Daten wurde als Maß für die Präzision die relative Standardabweichung (RSD) berechnet. Diese sollte unter 15 % liegen; im Bereich des LLOQ wurden Werte  $\leq 20\%$  toleriert.

Anhand der über die Kalibriergeraden errechneten Konzentration der eingesetzten Qualitätskontrollproben, wurde sowohl an einem Tag als auch an fünf aufeinander folgenden Tagen die Richtigkeit (Within-day- bzw. Between-day-Richtigkeit) ermittelt. Als statistische Größe wurde der relative Fehler (RE) berechnet, dessen Wert 15 % (bzw. 20 % im Bereich des LLOQ) nicht übersteigen sollte.



Die Wiederfindung wurde unter Verwendung von Zelllysats als Probenmatrix ermittelt. Dazu wurden die ATP-Standardlösungen und Qualitätskontrollproben zum Zelllysats pipettiert (sog. „spiken“). Anschließend wurde der ATP-Gehalt des reinen Zelllysats als auch der gespikten Proben vermessen. Die auf diese Weise erhaltenen Lumineszenzwerte wurden mit den Werten verglichen, die bei der Vermessung der ATP-Lösungen in reiner Triton-Lösung bestimmt wurden. Die Messungen wurden insgesamt sechsmal durchgeführt. Die Wiederfindung wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$W [\%] = \frac{L_s - L_u}{L_a} \cdot 100 \% \quad \text{Gl. 3.4}$$

- W: Wiederfindung  
L<sub>s</sub>: Lumineszenz der gespikten Lösung  
L<sub>u</sub>: Lumineszenz der ungespikten Lösung  
L<sub>a</sub>: Lumineszenz des reinen Analyten

Die Wiederfindung sollte in einem Bereich von  $\pm 15 \%$  liegen [249].

### 3.6.4 Versuchsbedingungen

Zur Messung wurden speziell für Lumineszenzmessungen entwickelte weiße 96-Well-Platten von Nunc™ verwendet. Die weißen Platten gewährleisteten eine maximale Reflektion des emittierten Lichts und eine geringe Autolumineszenz. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Aussaat von 20.000 Zellen/Well in Nährmedium in die weißen 96-Well-Platten. Parallel hierzu wurden Zellen in eine klare 96-Well-Platte ausgesät, in der die Proteinbestimmung (detaillierter Versuchsablauf wird in Kap. 3.6.5.1 beschrieben) durchgeführt wurde. Die 96-Well-Platten wurden über Nacht im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Als Verdunstungsschutz diente PBS-Puffer in den äußeren Wells. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Substanzen entsprechend der Fragestellung (s. Kap. 3.6.6 – 3.6.8). Alle Konzentrationen wurden im Triplikats vermessen. Nach dem Ende der Inkubationsphase wurden das Nährmedium und der PBS-Puffer durch vorsichtiges Ausschlagen der 96-Well-Platten auf Zellstoff entfernt.

Die 96-Well-Platte, die der Bestimmung der Proteine diene, wurde vorsichtig mit 100  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer gespült, um Reste des Nährmediums aus den Wells zu entfernen und erneut ausgeschlagen. Damit wurde vermieden, dass im Nährmedium enthaltene Proteine die spätere Proteinquantifizierung verfälschen. Die 96-Well-Platte wurde bis zur Proteinbestimmung mittels BCA-Assay (s. Kap. 3.6.5.1) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Zellen in der weißen 96-Well-Platte für die ATP-Bestimmung wurden durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  1 %iger Triton-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Dadurch wurde das intrazelluläre ATP freigesetzt. Die nach Kap. 3.6.3 hergestellten Standardlösungen (S1 – S6) und Qualitätskontrollproben (QC1 – QC3) wurden wie in Abb. 3.2 dargestellt auf die 96-Well-Platte pipettiert. Damit für die Zellproben, Standardlösungen und Qualitätskontrollproben identische experimentelle Bedingungen gegeben waren, wurden die Standardlösungen und Qualitätskontrollproben in gleicher Weise wie die Zellproben mit 1 %iger Triton-Lösung inkubiert. In die äußeren Wells, in denen sich zuvor nur PBS-Puffer befand, wurden dazu 90  $\mu\text{L}$  der Triton-Lösung pipettiert und diese jeweils mit 10  $\mu\text{L}$  Standardlösung bzw. Qualitätskontrollprobe versetzt, sodass sich eine Kalibriergerade in einem Konzentrationsbereich von 0,1 – 5  $\mu\text{M}$  ATP ergab.

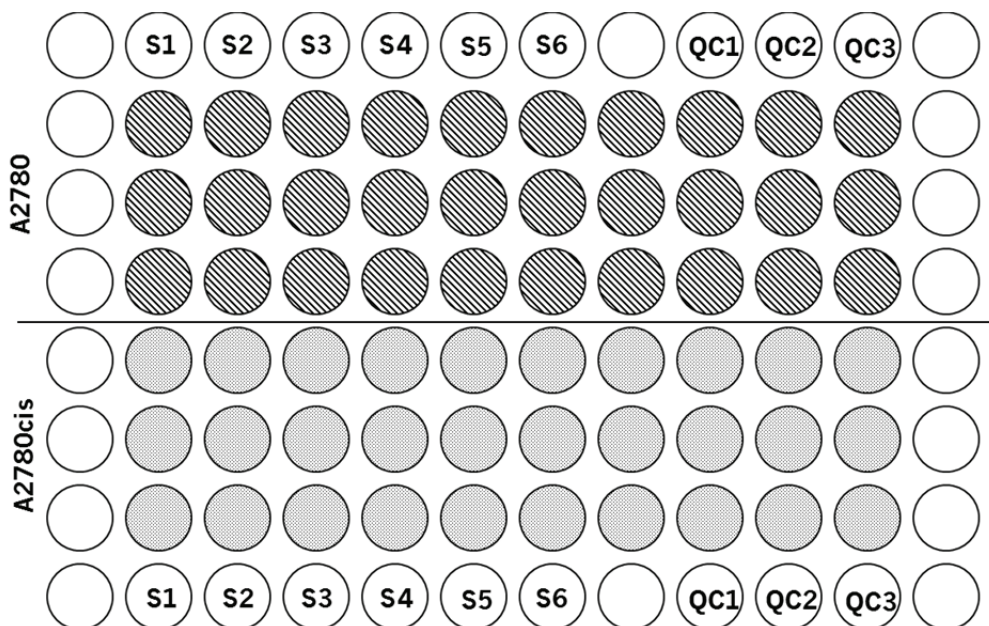
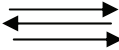


Abb. 3.2: Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte für den ATP-Assay. ○: Well mit PBS-Puffer, ◐: Well mit A2780-Zellen, ◑: Well mit A2780cis-Zellen, QC1 – QC3: Qualitätskontrollproben, S1 – S6: Standardlösungen.

Nach Ablauf der Lysezeit wurde der ATP-Gehalt im Multiwell-Reader LUMIstar™ Optima, der auf 28 °C vorgeheizt wurde, bei einer Wellenlänge von 562 nm vermessen. Die benötigten Geräteeinstellungen können Tab. 3.5 entnommen werden.

Tab. 3.5: *Geräteeinstellungen des Multiwell-Readers LUMIstar™ Optima.*

<b>Einstellungen</b>	
Messmodus	Well
Anzahl der Intervalle	80
Messzeit pro Intervall	0,1 s
Intervall zwischen zwei Reihen	0,5 s
Injektionsvolumen	30 µL
Pumpgeschwindigkeit	310 µL/s
<i>Required value</i>	40 %
<i>Gain</i>	4095
Leserichtung	

Der Multiwell-Reader injiziert automatisch mit Hilfe eines Pumpsystems 30 µL der ATP-Standardreaktionslösung (Herstellung s. Tab. 3.6) in jedes einzelne Well und vermisst direkt im Anschluss die Lumineszenz des Wells.

Tab. 3.6: *Herstellung der ATP-Standardreaktionslösung.*

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen [mL]</b>
PURELAB® Plus-Wasser	8,9
Reaktionspuffer, 20 x	0,5
D,L-Dithiothreitol (DTT) (0,1 M)*	0,1
D-Luciferin (10 mM)*	0,5
Luciferase, <i>firefly</i> (5 mg/mL)	0,0025

\* D-Luciferin und DTT wurden entsprechend der Produktinformation des ATP Determination Kits hergestellt und gelagert [250].

Die benötigte Menge ATP-Standardreaktionslösung wurde vor jedem Versuch bis auf den Zusatz der Luciferase hergestellt und unter Lichtschutz aufbewahrt. Kurz vor der Messung erfolgte die Zugabe der Luciferase. Da diese sehr instabil ist, wurde die Lösung zur Durchmischung nur leicht geschwenkt. Vor der Messung wurde das Schlauchsystem des Readers einmal mit der ATP-Standardreaktionslösung durchgespült.

#### **3.6.4.1 Datenauswertung**

Für jedes Well wurde die Lumineszenz über 80 Intervalle vermessen, was einer Zeitdauer von ca. 8 s/Well entspricht. Aus den letzten 20 Intervallwerten der Enzymkinetik (Plateauphase) wurde der Mittelwert der Lumineszenzeinheit (Relative Lichteinheit, RLU) für jedes Well berechnet. Aus den bei der Doppelbestimmung erhaltenen Mittelwerten wurde mit der Software Microsoft® Excel mittels linearer Regression (ungewichtet) eine Kalibriergerade erstellt, die anschließend zur Berechnung des ATP-Gehalts der Qualitätskontroll- und Zellproben diente.

Da die Lumineszenzwerte aufgrund der unterschiedlichen Aktivität der Luciferase an verschiedenen Versuchstagen nicht vergleichbar waren, wurde die Wachstumskontrolle des jeweiligen Versuchstages gleich 100 % gesetzt und die Werte der behandelten Zellen bzw. der einzelnen Zeitpunkte prozentual auf diesen Kontrollwert bezogen.

Für die Quantifizierung des intrazellulären ATP-Gehalts wurde die ATP-Konzentration anhand der Standardkurve berechnet und in pM bezogen auf den zellulären Proteingehalt [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] angegeben.

#### **3.6.4.2 Qualitätssicherung**

Auf jeder 96-Well-Platte wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Die Kalibrierung wurde akzeptiert, wenn folgende Kriterien erfüllt waren [249]:

- Korrelationskoeffizient  $r \geq 0,99$  (lineare Regression, ungewichtet)
- Abweichung der Residuen  $\leq 15 \%$ , am LLOQ  $\leq 20 \%$ , vom nominalen Wert
- Mindestens vier von sechs Standards, einschließlich des LLOQ- und des ULOQ-Standards, mussten die obengenannten Kriterien erfüllen

Zudem wurden auf jeder 96-Well-Platte drei Qualitätskontrollproben mittels einer Doppelbestimmung vermessen. Die berechneten Konzentrationen von mindestens zwei der drei Qualitätskontrollproben je Platte sollten dabei nicht mehr als  $\pm 15\%$  von den nominalen Werten abweichen.

### **3.6.5 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts bezogen auf den Proteingehalt**

Der intrazelluläre ATP-Gehalt ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig, unter anderem von den Wachstumsbedingungen, der Zellzahl und der Phase des Zellzyklus [255]. Um den ATP-Gehalt quantifizieren zu können, ist es aus diesen Gründen essentiell, die Versuchsbedingungen so konstant wie möglich zu halten. Die Zellen, die der ATP-Quantifizierung dienten, wurden dementsprechend einen Tag vor dem Versuch mit frischem Nährmedium versorgt, zur gleichen Zeit in die 96-Well-Platten ausgesät, inkubiert und mit Hilfe des Luminometers vermessen. Hierzu wurden die Wachstumskontrollen der ATP-Kinetik-Versuche (s. Kap. 3.6.6) verwendet, da diese den vorhergenannten Anforderungen entsprachen.

Da die Zellzahl aufgrund unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeiten und Zellgröße der verwendeten Zelllinien nicht als Bezugsgröße herangezogen werden konnte, wurde der ATP-Gehalt der Zelle als ATP/Protein [ $\text{pmol}/\mu\text{g}$ ] angegeben. Zu diesem Zweck wurde in Zusammenarbeit mit Dipl.-Pharm. M. Borrmann (Arbeitskreis Prof. Dr. G. Bendas, Dissertation in Vorbereitung) eine Proteinbestimmung basierend auf dem BCA-Assay in einer 96-Well-Platte etabliert und hinsichtlich der Between-day-Präzision und -Richtigkeit teilvalidiert. Die methodische Durchführung wird im nachfolgenden Kapitel erläutert.

#### **3.6.5.1 Bestimmung des Proteingehalts von Zellproben in einer 96-Well-Platte**

Die Bestimmung der Proteine erfolgte größtenteils wie bereits in Kap. 3.5.2 beschrieben. Da sich die Zellproben in einer 96-Well-Platte befanden, musste jedoch einige Schritte der Probenaufarbeitung angepasst werden.

Die aus den Versuchen gewonnenen (s. Kap. 3.6.4) und anschließend bei  $-20\text{ °C}$  gelagerten 96-Well-Platten wurden nach dem Auftauen mit  $20\ \mu\text{L}$  PBS-Puffer pro Well versetzt. Eine weitere unsterile 96-Well-Platte wurde für die Standardlösungen bzw. Qualitätskontrollproben vorbereitet. In diese wurden jeweils  $40\ \mu\text{L}$  der Standardlösung

bzw. der Qualitätskontrollprobe (s. Tab. 3.3) pipettiert. Zur Zelllyse wurden mit der Mehrkanalpipette 10  $\mu\text{L}$  1 M NaOH zu jeder Zellprobe bzw. 20  $\mu\text{L}$  zu jeder Standardlösung bzw. Qualitätskontrollprobe hinzupipettiert. Die Platten wurden anschließend für 30 min auf den Schüttelinkubator (Stufe 7 – 8) bei Raumtemperatur inkubiert. Die vollständige Zelllyse wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe der gleichen Menge 1 M HCl (äquimolar zu 1 M NaOH) wurden die Lösungen neutralisiert. Um in den Bereich der Kalibriergerade (50 – 400  $\mu\text{g}$  Protein/mL) zu gelangen, wurde jede Probe mit 20  $\mu\text{L}$  PURELAB® Plus-Wasser verdünnt. Anschließend wurden die Platten zur kurzen Durchmischung nochmals für 1 min auf den Schüttelinkubator (Stufe 7 – 8) gestellt. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren, welches der Durchmischung der Lösungen dienen sollte, wurden jeweils 20  $\mu\text{L}$  der Lösung mit Hilfe einer Multikanalpipette auf eine neue unsterile 96-Well-Platte übertragen. Neben einer Doppelbestimmung der Zellproben wurden die Standardlösungen in einer Dreifachbestimmung und die Qualitätskontrollproben entsprechend der Proben vermessen. Die Herstellung und Zugabe der BCA-Arbeitslösung und die UV-spektrometrische Auswertung bei 570 nm erfolgte, wie unter 3.5.2 beschrieben.

### 3.6.5.2 Validierung der Methode

Die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von ATP bezogen auf den Proteingehalt wurde durch die Bestimmung der Between-day-Präzision und -Richtigkeit sichergestellt. Zur Berechnung der Präzision und Richtigkeit wurden die Ergebnisse aus den ATP-Kinetik-Versuchen nach Inkubation mit Cisplatin verwendet. Auf jeder Platte wurden bei diesen Versuchen zwei Wachstumskontrollen mitvermessen. Der ATP/Protein-Gehalt der Wachstumskontrolle 1 (WK 1) wurde dabei gleich 100 % gesetzt und der ATP/Protein-Gehalt der 2. Wachstumskontrolle prozentual auf diesen Wert bezogen. Die berechneten prozentualen Werte der Wachstumskontrolle 2 wurden dann zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit herangezogen.

Für die Richtigkeit und Präzision wurden die Akzeptanzkriterien der FDA-Richtlinie angenommen [249], wonach der relative Fehler (RE) bzw. die relative Standardabweichung (RSD) unter 15 % liegen sollte.



### 3.6.6 Messung der ATP-Kinetik

Der Einfluss verschiedener Cisplatinkonzentrationen (5, 25 und 100  $\mu\text{M}$ ) auf den intrazellulären ATP-Gehalt der beiden Zelllinien wurde zum einem unter glucosehaltigen und zum anderen unter glucosefreien Bedingungen untersucht. Hierzu wurden die Zellen wie in Kap. 3.6.4 beschrieben ausgesät. Nach der Adhäsion der Zellen wurde das Nährmedium gegen glucosefreies bzw. -haltiges Medium ausgetauscht. Anschließend wurden die Platten mit einer Cisplatin-Lösung entsprechender Konzentration versetzt. Das Pipettierschema ist in Abb. 3.3 dargestellt. Zu den Wachstumskontrollen wurde sterile 0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung pipettiert. Zwischen den einzelnen Inkubationszeitpunkten wurden die Platten zurück in den Inkubator gestellt (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ). Die Proben auf der 96-Well-Platte (0 – 12 h) wurden zum Zeitpunkt 0 analog 3.6.4 aufgearbeitet und vermessen, wohingegen die Proben auf der zweiten Platte (12 – 24 h) erst nach einer weiteren Inkubationszeit von 12 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  aufgearbeitet und vermessen wurden. Die Datenauswertung erfolgte wie unter Kap. 3.6.4.1 beschrieben.

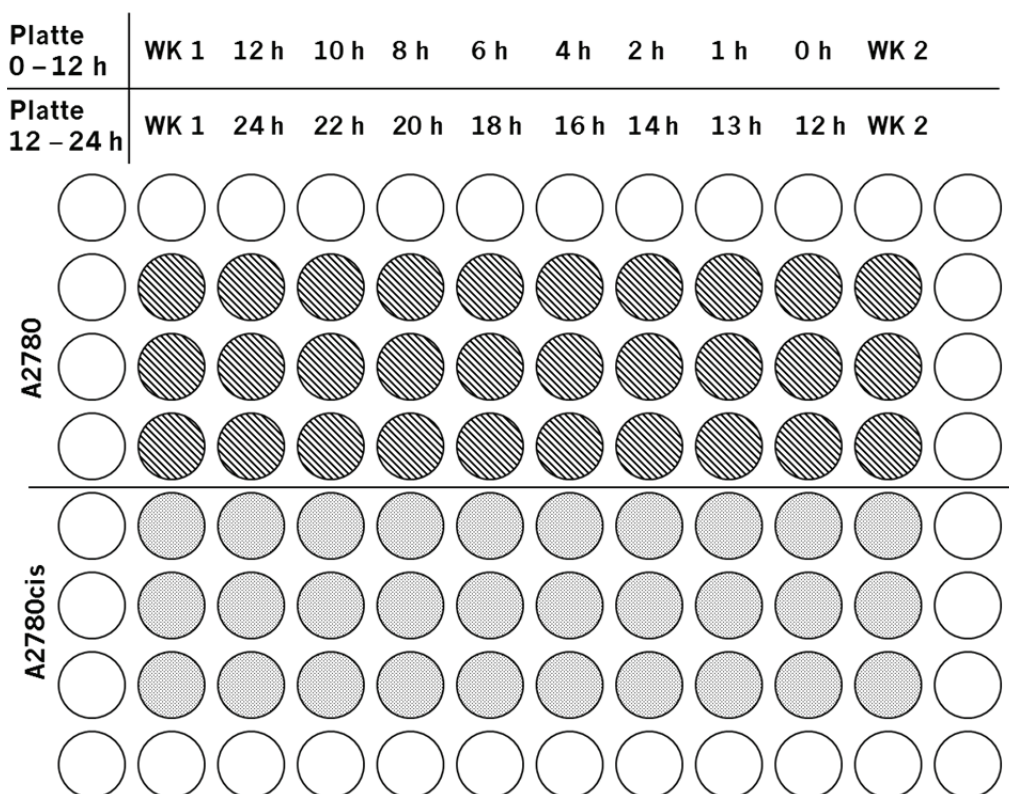


Abb. 3.3: Pipettierschema für die Messung der ATP-Kinetik (0 – 24 h) unter Einfluss von Cisplatin.

### 3.6.7 Versuche mit ATP-Depletion

Der intrazelluläre ATP-Gehalt kann durch Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette reduziert werden. Zu diesem Zweck können neben den Entkopplern der Atmungskette (z.B. 2,4-Dinitrophenol (DNP)) und Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung (z.B. Oligomycin) auch Inhibitoren der Elektronentransportkette (Komplex I – IV) eingesetzt werden. Letztgenannte sind dafür bekannt, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu induzieren, die in der Zelle die Apoptose auslösen können [138]. Aus diesem Grund wurden für die ATP-Depletionsversuche DNP und Oligomycin ausgewählt. Diese Versuche hatten das Ziel, den intrazellulären ATP-Gehalt zu minimieren, um unter energiereduzierten Bedingungen die Platinsensitivität zu charakterisieren. Es wurde darauf geachtet, dass der ATP-Gehalt nicht auf Werte unter 20 % (bezogen auf die Wachstumskontrolle) reduziert wurde, um durch Verlust der Zellvitalität ausgelöste unspezifische Effekte zu vermeiden [256,257]. Die Optimierung der Versuchsbedingungen (Inkubationsmedium, Inkubationsdauer und Konzentration des ATP-Depletors) wurde unter Verwendung von Oligomycin durchgeführt. Diese Versuche sollten eine ausreichende Senkung des intrazellulären ATP-Gehalts sicherstellen.

#### 3.6.7.1 Versuche zur Optimierung der Depletionsbedingungen (Oligomycin)

##### *Inkubationsbedingungen*

Zunächst wurden die Inkubationsbedingungen für die Depletionsversuche optimiert. Dazu wurden die Zellen über einen Zeitraum von 120 min mit 1  $\mu$ M Oligomycin inkubiert. Die Konzentration wurde auf der Grundlage der Ergebnisse der Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte von Oligomycin für das verwendete Zelllinienpaar ausgewählt. Zu der Kontrollreihe wurde entsprechend oligomycinfreies Medium pipettiert. Dieser Versuch wurde zunächst unter glucosehaltigen Bedingungen und anschließend unter glucosefreien Bedingungen durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen analog Kap. 3.6.4 aufgearbeitet und analysiert und die Ergebnisse nach Kap. 3.6.4.1 ausgewertet.

##### *Auswahl der Konzentration*

Um die optimale Oligomycinkonzentration zu finden, die den intrazellulären ATP-Gehalt ausreichend reduziert, wurde der Einfluss unterschiedlicher Oligomycin-



konzentrationen (0,01 – 1  $\mu\text{M}$ ) auf den intrazellulären ATP-Gehalt untersucht. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Oligomycinkonzentrationen über einen Zeitraum von 45 min in glucosefreiem Medium inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen entsprechend Kap. 3.6.4 aufgearbeitet und analysiert und die Ergebnisse nach Kap. 3.6.4.1 ausgewertet.

#### *Auswahl der Inkubationszeit*

Zur Untersuchung der optimalen Inkubationsdauer wurden die Zellen über 2 h mit 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin in glucosefreiem Medium inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen entsprechend Kap. 3.6.4 aufgearbeitet und analysiert und die Ergebnisse nach Kap. 3.6.4.1 ausgewertet.

#### *Wiederherstellung des ATP-Gehalts*

Um zu zeigen, dass die Zellen nicht irreversibel durch die Behandlung mit Oligomycin geschädigt wurden bzw. um die Inkubationsbedingungen für die Kumulationsversuche näher zu definieren, wurden die Zellen über 60 min mit 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin unter glucosefreien Bedingungen behandelt und das oligomycinhaltige Medium nach Ablauf der Inkubationszeit entfernt. Anschließend wurde frisches Nährmedium mit bzw. ohne Glucose zur weiteren Inkubation zugegeben und der Verlauf des ATP-Gehalts prozentual bezogen auf die Wachstumskontrolle untersucht. Nach der Inkubation wurden die Zellen entsprechend Kap. 3.6.4 aufgearbeitet und analysiert und die Ergebnisse nach Kap. 3.6.4.1 ausgewertet.

Ausgehend von den Ergebnissen der Optimierungsversuche wurden die Bedingungen für die Platinkumulationsversuche festgelegt (siehe Tab. 3.7).

*Tab. 3.7: Bedingungen für die Platinkumulationsexperimente unter ATP-Depletion.*

<b>Substanz</b>	Oligomycin
<b>Inkubationsmedium</b>	RPMI-1640 Medium (ohne Glucose)
<b>Konzentration</b>	1 $\mu\text{M}$
<b>Präinkubation; anschließende Koinkubation mit Cisplatin</b>	30 min; entsprechend der Inkubationsdauer mit Cisplatin

### 3.6.7.2 Versuche zur Optimierung der Depletionsbedingungen (2,4-Dinitrophenol)

Ausgehend von den Optimierungsversuchen mit Oligomycin, wurden die Depletionsversuche mit 2,4-Dinitrophenol (DNP) direkt in glucosefreiem Medium durchgeführt. Dabei wurden verschiedene DNP-Konzentrationen (50 und 100  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von 2 h getestet. Die Zellen wurden anschließend wie unter 3.6.4 beschrieben aufgearbeitet und luminometrisch ausgewertet. Die Datenauswertung erfolgte analog Kap. 3.6.4.1.

### 3.6.8 Inkubation mit Ouabain oder Sorafenib

#### *Ouabain*

Über einen Inkubationszeitraum von 120 min wurden die Zellen in glucosehaltigem Medium zu verschiedenen Zeitpunkten mit 50 nM Ouabain versetzt. Zu der Kontrollreihe wurde ouabainfreies Medium pipettiert. Analog wurde dieser Versuch unter glucosefreien Bedingungen durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen entsprechend Kap. 3.6.4 aufgearbeitet und analysiert und die Ergebnisse nach Kap. 3.6.4.1 ausgewertet.

#### *Sorafenib*

Insgesamt wurden zwei verschiedene Versuche durchgeführt.

Im ersten Versuch wurden die Zellen in glucosehaltigem Medium zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Inkubationszeitraum von 6 h mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib versetzt. Zu der Kontrollreihe wurde sorafenibfreies Medium pipettiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen entsprechend Kap. 3.6.4 aufgearbeitet und analysiert und die Ergebnisse nach Kap. 3.6.4.1 ausgewertet.

Im zweiten Versuch wurden die Zellen über 4 h mit unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen (0,5 – 100  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Zu der Kontrollreihe wurde sorafenibfreies Medium pipettiert. Der Versuch wurde sowohl unter glucosehaltigen als auch unter glucosefreien Bedingungen durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen entsprechend Kap. 3.6.4 aufgearbeitet und analysiert und nach Kap. 3.6.4.1 ausgewertet.

## **3.7 Platin-Analytik (Atomabsorptionsspektrometrie)**

### **3.7.1 Grundlagen**

Die Bestimmung des intrazellulären Platingehalts nach den Inkubationsversuchen mit Cisplatin bzw. Carboplatin erfolgte spektralanalytisch mittels flammenloser Atomabsorptionsspektrometrie (AAS). Diese Methode wurde von Kloft et al. entwickelt und von Dr. A. C. Pieck an dem Spektrometer SpectrAA® Zeemann 220 (Varian, Darmstadt) modifiziert und validiert [258,259]. Da dieses Gerät auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, war eine erneute Validierung bzw. Teilvalidierung der bestehenden Methoden nicht erforderlich. Für die Bestimmung von Platin in Zelllysaten wurden eine Methode mit Einfachinjektion (Pt 1-fach) und eine mit Dreifachinjektion (Pt 3-fach) verwendet. Der Messbereich dieser Methoden liegt bei 5 – 50 ng Platin/mL bzw. 1 – 10 ng Platin/mL.

Das Atomabsorptionsspektrometer setzt sich zusammen aus einem Graphitrohrföfen (Atomisierungseinheit), einer Platin-Hohlkathodenlampe (Lichtquelle), einem Monochromator (265,9 nm) und einem automatischen, programmierbaren Probengeber. Durch stufenweises Erhitzen der platinhaltigen Probenlösung auf 2700 °C werden die Platinatome über einen Veraschungsschritt atomisiert. Im atomisierten Zustand sind diese in der Lage, elementspezifische Strahlung zu absorbieren. Die absorbierte Lichtmenge ist dabei proportional zur Menge des in der Probe befindlichen Platins. Dieser Zusammenhang kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes beschrieben werden. Als Messsignal wird die Abschwächung der Intensität des eingestrahlt Lichts (Extinktion) detektiert.

Anhand eines parallel vermessenen Standards und einer entsprechenden Kalibrierkurve wurde der Platingehalt quantifiziert. Die ermittelten Werte für den intrazellulären Platingehalt wurden auf den zellulären Proteingehalt bezogen [ $\mu\text{mol Platin/g Protein}$ ].

### **3.7.2 Versuchsbedingungen**

#### **3.7.2.1 Kalibrierung**

Zu Beginn eines Analysenlaufs wurde zunächst eine Kalibriergerade aufgenommen. Je nach verwendeter Methode wurde die Kalibratorlösung mit der höchsten

Konzentration [10 bzw. 50 ng/mL] durch Verdünnen der Cisplatin-Arbeitslösung 2 (Herstellung s. 3.1.5) mit 6,5 %iger Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>) hergestellt. Aus dieser Kalibratorlösung erfolgte die vollautomatische Kalibrierung durch den Autosampler des Gerätes. Die entsprechenden Konzentrationen der Kalibratorlösungen sind in Tab. 3.8 aufgeführt.

Tab. 3.8: Konzentrationen der Kalibratorlösungen [ng Platin/mL].

Methode	Kalibratorlösung (ng Pt/mL)						
	1	2	3	4	5	6	7
<b>Pt 1-fach</b> [5 – 50 ng/mL]	5	10	20	30	40	50	/
<b>Pt 3-fach</b> [1 – 10 ng/mL]	1	2	3	4	5	7,5	10

/: entfällt

Zur Qualitätssicherung während der Messung dienen QC in drei verschiedenen Konzentrationen, die den gesamten Kalibrierbereich abdecken. Diese wurden aus einer von der Herstellung der Kalibratorlösung differierenden Cisplatin-Arbeitslösung 2 durch Verdünnen mit 6,5 %iger Salpetersäure hergestellt (s. Tab. 3.9).

Tab. 3.9: Konzentrationen der Qualitätskontrollproben [ng Platin/mL].

Methode	Qualitätskontrollproben [ng Pt/mL]		
	QC1	QC2	QC3
<b>Pt 1-fach</b> [5 – 50 ng/mL]	10	20	40
<b>Pt 3-fach</b> [1 – 10 ng/mL]	2,5	5	7,5

### 3.7.2.2 Probenaufarbeitung

Die aus den Zellinkubationsversuchen (s. Kap. 3.8) gewonnenen und bis zur Aufarbeitung bei –20 °C eingefrorenen Zellpellets wurden mit konzentrierter Salpetersäure (65 %) versetzt und für 1 h im Wasserbad bei 80 °C bis zur vollständigen

Zelllyse inkubiert. Nach Abkühlen der Probenlösungen wurden diese nach einem Zentrifugationsschritt mit einer entsprechenden Menge PURELAB® Plus-Wasser versetzt, sodass die Platinkonzentration der Probe im Kalibrierbereich der Messung lag. Anschließend wurden die Proben je nach Platingehalt mittels Einfach- bzw. Dreifachinjektion vermessen. Lagen die gemessenen Platinkonzentrationen oberhalb des Kalibrierbereiches, so wurden diese automatisch durch den Autosampler mit 6,5 %iger HNO<sub>3</sub> verdünnt. Aus den bei der Mehrfachbestimmung erhaltenen Mittelwerten wurde mit der Software Microsoft® Excel mittels linearer Regression (ungewichtet) eine Kalibriergerade erstellt, die anschließend zur Berechnung des Platingehalts der Qualitätskontroll- und Zellproben diente.

### 3.7.2.3 Qualitätssicherung

Vor jedem Analysenlauf wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Die Kalibrierung wurde akzeptiert, wenn folgende Kriterien erfüllt waren [249]:

- Abweichung der Residuen  $\leq 15\%$ , am LLOQ  $\leq 20\%$ , vom nominalen Wert
- Mindestens vier von sechs Standards, einschließlich des LLOQ- und des ULOQ-Standards, mussten obengenannte Kriterien erfüllen
- Korrelationskoeffizient  $r \geq 0,99$  (lineare Regression, ungewichtet)

Zudem wurden drei Qualitätskontrollproben unterschiedlicher Konzentration vermessen. Die berechneten Platinkonzentrationen von mindestens zwei der drei Qualitätskontrollproben je Analysenlauf sollten dabei nicht mehr als  $\pm 15\%$  vom nominalen Wert abweichen. Zusätzlich sollten mindestens 5 % der Proben eines Analysenlaufs aus Qualitätskontrollproben bestehen [248].

## 3.8 Zellinkubationsversuche mit Platinkomplexen

Für alle nachfolgend beschriebenen Versuche wurden nach erfolgter Zellzählung (s. Kap. 3.2.4) zunächst  $2 \times 10^6$  Zellen/Well in sterile 6-Wellen-Platten ausgesät und die Zellen über Nacht im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) anheften gelassen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen entsprechend der Fragestellung. Nach Ablauf der Inkubationszeit mit Platinkomplexen wurde das platinhaltige Medium abgesaugt und

die Zellen mit eisgekühltem PBS-Puffer gewaschen, um Platin- bzw. Mediumreste zu entfernen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, in Nährmedium aufgenommen und anschließend in der Eppendorf-Zentrifuge Micro 200R (1520 g, 1 min, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 1 mL eisgekühltem PBS-Puffer resuspendiert. Nach sorgfältigem Mischen wurden aus dieser Zellsuspension 2 x 20  $\mu\text{L}$  zur Proteinbestimmung entnommen. Es folgte ein zweiter Zentrifugations-schritt (18.620 g, 1 min, 4 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen ein weiteres Mal mit eisgekühltem PBS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (18.620 g, 1 min, 4 °C). Die erhaltenen Zellpellets für die Platin- und die Proteinbestimmung wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Das Ergebnis wurde angegeben als intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{M}$ ] bezogen auf den zellulären Proteingehalt [g/L]. Die Bestimmung des zellulären Platin- bzw. Proteingehalts ist in den Kapiteln 3.7.2.2 bzw. 3.5.2.2 beschrieben.

### **3.8.1 Konzentrationsabhängiger Influx von Cisplatin**

Um den Einfluss von Ouabain oder Sorafenib auf die Kumulation von Cisplatin zu untersuchen, wurden die Zellen vor der Inkubation mit Cisplatin mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Substanzen vorbehandelt.

Im ersten Versuch erfolgte eine Inkubation der Zellen mit verschiedenen Ouabainkonzentrationen (0,1 nM – 1 mM). Nach einstündiger Präinkubation mit Ouabain, wurde Cisplatin in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  zum ouabainhaltigen Medium pipettiert und die Zellen eine weitere Stunde inkubiert.

Im zweiten Versuch wurden die Zellen über 4 h mit verschiedenen Sorafenibkonzentrationen (0,1 nM – 75  $\mu\text{M}$ ) präinkubiert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurde das substanzhaltige Medium abgesaugt und cisplatinhaltiges Medium (100  $\mu\text{M}$  Cisplatin) für eine weitere Stunde hinzugegeben. Parallel zu beiden Versuchen wurde jeweils eine Kontrollplatte mit cisplatinhaltigem Nährmedium inkubiert.

Aus den Ergebnissen eines Versuchs wurde für jede der prä- bzw. koinkubierten Substanzen eine sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurve mit Hilfe der Software GraphPad PRISM® Version 4.00 erstellt und daraus der  $\text{IC}_{50}$ -Wert berechnet. Die  $\text{IC}_{50}$  ist die Konzentration, bei der die Hälfte des maximalen Effekts, in diesem Fall die Aufnahme von Platinverbindungen, erreicht wird. Zur Visualisierung in der

Konzentrations-Effekt-Kurve wurde für die Kontrolle, d.h. die Zellen, die ausschließlich mit Cisplatin behandelt wurden, eine um zwei log-Einheiten geringere Konzentration als die kleinste zugegebene Konzentration angenommen.

### **3.8.2 Zeitabhängiger Influx von Cisplatin**

Um den Einfluss von ATP, Oligomycin, Ouabain oder Sorafenib auf die zelluläre Cisplatinkumulation zu untersuchen, wurden je nach Fragestellung verschiedene Prä- und Koinkubationsversuche mit jeweils einer der obengenannten Substanzen durchgeführt. Zunächst wurden  $2 \times 10^6$  Zellen/Well in sterile 6-Well-Platten ausgesät. Nach der Adhäsion der Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte eine Prä- bzw. Koinkubation der Zellen mit einer konstanten Konzentration der jeweiligen Substanz. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von maximal 4 h mit Cisplatin in einer Endkonzentration von 100 µM inkubiert. Die detaillierten Versuchsbedingungen können Tab. 3.10 entnommen werden.

### **3.8.3 Efflux von Cisplatin**

Um den Efflux von Cisplatin unter dem Einfluss des ATP-Depletors Oligomycin zu charakterisieren, wurden zunächst  $2 \times 10^6$  Zellen/Well in sterile 6-Well-Platten ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte eine Behandlung der Zellen mit 100 µM Cisplatin in glucosefreiem Medium über 1 h. Eine halbe Stunde vor Ablauf der Inkubationszeit mit Cisplatin wurde entweder 10 µL glucosefreies Medium (Kontrolle) oder 10 µL Oligomycin in einer finalen Konzentration von 1 µM zugegeben. Anschließend wurden die Platten zweimal mit eisgekühltem PBS-Puffer gewaschen und für 0, 2, 5, 10 und 60 min mit cisplatinfreiem Medium inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Zellen wie in Kap. 3.8. beschrieben aufgearbeitet.

Tab. 3.10: Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Influx von Cisplatin.

Cisplatin [Endkonzentration]	Modulator [Konzentration]	Inkubationsbedingungen des Modulators	Inkubationsmedium	Inkubationsdauer mit Cisplatin [min]
— 100 µM	Oligomycin [1 µM]	Präinkubation: 0,5 h, gefolgt von: Koinkubation	glucosefrei	— 20, 60, 120, 180
100 µM	ATP [100 µM]	Koinkubation	glucosehaltig und serumfrei**	60
100 µM	ATP [100 µM]	Koinkubation	glucose- und serumfrei**	10 und 60
— 100 µM	Oligomycin [1 µM], gefolgt von: ATP [100 µM]	Präinkubation: 0,5 h, gefolgt von: Koinkubation	glucose- und serumfrei**	— 10 und 60
— 100 µM	Ouabain [50 nM]	Präinkubation: 1 h, gefolgt von: Koinkubation	glucosehaltig	— 20, 60, 120, 180, 240
— 100 µM	Sorafenib* [4,374 µM] —	Präinkubation: 0,5, 2, 4, 6 h, gefolgt von: Inkubation	glucosehaltig	— 60
— 100 µM	Sorafenib [5 µM] —	Präinkubation: 4 h, gefolgt von: Inkubation	glucosehaltig glucosehaltig	— 10, 20, 60, 120, 180

\* Diese Versuche wurden von M. Sc. C. Spanier im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt [260] Bei der Berechnung der Sorafenibkonzentration wurde das zugehörige Anion (Tosylat) nicht berücksichtigt.

\*\* Das serumfreie Medium wurde bis auf den Zusatz von FKS analog des glucosefreien bzw. glucosehaltigen Zellkulturmediums hergestellt (s. Kap. 3.1.5).



### 3.8.4 Influx von Carboplatin

Um den Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors Sorafenib auf die Kumulation von Carboplatin zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Influxexperimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zunächst  $2 \times 10^6$  Zellen/Well in sterile 6-Well-Platten ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Inkubation der Zellen mit 200 µM Carboplatin unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen.

Im ersten Versuch wurde nach einer vierstündigen Präinkubation der Zellen mit verschiedenen Sorafenibkonzentrationen [10 nM – 100 µM] das substanzhaltige Medium entfernt und die Zellen für weitere 2 h mit carboplatinhaltigem Medium inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem die Zellen nur mit Medium präinkubiert wurden.

Im zweiten Versuch wurden die Zellen mit einer fixen Sorafenibkonzentration [5 µM] über 4 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen bis zu 3 h mit Carboplatin inkubiert.

Nach Ende der Inkubationsphase wurden die Zellen wie in Kap. 3.8 beschrieben aufgearbeitet und anschließend der intrazelluläre Platingehalt (s. Kap. 3.7.2.2) bestimmt.

## 3.9 Genexpression auf Proteinebene

Die Proteinexpression der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α<sub>1</sub>-Untereinheit wurde in der sensitiven A2780-Zelllinie und der cisplatinresistenten Zelllinie A2780cis mittels Western Blot-Analyse, nach vorheriger Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, untersucht. Als *housekeeping*-Protein wurde Beta (β)-Actin verwendet. Die auf der Membran gebundenen Zielproteine wurden mit spezifischen Antikörpern immunochemisch nachgewiesen. Insgesamt wurde die Genexpression an drei unabhängigen Versuchstagen bestimmt.

### 3.9.1 Proteinisolierung

Die Tumorzellen wurden in einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von mindestens 80 % kultiviert und im Anschluss mit 50 nM Ouabain, 1 µM Oligomycin (in glucosefreiem Medium) und 5 µM Cisplatin – allein oder nach einer Präinkubation mit 50 nM Ouabain – über einen Zeitraum von 1 – 2 h inkubiert. Parallel hierzu wurden Zellen nur mit Medium inkubiert, welche als Kontrolle verwendet wurden.

Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskühlem PBS-Puffer gewaschen. 500 µL Lysis-Puffer (Herstellung s. 3.1.5) wurde mit 5 µL Pepstatin A-Lösung [2 mg/mL] und 2 µL Leupeptin-Lösung [5 mg/mL] versetzt und zu jeder Flasche pipettiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die vollständige Zelllyse erfolgte auf dem Schüttelinkubator (Stufe 8, 30 min, 4 °C). Die Zelllysate wurden anschließend bei 18.620 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand auf Eis aliquotiert. Dabei wurden 3 x 100 µL für die Bestimmung der Proteinexpression entnommen und 2 x 20 µL für die Quantifizierung des Proteingehalts der Proben. Dieser wurde mit Hilfe des BCA-Assays bestimmt (s. Kap. 3.5.2). Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei –80 °C gelagert.

### 3.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der isolierten Proteine erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der diskontinuierlichen Methode von Lämmli [261]. Hierbei werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel auf eine Lauffront konzentriert und anschließend in einem Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Trennprinzip der SDS-PAGE beruht darauf, dass die Proteine konstante Mengen SDS binden und somit negativ geladene Protein-SDS-Komplexe von gleichem Ladungs-/Größe-Verhältnis entstehen, die im elektrischen Feld abhängig von ihrer Molekülgröße zur Anode wandern. Die Zusammensetzung des Trenngels richtete sich hierbei nach der Größe der zu detektierenden Proteine. Die Proteingröße der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α<sub>1</sub>-Untereinheit beträgt 110 kDa und die des *housekeeping*-Proteins β-Actin 42 kDa. Aus diesem Grund wurde in allen Versuchen ein 7,5 %iges Trenngel verwendet, welches einen Größenbereich von 30 – 200 kDa abdeckte.

Die isolierten Proteinproben wurden zunächst so verdünnt, dass sich ein Gesamtproteingehalt von ca. 15 µg pro Geltasche ergab. Durch Zugabe von SDS-haltigem

Probenauftragspuffer (Herstellung s. 3.1.5) im Verhältnis 1:1 und DTT-Lösung in einer Endkonzentration von 160 mM wurden die Proteinproben für 30 min bei Raumtemperatur denaturiert. Der Zusatz von DTT diente der Reduktion von Disulfidbrücken zwischen den Proteinen. Die denaturierte Proteinlösung wurde anschließend auf das Gel pipettiert.

Hierzu wurde zuerst die Trenngel-Lösung (Acrylamid: 7,5 %) nach Tab. 3.11 hergestellt und zügig in die vorbereitete Gelkammer gefüllt.

Tab. 3.11: Herstellung der Trenngel- und Sammelgel-Lösung.

	Trenngel-Lösung [7,5 % Acrylamid]	Sammelgel-Lösung [5 % Acrylamid]
Acrylamid [30 %]	3,750 mL	833 µL
Trenngel-Puffer	5,625 mL	–
Sammelgel-Puffer	–	625 µL
PURELAB® Plus-Wasser	5,345 mL	3,445 mL
SDS [10 %]	150 µL	50 µL
TEMED*	27 µL	5 µL
Ammoniumperoxodisulfat (APS) [10 %]*	105 µL	20,8 µL

\* Diese Substanzen wurden erst kurz vor dem Gießen des Gels hinzugefügt. Durch die Radikalbildung von APS wird unter der Katalyse von TEMED die Polymerisation des Gels initiiert.

Um eine glatte Phasengrenze zwischen den beiden Gelen zu erhalten, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels (ca. nach 15 min) wurde Isopropanol vorsichtig abgeschüttet und die Sammelgel-Lösung (Acrylamid: 5 %) hergestellt (s. Tab. 3.11). Das Trenngel wurde mit dieser Lösung überschichtet und anschließend der Gelkamm zur Ausbildung der Geltaschen eingesetzt. Dabei musste darauf geachtet werden, Lufteinschlüsse zu vermeiden.

Nach einer 30-minütigen Polymerisationszeit wurden die Proteinproben und zusätzlich der vorgefärbte Protein-Größenstandard Roti®-Mark (Molekulargewichtsbereich: 17 – 245 kDa) zur Identifizierung der Banden in die Probetaschen pipettiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in Elektrophoresepuffer (1 x) nach Anlegen einer

elektrischen Spannung von 200 V. Nach 45 min wurde das Gel entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel bis zur weiteren Verarbeitung in Transferpuffer für mindestens 5 min äquilibriert.

### 3.9.3 Western Blot

Für die vollständige Übertragung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine synthetische Membran wurde das Tank-Blot-Verfahren angewendet. Hierbei werden die Proteine in einer mit Puffer gefüllten Blotting-Apparatur durch Anlegen einer Spannung auf die Oberfläche einer Membran transferiert und dort immobilisiert. In dieser Arbeit wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran verwendet, die zuerst für 20 s in Methanol und anschließend bis zur weiteren Verwendung in Transferpuffer äquilibriert wurde. Nach den Herstellerangaben wurde das aus der SDS-PAGE erhaltene Trenngel zusammen mit der PVDF-Membran luftblasenfrei in die mit Transferpuffer gefüllte Blotting-Apparatur eingesetzt. Nach Anlegen einer konstanten Spannung von 100 V wurde der elektrophoretische Transfer bei 4 °C über einen Zeitraum von 1 h durchgeführt. Nach Ablauf der Transferzeit wurde die Membran entnommen und bis zum spezifischen Proteinnachweis mittels Chemolumineszenz in trisgepufferter Salzlösung (TBS-Puffer, Herstellung s. 3.1.5) geschüttelt.

### 3.9.4 Immunodetektion

Nach erfolgreichem Transfer der aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran wurden diese mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion detektiert. Mit dieser Methode können Proteine spezifisch bis in den Picogramm-Bereich auf einem Blot nachgewiesen werden. Dazu wurde zunächst ein primärer Antikörper eingesetzt, der spezifisch mit dem Ziel-Antigen reagiert. Ein gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichteter sekundärer Antikörper ist an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Dieses wurde durch Zugabe eines HRP-Substrats bestehend aus Luminol und Peroxid-Puffer mittels Chemolumineszenz nachgewiesen. Diese beruht auf dem Prinzip einer Lichtemission und kann mit Hilfe einer CCD (*charge-coupled device*)-Kamera detektiert werden. Die digitalisierten CCD-Kamera-

aufnahmen wurden zur densitometrischen Quantifizierung der Signale mit der Software Quantity One® verwendet.

Um unspezifische Bindungen der primären Antikörper auf der PVDF-Membran zu verhindern, wurde die Membran zunächst für 1 h in 5 %iger Blockierungslösung (Herstellung s. 3.1.5) geschüttelt. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBS-T-Lösung (TBS-Puffer mit TWEEN®-20, Herstellung s. 3.1.5) gewaschen. Der primäre Antikörper gegen die  $\alpha_1$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase wurde mit TBS-T-Lösung, welche 5 % BSA und 1 % Natriumazid enthielt (s. Tab. 3.12), 1:500 verdünnt. 10 mL dieser Lösung wurden vorsichtig auf die Membran pipettiert. Die Inkubation erfolgte auf dem Schüttelinkubator (Stufe 8) für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Blot über Nacht bei +4 °C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Morgen wurde die primäre Antikörperlösung abgenommen und die Membran erneut dreimal für 10 min mit TBS-T-Lösung gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Tab. 3.12: Herstellung der Verdünnung des primären Antikörpers gegen  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$  (1:500).

Natriumazid	10 mg
BSA	500 mg
TBS-T-Lösung	10 mL
$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase $\alpha_1$ -Antikörper-Lösung (in PBS), (s. 3.1.1)	20 $\mu\text{L}$

Anschließend erfolgte die Zugabe der frisch hergestellten Lösung des HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers in einer 1:1000-Verdünnung. Die Herstellung dieser Lösung kann Tab. 3.13 entnommen werden. Die Membran wurde 1,5 h auf dem Schüttelinkubator (Stufe 8) bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Detektion der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$  wurde der Blot wieder dreimal für 10 min mit TBS-T-Lösung gewaschen. Zur Visualisierung der Banden wurde der Blot für 2 min mit 1 mL nach Herstellerangaben frischhergestelltem Pierce ECL (*enhanced chemiluminescence*) Western Blotting Substrat bei Raumtemperatur inkubiert und die Chemolumineszenz der Banden mit Hilfe des VersaDoc™ Imaging Systems auf einem Röntgenfilm detektiert und dokumentiert. Die Expositionszeit lag bei 60 s.

Tab. 3.13: Herstellung der Verdünnung des sekundären Antikörpers (1:1000).

Milchpulver	0,5 g
TBS-T-Lösung	10 mL
<i>Anti-goat IgG</i> -Antikörper-Lösung (in PBS), HRP-konjugiert (s. 3.1.1)	10 $\mu$ L

Nach der Detektion der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$  wurde das *housekeeping*-Protein  $\beta$ -Actin detektiert. Dazu wurde der Blot dreimal für 10 min mit TBS-T-Lösung gewaschen und für 1 h mit der primären Antikörperlösung gegen  $\beta$ -Actin (Herstellung s. Tab. 3.14) bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut folgte ein dreimaliges Waschen mit TBS-T-Lösung.

Tab. 3.14: Herstellung der Verdünnung des primären Antikörpers gegen  $\beta$ -Actin (1:4000).

Natriumazid	10 mg
BSA	500 mg
TBS-T-Lösung	10 mL
$\beta$ -Actin-Antikörper-Lösung (in PBS), (s. 3.1.1)	2,5 $\mu$ L

Anschließend wurde der Blot mit der sekundären Antikörperlösung (s. Tab. 3.15) für 90 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Membran wie oben beschrieben gewaschen und die Banden detektiert.

Tab. 3.15: Herstellung der Verdünnung des sekundären Antikörpers (1:1000).

Milchpulver	0,5 g
TBS-T-Lösung	10 mL
<i>Anti-mouse IgG</i> -Antikörper-Lösung (in PBS), HRP-konjugiert (s. 3.1.1)	10 $\mu$ L

### 3.9.5 Auswertung

Die detektierten Banden wurden densitometrisch mit Hilfe der Software Quantity One<sup>®</sup> quantifiziert. Gemessen wurden die Signalintensitäten der Banden. Um unterschiedliche Datensätze zusammenzufassen oder zu vergleichen, wurden die an verschiedenen Versuchstagen gemessenen Daten normalisiert. Dazu wurde für jedes Protein die Intensität der Bande mit dem höchsten Signal gleich 100 % gesetzt und die restlichen Banden relativ auf diese bezogen. Die Intensität wurde anschließend als relatives Verhältnis der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$  zu  $\beta$ -Actin (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase/ $\beta$ -Actin) angegeben.

### 3.10 <sup>195</sup>Pt-NMR-Spektroskopie

Eine mögliche Interaktion von Cisplatin mit Oligomycin bzw. Sorafenib wurde mittels <sup>195</sup>Pt-NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie untersucht. Die <sup>195</sup>Pt-NMR-Spektren der Gemische von Cisplatin und jeweils einem der beiden Reaktionspartner wurden über einen Zeitraum von bis zu 22 h am Bruker DPX 300 Spektrometer aufgenommen. Die Spektren wurden in Bezug auf externes K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> bei  $\delta = -1,614$  ppm kalibriert. Die Messungen wurden von Dr. P. Marqués Gallego aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan Reedijk an der Universität Leiden durchgeführt.

### 3.11 Statistische Datenanalyse

Die Versuche an einem Tag wurden in einem Triplikat durchgeführt und aus diesem der Mittelwert (MW) berechnet. Die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten (d.h. von verschiedenen Tagen) wurden als MW  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben.

Unter der Annahme, dass die Mittelwerte annähernd normalverteilt sind, wurden Unterschiede zwischen zwei Stichproben mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test für abhängige bzw. unabhängige Stichproben auf statistische Signifikanz getestet. Ob eine Normalverteilung vorliegt, konnte aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs

( $n < 25$ ) nicht valide getestet werden. Des Weiteren wurden bei diesen kleinen Stichprobenumfängen auch keine nicht-parametrischen Tests angewandt.

Um den Einfluss zweier unabhängiger Variablen, wie z.B. Zeit und Behandlung mit einer Substanz, auf den intrazellulären Platingehalt zu untersuchen, wurde die zweifaktorielle ANOVA (Varianzanalyse) mit Post-hoc-Test nach Bonferroni durchgeführt.

Die  $EC_{50}$ -Werte, die aus den Zytotoxizitätsbestimmungen ermittelt wurden, werden im Allgemeinen als log-normalverteilt angesehen [241]. Aus diesem Grund wurden die  $pEC_{50}$ -Werte gemittelt und Unterschiede zwischen den Gruppen mit Hilfe des Student's t-Test für unabhängige Stichproben auf statistische Signifikanz getestet.

In allen Fällen wurde ein p-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Platinsensitivität unter glucosefreien Bedingungen

Einige Untersuchungen zur Cisplatinsensitivität wurden unter Verwendung von glucosefreiem Medium durchgeführt, um die intrazelluläre ATP-Produktion über die Glykolyse zu verhindern. Aus diesem Grund war es notwendig, wichtige Parameter, wie beispielsweise den  $EC_{50}$ -Wert von Cisplatin und den intrazellulären Platingehalt nach Inkubation mit Cisplatin unter glucosefreien Bedingungen in den beiden Zelllinien A2780 und A2780cis näher zu charakterisieren.

#### 4.1.1 Zytotoxizität von Cisplatin unter glucosefreien Bedingungen

Die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Cisplatin unter glucosehaltigen bzw. -freien Bedingungen wurde mit Hilfe des MTT-Assays ermittelt. Repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abb. 4.1 (vgl. Appendix A1) dargestellt.

Tab. 4.1 gibt eine Übersicht über die aus den Konzentrations-Effekt-Kurven berechneten  $EC_{50}$ -Werten von Cisplatin unter den oben beschriebenen Bedingungen. In beiden Zelllinien waren die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte unter glucosehaltigen bzw. -freien Bedingungen vergleichbar.

Tab. 4.1:  $pEC_{50}$ - und  $EC_{50}$ -Werte von Cisplatin in glucosehaltigem Medium im Vergleich zu den Werten in glucosefreiem Medium ( $pEC_{50}$ : MW  $\pm$  SE;  $n = 4$ ; Student's  $t$ -Test für unabhängige Stichproben).

	A2780		A2780cis	
	$pEC_{50}$ ( $EC_{50}$ )	p-Wert	$pEC_{50}$ ( $EC_{50}$ )	p-Wert
glucosehaltig	$5,682 \pm 0,11$ (2,08 $\mu$ M)	0,7628	$4,917 \pm 0,02$ (12,11 $\mu$ M)	0,7022
glucosefrei	$5,638 \pm 0,08$ (2,30 $\mu$ M)		$4,905 \pm 0,02$ (12,44 $\mu$ M)	

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in dem nach Gl. 3.1 berechneten Resistenzfaktor der resistenten Zellen gegenüber Cisplatin unter glucosefreien (Resistenzfaktor = 5,4)

bzw. -haltigen Bedingungen (Resistenzfaktor = 5,8) wider. Der Glucosegehalt des Mediums hat demnach keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Cisplatin.

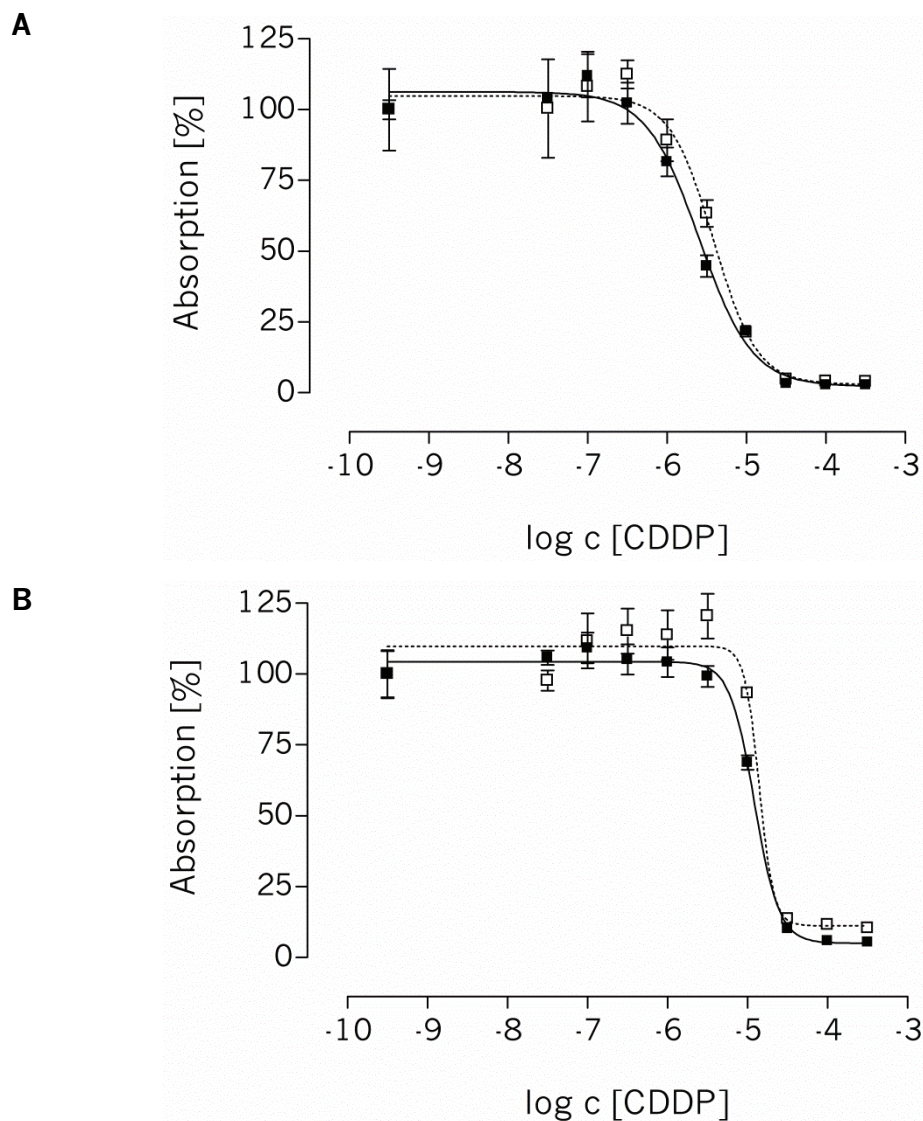


Abb. 4.1: Sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen in glucosehaltigem (■) oder -freiem (□) Medium. Dargestellt sind jeweils repräsentative Kurven aus einer Reihe von vier unabhängigen Experimenten (vermessen in Triplikaten,  $MW \pm SD$ ). Die Absorption wird angegeben in % bezogen auf die Wachstumskontrolle (100 %).

#### 4.1.2 Kumulation von Cisplatin unter glucosefreien Bedingungen

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Cisplatinempfindlichkeit unter glucosefreien Bedingungen ist der intrazelluläre Platingehalt nach Inkubation mit

Cisplatin. Mit den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob die Platinkumulation unter glucosefreien Bedingungen im Vergleich zu den Standardbedingungen (glucosehaltiges Medium) verändert war.

Die Platinkumulation setzt sich aus simultanem Influx und Efflux von Platinverbindungen zusammen. Da man die beiden Prozesse nicht getrennt bestimmen kann, wurde eine höhere Cisplatinkonzentration [100  $\mu\text{M}$ ] ausgewählt, um den Influxprozess zu begünstigen. Der intrazelluläre Platingehalt nach Inkubation mit Cisplatin in glucosefreiem und glucosehaltigem Nährmedium ist in Abb. 4.2 (vgl. Appendix A2) dargestellt.

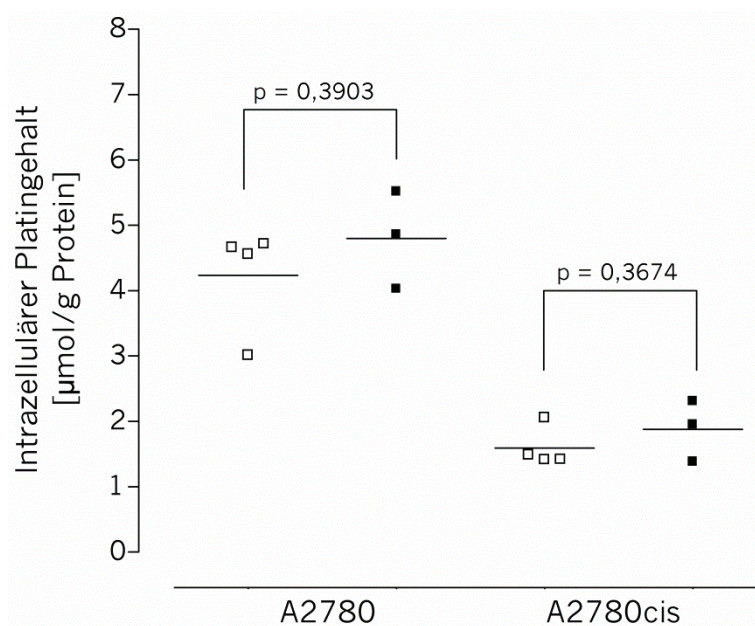


Abb. 4.2: Vergleich des intrazellulären Platingehalts [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin in glucosefreiem ( $\square$ ) oder glucosehaltigem ( $\blacksquare$ ) Medium über 1 h (MW;  $n = 3 - 4$ ; Student's t-Test für unabhängige Stichproben).

In den resistenten Zellen wurde in beiden Nährmedien eine verminderte Platinaufnahme im Vergleich zu den sensitiven Zellen beobachtet. Die Aufnahme war dabei um den Faktor 2,6 (glucosehaltig) bzw. 2,7 (glucosefrei) in den resistenten Zellen reduziert. Einen vergleichbaren Faktor berichtete auch schon Dr. J. Zisowsky in seiner Dissertation bei der Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Platinaufnahme für das Zelllinienpaar A2780/A2780cis [88]. Zwischen glucosefreiem und -haltigem Medium findet sich jedoch kein Unterschied in dem intrazellulären Platingehalt in A2780- und A2780cis-Zellen.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass weder die Cisplatinempfindlichkeit noch die zelluläre Kumulation von Cisplatin durch glucosefreie Bedingungen im Vergleich zu den Standardbedingungen beeinflusst wird.

## 4.2 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts

### 4.2.1 Optimierung des ATP-Biolumineszenz-Assays

Zu Beginn wurde zunächst die bestehende Methode von Dr. H. Müller zur Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts verwendet [251]. Analog zu dieser Methode erfolgte die Zugabe des tritonhaltigen Lysereagens (Endkonzentration: 1 % Triton) zu den sich noch im Nährmedium befindenden Zellen. In Abb. 4.3 ist schematisch eine 96-Well-Platte dargestellt. Für die Optimierung des ATP-Biolumineszenz-Assays wurden nur die unbehandelten Zellen (Wachstumskontrollen) berücksichtigt (s. Abb. 4.3: 1. – 3.), sodass auf die Darstellung des vollständigen Inkubationsschemas verzichtet wurde.

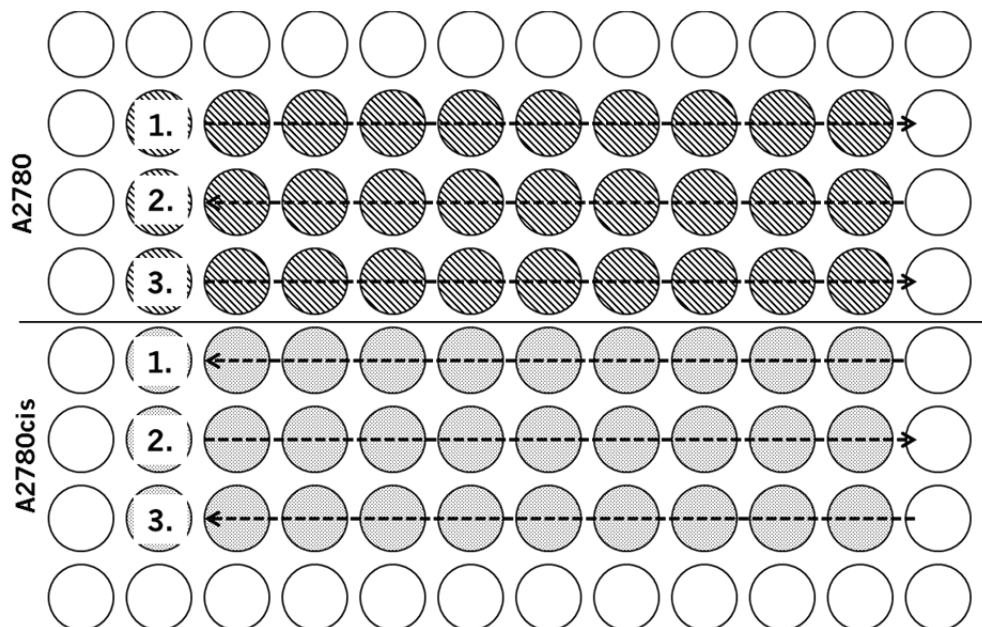


Abb. 4.3: Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte für den ATP-Assay. Die Wachstumskontrollen der A2780- und A2780cis-Zellen wurden jeweils in einem Triplikat vermessen (1. – 3.). Die gestrichelten Pfeile zeigen die Leserichtung des Multiwell-Readers LUMIstar™ Optima an.



Im Verlauf der Messung zeigte sich innerhalb eines Triplikats einer Zelllinie eine Abnahme der Lumineszenz [RLU] um ca. 30 % parallel zur Leserichtung des Multiwell-Readers (s. Abb. 4.4).

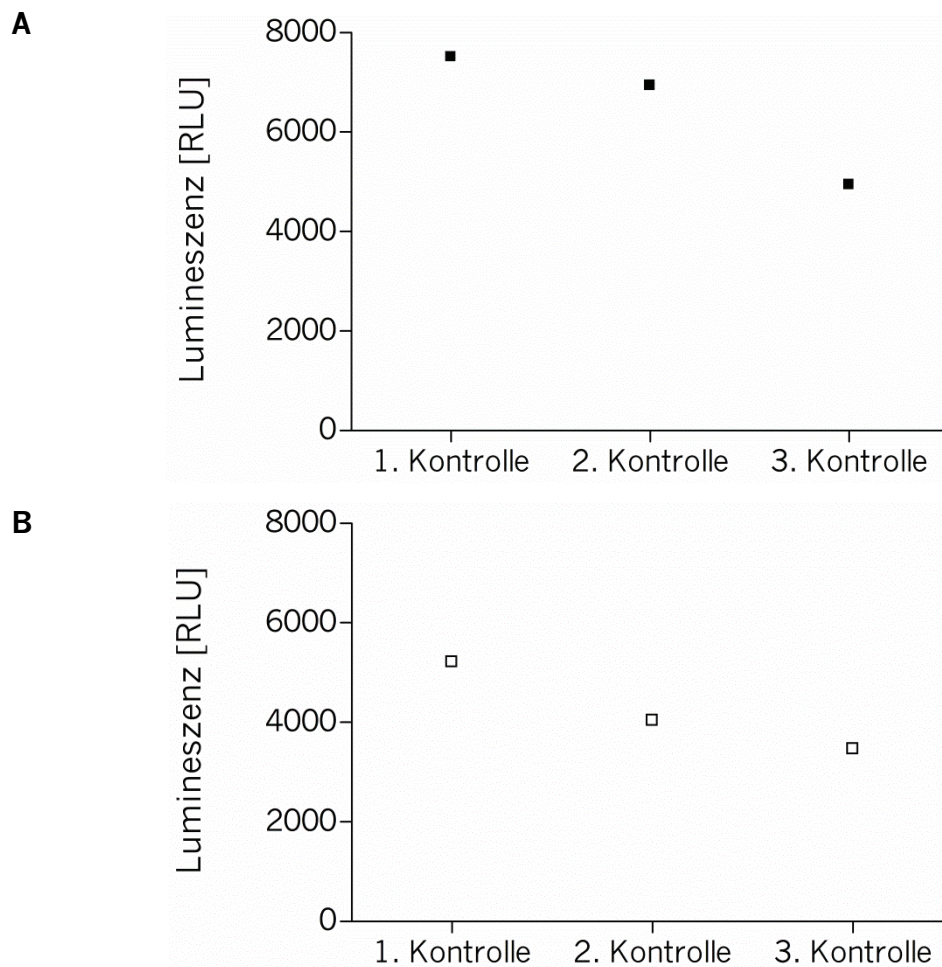


Abb. 4.4: Einfluss des Nährmediums auf die Lumineszenz in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchstages. Die Lumineszenz [RLU] ist proportional zum ATP-Gehalt.

Da die Lyse der Zellen in serumhaltigem Nährmedium durchgeführt wurde, ist es möglich, dass Serumenzyme das aus der Zelle freigesetzte ATP hydrolysieren, sodass dieses nicht mehr mit dem Substrat Luciferin reagieren kann [181]. Folglich nimmt der ATP-Gehalt ab, was sich in einer Abnahme der Lumineszenz im Verlauf eines Triplikats widerspiegelt. In einem neuen Versuchsansatz wurde aus diesem Grund der Einfluss von Nährmedium mit fetalem Kälberserum (FKS), Nährmedium mit inaktiviertem FKS und PBS-Puffer auf die Lumineszenz untersucht. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe der Triton-Lösung in einer Endkonzentration von 1 % Triton. In Abb. 4.5 (s. auch Appendix B1) ist deutlich zu erkennen, dass die Lumineszenz, angegeben in

RLU, in PBS-Puffer in beiden Zelllinien am höchsten ist und dann in der Reihenfolge FKS inaktiviert > FKS abnimmt. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass das serumhaltige Medium einen Einfluss auf die Lumineszenz hat.

Aus diesem Grund war eine Optimierung der bestehenden Methode von Dr. H. Müller erforderlich. Für alle folgenden Versuche wurde nach Ablauf der Inkubationszeit das serumhaltige Nährmedium entfernt. Dann wurden die A2780- und A2780cis-Zellen durch Zugabe von Triton-Lösung [1%] lysiert und die Lumineszenz wie in Kap. 3.6.4 beschrieben vermessen.

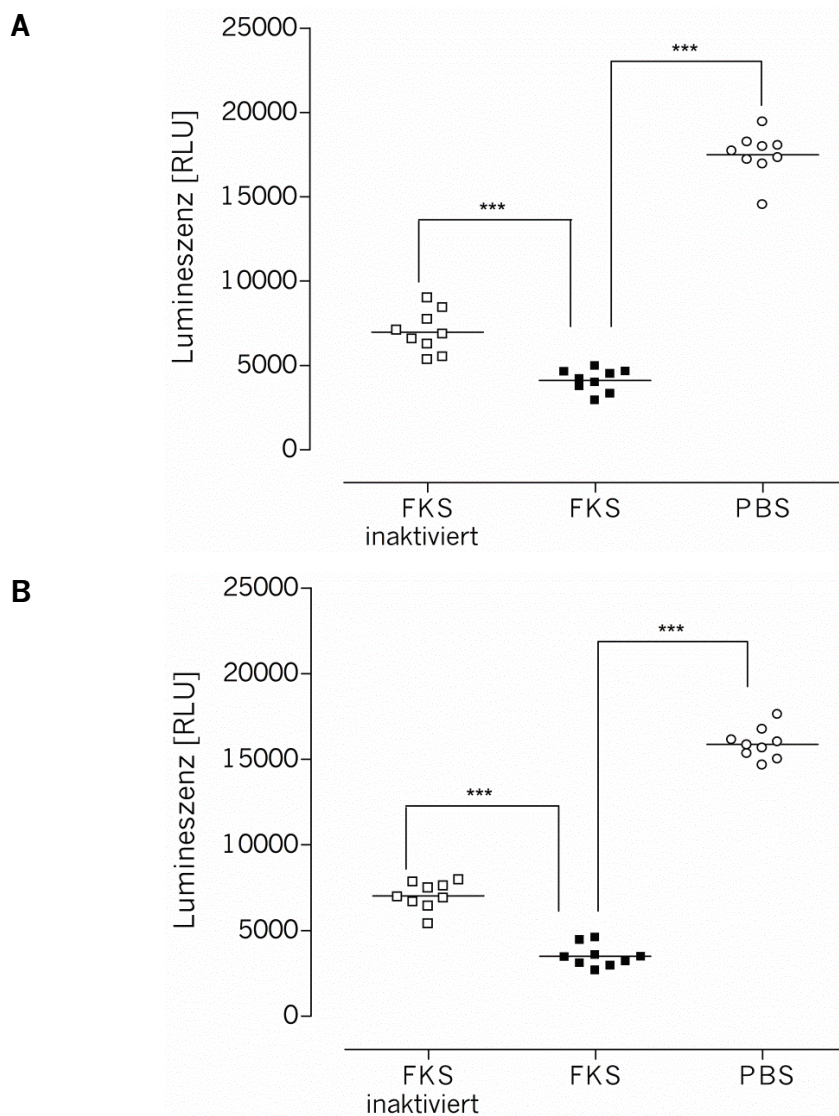


Abb. 4.5: Einfluss von FKS, inaktiviertem FKS und PBS-Puffer auf die Lumineszenz in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen (MW; \*\*\*:  $p < 0,001$ , Student's  $t$ -Test für abhängige Stichproben). Dargestellt ist ein Versuch, durchgeführt in neun Replikaten. Die Lumineszenz ist proportional zum ATP-Gehalt.

## 4.2.2 Validierung des ATP-Biolumineszenz-Assays

Nach Optimierung der Lysebedingungen wurde die Methode hinsichtlich Linearität, Präzision, Richtigkeit und Wiederfindung nach den FDA-Richtlinien überprüft [249]. Auf eine vollständige Validierung wurde verzichtet, da es sich bei dem *ATP Determination Kit* der Firma Invitrogen um ein kommerzielles Kit handelt und die Methode bereits von Dr. H. Müller an unserem Institut unter Verwendung des Multiwell-Readers LUMIstar™ Optima etabliert wurde [251].

### 4.2.2.1 Linearität

Die Linearität in dem gewählten Kalibrierbereich von 0,1 – 5  $\mu\text{M}$  ATP wurde anhand von sechs unabhängig voneinander hergestellten und vermessenen Kalibriergeraden untersucht. Mittels linearer Regression konnte ein Zusammenhang zwischen ATP-Konzentration und Lumineszenzsignal bestätigt werden. Zur Quantifizierung des linearen Zusammenhangs wurde der Korrelationskoeffizient  $r$  bestimmt. Für alle sechs vermessenen Kalibriergeraden wurde ein Korrelationskoeffizient  $r > 0,99$  berechnet (s. Appendix B1). Die Abweichungen der ermittelten Standardkonzentrationen von den Nominalkonzentrationen lagen zwischen  $-8,35\%$  und  $+14,89\%$ . Die von der FDA geforderten Akzeptanzkriterien hinsichtlich der Linearität wurden somit erfüllt. Eine repräsentative Kalibriergerade wird in Abb. 4.6 gezeigt.

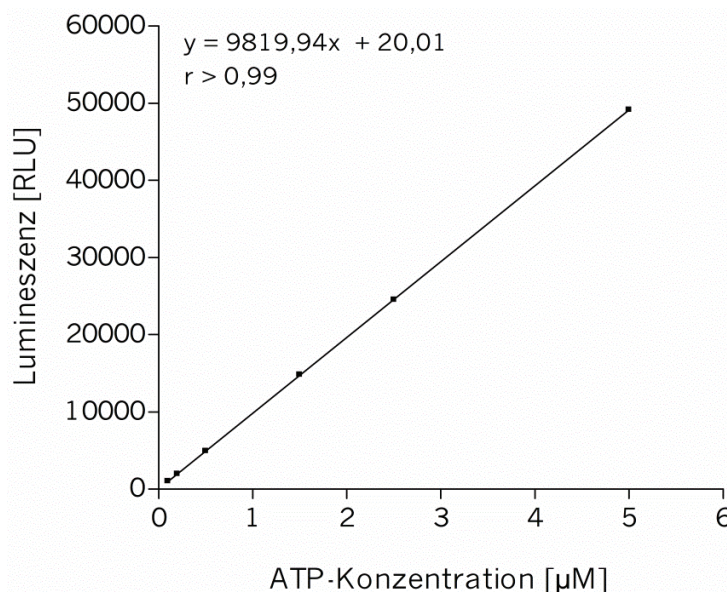


Abb. 4.6: Charakteristische Kalibriergerade der intrazellulären ATP-Bestimmung.

#### 4.2.2.2 Präzision

Die relativen Standardabweichungen der Methoden (Within)- und Vergleichs (Between-day)-Präzision können Tab. 4.2 (vgl. auch Appendix B1) entnommen werden.

Tab. 4.2: *Within-day- und Between-day-Präzision (RSD [%]) der modifizierten ATP-Bestimmung nach Müller et al. (n = 5).*

ATP-Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Präzision, RSD [%]	
	Within-day	Between-day
0,3	+7,2	+11,9
2	+6,1	+5,3
4	+2,3	+3,3

Die ermittelten relativen Standardabweichungen lagen alle unter den geforderten 15 % und erfüllten somit die Akzeptanzkriterien der FDA-Guideline hinsichtlich der Präzision.

#### 4.2.2.3 Richtigkeit

Anhand der über die Kalibriergeraden errechneten Konzentrationen der eingesetzten Qualitätskontrollproben wurde die Richtigkeit sowohl an einem Tag (Within-day-Richtigkeit) als auch an fünf aufeinander folgenden Tagen (Between-day-Richtigkeit) ermittelt. Die Ergebnisse können Tab. 4.3 entnommen werden (s. auch Appendix B1).

Tab. 4.3: *Within-day- und Between-day-Richtigkeit (RE [%]) der modifizierten ATP-Bestimmung nach Müller et al. (n = 5).*

ATP-Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Richtigkeit, RE [%]	
	Within-day	Between-day
0,3	-4,5	+7,7
2	-3	+4,6
4	-8,9	+0,7



Die Abweichungen der berechneten ATP-Konzentrationen von den Nominalkonzentrationen lagen zwischen  $-8,9\%$  und  $+7,7\%$ . Somit wurden auch hinsichtlich der Richtigkeit die Akzeptanzkriterien der FDA erfüllt, wonach der relative Fehler maximal  $\pm 15\%$  betragen darf.

#### 4.2.2.4 Wiederfindung

Die Bestimmung der Wiederfindung diente der Untersuchung des Einflusses des Zelllysats auf die Höhe des Lumineszenzsignals zur Quantifizierung des zellulären ATP-Gehalts. Als Referenz wurden ATP-Lösungen unterschiedlicher Konzentration in reiner Lyselösung vermessen. Die prozentuale Wiederfindung aus sechs Experimenten, berechnet nach Gl. 3.4, ist in Tab. 4.4 zusammengestellt.

Tab. 4.4: Wiederfindung von ATP [%] in Zelllysats ( $n = 6$ ).

ATP-Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Wiederfindung [%]			
	A2780		A2780cis	
	MW	SD	MW	SD
0,1	102,54	5,7	105,61	7,6
0,2	104,96	7,9	109,37	4,7
0,5	105,49	5,5	107,63	7,1
1,5	95,60	8,7	99,26	4,8
2,5	90,34	3,9	95,61	3,2
5	89,22	3,8	94,55	2,1
0,3	104,05	8,7	106,06	8,2
2	89,59	5,6	91,76	4,0
4	89,66	2,8	94,90	2,9

Die mittlere Wiederfindung betrug zwischen  $89,22 - 109,37\%$ . Die berechneten Werte aller untersuchten ATP-Konzentrationen lagen somit noch im Rahmen der geforderten Akzeptanzkriterien [249].

### 4.2.3 Intrazellulärer ATP-Gehalt

Der intrazelluläre ATP-Gehalt der unbehandelten A2780-Zellen und deren cisplatin-resistenter Variante A2780cis wurden mit Hilfe des optimierten ATP-Biolumineszenz-Assays bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit der gemessenen ATP-Werte der beiden Zelllinien wurde der ATP-Gehalt [pmol] in Bezug auf die zelluläre Proteinmenge [ $\mu\text{g}$ ] angegeben. Somit konnte der Einfluss unterschiedlicher Wachstumseigenschaften der Zellen und der Zellgröße auf den ATP-Gehalt minimiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Proteinbestimmung basierend auf dem BCA-Protein-Assay in einer 96-Well-Platte etabliert.

#### 4.2.3.1 Teilvalidierung

Der BCA-Protein-Assay wurde bereits hinsichtlich der Kriterien Bestimmungsgrenze, Linearität, Präzision und Richtigkeit in unserem Arbeitskreis von Dr. D. Garmann teilvalidiert [248]. Da die Probenaufarbeitung bei dieser Teilvalidierung in Reaktionsgefäßen erfolgte, wurde für die Aufarbeitung der Proteinproben in 96-Well-Platten erneut die Richtigkeit (RE [%]) und Präzision (RSD [%]) der Ergebnisse in Zusammenarbeit mit Dipl.-Pharm. M. Borrmann (Arbeitskreis Prof. Dr. G. Bendas, Dissertation in Vorbereitung) untersucht. Die Untersuchungen für diese Methode wurden auf die Ermittlung der Between-day-Präzision und -Richtigkeit beschränkt, da diese die Reproduzierbarkeit der Methode über einen längeren Zeitraum sicherstellen und in der Regel auch eine höhere Variabilität aufzeigen, als die Within-day-Präzision bzw. -Richtigkeit. An insgesamt 21 Tagen wurde der ATP-Gehalt (angegeben in ATP/Protein) der Zelllinien A2780 und A2780cis unabhängig voneinander bestimmt. Hierzu wurden auf den 96-Well-Platten jeweils zwei Wachstumskontrollen in einem Triplikat ausgesät und nach Ablauf der Inkubationszeit der intrazelluläre ATP- bzw. Protein-Gehalt bestimmt. Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle 1 aus den Versuchen der ATP-Kinetik mit Cisplatin (s. Kap. 4.2.4) wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle 2 prozentual auf diesen bezogen. Für die Richtigkeit und die Präzision wurden die Akzeptanzkriterien der FDA angenommen [249]. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.5 zusammengefasst.

Tab. 4.5: *Between-day-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) der Quantifizierung des intrazellulären ATP-Gehalts in Bezug auf den zellulären Proteingehalt (n = 21).*

	<b>A2780</b>	<b>A2780cis</b>
Richtigkeit, RE [%]	+2,4	+5,9
Präzision, RSD [%]	+24,2	+18,9

Wie in der Tabelle zu erkennen ist, wurden die von der FDA geforderten Akzeptanzkriterien hinsichtlich Richtigkeit, nicht jedoch für die Präzision erfüllt. Da sowohl die Präzision des sensitiven ATP-Biolumineszenz-Assays als auch die Präzision des BCA-Protein-Assays mit in die Berechnung einbezogen wurde, wurden diese höheren Werte dennoch toleriert.

#### **4.2.3.2 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts**

Der mittlere intrazelluläre ATP-Gehalt bezogen auf den zellulären Proteingehalt beträgt in den unbehandelten A2780-Zellen  $3,32 \pm 0,2$  pmol/ $\mu$ g und in den A2780cis-Zellen  $4,00 \pm 0,3$  pmol/ $\mu$ g (MW  $\pm$  SE; n = 28). Die Ergebnisse der einzelnen Versuchstage können Appendix B2 entnommen werden. Der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien ist statistisch signifikant (p = 0,0309, Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Das Ergebnis bestätigt frühere Ergebnisse von Krieger et al. [262] und liegt im Bereich des ATP-Gehalts anderer Zelllinien [123,254,263]. Der höhere ATP-Gehalt in den resistenten Zellen könnte ein Hinweis auf eine mögliche Rolle von ATP in der Cisplatinresistenz sein.

#### **4.2.4 Intrazellulärer ATP-Gehalt nach Inkubation mit Cisplatin unter glucosehaltigen Bedingungen**

Um die Rolle von ATP in der Platinsensitivität näher zu charakterisieren, wurde der zeitabhängige Verlauf des zellulären ATP-Gehalts nach Inkubation der beiden Zelllinien mit drei verschiedenen Cisplatinkonzentrationen (5, 25 und 100  $\mu$ M) unter glucosehaltigen Bedingungen über einen Zeitraum von 24 h untersucht (s. Appendix B2).

Zunächst wurden die Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  Cisplatin behandelt. Eine vergleichbare Konzentration wird therapeutisch im Plasma der Patienten erreicht, welche eine cisplatinbasierte Therapie erhalten [264]. Der zeitabhängige Verlauf des ATP-Gehalts (in % bezogen auf die Wachstumskontrolle) unter Einfluss von 5  $\mu\text{M}$  Cisplatin ist in Abb. 4.7 dargestellt. Beide Tumorzelllinien zeigen einen ähnlichen Verlauf über die Zeit.

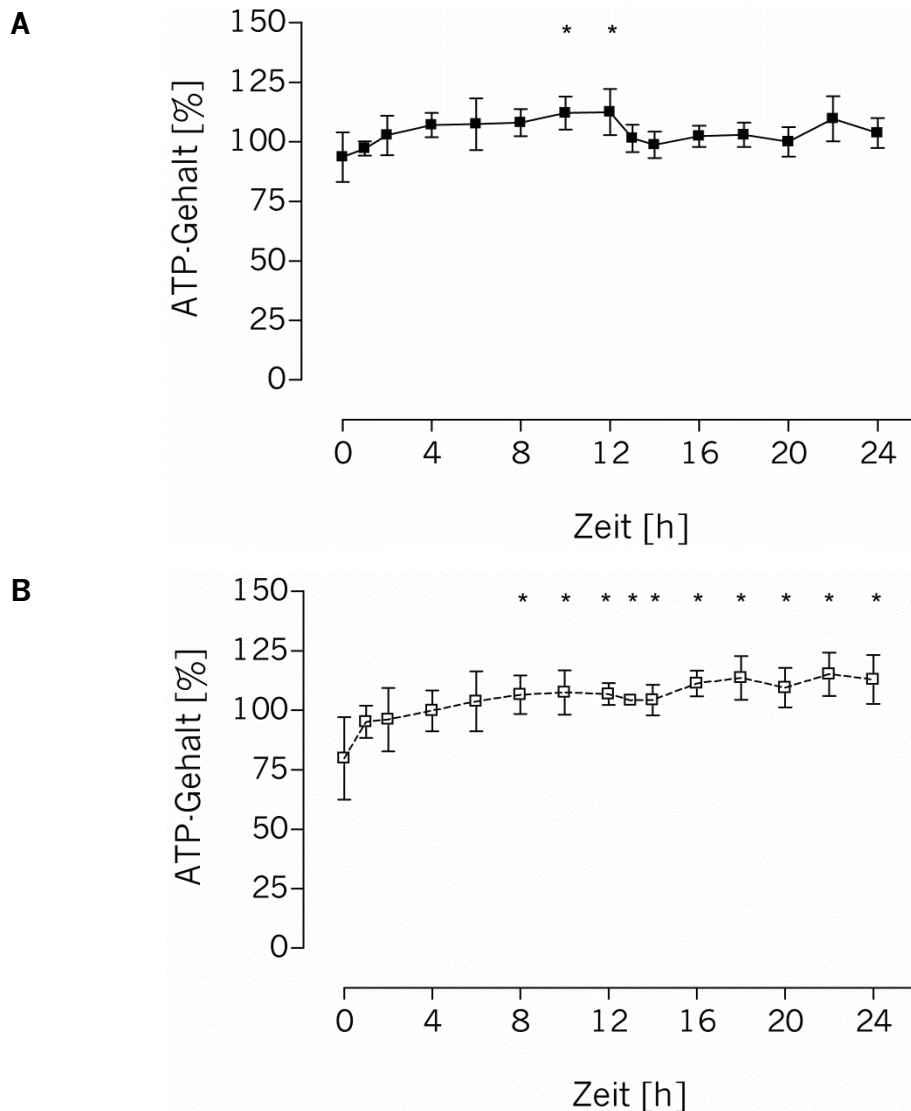


Abb. 4.7: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] nach Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Cisplatin in glucosehaltigem Medium in **A** A2780-Zellen und **B** A2780cis-Zellen über 24 h (MW  $\pm$  SD; n = 4; \*: p < 0,05, Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

Der zeitabhängige Verlauf des ATP-Gehalts in den sensitiven Zellen ist durch einen leichten Anstieg (ca. 10 %) und einer anschließenden Abnahme des intrazellulären

ATP-Gehalts charakterisiert (Abb. 4.7 A). Die Abnahme nach einer Inkubationsdauer von 12 h ist möglicherweise auf zytotoxische Effekte von Cisplatin zurückzuführen, da die eingesetzte Konzentration mehr als zweifach toxischer ist, als der ermittelte  $EC_{50}$ -Wert von Cisplatin ( $\sim 2 \mu\text{M}$ ) für die A2780-Zellen. In den resistenten Zelllinien ist über den untersuchten Zeitraum ein Anstieg des ATP-Gehalts um ca. 15 % zu erkennen (Abb. 4.7 B). Die in diesem Experiment verwendete Cisplatinkonzentration liegt unterhalb des bestimmten  $EC_{50}$ -Wertes ( $\sim 12 \mu\text{M}$ ) von Cisplatin für die A2780cis-Zellen, sodass der zeitabhängige ATP-Anstieg durch weiteres Wachstum und Proliferation der resistenten Zellen zu erklären ist.

In Tumorgewebe von Patienten, die eine Therapie mit Cisplatin erhalten, wird therapeutisch eine Konzentration von ca.  $25 \mu\text{M}$  Cisplatin erreicht [264]. Deswegen wurde in einem weiteren Versuchsansatz der ATP-Gehalt nach Inkubation der Tumorzellen mit  $25 \mu\text{M}$  Cisplatin über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Der Einfluss dieser Konzentration auf den intrazellulären ATP-Gehalt der Zelllinien A2780 und A2780cis ist in Abb. 4.8 dargestellt.

Abb. 4.8 A zeigt, dass der intrazelluläre ATP-Gehalt in den A2780-Zellen nach Inkubation mit  $25 \mu\text{M}$  Cisplatin innerhalb der ersten 12 h um ca. 20 % signifikant ansteigt und anschließend auf 50 % absinkt. Die in diesem Versuch eingesetzte Konzentration ist um das 10-fache höher als der ermittelte  $EC_{50}$ -Wert von Cisplatin für die sensitiven Zellen (s. Kap. 4.1.1). Die Abnahme der Lumineszenz könnte demnach auf zytotoxische Effekte von Cisplatin zurückzuführen sein, die ein Absterben der Zelllinie A2780 bedingen. Auch der ermittelte  $EC_{50}$ -Wert von Cisplatin für die A2780cis-Zellen ist um das 2-fache höher als die eingesetzte Konzentration. In Abb. 4.8 B ist zu erkennen, dass der prozentuale ATP-Gehalt der resistenten Zellen über den beobachteten Zeitraum einen leichten Anstieg aufweist. Dieser ist jedoch nicht statistisch signifikant. Eine Cisplatinkonzentration von  $25 \mu\text{M}$  ist vermutlich nicht ausreichend, um zytotoxische Effekte in den A2780cis-Zellen auszulösen.

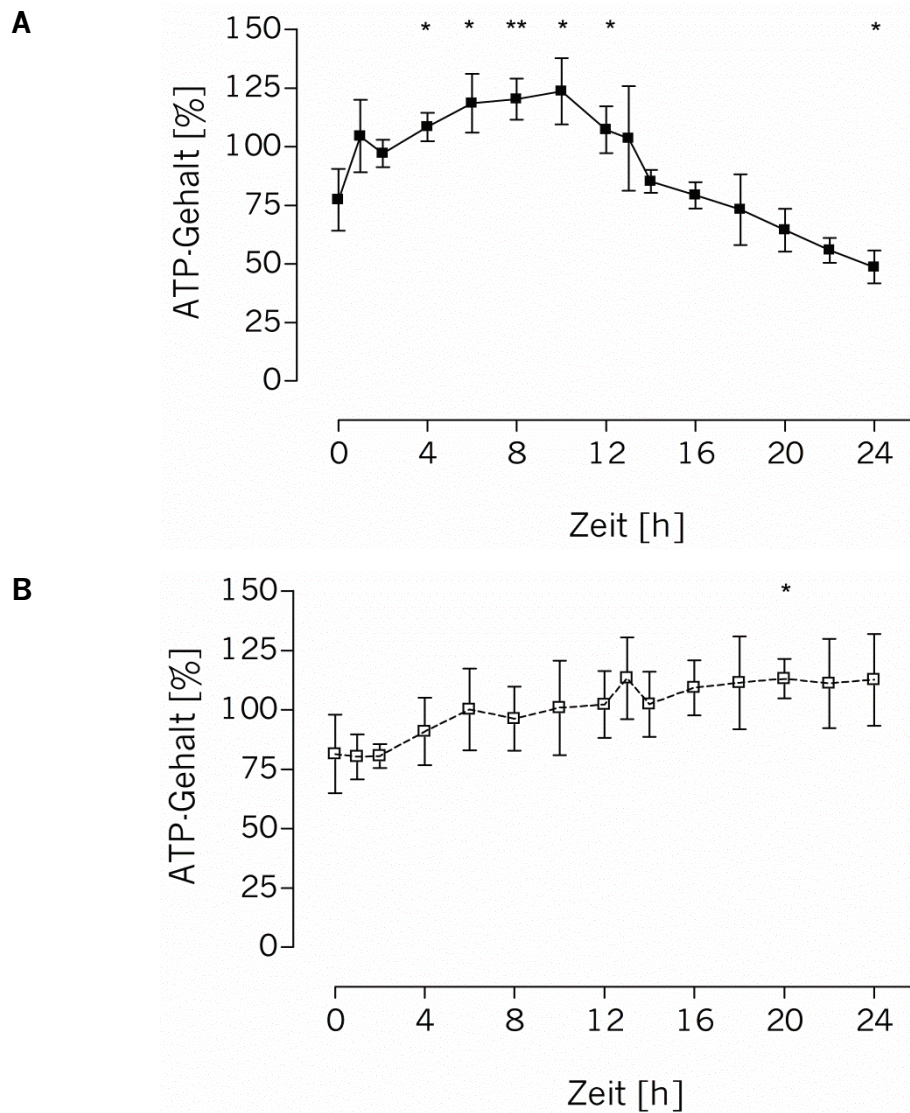


Abb. 4.8: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] nach Inkubation mit 25  $\mu$ M Cisplatin in glucosehaltigem Medium in **A** A2780-Zellen und **B** A2780cis-Zellen über 24 h (MW  $\pm$  SD; n = 3; \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

In einem dritten Experiment wurden die Zellen mit 100  $\mu$ M Cisplatin über einen Zeitraum von 24 h inkubiert und anschließend der ATP-Gehalt der Zellen vermessen. Diese Konzentration wurde auch im Rahmen der Influx- bzw. Effluxversuche eingesetzt. Dieser Versuch sollte dem besseren Verständnis der metabolischen Prozesse während der Kumulationsexperimente dienen. Der zeitabhängige Verlauf des ATP-Gehalts [%] des Zelllinienpaares wird in Abb. 4.9 gezeigt.



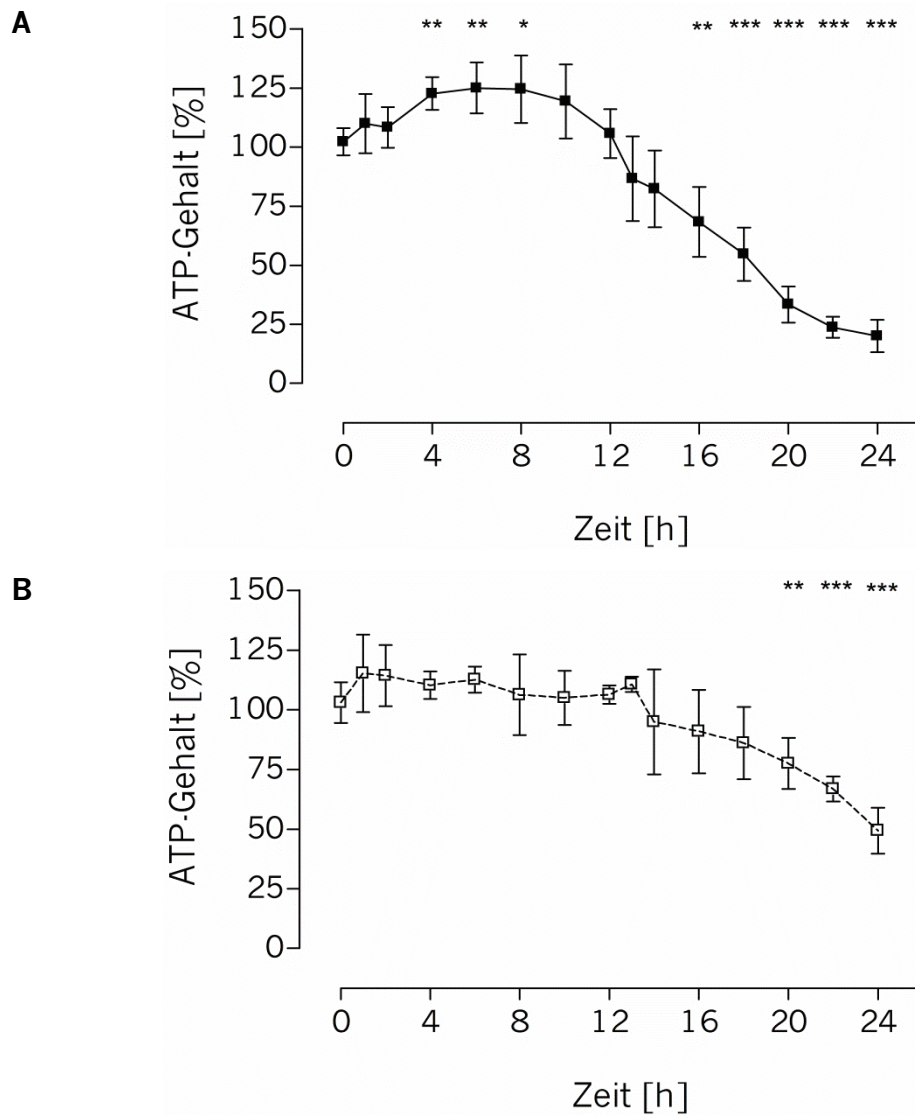


Abb. 4.9: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] nach Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin in glucosehaltigem Medium in **A** A2780-Zellen und **B** A2780cis-Zellen über 24 h (MW  $\pm$  SD; n = 4; \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

Eine Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin führte zunächst zu einem signifikanten Anstieg des ATP-Gehalts um ca. 25 % in der sensitiven Zelllinie innerhalb der ersten 12 h (Abb. 4.9 A). Im weiteren Verlauf nahm dieser auf ein Minimum von ca. 20 % ab. In den resistenten Zellen bleibt der ATP-Gehalt bezogen auf die Wachstumskontrolle über einen Zeitraum von 12 h weitestgehend unverändert (Abb. 4.9 B). Im weiteren Verlauf nahm im Unterschied zu den vorher getesteten Konzentrationen der ATP-Gehalt um ca. 50 % ab. Die in diesem Versuch eingesetzte Cisplatinkonzentration ist

etwa 10-fach höher als der im MTT-Assay ermittelte  $EC_{50}$ -Wert von Cisplatin in A2780cis-Zellen, sodass diese Konzentration ebenfalls zytotoxisch wirkt.

#### **4.2.5 Intrazellulärer ATP-Gehalt nach Inkubation mit Cisplatin unter glucosefreien Bedingungen**

Einige Kumulationsversuche mit Cisplatin wurden in dieser Arbeit in glucosefreiem Medium durchgeführt. Um den Einfluss von ATP auf die Platinsensitivität unter glucosefreien Bedingungen näher zu charakterisieren, wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt nach Inkubation von A2780- bzw. A2780cis-Zellen mit zwei verschiedenen Cisplatinkonzentrationen (25 und 100  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von 24 h bestimmt (s. auch Appendix B2). Der zeitabhängige Verlauf des ATP-Gehalts unter Einfluss von 25  $\mu\text{M}$  Cisplatin in glucosefreiem Medium ist in Abb. 4.10 dargestellt.

Wie bereits bei der Inkubation der sensitiven Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  Cisplatin unter glucosehaltigen Bedingungen beobachtet werden konnte, steigt der zelluläre ATP-Gehalt über einen Zeitraum von 16 h um ca. 20 % im Vergleich zur Wachstumskontrolle an (Abb. 4.10 A). Dieser Anstieg ist jedoch nur bei einer Inkubationsdauer von 6 bzw. 8 h statistisch signifikant. Im weiteren Verlauf nimmt der ATP-Gehalt um ca. 15 % ab (Zeitpunkt 24 h). Der prozentuale ATP-Gehalt der resistenten Zellen zeigt über den beobachteten Zeitraum einen konstanten Verlauf (Abb. 4.10 B).

Des Weiteren wurde auch eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin, die bei Kumulationsversuchen unter glucosefreien Bedingungen eingesetzt wurde, auf den Verlauf des ATP-Gehalts in beiden Zelllinien untersucht. In Abb. 4.11 ist der prozentuale ATP-Gehalt über einen Zeitraum von 24 h für beide Zelllinien dargestellt. Wie auch schon unter glucosehaltigen Bedingungen gezeigt werden konnte, führte auch eine Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin unter glucosefreien Bedingungen zunächst zu einem Anstieg des ATP-Gehalts um ca. 25 % in der sensitiven Zelllinie innerhalb der ersten acht Stunden (Abb. 4.11 A). Dieser Anstieg war jedoch nicht statistisch signifikant.



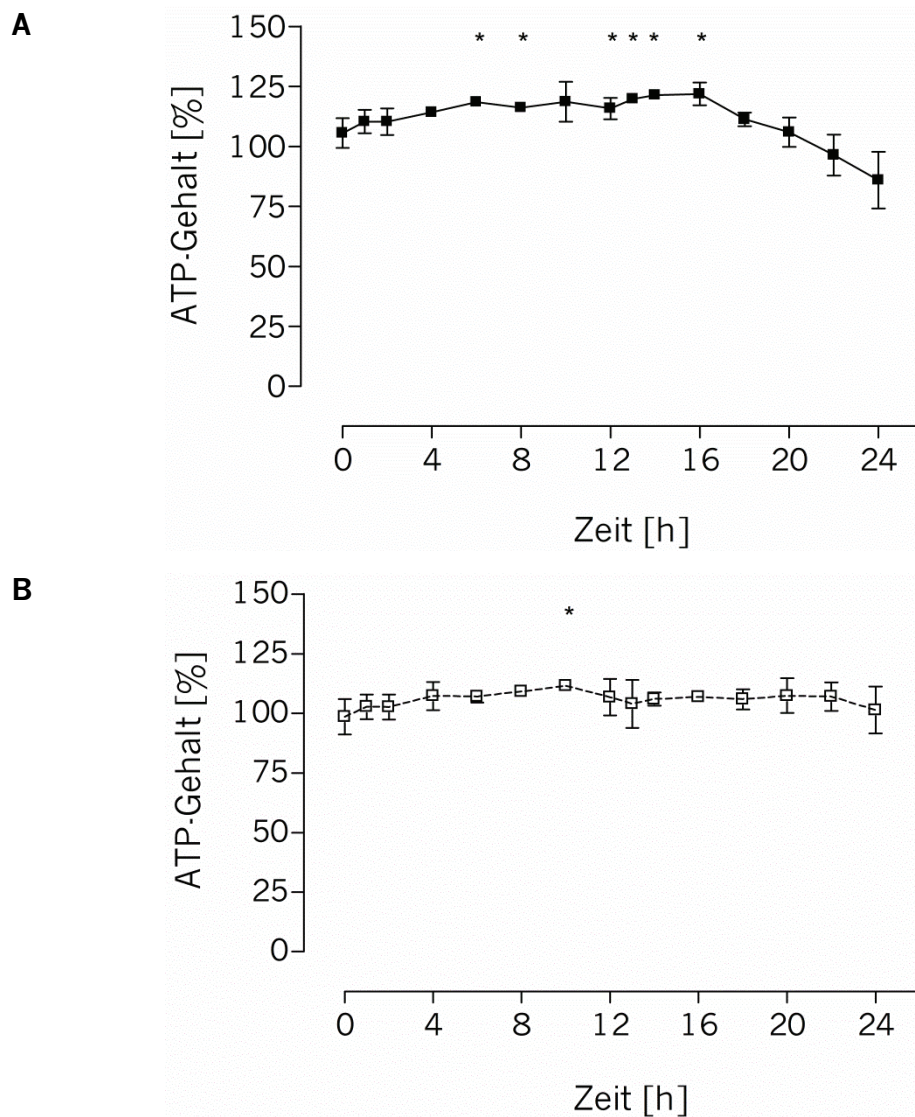


Abb. 4.10: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] nach Inkubation mit 25  $\mu$ M Cisplatin in glucosefreiem Medium in **A** A2780-Zellen und **B** A2780cis-Zellen über 24 h (MW  $\pm$  SD; n = 3; \*:  $p < 0,05$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

Im weiteren Verlauf nimmt dieser bedingt durch den zytotoxischen Effekt von 100  $\mu$ M Cisplatin um ca. 50 % ab. In den resistenten Zellen zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen unter glucosehaltigen Bedingungen ein leichter Anstieg des ATP-Gehalts bezogen auf die Wachstumskontrolle, welcher nach 10 h den Maximalwert erreichte (Abb. 4.11 B). Im weiteren Verlauf nahm der ATP-Gehalt um ca. 25 % ab.

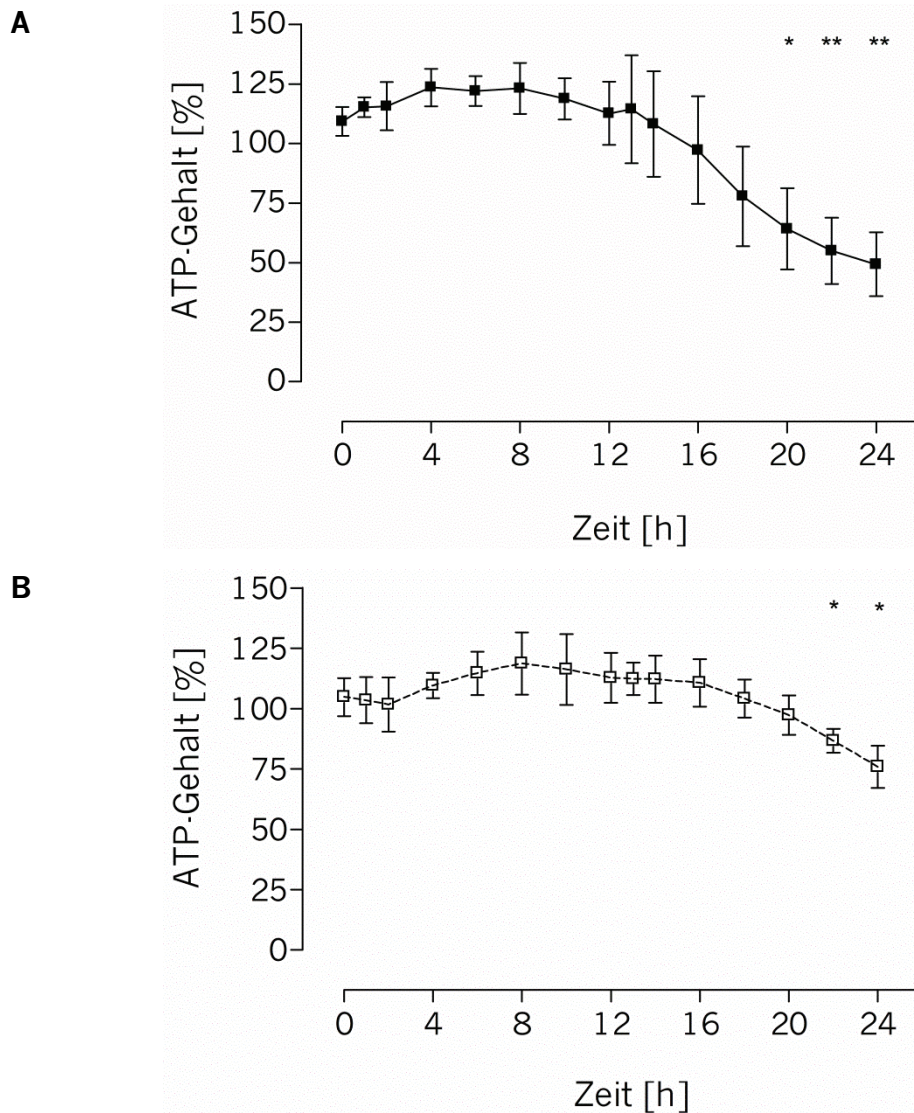


Abb. 4.11: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] nach Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin in glucosefreiem Medium in **A** A2780-Zellen und **B** A2780cis-Zellen über 24 h (MW  $\pm$  SD; n = 3; \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

#### 4.2.6 Intrazellulärer ATP-Gehalt nach Inkubation mit ATP-Depletoren

Als ATP-Depletoren wurden zum einen 2,4-Dinitrophenol (DNP), ein Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette, und zum anderen Oligomycin, ein Inhibitor der mitochondrialen  $F_0F_1$ -ATPase ausgewählt (s. Kap. 3.6.7). Die Depletionsversuche hatten das Ziel, den intrazellulären ATP-Gehalt zu minimieren, um unter energiereduzierten Bedingungen die Platinsensitivität zu untersuchen.

#### 4.2.6.1 Zytotoxizität der ATP-Depletoren

Zunächst war es notwendig, die Zytotoxizität der gewählten ATP-Depletoren in den sensitiven A2780-Zellen und deren cisplatinresistenter Variante A2780cis mit Hilfe des MTT-Assays zu bestimmen.

##### *Oligomycin*

Eine repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurve von Oligomycin ist in Abb. 4.12 dargestellt. In der Abbildung ist ein biphasischer Verlauf der sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Kurve zu erkennen.

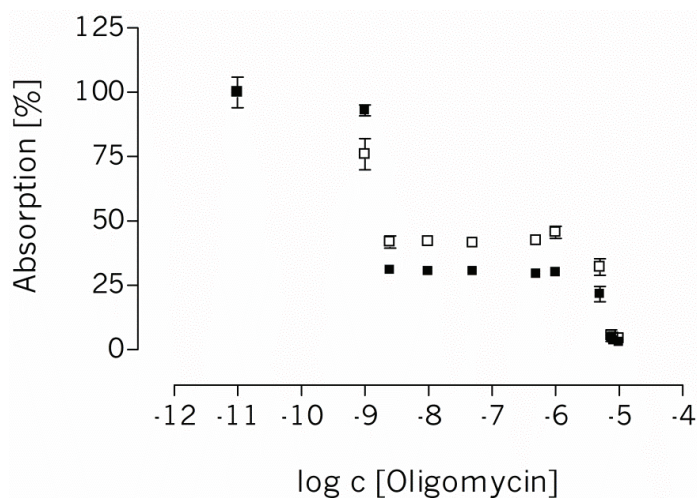


Abb. 4.12: Sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurve von Oligomycin in A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□). Dargestellt ist eine repräsentative Kurve aus einer Reihe von elf unabhängigen Experimenten (vermessen in Triplikaten,  $MW \pm SD$ ). Die Absorption wird angegeben in % bezogen auf die Wachstumskontrolle (100 %).

Die  $EC_{50}$ -Werte des 1. und 2. Wendepunktes der sigmoidalen Kurve wurden mittels nichtlinearer Regression für jede Zelllinie berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.6 zusammengefasst.

Die  $EC_{50}$ -Werte im Bereich des ersten Wendepunktes lagen im nanomolaren Bereich; die des zweiten Wendepunktes im mikromolaren Bereich. Die Sensitivität der beiden Tumorzelllinien gegenüber Oligomycin war vergleichbar.

Tab. 4.6:  $pEC_{50}$ - und  $EC_{50}$ -Werte von Oligomycin nach einer Inkubation über 72 h ( $pEC_{50}$ :  $MW \pm SE$ ;  $n = 11$ ; Student's  $t$ -Test für unabhängige Stichproben).

	A2780	A2780cis	
	$pEC_{50}$ ( $EC_{50}$ )	$pEC_{50}$ ( $EC_{50}$ )	p-Wert
1. Wendepunkt	$8,776 \pm 0,05$ (1,68 nM)	$8,923 \pm 0,07$ (1,19 nM)	0,0978
2. Wendepunkt	$5,183 \pm 0,02$ (6,57 $\mu$ M)	$5,151 \pm 0,02$ (7,06 $\mu$ M)	0,3239

Repräsentative sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurven für die einzelnen Wendepunktbereiche sind in Abb. 4.13 dargestellt (vgl. auch Appendix B3).

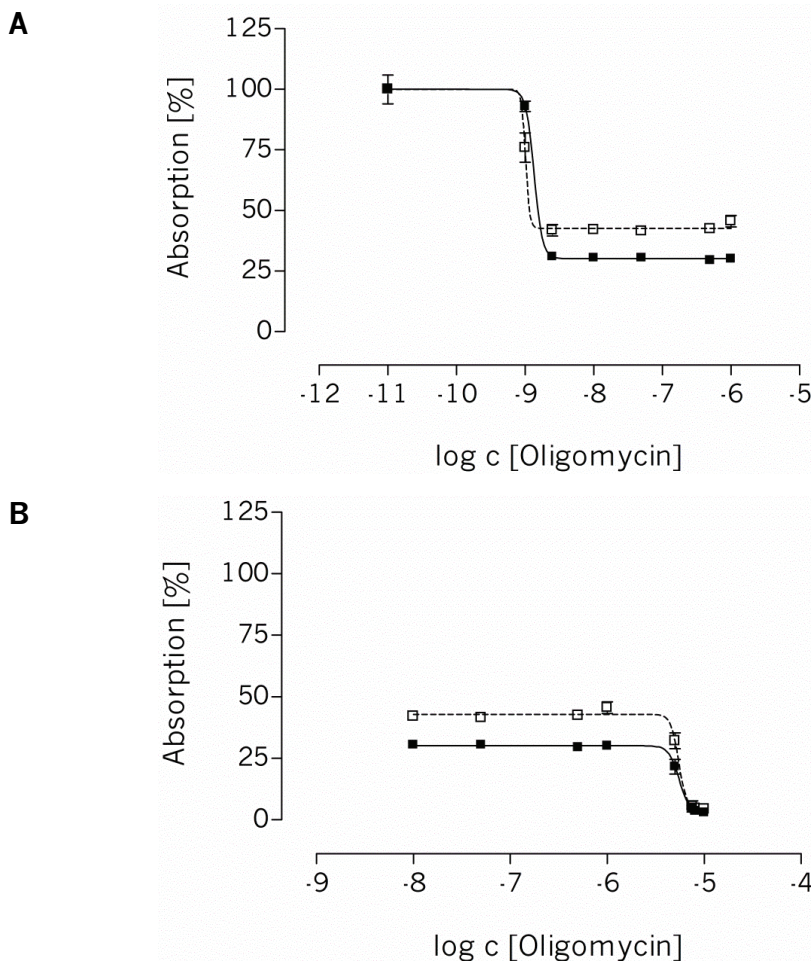


Abb. 4.13: Sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurven von Oligomycin in A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□). Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Kurve für die Berechnung des 1. (**A**) und des 2.  $EC_{50}$ -wertes (**B**) aus einer Reihe von elf unabhängigen Experimenten (vermessen in Triplikaten,  $MW \pm SD$ ). Die Absorption wird angegeben in % bezogen auf die Wachstumskontrolle (100 %).



Das in dieser Arbeit verwendete Oligomycin ist ein Gemisch aus Oligomycin A, B und C und besteht zum größten Teil (~ 65 %) aus Oligomycin A. Der biphasische Verlauf kann durch die unterschiedlichen  $EC_{50}$ -Werte der einzelnen Komponenten begründet werden.

Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in dem ATP-reduzierenden Wirkungsmechanismus von Oligomycin, welcher bei niedrigen Konzentrationen zunächst zu einer Beeinträchtigung der Zellvitalität führt, erkennbar in einer Abnahme der Absorption. Grundlegende Stoffwechselfunktionen werden aufrechterhalten. Erst bei höheren Konzentrationen überwiegt der zytotoxische Effekt.

#### *2,4-Dinitrophenol*

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Zytotoxizität von 2,4-Dinitrophenol in A2780- und A2780cis-Zellen werden in Abb. 4.14 und Tab. 4.7 (s. auch Appendix B3) gezeigt.

Im Vergleich zu Oligomycin waren die  $EC_{50}$ -Werte von DNP in beiden Zelllinien ca. um den Faktor 10 höher. Auch hier finden sich keine signifikanten Unterschiede in der Sensitivität gegenüber DNP zwischen beiden Zelllinien.

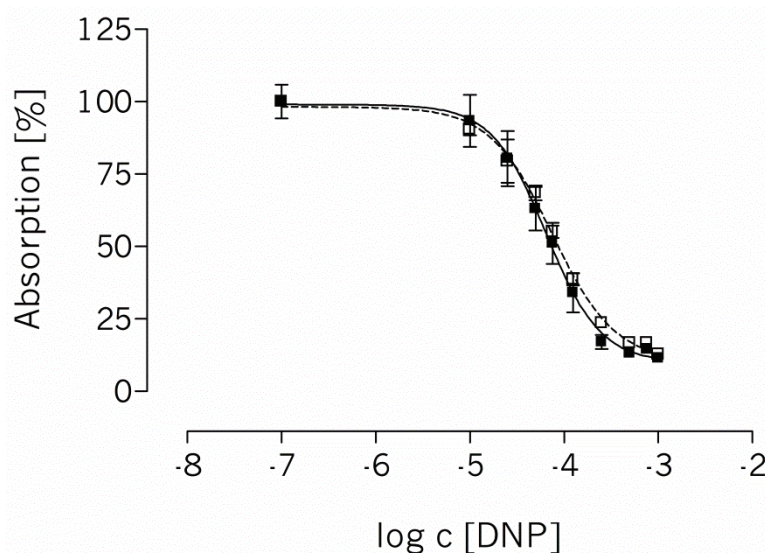


Abb. 4.14: Sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurve von 2,4-Dinitrophenol in A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□). Dargestellt ist eine repräsentative Kurve aus einer Reihe von sieben unabhängigen Experimenten (vermessen in Triplikaten,  $MW \pm SD$ ). Die Absorption wird angegeben in % bezogen auf die Wachstumskontrolle (100 %).

Tab. 4.7:  $pEC_{50}$ - und  $EC_{50}$ -Werte von 2,4-Dinitrophenol nach einer Inkubation über 72 h ( $pEC_{50}$ :  $MW \pm SE$ ;  $n = 7$ ; Student's t-Test für unabhängige Stichproben).

A2780	A2780cis	
$pEC_{50}$ ( $EC_{50}$ )	$pEC_{50}$ ( $EC_{50}$ )	p-Wert
$4,279 \pm 0,13$ ( $52,58 \mu\text{M}$ )	$4,156 \pm 0,11$ ( $69,82 \mu\text{M}$ )	0,4787

#### 4.2.6.2 Versuche zur Optimierung der Depletionsbedingungen (Oligomycin)

Ausgehend von den Zytotoxizitätsversuchen wurde anschließend der Einfluss der ATP-Depletoren auf den intrazellulären ATP-Gehalt untersucht. Dabei wurden Konzentrationen eingesetzt, die weniger zytotoxisch waren als der ermittelte  $EC_{50}$ -Wert der jeweiligen Substanz.

##### Glucosehaltige Bedingungen

Der intrazelluläre ATP-Gehalt der A2780- und A2780cis-Zellen nach Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$  Oligomycin in glucosehaltigem Medium ist in Abb. 4.15 dargestellt (vgl. Appendix B4).

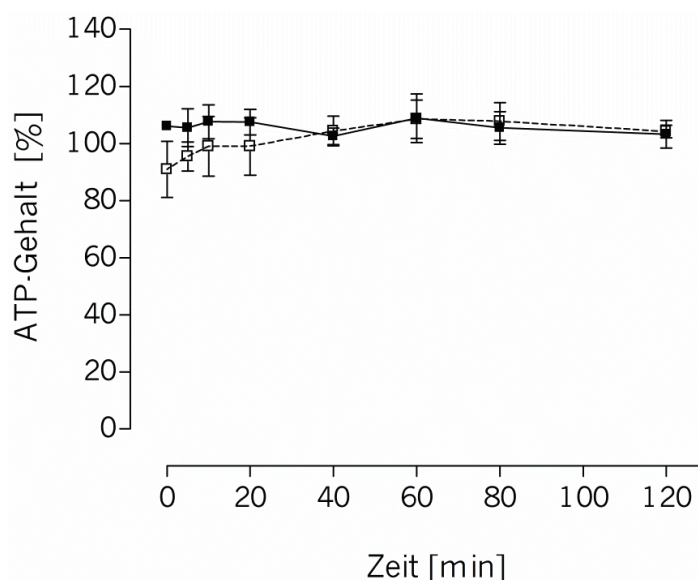


Abb. 4.15: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] der A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□) nach Inkubation mit  $1 \mu\text{M}$  Oligomycin in glucosehaltigem Medium über 120 min ( $MW \pm SD$ ;  $n = 3$ ). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass der ATP-Gehalt über den untersuchten Zeitraum von 2 h nahezu unverändert bleibt. Es ist bekannt, dass Tumorzellen Energie in Form von ATP über die Glykolyse produzieren können, wenn die mitochondriale Atmungskette gehemmt wird [44,265]. In einem weiteren Versuchsansatz wurde aus diesem Grund glucosefreies Medium eingesetzt. Gleichzeitig wurde in diesem Experiment der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Oligomycin auf den intrazellulären ATP-Gehalt über einen Zeitraum von 45 min untersucht.

#### *Konzentrationsabhängigkeit*

Der Verlauf des ATP-Gehalts in Abb. 4.16 zeigt, dass bei Einsatz der Oligomycin-konzentrationen 1 und 10 nM in glucosefreiem Medium der ATP-Gehalt in beiden Zelllinien ungefähr auf dem Niveau der unbehandelten Zellen liegt. Eine Behandlung mit 100 nM bzw. 1  $\mu$ M Oligomycin führt zu einer Abnahme des intrazellulären ATP-Gehalts, die mit längerer Inkubationsdauer und steigender Oligomycinkonzentration zunimmt, wobei das Ausmaß der Reduktion in den sensitiven Zellen (Abb. 4.16 A) stärker ausgeprägt ist als in den resistenten Zellen (Abb. 4.16 B).

Nach 45-minütiger Inkubation mit 1  $\mu$ M Oligomycin unter glucosefreien Bedingungen wurde der ATP-Gehalt der Zelllinien A2780 bzw. A2780cis auf 32 % bzw. 67 % des Ausgangswertes reduziert (s. Appendix B4). Diese Konzentration wurde für weitere Untersuchungen zur ATP-Depletion eingesetzt.

#### *Zeitabhängigkeit*

Die optimale Inkubationsdauer mit Oligomycin wurde in einem weiteren Versuch ermittelt. Dazu wurde das Zelllinienpaar A2780/A2780cis über einen Zeitraum von 2 h mit 1  $\mu$ M Oligomycin inkubiert. Der zeitabhängige Verlauf ist in Abb. 4.17 dargestellt (s. auch Appendix B4).

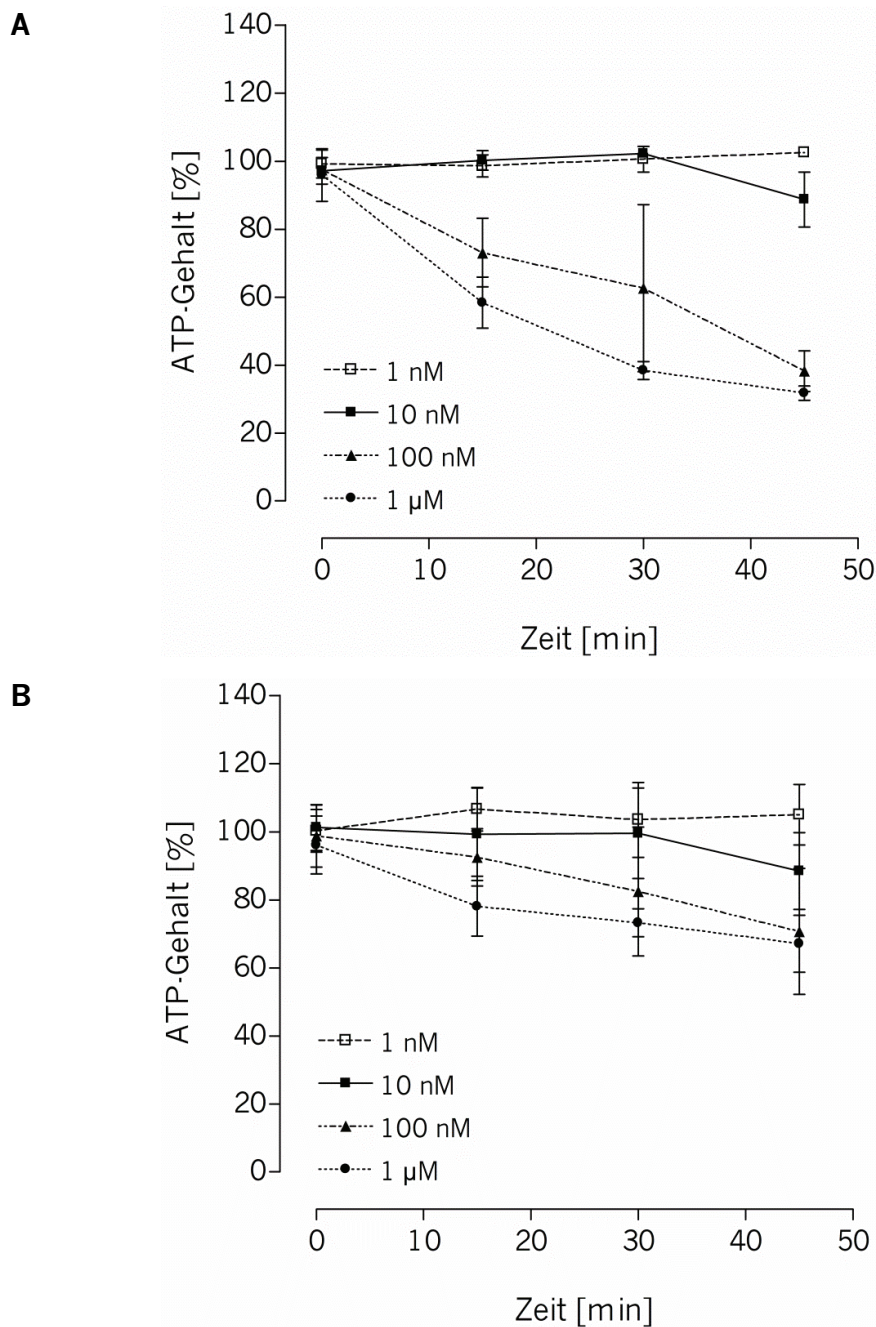


Abb. 4.16: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] der **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Oligomycin (1 nM – 1 µM) in glucosefreiem Medium über 45 min (MW ± SD; n = 3 – 4). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

Beide Zelllinien zeigen einen ähnlichen Verlauf, wobei die Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts in A2780-Zellen stärker ausgeprägt ist als in A2780cis-Zellen. Innerhalb der ersten 30 min nimmt der ATP-Gehalt unter Behandlung mit 1 µM Oligomycin um 55 % (A2780) bzw. 40 % (A2780cis) ab (vgl. Appendix B4) und



erreicht dann eine Plateauphase. Aus diesem Grund wurde für weitere Versuche eine Inkubationsdauer von 30 min ausgewählt.

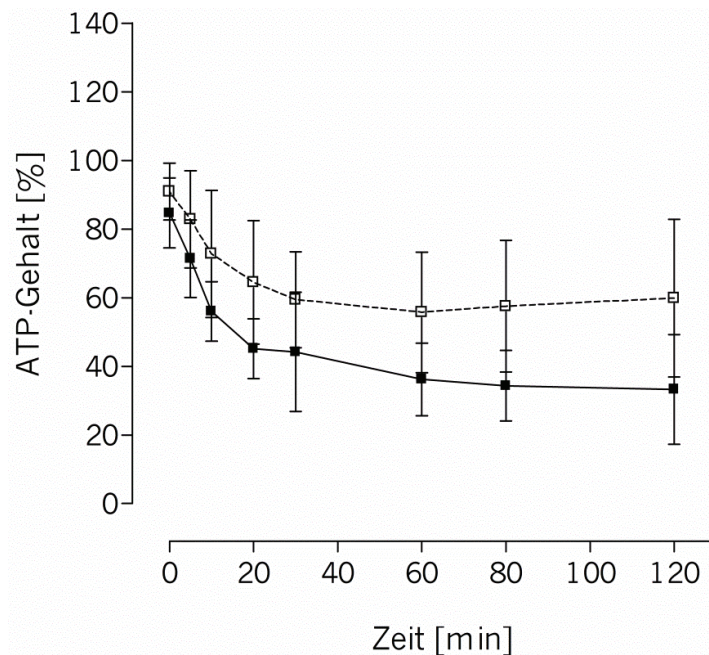


Abb. 4.17: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] der A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□) nach Inkubation mit  $1 \mu\text{M}$  Oligomycin in glucosefreiem Medium über 120 min ( $MW \pm SD$ ;  $n = 4$ ). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual auf diesen bezogen.

#### Wiederherstellung des ATP-Gehalts nach Inkubation mit Oligomycin

Um die Bedingungen für die ATP-Depletionsversuche näher zu charakterisieren, wurde untersucht, wie sich der Ersatz des oligomycinhaltigen Mediums durch glucosefreies (Abb. 4.18 A) bzw. glucosehaltiges (Abb. 4.18 B) Medium auf den ATP-Gehalt auswirkt. Dazu wurden die Zellen über 1 h mit  $1 \mu\text{M}$  Oligomycin unter glucosefreien Bedingungen inkubiert und nach Ablauf dieser Inkubationszeit das substanzhaltige Nährmedium für 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min gegen glucosefreies bzw. glucosehaltiges Medium ausgetauscht.

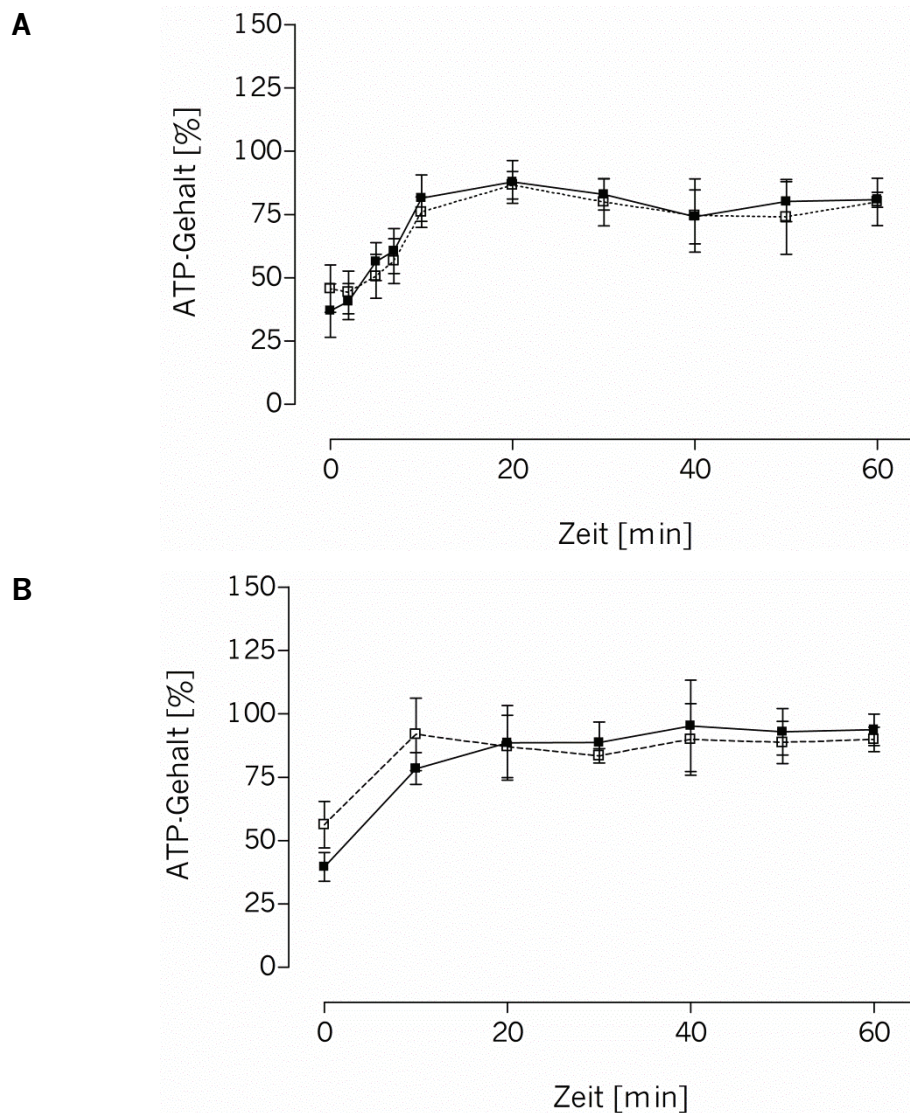


Abb. 4.18: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] der A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□) nach Inkubation mit 1  $\mu$ M Oligomycin in glucosefreiem Medium über 60 min und anschließendem Austausch durch **A** glucosefreies Medium bzw. durch **B** glucosehaltiges Medium bis zu einer Zeit von 60 min (MW  $\pm$  SD; n = 3 – 5). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

Anhand der Abbildungen ist zu erkennen, dass sowohl unter glucosefreien als auch unter -haltigen Bedingungen der ATP-Gehalt innerhalb der ersten 20 min nach Entfernung des Oligomycins wieder auf 85 – 95 % ansteigt (s. Appendix B4). Konsequenterweise wurde daher in allen folgenden Experimenten Oligomycin in dem Inkubationsmedium belassen.

Daraus ergaben sich die Bedingungen für weitere Untersuchungen des Einflusses der ATP-Depletion auf die Platinsensitivität. Eine ausreichende Depletion des ATP-Gehalts

kann nach einer 30-minütigen Präinkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin unter glucosefreien Bedingungen und nachfolgender Koinkubation mit Cisplatin erzielt werden.

#### 4.2.6.3 Versuche zur Optimierung der Depletionsbedingungen (2,4-Dinitrophenol)

Wie bereits zuvor gezeigt, sollte für die Depletionsversuche glucosefreies Medium verwendet werden. Auch hier wurde ausgehend von den Ergebnissen der Zytotoxizitätsbestimmungen zunächst eine Konzentration unterhalb des ermittelten  $\text{EC}_{50}$ -Wertes eingesetzt. Im Rahmen eines Vorversuchs wurde nach Inkubation der Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  DNP der intrazelluläre ATP-Gehalt in beiden Zelllinien bestimmt. In Abb. 4.19 ist zu erkennen, dass sowohl mit der Zeit, als auch mit der eingesetzten DNP-Konzentration der prozentuale ATP-Gehalt unverändert bleibt.

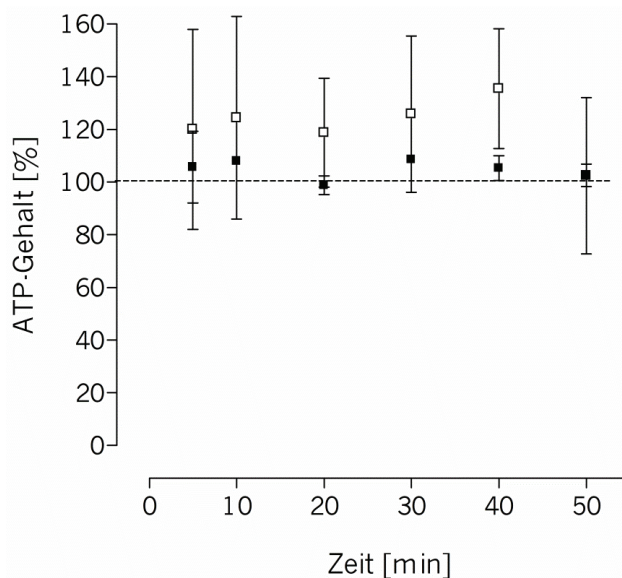


Abb. 4.19: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] der A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□) nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  2,4-Dinitrophenol in glucosefreiem Medium über 50 min. Dargestellt ist ein Vorversuch (vermessen in Triplikaten,  $\text{MW} \pm \text{SD}$ ). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

In A2780cis-Zellen liegen die Werte unter Behandlung mit DNP sogar über dem Ausgangsniveau (s. auch Appendix B5).

Da unter den gewählten Bedingungen keine Reduktion des ATP-Gehalts zu beobachten war, wurde dieser Versuch direkt mit einer höheren DNP-Konzentration [100  $\mu\text{M}$ ] und über einen längeren Zeitraum von 2 h untersucht. Wie in Abb. 4.20 zu erkennen ist,

ändert sich hier der prozentuale ATP-Gehalt ebenfalls nur geringfügig (vgl. auch Appendix B5).

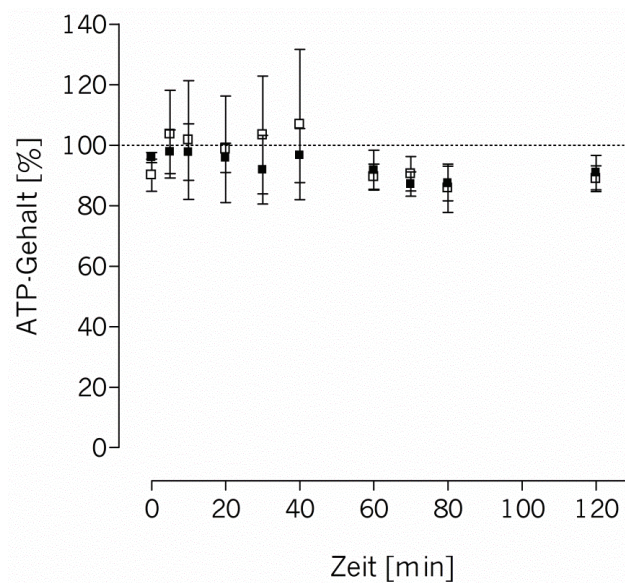


Abb. 4.20: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] der A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□) nach Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  2,4-Dinitrophenol in glucosefreiem Medium über 120 min ( $MW \pm SD$ ;  $n = 3 - 4$ ). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

Eine 80-minütige Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  DNP führte in beiden Zelllinien zu einer Reduktion des ATP-Gehalts um maximal 15 %. Da diese Konzentration schon im zytotoxischen Bereich für die verwendeten Tumorzellen liegt und auch keine ausreichende Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts erzielt werden konnte, wurde DNP nicht weiter für die Charakterisierung der Platinsensitivität nach ATP-Depletion verwendet.

### 4.3 Einfluss von intra- und extrazellulärem ATP auf die Platinsensitivität

#### 4.3.1 Einfluss von intrazellulärem ATP auf die Platinkumulation

Einer der möglichen Mechanismen der Cisplatinresistenz ist eine verminderte Platinkumulation. Wie in Kap. 4.1.2 erwähnt, werden für die Kumulationsversuche hohe extrazelluläre Cisplatinkonzentrationen eingesetzt, um den Influxprozess zu

begünstigen. Es wird postuliert, dass Platinkomplexe neben der passiven Diffusion auch über aktive Transportprozesse in die Tumorzelle aufgenommen werden [87]. Der folgende Versuch hatte zum Ziel, den Einfluss des intrazellulären ATP-Gehalts auf die Kumulation von Cisplatin über die Zeit zu untersuchen. In Abb. 4.21 ist der Effekt von Oligomycin auf die Cisplatin Aufnahme dargestellt (s. auch Appendix C1).

Der Einfluss der unabhängigen Variablen Zeit und Behandlung mit Oligomycin auf den intrazellulären Platingehalt wurde mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) statistisch ausgewertet (s. Tab. 4.8). Zudem wurde die Interaktion der beiden Variablen ermittelt.

Tab. 4.8: Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA zur Untersuchung des Einflusses von Oligomycin, Zeit und Interaktion von Oligomycin und Zeit auf die Kumulation von Cisplatin.

Variable	A2780		A2780cis	
	% der Gesamtvariabilität	p-Wert	% der Gesamtvariabilität	p-Wert
Oligomycin [1 µM]	8,01	0,0025	2,07	n.s.
Zeit [min]	69,92	< 0,0001	72,48	< 0,0001
Interaktion	2,41	n.s.	0,51	n.s.

*n.s.: nicht signifikant*

Es ist zu erkennen, dass in beiden Zelllinien mit Zunahme der Inkubationsdauer mit Cisplatin der intrazelluläre Platingehalt linear ansteigt ( $p < 0,0001$ , zweifaktorielle ANOVA). Während der Inkubation mit 1 µM Oligomycin konnte in beiden Zelllinien eine Reduktion der Platinkumulation beobachtet werden. Abb. 4.21 A zeigt, dass der intrazelluläre Platingehalt in den ATP-reduzierten A2780-Zellen im Vergleich zu den unter Standardbedingungen kultivierten Zellen um 18 – 47 % vermindert ist ( $p = 0,0025$ , zweifaktorielle ANOVA). In den A2780cis-Zellen (Abb. 4.21 B) wurde die Kumulation von Cisplatin unter Einfluss von Oligomycin zu einem geringeren Ausmaß reduziert (16 – 21 %). Dieses Ergebnis war jedoch nicht statistisch signifikant ( $p = 0,1394$ , zweifaktorielle ANOVA). Die starken Streuungen der Messergebnisdaten sind vermutlich auf die Verwendung von glucosefreiem Medium und einem Mangel an intrazellulärem ATP zurückzuführen.



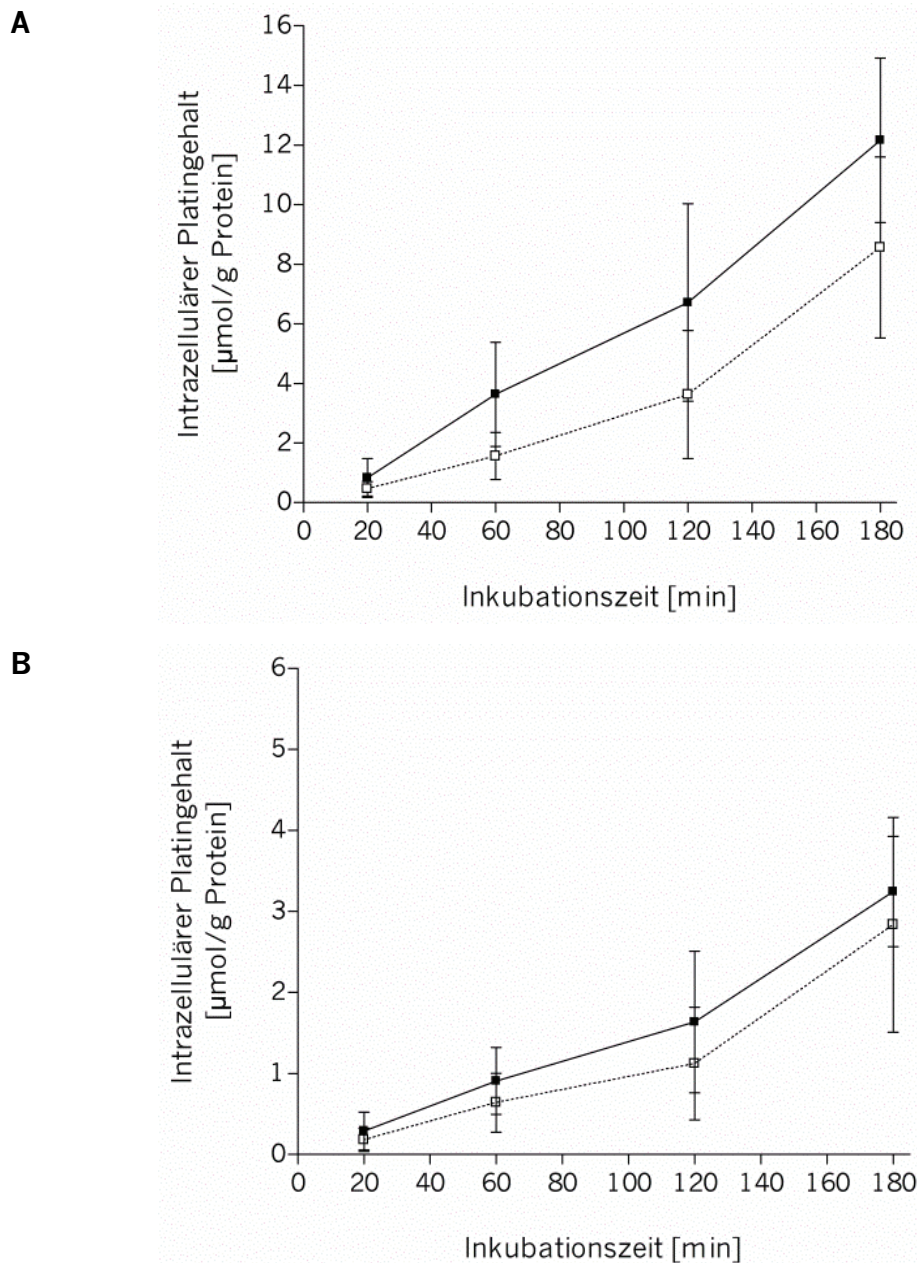


Abb. 4.21: Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin ohne (■) oder mit halbstündiger Prä- und anschließender Koinkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin (□) ( $MW \pm SD$ ;  $n = 3 - 5$ ). Alle Inkubationen wurden in glucosefreiem Medium durchgeführt.

#### 4.3.2 Einfluss von extrazellulärem ATP auf die Platinkumulation

In dem vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung des intrazellulären ATP-Gehalts eine Reduktion des intrazellulären Platingehalts nach Inkubation mit Cisplatin zur Folge hat. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass im

Umkehrschluss die Zugabe von extrazellulärem ATP zu einer Steigerung des Platingehalts führen könnte. Die  $EC_{50}$ -Werte von ATP für A2780- und A2780cis-Zellen wurden bereits von A. Rotte aus unserer Arbeitsgruppe bestimmt (115,3  $\mu$ M und 5,7 mM) [187]. Es wurde bei den nachfolgenden Versuchen darauf geachtet, dass die gewählte Konzentration unterhalb des  $EC_{50}$ -Wertes lag. Demnach wurden die Zellen mit 100  $\mu$ M ATP unter glucose- und serumfreien Bedingungen sowohl über 10 min als auch über 60 min mit 100  $\mu$ M Cisplatin koinkubiert. Die Verwendung von serumfreiem Medium in den Influxexperimenten war notwendig, um eine mögliche Hydrolyse von ATP durch Enzyme des fetalen Kälberserums zu verhindern [181]. Kitagawa et al. zeigten in einer Studie, dass der Effekt von extrazellulärem ATP auf die Membranpermeabilität erst nach vorheriger ATP-Depletion beobachtet werden kann [176]. Aus diesem Grund wurde der intrazelluläre Platingehalt in einem weiteren Versuchsansatz zusätzlich nach einer 30-minütigen Präinkubation mit 1  $\mu$ M Oligomycin und anschließender Koinkubation mit ATP und Cisplatin für die entsprechende Zeit gemessen. Die Ergebnisse sind in den Abb. 4.22 und Abb. 4.23 dargestellt (s. auch Appendix C1).

Nach einer Koinkubation mit 100  $\mu$ M ATP über 10 min zeigte sich weder in den sensitiven (Abb. 4.22 A) noch in den resistenten Zellen (Abb. 4.22 B) ein Einfluss auf den intrazellulären Platingehalt. Auch eine vorherige ATP-Depletion mit 1  $\mu$ M Oligomycin führte zu keiner Veränderung des intrazellulären Platingehalts in beiden Zelllinien.

Die Ergebnisse für eine Koinkubationsdauer von 60 min sind in Abb. 4.23 dargestellt. In Abb. 4.23 A ist zu erkennen, dass eine ATP-Koinkubation zu einem erhöhten intrazellulären Platingehalt in den sensitiven Zellen führt ( $p = 0,0464$ ). In den resistenten Zellen wurde unter Einfluss von ATP eine Steigerung des mittleren Platingehalts um ca. 18 % beobachtet (Abb. 4.23 B). Diese Veränderung war jedoch nicht statistisch signifikant ( $p = 0,3545$ ).

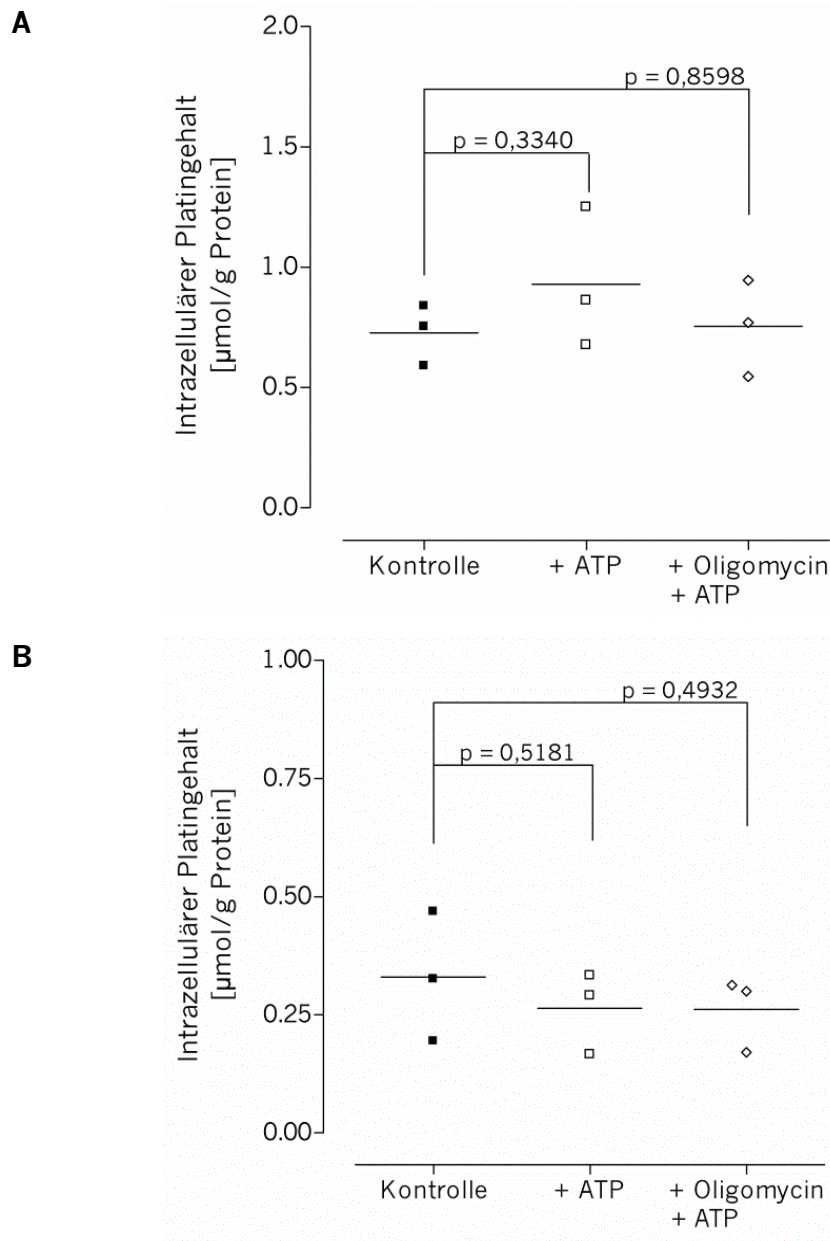


Abb. 4.22: Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin, nach Koinkubation von  $100 \mu\text{M}$  ATP und  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin sowie nach halbstündiger Präinkubation mit  $1 \mu\text{M}$  Oligomycin und anschließender Koinkubation mit ATP und Cisplatin (jeweils in einer Endkonzentration von  $100 \mu\text{M}$ ) über 10 min (MW;  $n = 3$ ; Student's *t*-Test für unabhängige Stichproben). Alle Inkubationen wurden in serum- und glucosefreiem Medium durchgeführt.

Auch bei einer Koinkubation über 60 min wurde kein Einfluss einer vorherigen ATP-Depletion auf die Platinkumulation in A2780- und A2780cis-Zellen beobachtet.



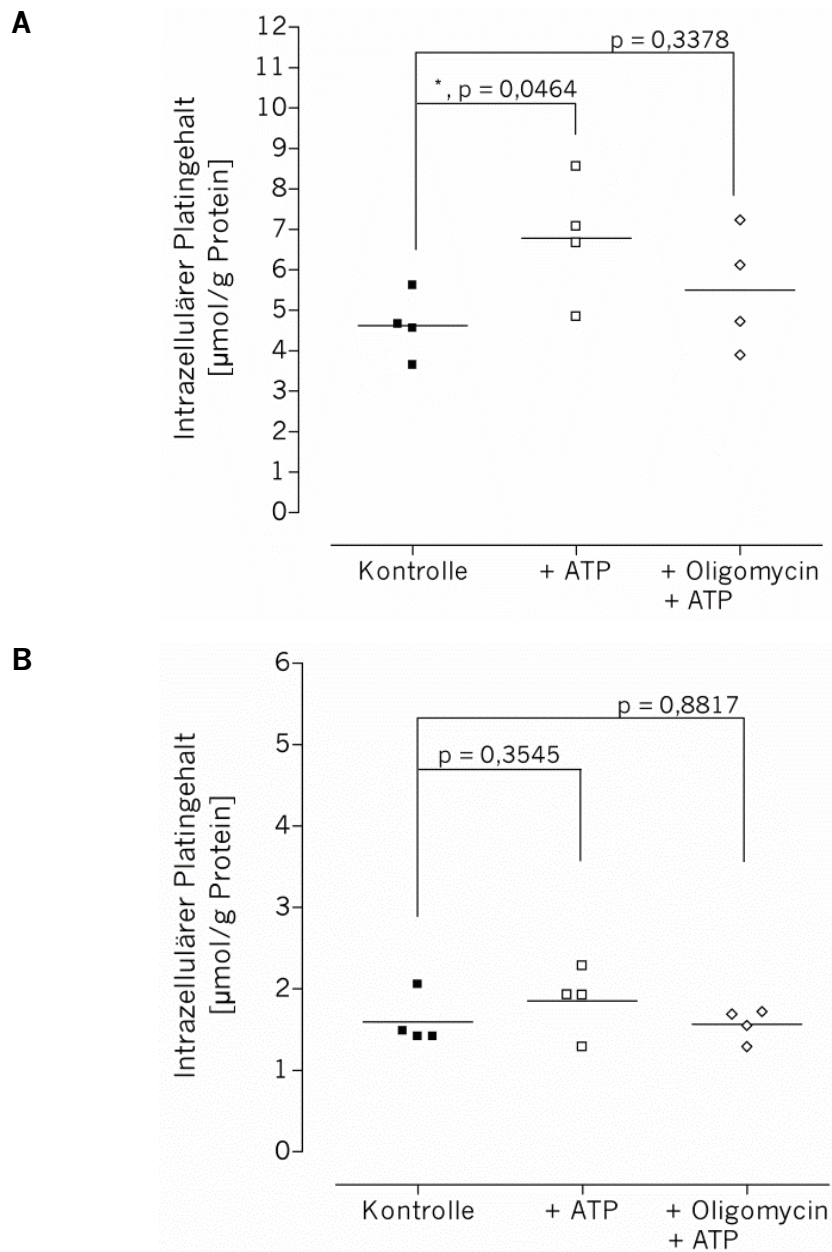


Abb. 4.23: Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin, nach Koinkubation von  $100 \mu\text{M}$  ATP und  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin sowie nach halbstündiger Präinkubation mit  $1 \mu\text{M}$  Oligomycin und anschließender Koinkubation mit ATP und Cisplatin (jeweils in einer Endkonzentration von  $100 \mu\text{M}$ ) über 60 min (MW;  $n = 4$ ; Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Alle Inkubationen wurden in serum- und glucosefreiem Medium durchgeführt.

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass sowohl extrazelluläres ATP, als auch intrazelluläres ATP eine Rolle in der Platinkumulation in sensitiven Ovarialkarzinomzellen spielen.

### 4.3.3 Chemische Interaktion von Oligomycin und Cisplatin

Da im Rahmen der oben beschriebenen Versuche Oligomycin gleichzeitig mit Cisplatin eingesetzt wurde, ist es möglich, dass die beiden Substanzen im Nährmedium ein Reaktionsprodukt bilden, dessen Aufnahme in die Zelle verändert sein kann. Eine mögliche chemische Interaktion der beiden Kombinationspartner wurde mit Hilfe der  $^{195}\text{Pt}$ -NMR-Spektrometrie überprüft. Das Mischungsverhältnis von Oligomycin und Cisplatin beträgt 1:100, da dieses Verhältnis auch in den zeitabhängigen Influxversuchen verwendet wurde. Demnach wurden 5 mM Cisplatin und 50  $\mu\text{M}$  Oligomycin in einer 1:1-Mischung aus PBS-Puffer und Ethanol bei 37 °C inkubiert. Über einen Zeitraum von 22 h wurde alle 2 h ein  $^{195}\text{Pt}$ -NMR-Spektrum aufgenommen. Wie in Abb. 4.24 zu erkennen ist, konnte kein Reaktionsprodukt beobachtet werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass eine mögliche Adduktbildung zwischen Oligomycin und Cisplatin einen Einfluss auf die zelluläre Platinkumulation hat.

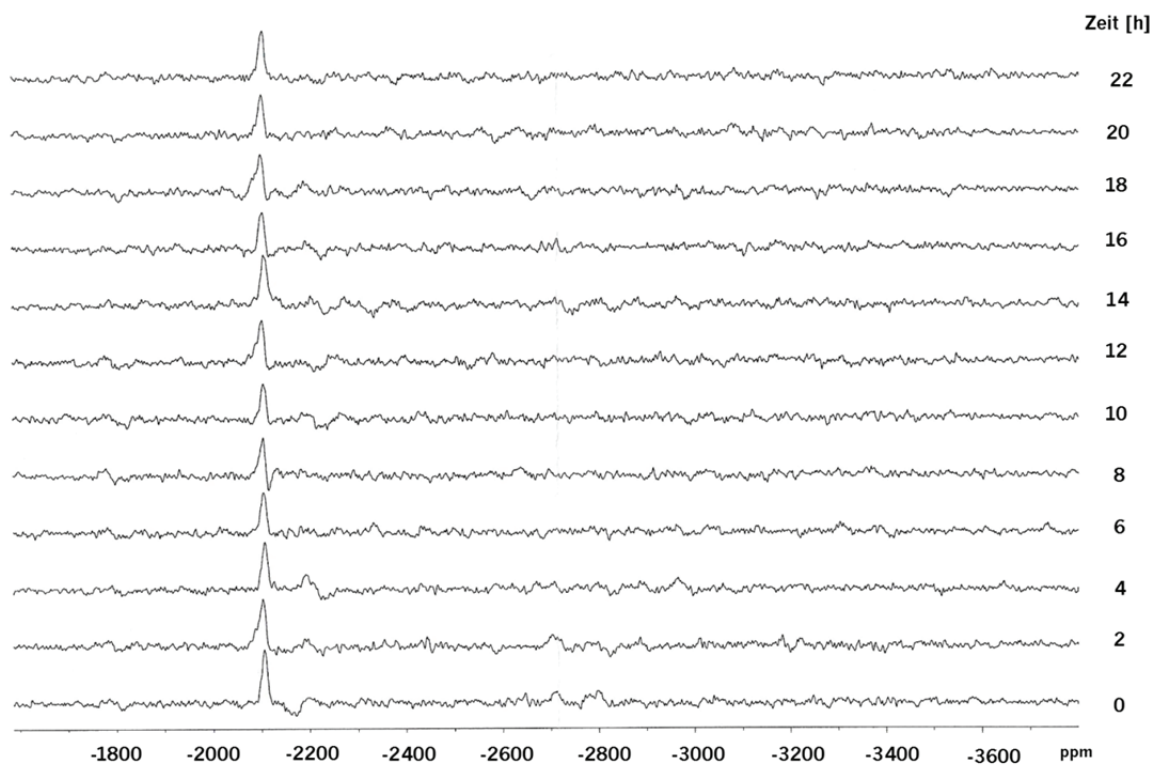


Abb. 4.24:  $^{195}\text{Pt}$ -NMR-Spektrum eines Gemischs bestehend aus 5 mM Cisplatin und 50  $\mu\text{M}$  Oligomycin in PBS/Ethanol (1:1) bei 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit.

#### 4.3.4 Einfluss von intrazellulärem ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin

Es wurde häufig gezeigt, dass der intrazelluläre Platingehalt im direkten Zusammenhang mit der Zytotoxizität der Platinkomplexe steht. Als weiterer wichtiger Parameter wurde deshalb die Zytotoxizität von Cisplatin unter Einfluss von Oligomycin bestimmt. Es wurde vermutet, dass eine Reduktion der Platinkumulation unter Einfluss von Oligomycin auch zu einer Verminderung der Zytotoxizität von Cisplatin führen könnte.

Abb. 4.25 gibt einen Überblick über die mit dem MTT-Assay ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven in A2780- und A2780cis-Zellen (vgl. auch Appendix C2).

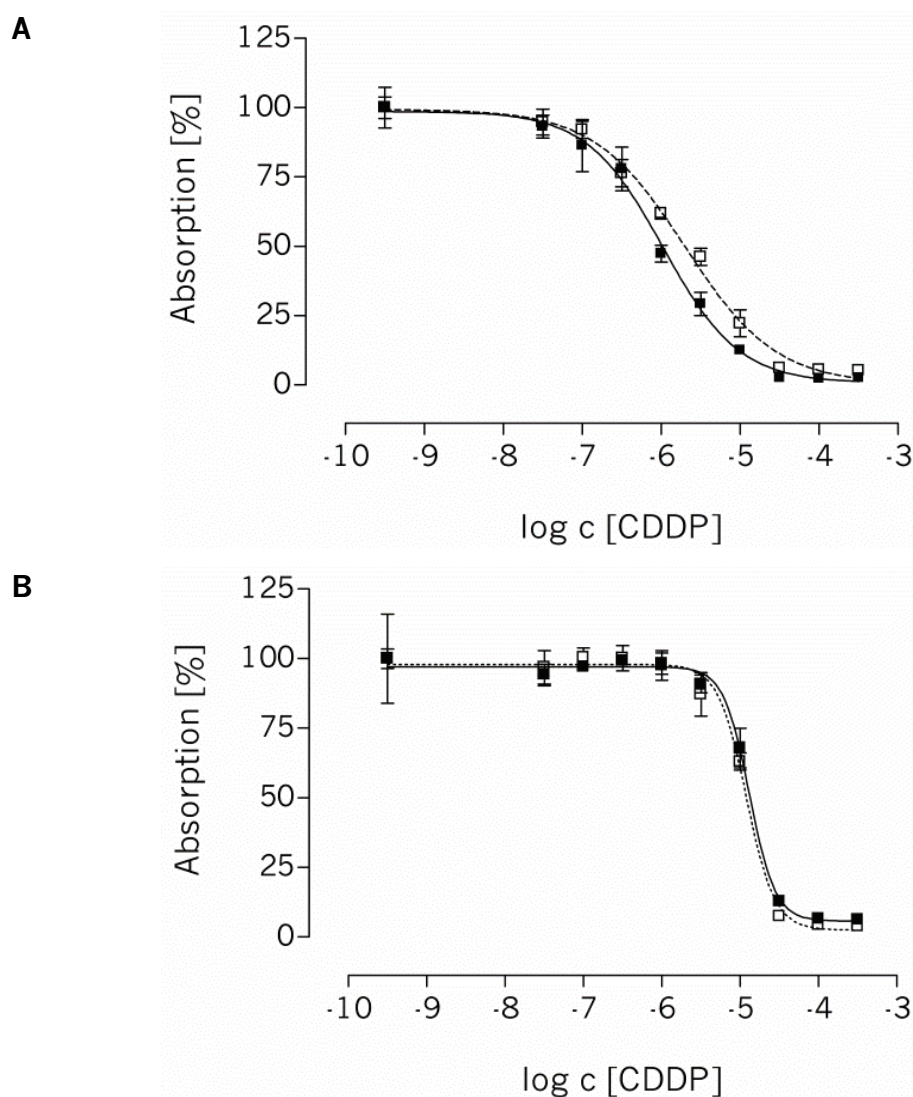


Abb. 4.25: Sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen ohne (■) und mit 1 μM Oligomycin (□). Dargestellt sind jeweils repräsentative Kurven aus einer Reihe von sieben unabhängigen Experimenten (vermessen in Triplikaten, MW ± SD). Die Absorption wird angegeben in % bezogen auf die Wachstumskontrolle (100 %).

Die Zytotoxizität von Cisplatin unter Einfluss von 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin ist für jede Zelllinie in Tab. 4.9 dargestellt.

Tab. 4.9:  $pEC_{50}$ - und  $EC_{50}$ -Werte von Cisplatin im Vergleich zu den  $pEC_{50}$ -Werten von Cisplatin in Kombination mit 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin nach einer Inkubation über 72 h ( $pEC_{50}$ :  $MW \pm SE$ ;  $n = 7$ ; Student's t-Test für unabhängige Stichproben).

	<b>A2780</b>		<b>A2780cis</b>	
	$pEC_{50}$ ( $EC_{50}$ )	p-Wert	$pEC_{50}$ ( $EC_{50}$ )	p-Wert
Cisplatin	$5,527 \pm 0,11$ (2,97 $\mu\text{M}$ )	0,9036	$4,896 \pm 0,01$ (12,71 $\mu\text{M}$ )	0,7123
1 $\mu\text{M}$ Oligomycin, Prä-/Koinkubation	$5,505 \pm 0,14$ (3,13 $\mu\text{M}$ )		$4,871 \pm 0,07$ (13,46 $\mu\text{M}$ )	

Entgegen den Erwartungen, die sich aus dem Influxexperiment ergaben, konnte kein Effekt von Oligomycin auf die Zytotoxizität von Cisplatin gezeigt werden. Im Gegensatz zu dem Kumulationsversuch unter Einfluss von Oligomycin, wurde der MTT-Assay unter glucosehaltigen Bedingungen durchgeführt, da eine Inkubation der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin und Cisplatin in glucosefreiem Medium über 72 h ein Absterben der Zellen zur Folge hatte. Es ist möglich, dass aufgrund der Verwendung des glucosehaltigen Mediums kein Effekt von Oligomycin auf die Zytotoxizität beobachtet werden konnte.

Aus diesem Grund wurde die Vitalität der Zellen unter den Bedingungen der Influxexperimente mittels MTT-Assay bestimmt. Nach Inkubation der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin in glucosefreiem Medium, wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin für eine weitere Stunde koinkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die MTT-Lösung für eine halbe Stunde zugegeben und die Platte wie in Kap. 3.3.2 beschrieben ausgewertet. Als Ergebnis wurde in diesem Versuch die Vitalität in % bezogen auf die Wachstumskontrolle angegeben. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 4.26 dargestellt (s. auch Appendix C2).

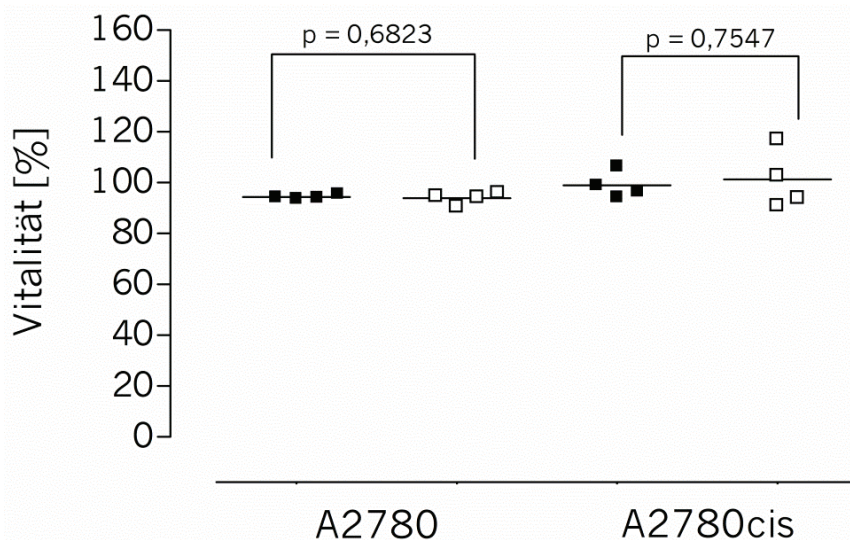


Abb. 4.26: Vitalität [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach einstündiger Inkubation mit 100 µM Cisplatin ohne (■) und mit Prä-/Koinkubation mit 1 µM Oligomycin (□) über 1 h (MW; n = 4; Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Die Versuche wurden in glucosefreiem Medium durchgeführt. Die Vitalität wird angegeben in % Absorption bezogen auf die unbehandelten Zellen (100 %).

Auch unter diesen Bedingungen zeigte sich in beiden Ovarialkarzinomzelllinien kein signifikanter Unterschied in der Vitalität zwischen den mit Oligomycin vorbehandelten Zellen und den Zellen, die ausschließlich mit Cisplatin behandelt wurden. Daraus lässt sich folgern, dass eine verminderte Platinkumulation unter Oligomycin keinen Einfluss auf die Zellvitalität hat.

#### 4.3.5 Einfluss von intrazellulärem ATP auf den Efflux von Cisplatin

Um den Einfluss von Oligomycin auf die Kumulation von Cisplatin näher zu charakterisieren, wurde der Efflux von Cisplatin unter ATP-reduzierten Bedingungen bestimmt. In Abb. 4.27 sind die Ergebnisse zum Efflux in den Zelllinien A2780 und A2780cis dargestellt (s. auch Appendix C3).



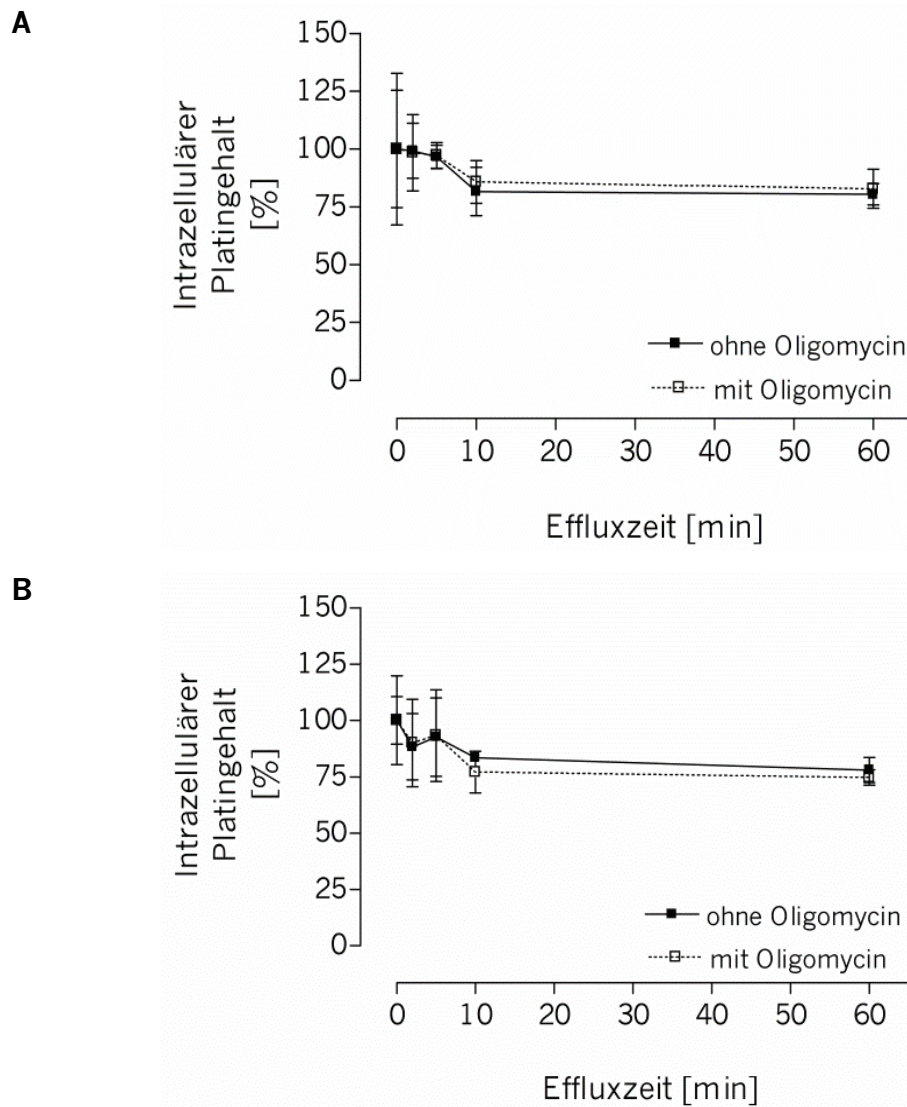


Abb. 4.27: Intrazellulärer Platingehalt [%] in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach einstündiger Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin in glucosefreiem Medium und anschließender Inkubation mit cisplatinfreiem Medium ( $MW \pm SD$ ;  $n = 3$ ). 30 min vor Ablauf der Inkubationszeit mit Cisplatin wurde glucosefreies Medium oder Oligomycin in einer finalen Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  zugesetzt. Der mittlere Platingehalt nach Ablauf der Inkubationszeit mit Cisplatin wurde gleich 100 % gesetzt.

In beiden Zelllinien konnte ein rascher Abfall des intrazellulären Platingehalts auf ca. 75 % des Ausgangswertes innerhalb der ersten 10 min beobachtet werden. Anschließend wurde in beiden Zelllinien ein Plateau erreicht. Die prozentuale Darstellung der Effluxergebnisse verdeutlicht, dass der intrazelluläre Platingehalt in A2780- und A2780cis-Zellen vergleichbar schnell abnahm. Die Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA sind in Tab. 4.10 zusammengefasst. Weder in der Zelllinie A2780 ( $p = 0,4720$ , zweifaktorielle ANOVA) noch in A2780cis-Zellen ( $p = 0,9382$ ,

zweifaktorielle ANOVA) konnten signifikante Unterschiede im Efflux von Cisplatin unter Einfluss von Oligomycin im Vergleich zu den unter Standardbedingungen kultivierten Zellen beobachtet werden.

Tab. 4.10: Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA zur Untersuchung des Einflusses der Variablen Oligomycin, Zeit und Interaktion von Oligomycin und Zeit auf den Efflux von Cisplatin.

Variable	A2780		A2780cis	
	% der Gesamtvariabilität	p-Wert	% der Gesamtvariabilität	p-Wert
Oligomycin [1 µM]	1,91	n.s.	0,02	n.s.
Zeit [min]	26,64	n.s.	35,76	n.s.
Interaktion	0,51	n.s.	1,14	n.s.

*n.s.: nicht signifikant*

Dieses Ergebnis zeigt, dass Unterschiede in der Platinkumulation unter ATP-Mangel eher auf Unterschiede im Influx und nicht auf den Efflux zurückzuführen sind.

#### 4.4 Einfluss von Ouabain auf die Platinsensitivität

In einigen Veröffentlichungen wird die Beteiligung des ATP-abhängigen Transportproteins  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase an der zellulären Aufnahme von Platinverbindungen diskutiert [85,92,266]. Neben der Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und der damit verbundenen Inhibition der mitochondrialen ATP-Produktion ist Oligomycin ebenso bekannt dafür, mit der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase zu interagieren [267]. Die unter Oligomycin beobachtete Reduktion des intrazellulären Platiningehalts könnte also auch durch eine Inhibition dieses Transportproteins hervorgerufen worden sein. Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, wurden Kumulationsexperimente mit Ouabain, einem spezifischen Inhibitor der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase durchgeführt [149].

#### 4.4.1 Zytotoxizität von Ouabain

Zunächst wurde die Sensitivität des Zelllinienpaares A2780/A2780cis gegenüber Ouabain mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abb. 4.28 dargestellt (vgl. auch Appendix D1).

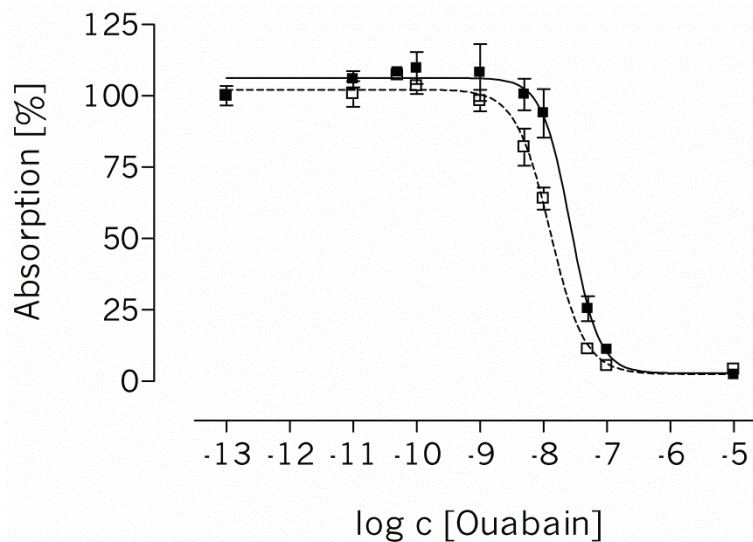


Abb. 4.28: Sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurve von Ouabain in A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□). Dargestellt ist eine repräsentative Kurve aus einer Reihe von sechs unabhängigen Experimenten (vermessen in Triplikaten,  $MW \pm SD$ ). Die Absorption wird in % bezogen auf die Wachstumskontrolle (100 %) angegeben.

In der Abbildung ist eine Linksverschiebung der sigmoidalen Kurve der resistenten Zellen im Vergleich zu den sensitiven Zellen zu erkennen. Anhand der Konzentrations-Effekt-Kurven wurden die  $EC_{50}$ -Werte von Ouabain ermittelt. Der  $EC_{50}$ -Wert für die A2780-Zellen betrug 18,32 nM ( $pEC_{50} = 7,737 \pm 0,05$  ( $MW \pm SE$ ),  $n = 6$ ), der für die A2780cis-Zellen 9,55 nM ( $pEC_{50} = 8,020 \pm 0,06$ ). Die resistente Zelllinie ist demnach um den Faktor 2 sensitiver gegenüber Ouabain verglichen mit der sensitiven Zelllinie ( $p = 0,005$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben).

#### 4.4.2 Einfluss von Ouabain auf die Platinkumulation

Der intrazelluläre Platingehalt wurde zum einen in Abhängigkeit von der eingesetzten Ouabainkonzentration und zum anderen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Cisplatin nach Inkubation mit Ouabain ermittelt. Andrews et al. konnten zeigen, dass



eine einstündige Präinkubation der Tumorzellen mit Ouabain zu einer maximalen Reduktion (ca. 50 %) der Platinaufnahme führt [85]. Längere Präinkubationszeiten führten dagegen zu einer Stimulation der zellulären Cisplatinaufnahme. Ouabain wurde zudem während der Inkubation mit Cisplatin in dem Nährmedium belassen. Ausgehend von den in der Literatur beschriebenen Bedingungen wurde eine Ouabain-Präinkubationsdauer von einer Stunde gewählt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde Cisplatin in einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  hinzugefügt. Eine chemische Interaktion von Ouabain und Cisplatin im Medium war anhand deren Strukturen nicht zu erwarten, da Ouabain keine Atome besitzt, für die Platin eine hohe Affinität hat.

Zunächst wurde der Einfluss unterschiedlicher Ouabainkonzentrationen (0,1 nM bis 1 mM) auf die Platinaufnahme untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.29 dargestellt (s. auch Appendix D2).

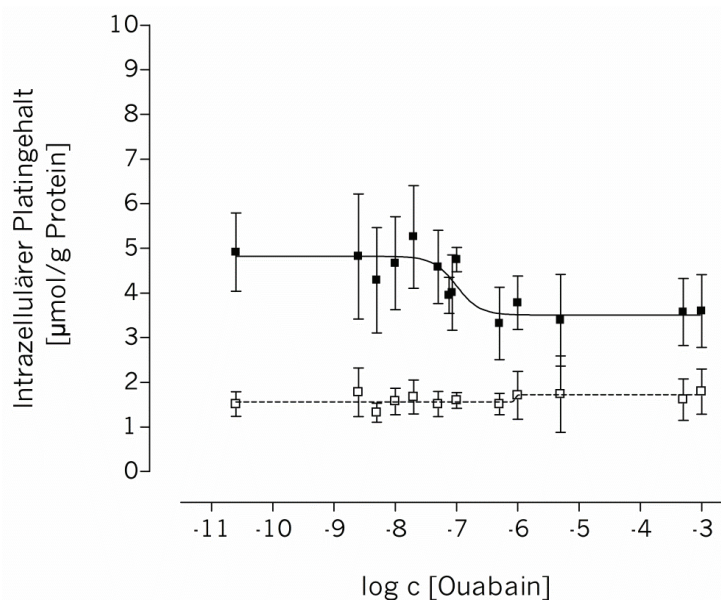


Abb. 4.29: Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□) nach einstündiger Präinkubation mit verschiedenen Ouabainkonzentrationen (0 – 1 mM) und anschließender einstündiger Koinkubation mit Cisplatin in einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ( $MW \pm SD$ ;  $n = 3 - 8$ ).

Es ist zu erkennen, dass die Platinaufnahme in den resistenten Zellen nicht durch Ouabain beeinflusst wird, wohingegen in den sensitiven Zellen der intrazelluläre Platingehalt mit steigenden Ouabainkonzentrationen abnimmt. Da es sich bei der in Abb. 4.29 dargestellten sigmoidalen Kurve um eine Mittelwertskurve aus drei bis acht unabhängigen Versuchstagen handelt, konnte aus dieser nicht der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von Ouabain für die Platinaufnahme berechnet werden. Auch eine Berechnung der  $\text{pIC}_{50}$ -

Werte anhand der Ergebnisse einzelner Versuchstage war nicht möglich, da eine sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurve aufgrund der Streuung der Ergebnisdaten und relativ wenigen Daten im Bereich des Wendepunktes schlecht abgeschätzt werden konnte.

Aus diesem Grund wurde der intrazelluläre Platingehalt in Abhängigkeit von verschiedenen Ouabainkonzentrationen in Abb. 4.30 prozentual dargestellt.

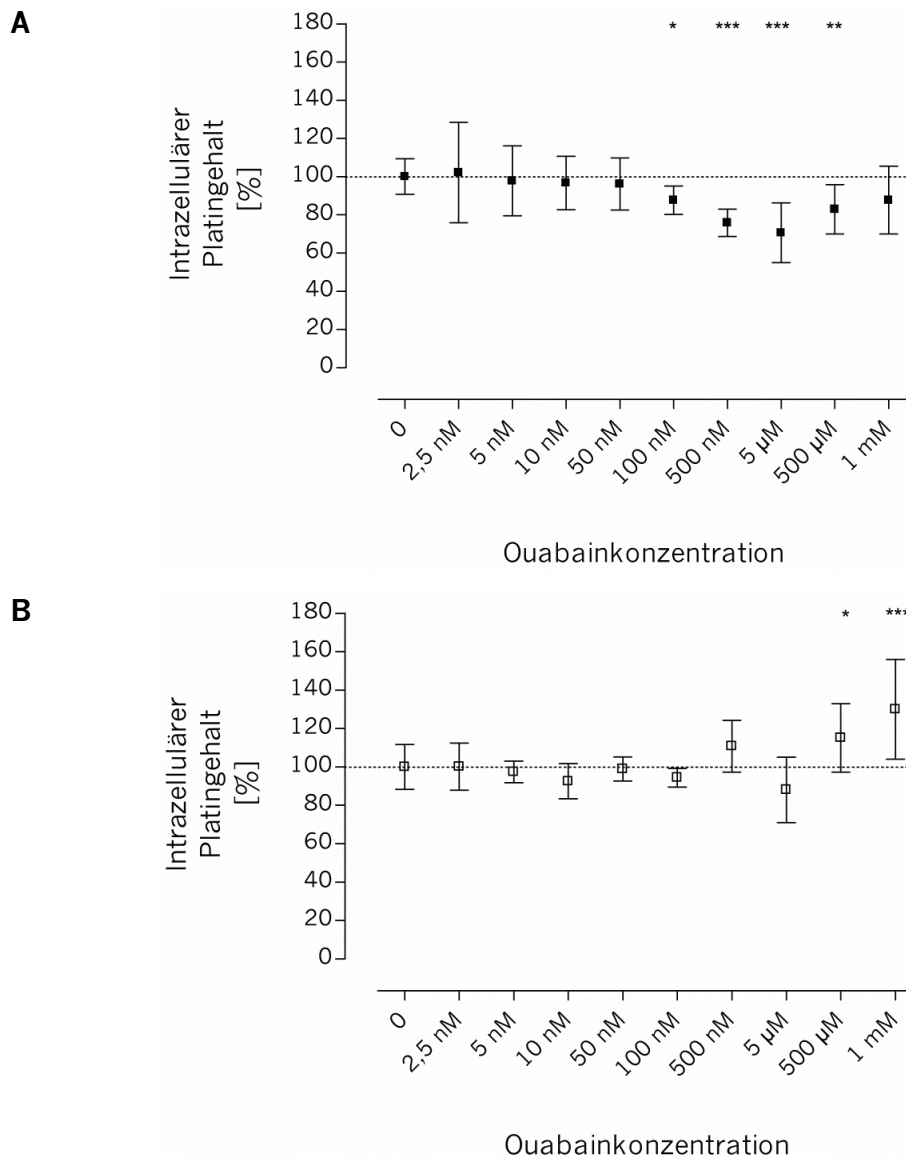


Abb. 4.30: Intrazellulärer Platingehalt [%] in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach einstündiger Präinkubation mit verschiedenen Ouabainkonzentrationen (0 – 1 mM) und anschließender einstündiger Koinkubation mit Cisplatin in einer finalen Konzentration von 100 µM. Der intrazelluläre Platingehalt der ausschließlich mit Cisplatin behandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (MW ± SD; n = 3 – 7; \*: p < 0,05, \*\*: p < 0,01, \*\*\*: p < 0,001, Student's t-Test für unabhängige Stichproben).

Bei Präinkubation mit 100 nM, 500 nM, 5  $\mu$ M und 500  $\mu$ M Ouabain wurde der intrazelluläre Platingehalt in den A2780-Zellen auf ca. 70 – 85 % bezogen auf die ausschließlich mit Cisplatin behandelten Zellen reduziert (s. auch Appendix D2). Dieser Effekt ist bei 5  $\mu$ M Ouabain am stärksten ausgeprägt. Bei höheren Konzentrationen zeigt sich ein leichter Anstieg. In den resistenten Zellen ist ab einer Konzentration von 500  $\mu$ M eine Zunahme des intrazellulären Platingehalts um 15 – 30 % zu beobachten, welche höchstwahrscheinlich auf die Zytotoxizität von Ouabain zurückzuführen ist. Eine Einschränkung der Zellvitalität kann zu einer erhöhten Membranpermeabilität und infolgedessen zu einer gesteigerten passiven Diffusion von Cisplatin führen.

Die aus den Ergebnissen des MTT-Assays ermittelten  $EC_{50}$ -Werte von Ouabain für das Zelllinienpaar lagen im nanomolaren Bereich. Die erste Konzentration, bei der ein deutlicher Effekt auf die Platinaufnahme in der Zelllinie A2780 gezeigt werden konnte, ist um ca. den Faktor 5,5 höher als der  $EC_{50}$ -Wert von Ouabain für diese Zelllinie. Aus diesem Grund war es notwendig, die maximal tolerable Ouabainkonzentration zu ermitteln. Hierzu wurden die Zellen mit drei verschiedenen Ouabainkonzentrationen über 3 und 5 h inkubiert. Anschließend wurde das ouabainhaltige Medium durch Nährmedium ersetzt und die Zellen bis zu 72 h weiter inkubiert. Durch diesen Versuch konnte überprüft werden, ob eine Inkubation mit Ouabain die Vitalität der Zellen so stark beeinträchtigt, dass die Zellen absterben. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe der MTT-Lösung und Auswertung nach Kap. 3.3.2. In Tab. 4.11 ist die Vitalität der Zellen angegeben. Für die weitere Verwendung der getesteten Ouabainkonzentration wurde eine Mindestvitalität von 80 % festgelegt.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, führte bereits eine dreistündige Inkubation mit 75 nM Ouabain in A2780cis-Zellen zu einem Vitalitätsverlust von mehr als 30 %. Die Vitalität von A2780-Zellen lag bei allen untersuchten Konzentrationen und Inkubationszeiten über den geforderten 80 % im Vergleich zur Wachstumskontrolle.

Tab. 4.11: Vitalität der Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Ouabain über 3 oder 5 h und anschließendem Austausch gegen substanzfreies Nährmedium und weitere Inkubation für 69 bzw. 67 h. Die Vitalität wird angegeben in % Absorption bezogen auf die Wachstumskontrolle (100 %).

		<b>A2780</b>			<b>A2780cis</b>		
Vitalität [%]							
Ouabain- konzentration [nM]	n	Mittelwert	SD	p-Wert	Mittelwert	SD	p-Wert
Ouabain, 3 h							
50	7	94,36	6,6	n.s.	80,58	4,1	0,0002
75	7	92,16	12,2	n.s.	69,61	6,3	< 0,0001
100	7	84,30	7,3	0,0057	68,89	9,6	< 0,0001
Ouabain, 5 h							
50	8	97,25	9,7	n.s.	83,16	9,3	0,0035
75	6	89,57	11,3	n.s.	69,48	7,7	< 0,0001
100	4	87,05	12,2	0,0876	71,24	8,0	0,0005

*n.s.: nicht signifikant*

Ausgehend von diesem Versuch, wurde eine Konzentration von 50 nM Ouabain ausgewählt, um den intrazellulären Platingehalt nach Inkubation mit Cisplatin über die Zeit zu untersuchen.

In Abb. 4.31 ist der Effekt von Ouabain auf die zeitabhängige Cisplatinaufnahme im Vergleich zum Versuch ohne Inhibitor dargestellt (s. auch Appendix D2).

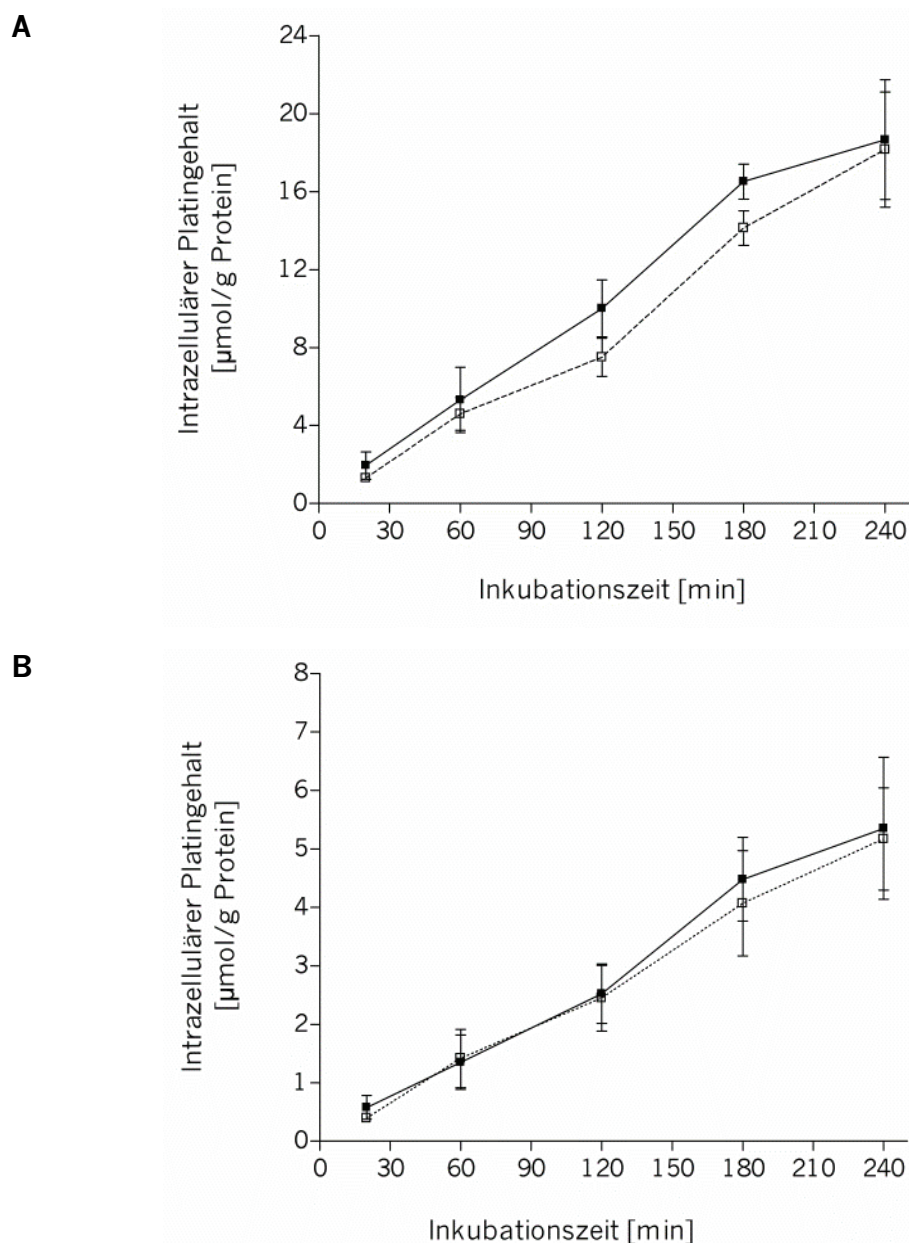


Abb. 4.31: Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin ohne (■) oder mit einstündiger Prä- und anschließender Koinkubation mit  $50 \text{ nM}$  Ouabain (□) ( $MW \pm SD$ ;  $n = 4 - 6$ ).

Die Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA zur Ermittlung des Effekts der beiden unabhängigen Variablen Behandlung mit Ouabain und Zeit auf den intrazellulären Platingehalt sind in Tab. 4.12 zusammengefasst. Sowohl in der sensitiven als auch in der resistenten Ovarialkarzinomzelllinie steigt der intrazelluläre Platingehalt erwartungsgemäß mit zunehmender Inkubationszeit statistisch signifikant an ( $p < 0,0001$ ). In Anwesenheit von Ouabain war der intrazelluläre Platingehalt in den

sensitiven Zellen signifikant niedriger ( $p = 0,0135$ , zweifaktorielle ANOVA). Nach Prä- und Koinkubation der sensitiven Zellen mit 50 nM Ouabain und Inkubation der Zellen mit 100  $\mu$ M Cisplatin für 2 h betrug der mittlere intrazelluläre Platingehalt  $75,77 \pm 11,0\%$  (MW  $\pm$  SD) im Vergleich zu den nur mit Cisplatin behandelten Zellen. Dieser Effekt wird jedoch nicht durch die Zeit verstärkt (Interaktion:  $p = 0,5486$ , zweifaktorielle ANOVA). In der Zelllinie A2780cis ist keine signifikante Abnahme der Platinaufnahme unter Einfluss von Ouabain zu beobachten ( $p = 0,4586$ , zweifaktorielle ANOVA).

Tab. 4.12: Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA zur Untersuchung des Einflusses der Variablen Ouabain, Zeit und Interaktion von Ouabain und Zeit auf die Kumulation von Cisplatin.

Variable	A2780		A2780cis	
	% der Gesamtvariabilität	p-Wert	% der Gesamtvariabilität	p-Wert
Ouabain [50 nM]	1,05	0,0135	0,18	n.s.
Zeit [min]	92,44	< 0,0001	88,32	< 0,0001
Interaktion	0,49	n.s.	0,17	n.s.

n.s.: nicht signifikant

#### 4.4.3 Einfluss von Ouabain auf den intrazellulären ATP-Gehalt

In den vorher dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass durch eine Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts auch der intrazelluläre Platingehalt vermindert werden kann. Um zu überprüfen, ob eine Behandlung mit Ouabain zu einer Veränderung des intrazellulären ATP-Gehalts führt, wurden die Tumorzellen über einen Zeitraum von 2 h mit 50 nM Ouabain inkubiert. Die Inkubation wurde zum einen in glucosehaltigem Medium und zum anderen in glucosefreiem Medium durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, zu dem ouabainfreies Medium pipettiert wurde. In den Abb. 4.32 und Abb. 4.33 ist der ATP-Gehalt [%] unter Einfluss von Ouabain dargestellt (s. auch Appendix D3).



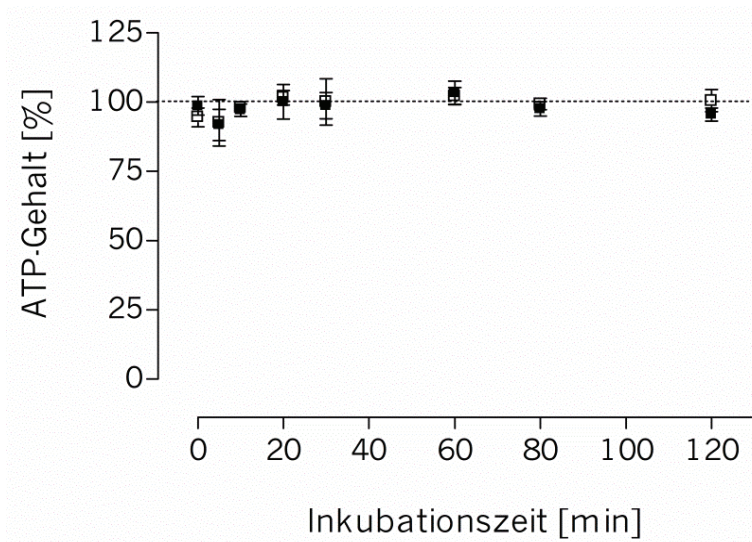


Abb. 4.32: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] der A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□) nach Inkubation mit 50 nM Ouabain in glucosehaltigem Medium über 120 min (MW  $\pm$  SD; n = 3). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

Aus den Abbildungen ist ersichtlich, dass 50 nM Ouabain weder unter glucosehaltigen noch unter -freien Bedingungen den zellulären ATP-Gehalt beeinflusst.

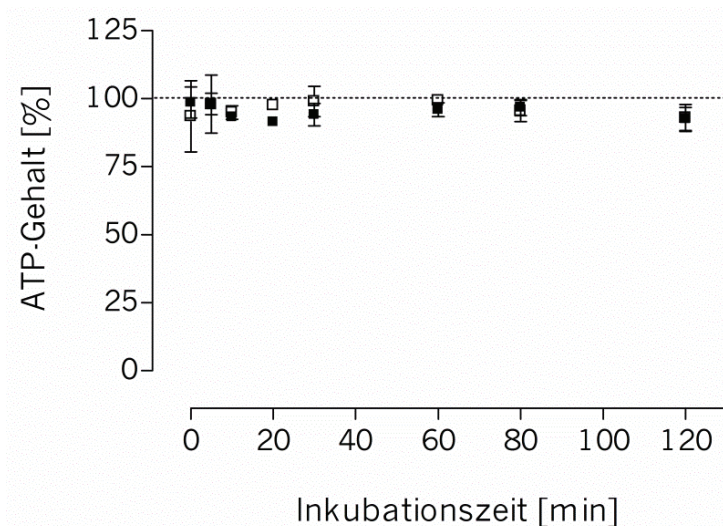


Abb. 4.33: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] der A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□) nach Inkubation mit 50 nM Ouabain in glucosefreiem Medium über 120 min (MW  $\pm$  SD; n = 3). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und der ATP-Gehalt zu den einzelnen Zeitpunkten prozentual darauf bezogen.

#### 4.4.4 Einfluss von Ouabain auf die Zytotoxizität von Cisplatin

In Anlehnung an die Influxexperimente wurde der Einfluss von Ouabain auf die Zytotoxizität von Cisplatin untersucht. Koinkubationsversuche von 50 nM Ouabain mit Cisplatin über einen Zeitraum von 72 h konnten nicht durchgeführt werden, da diese Ouabainkonzentration bereits die  $EC_{50}$ -Werte des Zelllinienpaares um das 2,5- bzw. 5-fache überschritten hätte. Aus diesem Grund wurden Kurzzeit-Inkubationen mit 50 nM Ouabain analog zu den Bedingungen des Influxversuchs durchgeführt. Nach einstündiger Präinkubation der A2780- und A2780cis-Zellen mit 50 nM Ouabain erfolgte die Koinkubation mit Cisplatin in einer finalen Konzentration von 100  $\mu$ M über 2 h. Parallel hierzu wurden die Zellen für 2 h nur mit 100  $\mu$ M Cisplatin oder für 1 h nur mit 50 nM Ouabain behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die MTT-Lösung zugegeben und die Platte wie in Kap. 3.3.2 beschrieben ausgewertet. In Abb. 4.34 ist zu erkennen, dass eine Präinkubation der Zellen mit 50 nM Ouabain und anschließende Koinkubation mit Cisplatin zu einer signifikanten Verringerung der Vitalität um ca. 18 – 23 % führt (s. Appendix D4). Da bereits eine alleinige einstündige Inkubation mit 50 nM Ouabain einen Vitalitätsverlust von ca. 10 – 15 % bedingt, kann der beobachtete Unterschied im Wesentlichen mit dem zytotoxischen Effekt der eingesetzten Ouabainkonzentration erklärt werden.

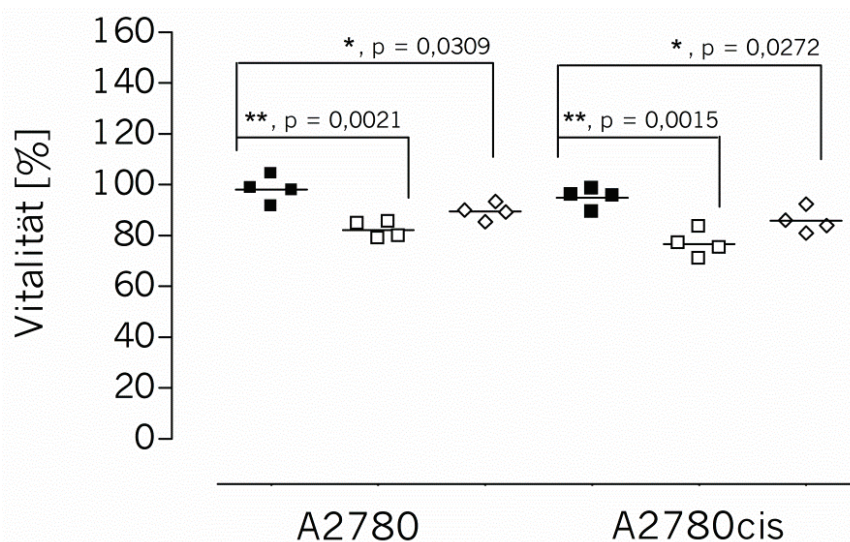


Abb. 4.34: Vitalität [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach zweistündiger Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin (■), nach einstündiger Inkubation mit 50 nM Ouabain (◇) und nach einstündiger Präinkubation mit 50 nM Ouabain und anschließender zweistündiger Koinkubation mit Cisplatin in einer finalen Konzentration von 100  $\mu$ M (□) (MW; n = 4; Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Die Vitalität wird angegeben in % Absorption bezogen auf die unbehandelten Zellen (100 %)



#### 4.4.5 Proteinexpression der $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase $\alpha_1$

Die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit [154]. Kishimoto et al. konnten zeigen, dass die Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit in einer cisplatin-resistenten Hepatom-Rattenzelllinie im Vergleich zu den sensitiven Zellen reduziert ist, wohingegen die Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit in beiden Rattenzelllinien vergleichbar ist [93]. Eine verminderte Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit konnte auch nach einer 24-stündigen Cisplatinexposition der sensitiven Hepatom-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen beobachtet werden. In dieser Arbeit wurde aus diesem Grund die Expression der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$ -Untereinheit in den unbehandelten A2780- und A2780cis-Zellen mittels Western Blot untersucht. Parallel hierzu wurde die Proteinexpression unter Einfluss von Cisplatin, Oligomycin und Ouabain bestimmt. Die Konzentrationen von Ouabain und Oligomycin, die Inkubationsdauer und das Inkubationsmedium wurden analog der Kumulationsexperimente ausgewählt. Da in den Influxexperimenten relativ hohe Cisplatinkonzentrationen verwendet wurden, wurde für die Bestimmung des Expressionslevels eine niedrigere Cisplatinkonzentration von  $5 \mu\text{M}$  gewählt. Eine Inkubationsdauer von einer Stunde wurde gewählt, da auch in der klinischen Praxis die Infusionsdauer von Cisplatin ca. 1 h beträgt. Zusätzlich wurden die Zellen über 2 h mit  $5 \mu\text{M}$  Cisplatin inkubiert, da bei den Platinkumulationsexperimenten unter Einfluss von Ouabain ein erniedrigter intrazellulärer Platingehalt beobachtet wurde. In Abb. 4.35 ist ein repräsentativer Western Blot aus einer Reihe von drei unabhängigen Expressionsanalysen dargestellt.

Die Expressionslevel der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$ -Untereinheit bezogen auf die Expressionslevel von  $\beta$ -Actin mit und ohne Behandlung mit den oben beschriebenen Substanzen sind in Abb. 4.36 zusammengefasst (s. auch Appendix D5). Die Proteinexpression der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$  beträgt in den unbehandelten A2780-Zellen  $1,9 \pm 0,6$  (MW  $\pm$  SD;  $n = 3$ , durchgeführt in Duplikaten; Abb. 4.36 A) und  $1,2 \pm 0,3$  in den A2780cis-Zellen (s. Abb. 4.36 B). Die Proteinexpression der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$  ist in den sensitiven Zellen im Vergleich zu den resistenten Zellen statistisch signifikant höher ( $p = 0,026$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Dies stimmt mit dem Ergebnis überein, dass nur in den sensitiven Zellen eine Beeinflussung der zellulären Platin-aufnahme in Anwesenheit von Ouabain beobachtet wurde.

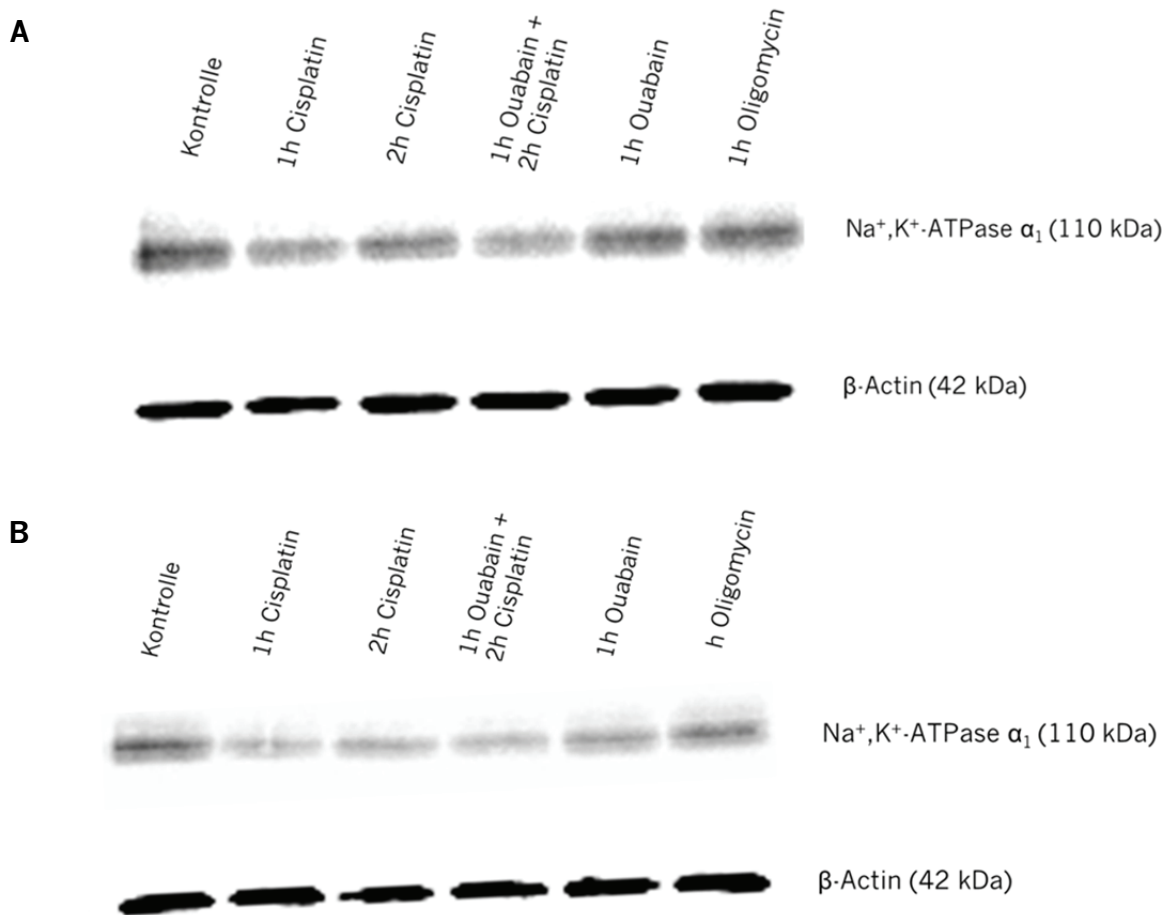


Abb. 4.35: Western Blot der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α<sub>1</sub>-Expression in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 50 nM Ouabain, 5 μM Cisplatin oder 1 μM Oligomycin (glucosefreie Bedingungen) für die in der Abbildung angegebene Inkubationszeit. Als housekeeping-Protein wurde β-Actin verwendet. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus einer Reihe von drei unabhängigen Experimenten.

Eine einstündige Inkubation mit Cisplatin führte zu einer Downregulation der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α<sub>1</sub> in den A2780-Zellen ( $p < 0,05$ ; Abb. 4.35A und Abb. 4.36A). Dieser Effekt konnte bei einer Inkubationsdauer von 2 h nicht beobachtet werden. Interessanterweise führte jedoch eine einstündige Präinkubation mit Ouabain und nachfolgende Inkubation mit Cisplatin über 2 h zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression ( $p < 0,05$ ). Ebenso führte eine einstündige Inkubation mit entweder 50 nM Ouabain oder 1 μM Oligomycin (unter glucosefreien Bedingungen) zu einer Downregulation der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α<sub>1</sub> ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ).

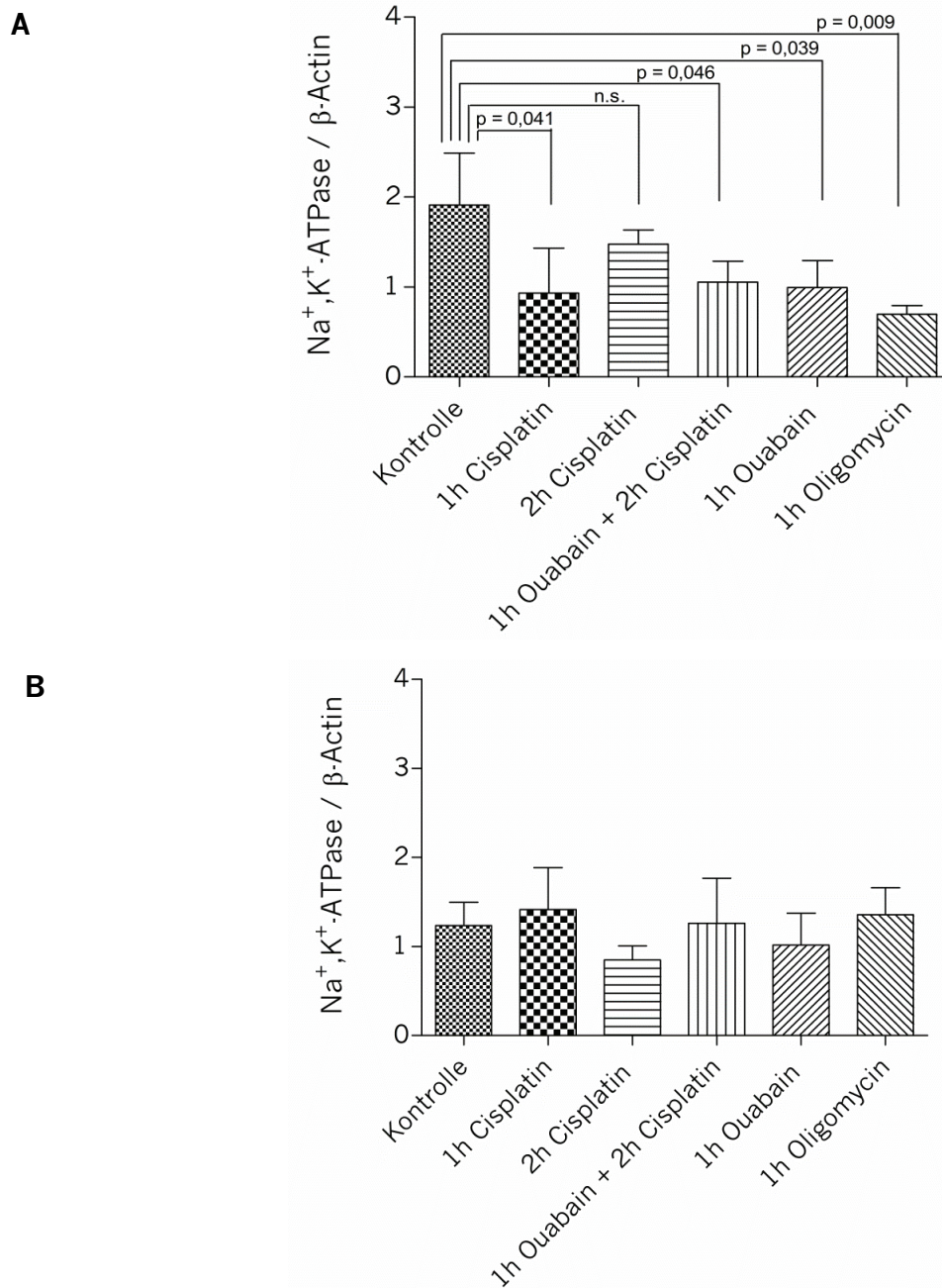


Abb. 4.36: Densitometrische Analyse der Chemolumineszenz aus drei unabhängigen Western Blot-Analysen. Dargestellt ist das relative Verhältnis der Expressionslevel der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$  zu den Expressionsleveln von  $\beta$ -Actin in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen mit und ohne Behandlung mit 50 nM Ouabain, 5  $\mu\text{M}$  Cisplatin oder 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin (glucosefreie Bedingungen) für die in der Abbildung angegebene Inkubationszeit (MW  $\pm$  SD; n = 3; Student's t-Test für unabhängige Stichproben).

Im Gegensatz zu den sensitiven Zellen konnten in den resistenten Zellen keine signifikanten Unterschiede des Expressionslevels unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen beobachtet werden.

#### 4.5 Vergleich des intrazellulären Platingehalts unter Einfluss von Oligomycin und Ouabain

Zum besseren Vergleich des intrazellulären Platingehalts nach einstündiger Präinkubation mit 50 nM Ouabain bzw. nach halbstündiger Präinkubation mit 1  $\mu$ M Oligomycin unter glucosefreien Bedingungen und anschließender Koinkubation mit Cisplatin, werden diese im Folgenden jeweils in %, bezogen auf den Platingehalt der nur mit Cisplatin behandelten Zellen, angegeben. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.13 zusammengefasst.

Tab. 4.13: Intrazellulärer Platingehalt [%] in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin über 180 min unter dem Einfluss von 1  $\mu$ M Oligomycin oder 50 nM Ouabain. Der intrazelluläre Platingehalt der nur mit Cisplatin behandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (MW  $\pm$  SD, n = 3 – 5).

Zeit [min]	A2780		A2780cis	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
50 nM Ouabain				
20	70,66	15,7	74,11	26,2
60	89,15	15,3	106,12	22,4
120	75,77	11,0	96,95	8,8
180	85,87	8,8	91,67	17,6
1 $\mu$ M Oligomycin				
20	81,83	42,6	79,00	37,8
60	52,63	29,1	82,08	46,9
120	63,13	31,5	80,51	37,7
180	69,33	15,8	83,95	27,3

Interessanterweise war zu den untersuchten Zeitpunkten die zelluläre Aufnahme von Cisplatin unter dem Einfluss von Oligomycin zu einem stärkeren Ausmaß reduziert als unter dem Einfluss von Ouabain. Lediglich bei einer Influxzeit von 20 min zeigte sich der gegensätzliche Fall. Hieraus lässt sich vermuten, dass neben dem Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-vermittelten Influx noch weitere energieabhängige Transportprozesse existieren.

## 4.6 Einfluss von Sorafenib auf die Platinsensitivität

Eine Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts führt zu einem verminderten intrazellulären Platingehalt nach Inkubation mit Cisplatin. Wie in Kap. 4.5 erläutert, scheinen neben dem  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase-vermittelten Influx noch weitere ATP-abhängige Prozesse an der Aufnahme von Platinverbindungen beteiligt zu sein. Beispielsweise benötigt die Signaltransduktion über den intrazellulären Raf/MEK/ERK-Signalweg Energie in Form von ATP. Sorafenib ist ein spezifischer Inhibitor dieser Signalkaskade. Aus Vorarbeiten von Dr. J. Zisowsky in Kooperation mit dem Westdeutschen Tumorzentrum Essen geht hervor, dass Sorafenib zu einer verringerten Kumulation von Cisplatin und Oxaliplatin in Kolonkarzinomzellen führt [88,236]. Um eine mögliche Beteiligung dieses Signalweges an der zellulären Kumulation von Cisplatin in dem Zelllinienpaar A2780/A2780cis näher zu untersuchen, wurden verschiedene Zytotoxizitäts- und Kumulationsversuche in Anwesenheit des Multikinase-Inhibitors Sorafenib durchgeführt. Darüber hinaus wurden diese Versuche auch mit Carboplatin durchgeführt, da in einigen klinischen Studien bereits die Kombination von Carboplatin und Sorafenib zur Therapie unterschiedlicher Tumoren getestet wurde [214,234].

Einige der folgenden Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Frau C. Spanier im Rahmen ihrer Masterarbeit an der Universität Bonn erhalten [260].

### 4.6.1 Zytotoxizität von Sorafenib

Zunächst wurde die Sensitivität der beiden Ovarialkarzinomzelllinien gegenüber Sorafenib bestimmt. Repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abb. 4.37 dargestellt (vgl. auch Appendix E1).

Für die sensitiven A2780-Zellen konnte ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $2,40 \mu\text{M}$  ermittelt werden ( $\text{pEC}_{50} = 5,619 \pm 0,14$ ,  $\text{MW} \pm \text{SD}$ ;  $n = 14$ ) und für die resistenten A2780cis-Zellen ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $3,11 \mu\text{M}$  ( $\text{pEC}_{50} = 5,508 \pm 0,29$ ). Der Unterschied ist nicht statistisch signifikant ( $p = 0,2082$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben).

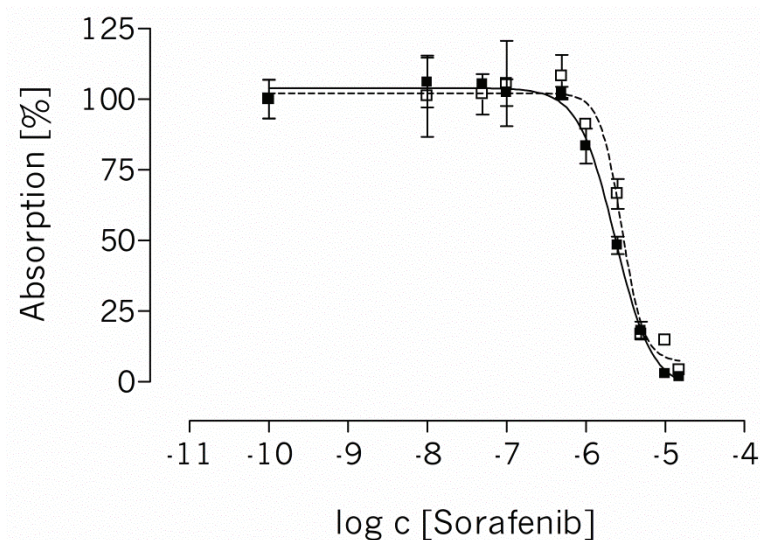


Abb. 4.37: Sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurve von Sorafenib in A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□). Dargestellt ist eine repräsentative Kurve aus einer Reihe von vierzehn unabhängigen Experimenten (vermessen in Triplikaten,  $MW \pm SD$ ). Die Absorption wird angegeben in % bezogen auf die Wachstumskontrolle (100 %).

## 4.6.2 Kombination mit Cisplatin

### 4.6.2.1 Einfluss von Sorafenib auf die Kumulation von Cisplatin

Dr. J. Zisowsky konnte bereits an den Tumorzelllinien HCT8 (ileocaecales Adenokarzinom) und HT29 (kolorektales Adenokarzinom) zeigen, dass eine Koinkubation von Sorafenib mit Cisplatin oder Oxaliplatin sowohl zu einem verringerten intrazellulären Platingehalt, als auch zu einer verringerten DNA-Adduktbildung führt [88]. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auch in dem Ovarialkarzinomzelllinienpaar A2780/A2780cis zu beobachten ist, wurde der Einfluss des Multi-Kinase-Inhibitors Sorafenib auf die Aufnahme von Cisplatin bzw. Carboplatin untersucht. Dabei wurde der intrazelluläre Platingehalt zum einen in Abhängigkeit von der eingesetzten Sorafenibkonzentration und zum anderen von der Inkubationszeit mit Cisplatin ermittelt.

Im Rahmen der Masterarbeit von Frau C. Spanier wurde der Einfluss unterschiedlicher Präinkubationszeiten mit  $4,374 \mu\text{M}$  Sorafenib<sup>1</sup> auf die intrazelluläre Platinkumulation untersucht [260]. Wie in Abb. 4.38 zu erkennen ist, führt eine Prä-

<sup>1</sup> Bei der Berechnung der Sorafenibkonzentration wurde das zugehörige Anion (Tosylat) nicht berücksichtigt.

inkubation mit Sorafenib über 6 h zu einem verringerten intrazellulären Platingehalt, wobei das Ausmaß der Reduktion mit Verlängerung der Präinkubationsdauer zunimmt.

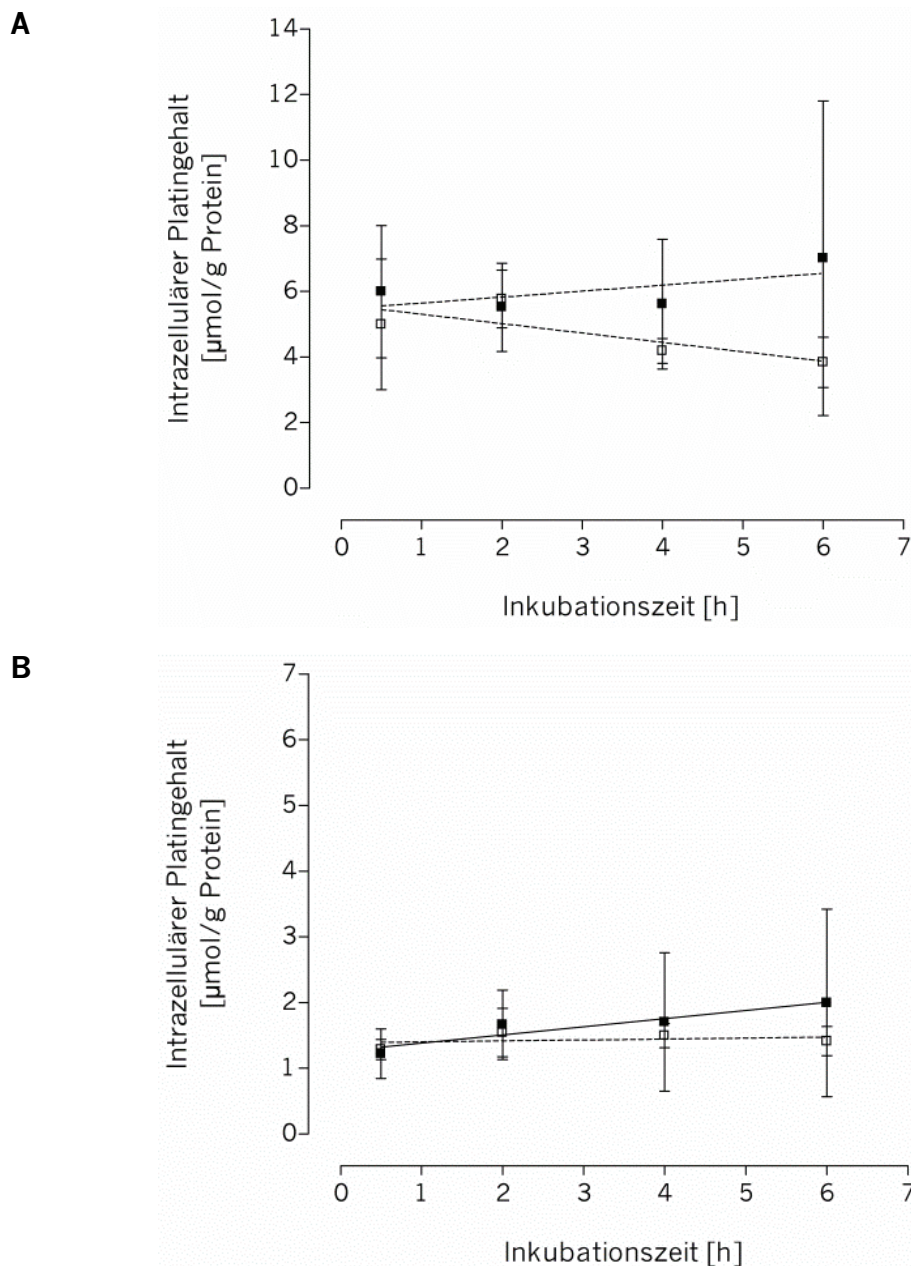


Abb. 4.38: Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin über 1 h (■) und nach unterschiedlich langer Präinkubation mit  $4,374 \mu\text{M}$  Sorafenib und anschließender einstündiger Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin (□) (MW  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).

In der Abbildung ist auch zu erkennen, dass der Effekt in den sensitiven Zellen stärker ausgeprägt ist (Abb. 4.38 A), als in den resistenten Zellen (Abb. 4.38 B). Nach 4 h



wurde in der mit Sorafenib behandelten sensitiven Zelllinie die Platinkumulation auf 75 % im Vergleich zu den unbehandelten A2780-Zellen reduziert (s. Appendix E2). Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant ( $p = 0,2891$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben). In der resistenten Zelllinie betrug der intrazelluläre Platingehalt nach vierstündiger Inkubation mit  $4,374 \mu\text{M}$  Sorafenib 88 % bezogen auf den Platingehalt der nur mit Cisplatin behandelten Zellen. Auch dieser Unterschied ist nicht statistisch signifikant ( $p = 0,7545$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Die fehlende statistische Signifikanz der Ergebnisse ist vermutlich auf deren hohe Variabilität zurückzuführen. Dennoch wurde für weitere Versuche eine Präinkubationsdauer von Sorafenib über 4 h festgelegt.

Um den Einfluss von Sorafenib auf die Platinaufnahme näher zu charakterisieren, wurden die Zellen in einer weiteren Versuchsreihe über 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Sorafenib ( $0,1 \text{ nM} - 75 \mu\text{M}$ ) präinkubiert und anschließend für eine weitere Stunde mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem die Zellen nur mit Medium präinkubiert wurden. Die Ergebnisse in Abb. 4.39 zeigen, dass der intrazelluläre Platingehalt in den A2780-Zellen durch Präinkubation mit Sorafenib in einem Konzentrationsbereich von  $0,1 \mu\text{M} - 10 \mu\text{M}$  Sorafenib um den Faktor 1,3 im Vergleich zu den ausschließlich mit Cisplatin behandelten Zellen abnimmt (s. auch Appendix E2).

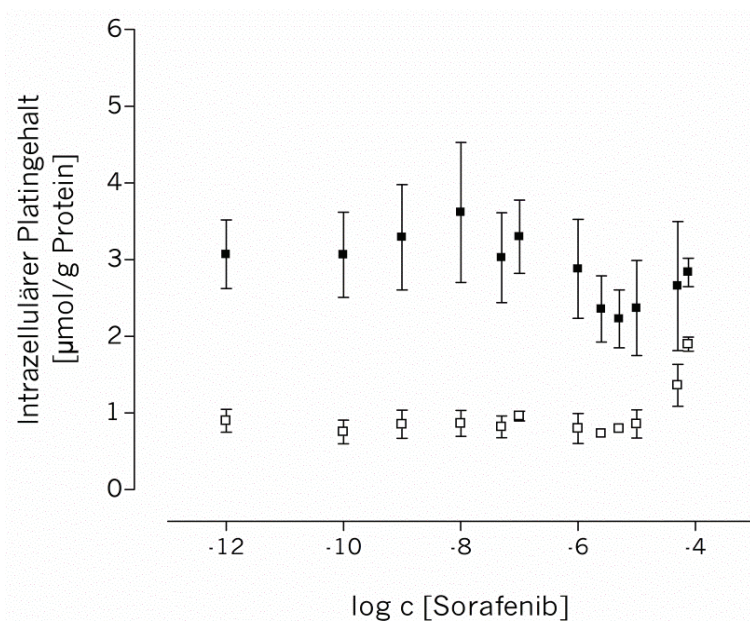


Abb. 4.39: Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□) nach vierstündiger Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Sorafenib ( $0 - 75 \mu\text{M}$ ) und anschließender einstündiger Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin ( $MW \pm SD$ ;  $n = 2 - 6$ ).



In der resistenten Zelllinie bleibt der Platingehalt über einen Konzentrationsbereich von 0,1 nM bis 10  $\mu$ M Sorafenib konstant bei  $0,730 \pm 0,04$  bis  $0,958 \pm 0,06$   $\mu$ mol Platin/g Protein (MW  $\pm$  SD). In beiden Zelllinien fällt auf, dass ab einer Sorafenibkonzentration von 50  $\mu$ M die Platinaufnahme zunimmt, wobei dieser Effekt in der resistenten Zelllinie stärker ausgeprägt ist. Nach Präinkubation der A2780cis-Zellen mit 75  $\mu$ M Sorafenib war der intrazelluläre Platingehalt doppelt so hoch wie in den ausschließlich mit Cisplatin behandelten Zellen.

Die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte für Sorafenib in beiden Tumorzelllinien sind deutlich niedriger als 50  $\mu$ M, sodass diese Konzentration bereits als zytotoxisch für die Zellen angesehen werden muss. Als Erklärung für eine gesteigerte Platinaufnahme nach Präinkubation mit höheren Sorafenibkonzentrationen kann wie bereits in Kap. 4.4.2 beschrieben eine gesteigerte Membranpermeabilität und dadurch bedingte passive Diffusion von Cisplatin als Folge der Zytotoxizität von Sorafenib vermutet werden.

Um die Sorafenibkonzentration zu ermitteln, bei der die Platinaufnahme in den A2780-Zellen halbmaximal reduziert ist (IC<sub>50</sub>), wurde für jeden Versuchstag eine Konzentrations-Effekt-Kurve erstellt und daraus mittels nichtlinearer Regression der pIC<sub>50</sub>-Wert berechnet. Hierbei wurden nur Sorafenibkonzentrationen in einem Bereich von 0,1 nM – 50  $\mu$ M berücksichtigt. Eine repräsentative sigmoidale Dosis-Effekt-Kurve aus einer Reihe von vier unabhängigen Experimenten ist in Abb. 4.40 dargestellt. Die Ergebnisse für die Zelllinie A2780cis sind in Appendix E2 tabellarisch aufgeführt.

Anhand der Konzentrations-Effekt-Kurven wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 0,99  $\mu$ M Sorafenib ermittelt (pIC<sub>50</sub> =  $6,004 \pm 0,07$ , MW  $\pm$  SE; n = 4). Des Weiteren wurde nach Präinkubation mit 1  $\mu$ M Sorafenib der zeitabhängige Verlauf der Aufnahme von 100  $\mu$ M Cisplatin über einen Zeitraum von bis zu 3 h untersucht. In einem Vorversuch führte jedoch diese Sorafenibkonzentration zu keiner deutlichen Abnahme des intrazellulären Platingehalts in beiden Zelllinien über eine Dauer von 2 h.

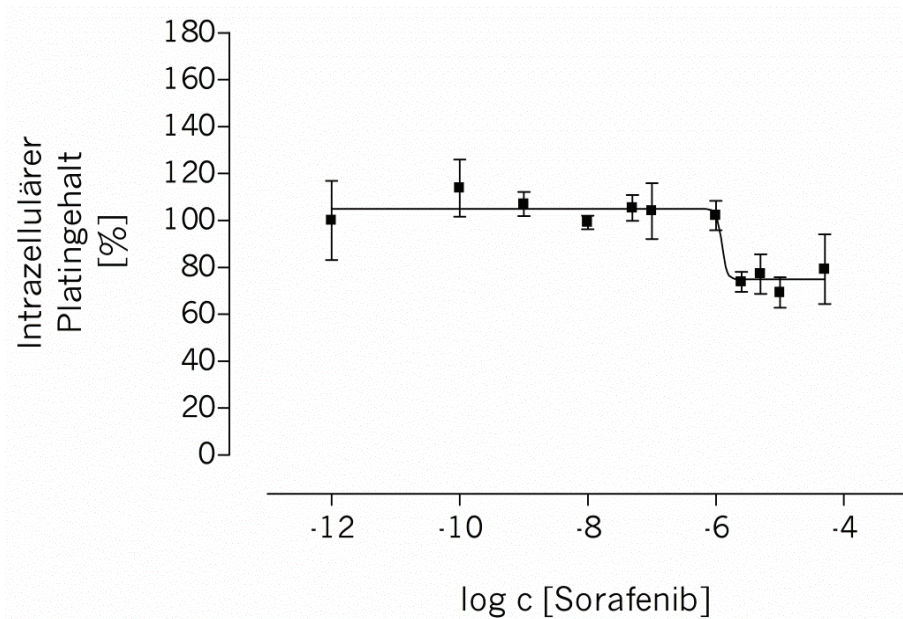


Abb. 4.40: Intrazellulärer Platingehalt [%] in A2780-Zellen nach vierstündiger Präinkubation mit verschiedenen Sorafenibkonzentrationen (0 – 50  $\mu\text{M}$ ) und anschließender einstündiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin. Dargestellt ist eine repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurve aus einer Reihe von vier unabhängigen Experimenten (vermessen in Triplikaten,  $\text{MW} \pm \text{SD}$ ). Der mittlere Platingehalt der ausschließlich mit Cisplatin behandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt.

Aus diesem Grund wurde der Versuch mit einer höheren Sorafenibkonzentration durchgeführt. Da der ermittelte  $\text{EC}_{50}$ -Wert der A2780-Zellen 2,40  $\mu\text{M}$  und für die A2780cis-Zellen 3,11  $\mu\text{M}$  beträgt, wurde zunächst mit Hilfe des MTT-Assays die Vitalität der Zellen nach vierstündiger Inkubation mit verschiedenen Sorafenibkonzentrationen oberhalb dieser  $\text{EC}_{50}$ -Werte (2,5 – 10  $\mu\text{M}$ ) bestimmt. Als Grenzwert wurde vorher eine Vitalität von 80 % bezogen auf die Wachstumskontrolle festgelegt. Die Ergebnisse aus dieser Vitalitätsbestimmung sind in Abb. 4.41 dargestellt (s. auch Appendix E2).

Als maximal tolerable Konzentration konnte eine Sorafenibkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  ermittelt werden. Die Vitalität der beiden Zelllinien lag unter diesen Bedingungen mit  $91,44 \pm 7,6 \%$  ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ , A2780) bzw.  $86,64 \pm 6,5 \%$  (A2780cis) oberhalb der mindestens geforderten Zellvitalität von 80 %. Somit konnten für diese Konzentration zytotoxische Effekte von Sorafenib weitestgehend ausgeschlossen werden.

Ausgehend von diesem Versuch wurde der Einfluss von 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib auf die Kumulation von Cisplatin in beiden Zelllinien über einen Zeitraum von 3 h untersucht. Wie in Abb. 4.42 zu sehen ist, nimmt der intrazelluläre Platingehalt in den sensitiven

Zellen nach Präinkubation mit Sorafenib ab, wohingegen dieser Effekt in den resistenten Zellen nicht zu beobachten ist (vgl. auch Appendix E2).

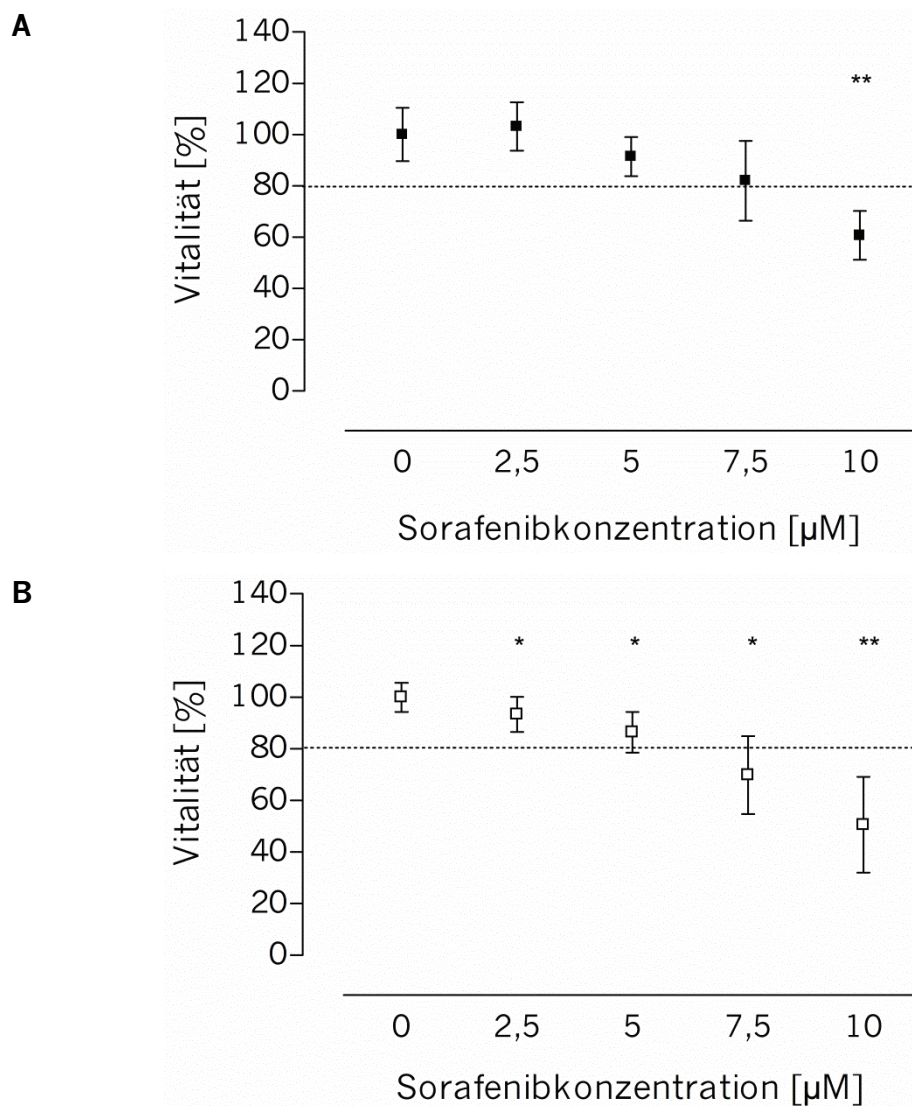


Abb. 4.41: Vitalität [%] der **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Sorafenibkonzentrationen (2,5 – 10  $\mu\text{M}$ ) über 4 h, anschließendem Austausch gegen substanzfreies Nährmedium und Inkubation für weitere 68 h (MW  $\pm$  SD; n = 6; \*: p < 0,05, \*\*: p < 0,01, Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Die Vitalität wird angegeben in % Absorption bezogen auf die unbehandelten Zellen (100 %).

Die Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA zur Ermittlung des Einflusses der beiden unabhängigen Variablen Behandlung mit Sorafenib und Zeit auf den intrazellulären Platingehalt sind in Tab. 4.14 zusammengefasst.

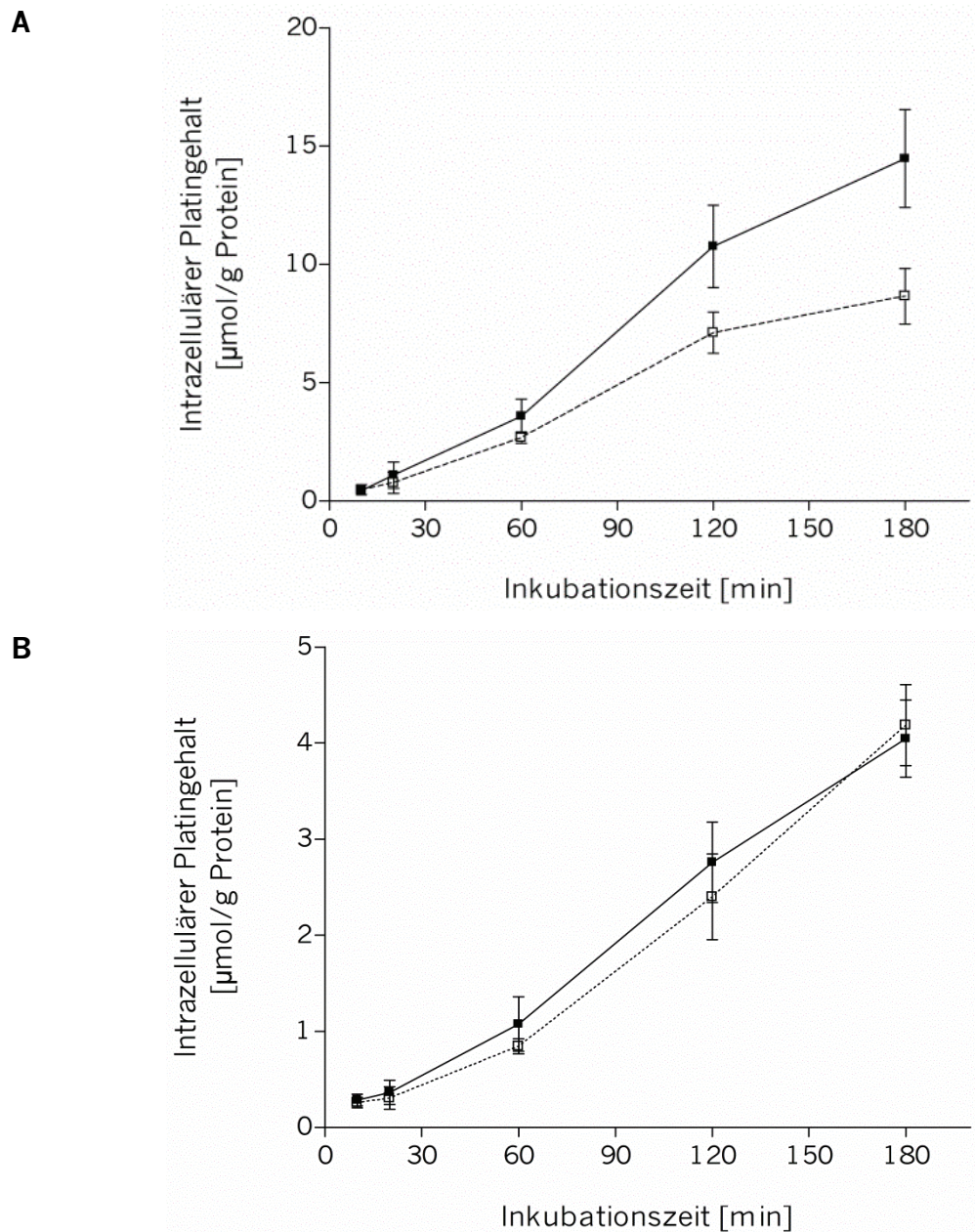


Abb. 4.42: Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin ohne (■) oder mit vierstündiger Prä- und anschließender Koinkubation mit  $5 \mu\text{M}$  Sorafenib (□) (MW  $\pm$  SD; n = 3).

Sowohl in den sensitiven als auch in den resistenten Zellen stieg der intrazelluläre Platingehalt mit zunehmender Inkubationszeit erwartungsgemäß statistisch signifikant an ( $p < 0,0001$ , zweifaktorielle ANOVA). Eine Präinkubation mit  $5 \mu\text{M}$  Sorafenib führte nur in den sensitiven Zellen zu einer signifikanten Verringerung der Kumulation von Cisplatin ( $p < 0,0001$ , zweifaktorielle ANOVA). Auch dieser Effekt nahm mit der Zeit zu (Interaktion:  $p = 0,0002$ , zweifaktorielle ANOVA).

Tab. 4.14: Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA zur Untersuchung des Einflusses der Variablen Sorafenib, Zeit und Interaktion von Sorafenib und Zeit auf die Kumulation von Cisplatin.

Variable	A2780		A2780cis	
	% der Gesamtvariabilität	p-Wert	% der Gesamtvariabilität	p-Wert
Sorafenib [5 µM]	4,95	< 0,0001	0,13	n.s.
Zeit [min]	86,46	< 0,0001	97,10	< 0,0001
Interaktion	5,52	0,0002	0,33	n.s.

n.s.: nicht signifikant

#### 4.6.2.2 Einfluss von Sorafenib auf die Zytotoxizität von Cisplatin

Da die Platinkumulation häufig im direkten Zusammenhang mit der Zytotoxizität der Platinkomplexe steht, wurde der Einfluss von Sorafenib auf die Platinsensitivität untersucht. Eine Koinkubation der im Influxexperiment eingesetzten Sorafenibkonzentration mit Cisplatin über einen Zeitraum von 72 h konnte aufgrund der bereits zytotoxischen Wirkung von 5 µM Sorafenib auf das Zelllinienpaar nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden Kurzzeit-Inkubationen mit 5 µM Sorafenib analog zu den Bedingungen des Influxversuchs durchgeführt. Die A2780- und A2780cis-Zellen wurden nach vierstündiger Inkubation mit 5 µM Sorafenib für eine weitere Stunde mit Cisplatin in einer finalen Konzentration von 100 µM inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die MTT-Lösung zugegeben und die Platte wie in Kap. 3.3.2 beschrieben ausgewertet. Das Ergebnis der Vitalitätsbestimmung ist in Abb. 4.43 dargestellt (s. auch Appendix E3).

Unter diesen Bedingungen zeigte sich in beiden Ovarialkarzinomzelllinien kein Unterschied in der Vitalität zwischen den mit Sorafenib vorbehandelten Zellen und den ausschließlich mit Cisplatin behandelten Zellen. Demnach hat eine verminderte Platinkumulation unter Sorafenib keinen Einfluss auf die Vitalität des Tumorzelllinienpaares.



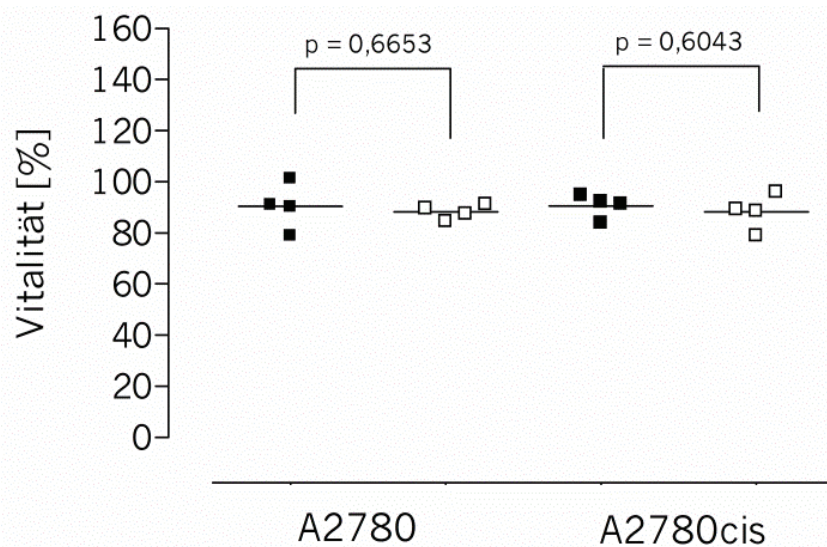


Abb. 4.43: Vitalität [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach einstündiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin (■) und nach vierstündiger Präinkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib und anschließender einstündiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin (□) (MW;  $n = 4$ ; Student's  $t$ -Test für unabhängige Stichproben). Die Vitalität wird angegeben als Absorption [%] bezogen auf die unbehandelten Zellen (100 %).

#### 4.6.2.3 Chemische Interaktion von Cisplatin und Sorafenib

Um eine chemische Interaktion zwischen Sorafenib und Cisplatin bei Koinkubation der beiden Substanzen auszuschließen, wurde eine Interaktion der beiden Substanzen über einen Zeitraum von 14 h mittels  $^{195}\text{Pt}$ -NMR-Spektroskopie untersucht. Bis zu einer maximalen Sorafenibkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  konnte im Rahmen der konzentrationsabhängigen Influxversuche eine Reduktion des intrazellulären Platingehalts nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin beobachtet werden. Daher wurde das Mischungsverhältnis von Sorafenib und Cisplatin analog des Kumulationsversuchs als 1:10 festgelegt. Cisplatin (7,5 mM) und Sorafenib (0,75 mM) wurden in einer 1:2-Mischung aus PBS-Puffer und Dimethylformamid bei 37 °C inkubiert. Alle 2 h wurde über einen Zeitraum von 14 h ein  $^{195}\text{Pt}$ -NMR-Spektrum aufgenommen. Zusätzlich wurde ein  $^{195}\text{Pt}$ -NMR-Spektrum mit 7,5 mM Cisplatin allein aufgenommen.

Wie in Abb. 4.44 zu sehen ist, findet keine Reaktion zwischen Sorafenib und Cisplatin statt. Über den untersuchten Zeitraum war nur der Cisplatinpeak bei  $\delta = -2150$  ppm zu erkennen.

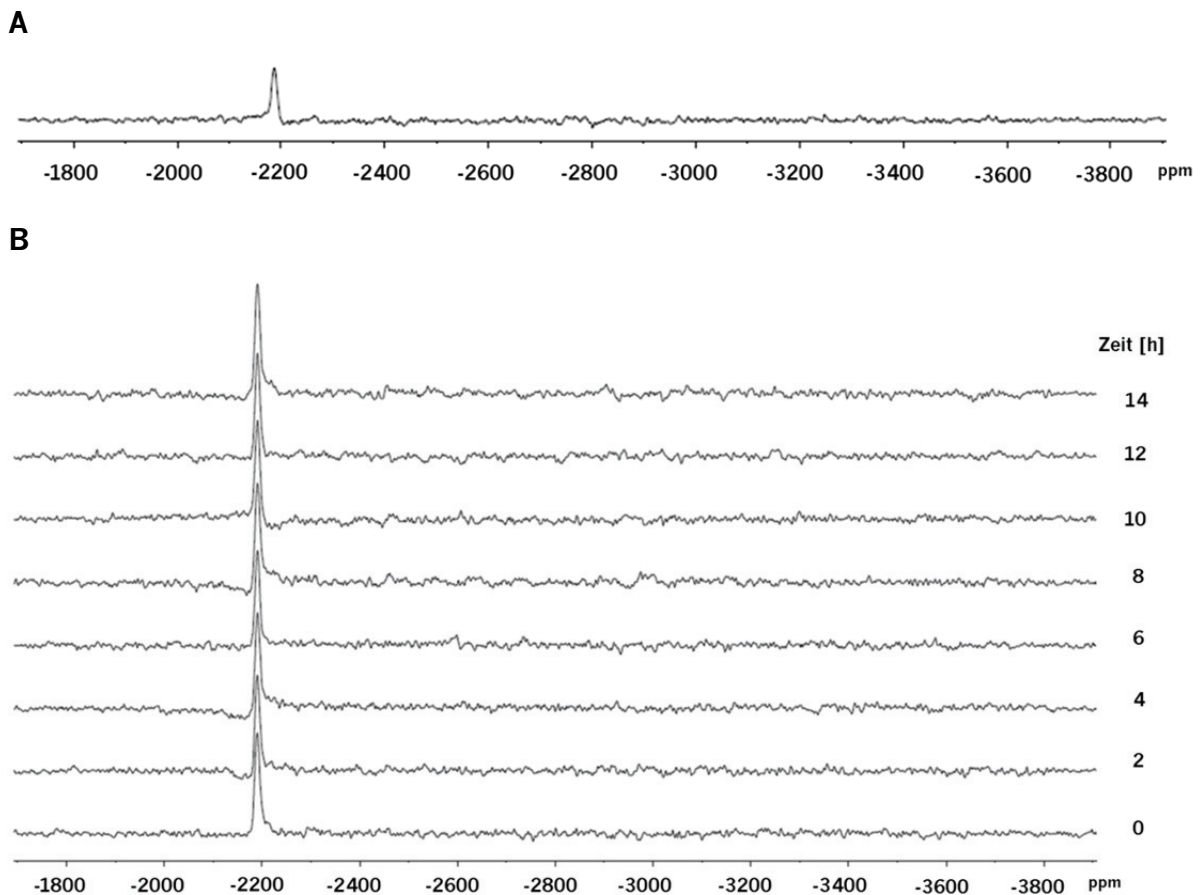


Abb. 4.44:  $^{195}\text{Pt}$ -NMR-Spektrum mit **A** 7,5 mM Cisplatin in PBS/DMF (1:2) bei 37 °C und von **B** eines Gemischs bestehend aus 7,5 mM Cisplatin und 0,75 mM Sorafenib in PBS/DMF (1:2) bei 37 °C über 14 h.

#### 4.6.2.4 Ermittlung der Kombinationsindices

Um den pharmakologischen Effekt der Kombination von Sorafenib mit Cisplatin *in vitro* zu charakterisieren, wurden die Zelllinien A2780 und A2780cis mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen der beiden Substanzen über 72 h inkubiert. Zur Beurteilung, ob ein antagonistischer oder synergistischer Effekt vorliegt, wurde anschließend der Kombinationsindex (CI) nach Gl. 3.2 berechnet. Das Ergebnis der Kombinationsanalysen zur Bestimmung der Kombinationsindices ist in Abb. 4.45 graphisch als Box-Whisker-Plot dargestellt.

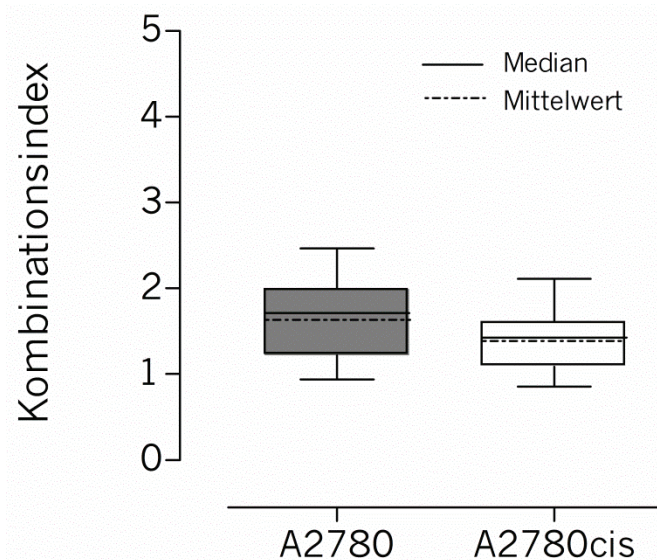


Abb. 4.45: Graphische Darstellung der CI-Werte der Kombination von Sorafenib und Cisplatin aus einer Reihe von 17 unabhängigen Kombinationsexperimenten.

Wie in Abb. 4.45 zu erkennen ist, zeigt die Kombination beider Substanzen in den Zelllinien A2780 und A2780cis einen antagonistischen Effekt, der ähnlich stark ausgeprägt ist. Der mittlere Kombinationsindex liegt bei  $1,651 \pm 0,11$  (MW  $\pm$  SE;  $n = 17$ ) in A2780- und bei  $1,413 \pm 0,10$  in A2780cis-Zellen. Der Unterschied ist nicht statistisch signifikant ( $p = 0,1169$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Wie anhand der 95 %-Konfidenzintervalle zu erkennen ist (vgl. Appendix E4), unterscheiden sich die Kombinationsindices signifikant von 1,1. Demnach lässt sich nach Chou das Ausmaß der Interaktion für A2780-Zellen als antagonistisch (CI = 1,45 – 3,3) und für A2780cis-Zellen als moderat antagonistisch (CI = 1,2 – 1,45) einstufen [246]. Da die berechneten CI-Werte eindeutig einer antagonistischen Interaktion zuzuordnen sind, wurde auf eine Berechnung des Kombinationsindex nach Gl. 3.3 (s. Kap. 3.4.1) verzichtet.

#### 4.6.3 Einfluss von Sorafenib auf den intrazellulären ATP-Gehalt

In der Literatur finden sich Hinweise, dass klinische relevante Konzentrationen von Sorafenib die Aktivität der Mitochondrien beeinträchtigen und somit zu einer Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts führen können [220]. Um zu untersuchen, ob möglicherweise ein reduzierter ATP-Gehalt eine Ursache für die verminderte Platinkumulation unter Sorafenib sein könnte, wurden die Zellen über einen Zeitraum



von 6 h mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib inkubiert und der ATP-Gehalt mittels ATP-Biolumineszenz-Assay ermittelt. Die ATP-Bestimmung erfolgte zunächst unter glucosehaltigen Bedingungen, da diese Bedingungen auch für den Influxversuch verwendet wurden. Wie in Abb. 4.46 zu erkennen ist, zeigt sich ab einer Inkubationsdauer von 2 h mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib nur in den A2780-Zellen eine signifikante Verringerung des intrazellulären ATP-Gehalts, wohingegen der ATP-Gehalt der A2780cis-Zellen durch die Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib weitestgehend unverändert blieb ( $92,17 \pm 7,9 \%$  bis  $98,40 \pm 13,5 \%$ , MW  $\pm$  SD); (s. auch Appendix E5).

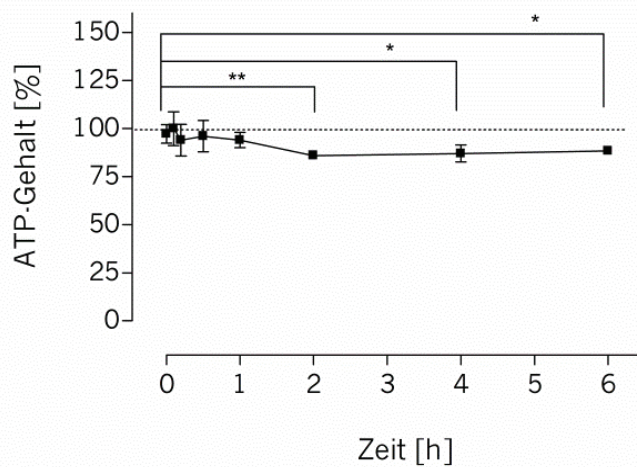
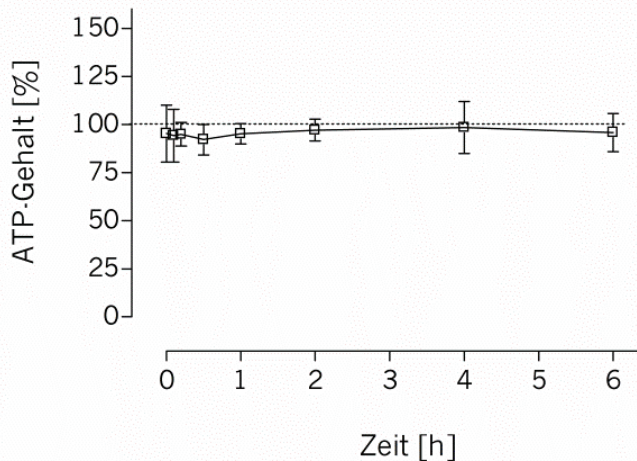
**A****B**

Abb. 4.46: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] nach Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib in glucosehaltigem Medium in **A** A2780- und **B** A2780cis Zellen über einen Zeitraum von 6 h. Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt (MW  $\pm$  SD; n = 4; \*: p < 0,05, \*\*: p < 0,01, Student's t-Test für unabhängige Stichproben).

Nach Inkubation mit Cisplatin bzw. Carboplatin wurde nach einer vierstündigen Präinkubation der Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib in glucosehaltigem Medium eine reduzierte Platinaufnahme beobachtet. Der intrazelluläre ATP-Gehalt zu diesem Zeitpunkt lag in den A2780-Zellen bei  $87,10 \pm 4,3 \%$  (MW  $\pm$  SD;  $p = 0,0201$ ) und in den A2780cis-Zellen bei  $98,40 \pm 13,5 \%$  ( $p = 0,7722$ ) bezogen auf die Wachstumskontrolle.

Um den Einfluss von Sorafenib auf den intrazellulären ATP-Gehalt weiter zu charakterisieren, wurden die Zellen über 4 h mit unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen (0,5 – 100  $\mu\text{M}$ ) sowohl unter glucosefreien, als auch unter glucosehaltigen Bedingungen inkubiert. Die Ergebnisse sind in den Abb. 4.47 und Abb. 4.48 dargestellt (vgl. auch Appendix E5).

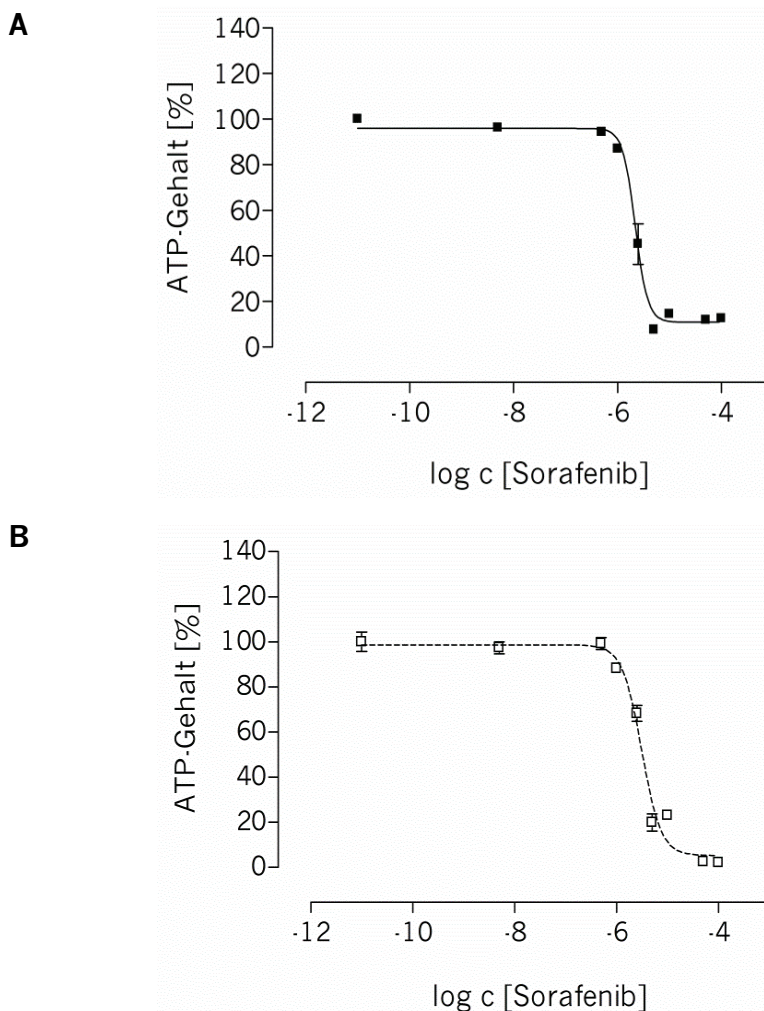


Abb. 4.47: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] nach vierstündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Sorafenib (0 – 100  $\mu\text{M}$ ) in glucosefreiem Medium in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen. Dargestellt ist eine repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurve aus einer Reihe von vier unabhängigen Experimenten (vermessen in Triplikaten, MW  $\pm$  SD). Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt.

In beiden Zelllinien wurden für den prozentualen ATP-Gehalt unter glucosefreien Bedingungen sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurven erhalten (s. Abb. 4.47). Anhand dieser wurden die  $pEC_{50}$ -Werte berechnet. Für die sensitiven A2780-Zellen wurde ein  $EC_{50}$ -Wert von  $5,00 \mu\text{M}$  ( $pEC_{50} = 5,301 \pm 0,004$ ; Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 4$ ), für die resistenten Zellen eine  $EC_{50}$ -Konzentration von  $6,79 \mu\text{M}$  ( $pEC_{50} = 5,168 \pm 0,047$ ) ermittelt.

Der ATP-Gehalt in Abhängigkeit von der Sorafenibkonzentration unter glucosehaltigen Bedingungen ist in Abb. 4.48 dargestellt.

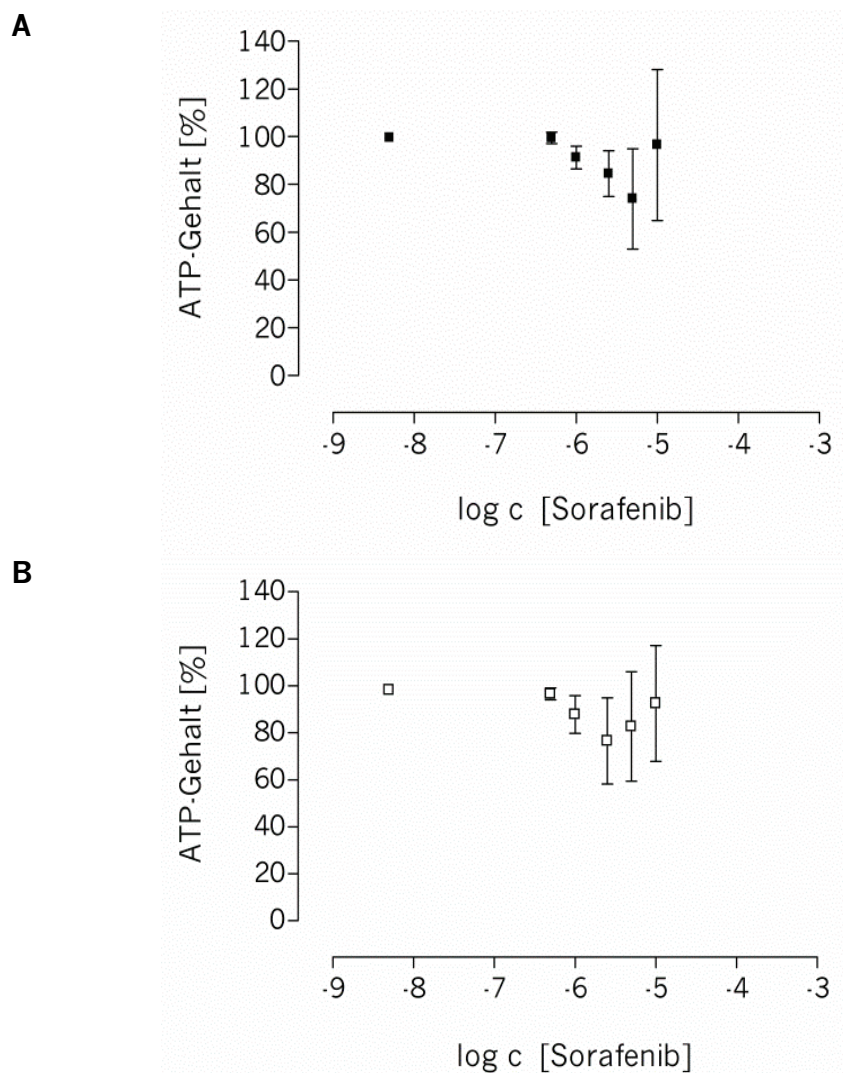


Abb. 4.48: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] nach vierstündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Sorafenib ( $0 - 10 \mu\text{M}$ ) in glucosehaltigem Medium in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen. Der ATP-Gehalt der Wachstumskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt (MW  $\pm$  SD;  $n = 3 - 6$ ).

Mit steigenden Sorafenibkonzentrationen nahm der ATP-Gehalt in beiden Zelllinien zunächst um ca. 25 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ab und stieg ab einer Konzentration von ca. 10  $\mu\text{M}$  Sorafenib wieder an. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei dem konzentrationsabhängigen Influxexperiment beobachtet. Hier stieg die Platinkumulation durch Präinkubation mit Sorafenibkonzentrationen  $> 50 \mu\text{M}$  an.

#### 4.6.4 Kombination mit Carboplatin

In einigen klinischen Studien wurde bereits die Kombination von Carboplatin und Sorafenib zur Therapie unterschiedlicher Tumore getestet [214,234]. Aus diesem Grund wurden verschiedene Kumulationsexperimente und Kombinationsanalysen ebenfalls unter Verwendung von Carboplatin durchgeführt.

##### 4.6.4.1 Zytotoxizität von Carboplatin

Zunächst wurde mit Hilfe des MTT-Assays überprüft, ob die in dieser Arbeit verwendeten cisplatinresistenten Zellen auch eine Resistenz gegenüber Carboplatin aufweisen. Eine repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurve von Carboplatin ist in Abb. 4.49 dargestellt (vgl. auch Appendix E6).

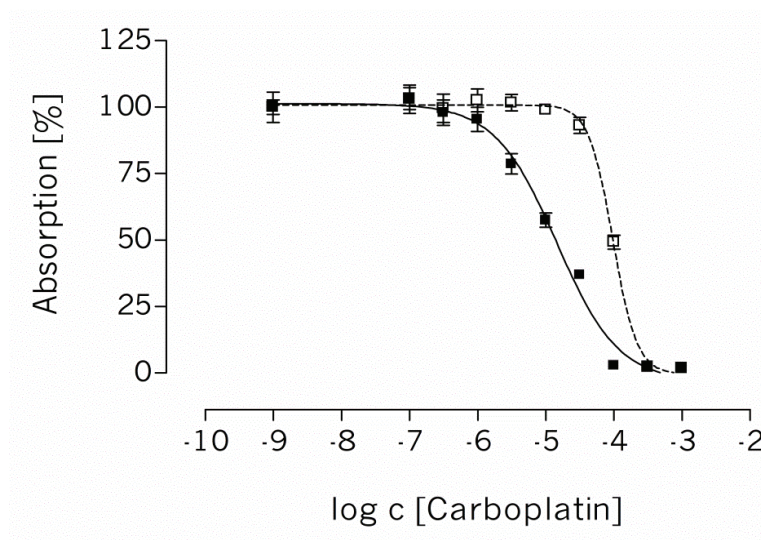


Abb. 4.49: Sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurve von Carboplatin in A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□). Dargestellt ist eine repräsentative Kurve aus einer Reihe von 12 unabhängigen Experimenten (vermessen in Triplikaten,  $MW \pm SD$ ). Die Absorption wird angegeben in % bezogen auf die Wachstumskontrolle.



Aus den erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven wurde für die A2780-Zelllinie ein  $EC_{50}$ -Wert von  $26,92 \mu\text{M}$  ( $pEC_{50} = 4,570 \pm 0,22$ ,  $MW \pm SE$ ;  $n = 12$ ) und für die A2780cis-Zelllinie ein  $EC_{50}$ -Wert von  $133,74 \mu\text{M}$  ( $pEC_{50} = 3,874 \pm 0,11$ ) ermittelt. Aus diesen Werten wurde ein Resistenzfaktor von 4,97 für die cisplatinresistenten Zellen gegenüber Carboplatin berechnet. Die A2780cis-Zellen zeigen demnach eine Kreuzresistenz gegenüber Carboplatin. Der Unterschied der  $pEC_{50}$ -Werte zwischen der sensitiven und resistenten Zelllinie ist statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben).

#### 4.6.4.2 Einfluss von Sorafenib auf die Kumulation von Carboplatin

Um den Einfluss von Sorafenib auf die Kumulation von Carboplatin zu untersuchen, wurde die zelluläre Platinaufnahme analog zu Cisplatin zum einen in Abhängigkeit von der eingesetzten Sorafenibkonzentration und zum anderen von der Inkubationszeit mit Carboplatin untersucht. Wie bereits für Cisplatin erläutert, wurde eine höhere Carboplatinkonzentration [ $200 \mu\text{M}$ ] ausgewählt, um den Influxprozess zu begünstigen.

Der Einfluss unterschiedlicher Sorafenibkonzentration auf die zelluläre Kumulation von Carboplatin ist in Abb. 4.50 dargestellt (s. auch Appendix E7).

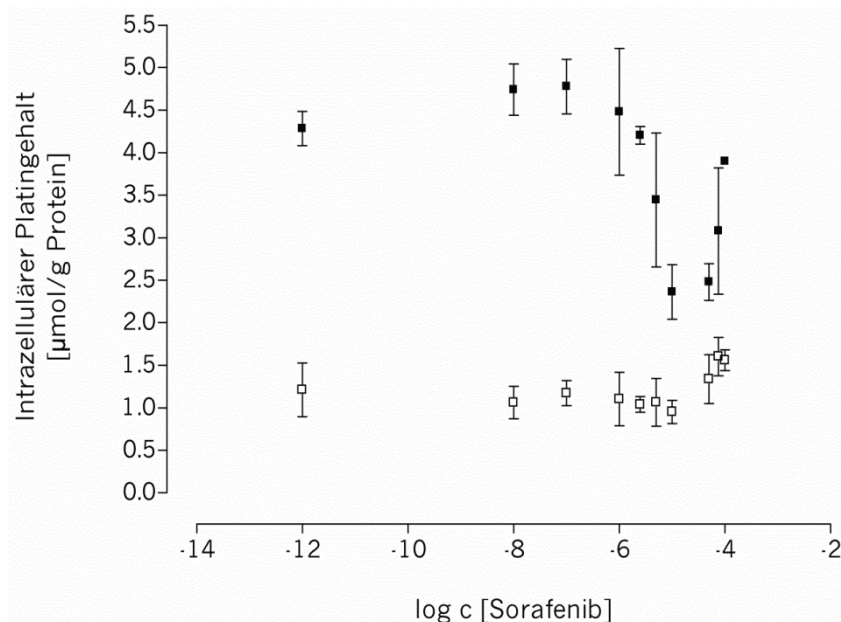


Abb. 4.50: Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in A2780- (■) und A2780cis-Zellen (□) nach vierstündiger Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Sorafenib (0 –  $100 \mu\text{M}$ ) und anschließender zwei-stündiger Inkubation mit  $200 \mu\text{M}$  Carboplatin ( $MW \pm SD$ ;  $n = 2 - 3$ ).

Der intrazelluläre Platingehalt nahm in den sensitiven Zellen durch Präinkubation mit Sorafenib (2,5 – 10  $\mu\text{M}$ ) um den Faktor 1,8 im Vergleich zu den ausschließlich mit Carboplatin behandelten Zellen ab. In der resistenten Zelllinie blieb der intrazelluläre Platingehalt über den Konzentrationsbereich (10 nM – 10  $\mu\text{M}$ ) konstant in einem Bereich von  $0,953 \pm 0,14$  bis  $1,210 \pm 0,31$   $\mu\text{mol Platin/g Protein}$ . Wie bereits beim Influxexperiment mit Cisplatin (s. Kap. 4.6.2.1), fällt auch hier auf, dass ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Sorafenib die Platinaufnahme in beiden Zelllinien wieder zunimmt. Im Vergleich zu den ausschließlich mit Carboplatin behandelten Zellen steigt der intrazelluläre Platingehalt in der resistenten Zelllinie bei Präinkubation mit 75  $\mu\text{M}$  Sorafenib um das 1,3-fache an. Die ermittelten  $\text{EC}_{50}$ -Werte für Sorafenib sind in beiden Ovarialkarzinomzelllinien niedriger als 50  $\mu\text{M}$ , sodass die erhöhte Platinaufnahme infolge einer zytotoxischen Sorafenibkonzentration aufgetreten sein könnte. Diese kann zu einer erhöhten Membranpermeabilität und dadurch passiven Diffusion von Carboplatin führen.

Um die Sorafenibkonzentration zu ermitteln, bei der die Platinaufnahme in den A2780-Zellen halbmaximal reduziert ist ( $\text{IC}_{50}$ ), wurde für jeden Versuchstag eine Konzentrations-Effekt-Kurve erstellt und daraus mittels nichtlinearer Regression der  $\text{pIC}_{50}$ -Wert berechnet. Eine repräsentative sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurve aus einer Reihe von drei unabhängigen Experimenten ist in Abb. 4.51 dargestellt. Die Ergebnisse für die Zelllinie A2780cis sind in Appendix E7 tabellarisch aufgeführt.

Anhand der Konzentrations-Effekt-Kurven wurde ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 4,22  $\mu\text{M}$  Sorafenib ermittelt ( $\text{pIC}_{50} = 5,375 \pm 0,07$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ ;  $n = 3$ ).

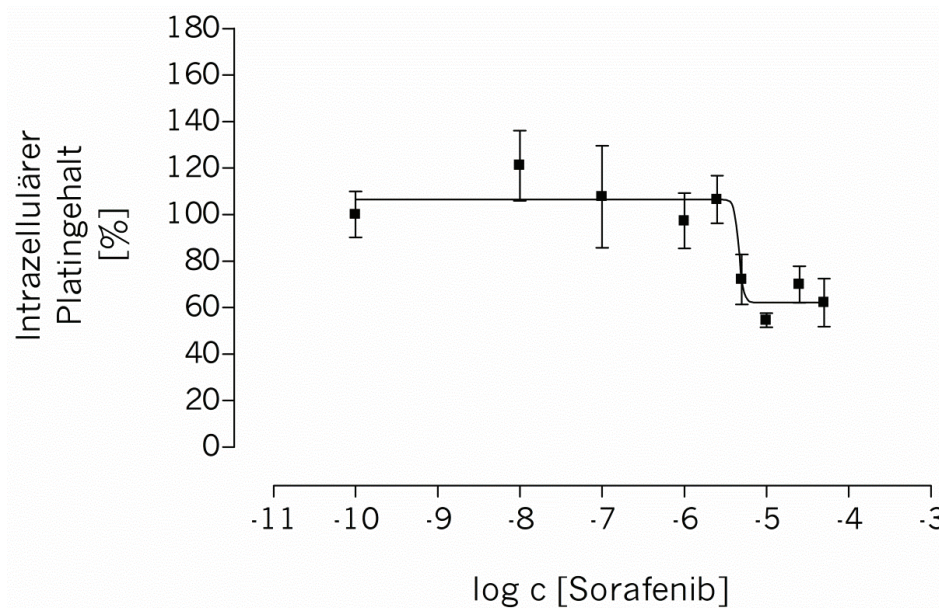


Abb. 4.51: Intrazellulärer Platingehalt [%] in A2780-Zellen nach vierstündiger Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Sorafenib (0 – 50  $\mu\text{M}$ ) und anschließender zweistündiger Inkubation mit 200  $\mu\text{M}$  Carboplatin. Dargestellt ist eine repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurve aus einer Reihe von drei unabhängigen Versuchstagen (vermessen in Triplikaten,  $MW \pm SD$ ). Der mittlere Platingehalt der ausschließlich mit Carboplatin behandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt.

Ausgehend von diesem Versuch wurde der Einfluss von 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib auf die Kumulation von Carboplatin in beiden Zelllinien über einen Zeitraum von 3 h untersucht. Wie in Abb. 4.52 zu sehen ist, nimmt im Verlauf der Zeit der intrazelluläre Platingehalt in den sensitiven Zellen nach Präinkubation mit Sorafenib ab, wohingegen dieser Effekt in den resistenten Zellen nicht zu beobachten ist (vgl. Appendix E7).

Die Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA zur Ermittlung des Einflusses der beiden unabhängigen Variablen Behandlung mit Sorafenib und Zeit auf den intrazellulären Platingehalt sind in Tab. 4.15 zusammengefasst. Sowohl in der sensitiven als auch in der resistenten Ovarialkarzinomzelllinie stieg der intrazelluläre Platingehalt mit zunehmender Inkubationszeit erwartungsgemäß statistisch signifikant an ( $p < 0,0001$ , zweifaktorielle ANOVA). Eine Präinkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib führte nur in den sensitiven Zellen zu einer signifikanten Verringerung der Kumulation von Carboplatin ( $p = 0,0001$ , zweifaktorielle ANOVA). Auch dieser Effekt nahm mit der Zeit zu (Interaktion:  $p = 0,0024$ , zweifaktorielle ANOVA).

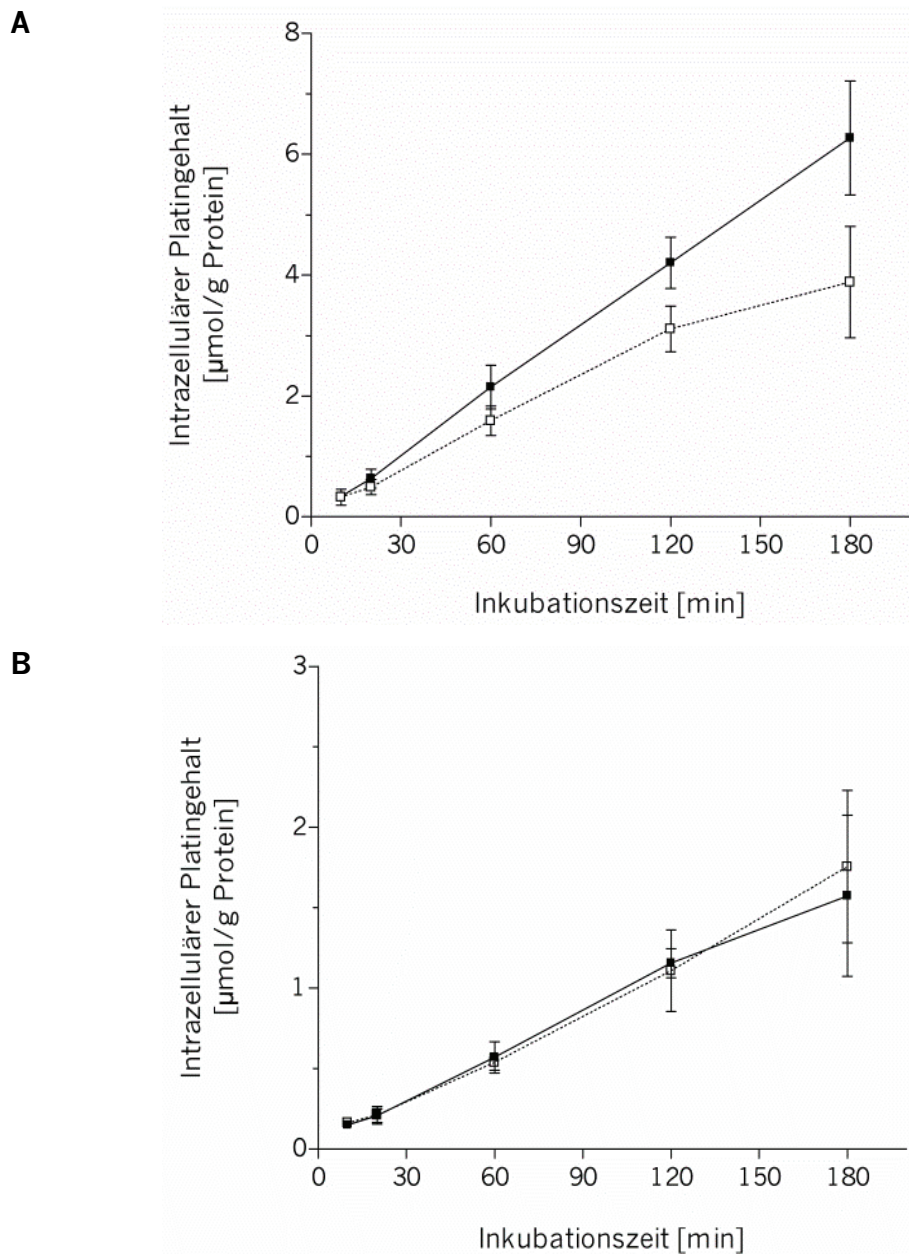


Abb. 4.52: Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in **A** A2780- und **B** A2780cis-Zellen nach Inkubation mit  $200 \mu\text{M}$  Carboplatin ohne (■) oder mit vierstündiger Prä- und anschließender Koinkubation mit  $5 \mu\text{M}$  Sorafenib (□) (MW  $\pm$  SD; n = 3).

Nach Präinkubation der sensitiven Zellen mit  $5 \mu\text{M}$  Sorafenib und anschließender Inkubation der Zellen mit  $200 \mu\text{M}$  Carboplatin für 3 h, betrug der mittlere intrazelluläre Platingehalt  $62,10 \pm 13,1 \%$  (MW  $\pm$  SD) im Vergleich zu den ausschließlich mit Carboplatin behandelten Zellen.



Tab. 4.15: Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA zur Untersuchung des Einflusses der Variablen Sorafenib, Zeit und Interaktion von Sorafenib und Zeit auf die Kumulation von Carboplatin.

Variable	A2780		A2780cis	
	% der Gesamtvariabilität	p-Wert	% der Gesamtvariabilität	p-Wert
Sorafenib [5 µM]	4,58	0,0001	0,04	n.s.
Zeit [min]	86,58	< 0,0001	89,43	< 0,0001
Interaktion	4,83	0,0024	0,45	n.s.

n.s.: nicht signifikant

#### 4.6.4.3 Ermittlung der Kombinationsindices

Um den pharmakologischen Effekt der Kombination von Sorafenib mit Carboplatin *in vitro* zu charakterisieren, wurden die Zelllinien A2780 und A2780cis mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen der beiden Substanzen über 72 h inkubiert. Zur Beurteilung, ob ein antagonistischer oder synergistischer Effekt vorliegt, wurde anschließend der Kombinationsindex berechnet. Das Ergebnis der Kombinationsanalysen zur Bestimmung der Kombinationsindices ist in Abb. 4.53 graphisch als Box-Whisker-Plot dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Kombination beider Substanzen in beiden Zelllinien einen antagonistischen Effekt zeigt, der ähnlich stark ausgeprägt ist. Der mittlere Kombinationsindex betrug  $1,977 \pm 0,30$  (MW  $\pm$  SE; n = 16) in den A2780-Zellen und  $1,602 \pm 0,15$  in den A2780cis-Zellen. Wie anhand der 95 %-Konfidenzintervalle zu erkennen ist (vgl. Appendix E8), unterscheiden sich die Kombinationsindices signifikant von 1,1. Demnach lässt sich nach Chou das Ausmaß der Interaktion für A2780- und A2780cis-Zellen als antagonistisch (CI = 1,45 – 3,3) einstufen [246]. Der Unterschied der CI-Werte zwischen den beiden Zelllinien ist nicht statistisch signifikant ( $p = 0,2762$ , Student's t-Test für unabhängige Stichproben). Ebenso wie auch schon bei der Kombination von Cisplatin und Sorafenib festgestellt werden konnte, führt eine gleichzeitige Inkubation von Carboplatin und Sorafenib zu einer antagonistischen Wirkung der beiden Kombinationspartner. Da die berechneten CI-Werte eindeutig einer antagonistischen Interaktion zuzuordnen sind, wurde auf eine Berechnung des Kombinationsindex nach Gl. 3.3 (s. Kap. 3.4.1) verzichtet.

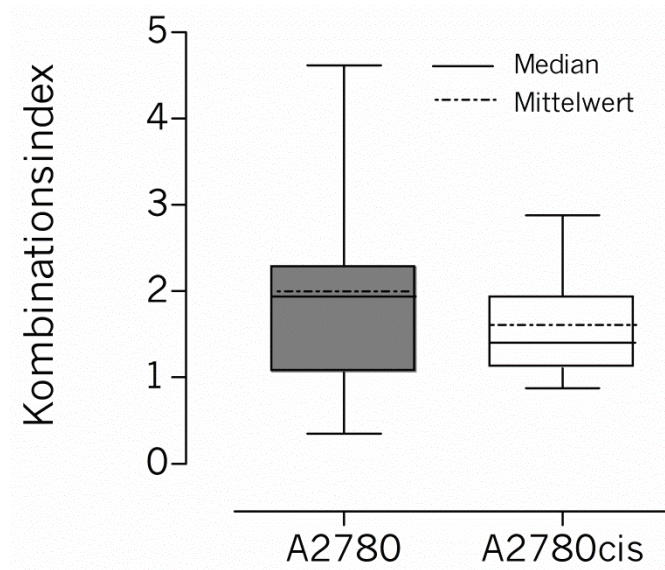


Abb. 4.53: Graphische Darstellung der CI-Werte der Kombination von Sorafenib und Carboplatin aus einer Reihe von 16 unabhängigen Kombinationsexperimenten.

## 5. Diskussion

In Kap. 5.1 wird die optimierte Methode zur Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts näher vorgestellt. In den nachfolgenden Kapiteln werden die in Kap. 4 beschriebenen Ergebnisse diskutiert. Es wird herausgestellt, welchen Einfluss ATP-abhängige Transportprozesse auf die Platinsensitivität bei dem Ovarialkarzinomzelllinienpaar A2780/A2780cis haben. Abschließend wird die klinische Relevanz dieser Arbeit beurteilt und die Diskussion mit einem Ausblick abgeschlossen.

### 5.1 Optimierung und Teilvalidierung der Methode

Das Nukleotid ATP ist der Hauptenergielieferant für wichtige energieabhängige Prozesse metabolisch aktiver und vitaler Zellen, wie beispielsweise für den aktiven Transport von Substanzen, die Signaltransduktion und die DNA-Reparatur. Wie bereits in der Einleitung erläutert, leisten diese Prozesse neben vielen anderen auch einen Beitrag zur zellulären Kumulation und beeinflussen die Zytotoxizität der Platin-komplexe. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von ATP in der Cisplatinresistenz herauszustellen. Aus diesem Grund war es notwendig, den intrazellulären ATP-Gehalt der verwendeten Zelllinien zu quantifizieren. Zur Bestimmung des ATP-Gehalts wurde in dieser Arbeit der ATP-Biolumineszenz-Assay verwendet. Das durch die Lumineszenz emittierte Licht ist hierbei direkt proportional zur intrazellulären ATP-Konzentration, welche mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert [252]. Die Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts wurde bereits vielfach zur Charakterisierung der Zellvitalität und Chemosensitivität verschiedener Zelllinien angewendet [239,252,253,268,269]. Mit dem ATP-Biolumineszenz-Assay ist es aufgrund der hohen methodischen Sensitivität und Spezifität möglich, bereits geringe Veränderungen des ATP-Gehalts der Zelle als Folge einer Exposition mit zytotoxischen Substanzen zu beobachten. Ein kritischer Schritt zur Quantifizierung des intrazellulären ATP-Gehalts mit Hilfe des Luciferin-Luciferase-Systems ist die effiziente Lyse der intakten Zellmembran. Nur so kann ATP möglichst vollständig aus der Zelle freigesetzt werden und damit für die Reaktion mit dem extrazellulär zugesetzten Luciferin zur Verfügung stehen. Die Lyse sollte schnell erfolgen, damit potentielle Veränderungen der metabolischen Aktivität der Zelle während der Lyse nicht zu einer Beeinflussung des ATP-Gehalts führen. Neben der effizienten Lyse der Zellmembran sollte das Lysereagens zusätzlich ATPasen oder

weitere energieabhängige Enzyme inaktivieren, um somit eine Änderung des zellulären ATP-Gehalts durch diese Enzyme zu verhindern. Des Weiteren sollte das verwendete Reagenz die enzymatische Luciferase-Reaktion nicht beeinträchtigen [270].

Eine Vielzahl an Reagenzien, die ATP aus der Zelle extrahieren, wurde bereits in der Literatur beschrieben [270]. Häufig zu diesem Zweck eingesetzte Extraktionsmittel sind neben der Trichloressigsäure (TCA) bzw. Perchlorsäure (PCA) auch das nicht-ionische Detergenz Triton [252,254,270-272]. Die effektivste Freisetzung von ATP aus der Zelle erfolgt mit Hilfe der TCA- bzw. PCA-Methode. Mit dieser Methode ist es möglich, sowohl intrazelluläres ATP freizusetzen als auch ATP-abbauende Enzyme zu inaktivieren [270]. Ein bedeutender Nachteil ist jedoch, dass die erhaltene Lyse vor der ATP-Messung neutralisiert und verdünnt werden muss, da die Säuren ansonsten die Aktivität der Luciferase reduzieren und dadurch zu einem niedrigeren Lumineszenzsignal führen können [273]. Auch die Verwendung von Triton® X-100 (Triton) als Extraktionsmittel für das intrazelluläre ATP ist eine weitverbreitete und etablierte Methode [254,272,274]. Kiesslich et al. zeigten an epidermoiden Tumorzellen, dass eine Lyse mit Triton zu einer ATP-Freisetzung führte, die ebenfalls mit der PCA-Methode erreicht werden konnte. Diese wurde als Referenzmethode verwendet. Auch die Präzision der beiden Methoden war vergleichbar (7,14 % vs. 7,26 %) [272]. Auch aktuellere Untersuchungen fanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der PCA-Methode und der Lyse mittels 0,1 % Triton (pH 9,2) im Hinblick auf die freigesetzte ATP-Menge oder Präzision der Methode [254]. Demnach ist auch Triton geeignet, intrazelluläres ATP in ausreichender Menge freizusetzen. Der entscheidende Vorteil dieser Methode ist zudem die schnelle und einfache Probenaufarbeitung, wohingegen bei der PCA- bzw. TCA-Methode mehrere Schritte notwendig sind. Zudem zeigt Triton keine Beeinflussung der Luciferaseaktivität, sondern es wurde sogar berichtet, dass Triton eine Verstärkung des emittierten Lumineszenzsignals bewirkt [275]. Auch bei der ATP-Bestimmung nach Mueller et al. wurde als Lyse-Reagenz Triton in einer finalen Konzentration von 1 % eingesetzt [251]. Dass diese Tritonkonzentration zu einem stabilen Lumineszenzsignal führt, bestätigten Hara und Mori [276]. Bei dieser Methode wurde jedoch der Lysepuffer zu den sich noch im serumhaltigen Medium befindenden Zellen pipettiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Serum befindliche Enzyme ATP abbauen, was über die Zeit zu einer abnehmenden Intensität des durch die Lumineszenz emittierten Lichts führte (s. Kap. 4.2.1). Diese Erkenntnis machte eine Optimierung der bestehenden Methode erforderlich. Dabei wurde nach der Inkubation mit den ATP-Depletoren das

Nährmedium aus den Wells entfernt und die Zellen durch direkte Zugabe von 1 %iger Triton-Lösung lysiert. Der ATP-Gehalt wurde unmittelbar nach der zehnmütigen Lyse mit Hilfe des Luminometers vermessen. Kritisch anzumerken ist hierbei, dass bei Verwendung dieses Lysereagenzes das freigesetzte ATP durch zellmembranständige ATPasen abgebaut werden könnte, was einen niedrigeren ATP-Gehalt der Zelle vortäuschen könnte. Die in dieser Arbeit ermittelte Wiederfindung einer zugesetzten ATP-Menge lag jedoch im Verlauf der Lumineszenzmessung in einem Bereich von 89 – 109 %. Die Befürchtung, dass im Rahmen dieser Methode zelluläres ATP durch verschiedene Enzyme abgebaut wird, konnte demnach widerlegt werden.

Der intrazelluläre ATP-Gehalt ist abhängig von unterschiedlichen Faktoren, u. a. von den Kultivierungsbedingungen, der Zellzahl und der Phase des Zellzyklus [255]. Um den intrazellulären ATP-Gehalt zu quantifizieren, ist es wichtig, diesen auf einen konstanten Referenzwert zu beziehen. Der zelluläre Proteingehalt ist ein Parameter, der sich nur langsam ändert und zudem einfach gemessen werden kann. Für die in dieser Arbeit etablierte ATP/Protein-Bestimmung konnte eine Between-day-Präzision von 18,9 % für die A2780-Zellen und 24,2 % für die A2780cis-Zellen ermittelt werden. Mögliche Erklärungen für die relativ hohe Ungenauigkeit dieser Methode werden nachfolgend diskutiert. Eine höhere Variabilität der Ergebnisse könnte zum einen dadurch entstanden sein, dass in die Berechnung des intrazellulären ATP/Protein-Gehalts sowohl die Impräzision des sensitiven ATP-Biolumineszenz-Assays als auch die des BCA-Assays einging. Zum anderen könnte durch notwendige Teilschritte dieser Methode, wie beispielsweise das Entfernen des Nährmediums und Spülen der 96-Well-Platte mit PBS-Puffer, ein ungleichmäßiger Zellverlust entstanden sein, der als Ursache für die geringe Präzision angesehen werden kann. Kritisch ist zudem anzuführen, dass die Bestimmung des ATP- und Protein-Gehalts jeweils in verschiedenen 96-Well-Platten erfolgte. Unterschiedliche Wachstumseigenschaften der Zellen in den einzelnen Platten könnten beispielsweise ebenfalls eine höhere Variabilität bedingt haben. Ein sinnvoller Ansatz, um die Schwankungen der gemessenen Werte zwischen den 96-Well-Platten und den Versuchstagen zu minimieren, wäre die simultane Bestimmung des ATP- und Protein-Gehalts auf einer 96-Well-Platte. Eine derartige Methode wurde von Koeszegi et al. für die ATP/Protein-Bestimmung in zwei verschiedenen humanen Zelllinien beschrieben [254]. Die von dieser Arbeitsgruppe ermittelte Within-Day-Präzision lag jedoch auch in einer Größenordnung von 10,1 – 22,5 % (RSD). Ob die Anwendung dieser Methode für unser Zelllinienpaar tatsächlich eine bessere Between-Day-Präzision ermöglicht, ist in

weiteren Versuchen zu überprüfen. Darüber hinaus erfordert die Anwendung dieser Methode auch eine erneute Optimierung und Validierung der Messbedingungen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit dem verwendeten ATP-Biolumineszenz-Assay der ATP-Gehalt nach Exposition mit verschiedenen Substanzen einfach und zuverlässig charakterisiert werden kann und eine Quantifizierung des intrazellulären ATP-Gehalts in den beiden Zelllinien in Bezug auf den Proteingehalt mit einer akzeptablen Präzision möglich ist.

## **5.2 Bedeutung von intra- und extrazellulärem ATP für die Platinsensitivität**

### **5.2.1 Intrazellulärer ATP-Gehalt**

Die unbehandelten resistenten Zellen zeigten einen signifikant höheren ATP-Gehalt (Faktor 1,2) im Vergleich zu den sensitiven Zellen. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Ergebnisse von Krieger et al. [262]. Eine erhöhte metabolische Aktivität und ein daraus resultierender höherer ATP-Gehalt in A2780cis-Zellen könnten eine mögliche Konsequenz der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin sein, um der Zelle als Schutz gegenüber zytotoxischen Substanzen bzw. zellulärem Stress zu dienen. Diese Beobachtung scheint jedoch spezifisch für A2780cis-Zellen zu sein, da andere Arbeitsgruppen entweder keine Unterschiede zwischen cisplatinsensitiven und -resistenten Tumorzelllinien (unter anderem des Ovarialkarzinoms) detektieren konnten [93,277], bzw. einen niedrigeren ATP-Gehalt bezogen auf den zellulären Proteingehalt in cisplatinresistenten murinen Leukämiezellen im Vergleich zu sensitiven Zellen fanden [263].

Tumorzellen können Energie in Form von ATP über den Abbau von Glucose (Glykolyse) oder über die mitochondriale Atmungskette generieren. Demzufolge könnte sowohl eine erhöhte Glykolyserate als auch eine gesteigerte mitochondriale Aktivität (erhöhtes Transmembranpotential der Mitochondrien) in der Zelllinie A2780cis zu einem Anstieg des intrazellulären ATP-Gehalts geführt haben [130,132,255,278].

In der Literatur ist beschrieben, dass verschiedene cisplatinresistente Tumorzellen einen erhöhten Glucoseverbrauch aufweisen [263,279]. Ein Vergleich der Kumulation und Zytotoxizität von Cisplatin, als wichtige Parameter zur Charakterisierung der Platinsensitivität, zeigte unter glucosefreien bzw. -haltigen Bedingungen keine

signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Tumorzelllinien. Dies lässt vermuten, dass in dem Zelllinienpaar A2780/A2780cis Unterschiede im Glucoseverbrauch zur Energiebereitstellung in Form von ATP für die Resistenz gegenüber Cisplatin nicht relevant sind.

Von Veränderungen der Morphologie, des Transmembranpotentials und der Anzahl an Mitochondrien wurde bereits in Zusammenhang mit Cisplatinresistenz in der Literatur berichtet [42,280-283]. Andrews et al. zeigten, dass cisplatinresistente Ovarialkarzinomzellen ein erhöhtes mitochondriales Transmembranpotential (MTP) aufweisen [280]. Eine Erniedrigung des MTP führte entsprechend zu einer Wiederherstellung der Sensitivität der resistenten Zellen gegenüber Cisplatin [282,283]. Interessanterweise können durch einen Verlust des MTP die ersten Schritte des mitochondrialen Apoptoseweges eingeleitet werden [44,57,284]. Die Vermutung liegt nahe, dass die resistenten Zellen ein erhöhtes MTP und dadurch bedingt eine gesteigerte ATP-Synthese aufweisen. Ein erhöhter intrazellulärer ATP-Gehalt könnte als Schutz der Zelle vor dem intrinsischen Apoptoseweg dienen. Des Weiteren ist es möglich, dass der erhöhte energetische Metabolismus in den resistenten Zellen die Reparatur von Platin-DNA-Addukten über das NER-System begünstigt [48,122,125]. Der erhöhte ATP-Gehalt in der Zelllinie A2780cis könnte demnach ein entscheidendes Charakteristikum der Cisplatinresistenz darstellen.

Eine Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Cisplatin zeigte nur einen geringen Einfluss auf den intrazellulären ATP-Gehalt, wohingegen toxischere Konzentrationen, die 10-fach [25  $\mu\text{M}$ ] bzw. 50-fach [100  $\mu\text{M}$ ] über dem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von Cisplatin in A2780-Zellen lagen, zu einem signifikanten Anstieg des ATP-Gehalts in den A2780-Zellen führten. In A2780cis-Zellen war jedoch bei keiner der getesteten Konzentrationen eine Erhöhung des intrazellulären ATP-Gehalts zu erkennen. Dieses Ergebnis bestätigt die Befunde von Krieger et al., die ebenfalls an dem Zelllinienpaar A2780/A2780cis zeigten, dass eine Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  Cisplatin den intrazellulären ATP-Gehalt in den sensitiven Zellen erhöht, jedoch nicht in den resistenten Zellen [262]. Auch die Arbeitsgruppe von Suzuki zeigte an einer Reihe von verschiedenen cisplatin sensitiven oralen Plattenepithelkarzinomzellen, dass eine Inkubation mit 1 mM Cisplatin ( $\text{EC}_{50}$  Cisplatin: 0,1 mM) zu einem Anstieg des intrazellulären ATP-Gehalts um ca. 25 % führt [285]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde berichtet, dass eine Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Cisplatin auch zu einer Erhöhung des intrazellulären ATP-Gehalts in resistenten Ovarialkarzinomzellen führt, die jedoch geringer ausgeprägt ist als die in den sensitiven Zellen [277]. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die sensitiven Zellen als



Abwehrmechanismus gegenüber Cisplatin in den ersten Stunden vermehrt ATP produzieren, wohingegen der ATP-Gehalt der resistenten Zellen als Folge einer chronischen Exposition mit steigenden Cisplatinkonzentrationen (s. Kap. 3.1.8) bereits hochreguliert ist, um die Zelle vor den zytotoxischen Effekten von Cisplatin zu schützen. Der erhöhte intrazelluläre ATP-Gehalt könnte somit ein Resultat der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin in A2780cis-Zellen sein. Jedoch sind die beteiligten Mechanismen näher zu definieren.

Unter glucosefreien Bedingungen wurde innerhalb der ersten Stunden der Behandlung mit Cisplatin ein geringer Anstieg (ca. 15 – 20 %) des ATP-Gehalts in den sensitiven Zellen im Vergleich zur Wachstumskontrolle beobachtet. Im Gegensatz zu den Versuchen in glucosehaltigem Medium, war diese Zunahme jedoch nicht statistisch signifikant. In den resistenten Zellen blieb der intrazelluläre ATP-Gehalt über den untersuchten Zeitraum weitestgehend unverändert. Der geringere Anstieg des ATP-Gehalts unter glucosefreien Bedingungen im Vergleich zu glucosehaltigen Bedingungen könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass Tumorzellen bevorzugt ATP über die aerobe Glykolyse im Zytosol produzieren (50 % der ATP-Synthese) [44,128]. Diese Form der ATP-Generation ist zudem schneller als die Produktion von ATP über die Atmungskette [286]. Induziert durch Stress, wie beispielsweise durch eine Exposition mit dem zytotoxischen Cisplatin, können die Zellen auf diese Weise in kurzer Zeit ATP zur Verfügung stellen. Die Verwendung von glucosefreiem Medium könnte somit die ATP-Produktion, induziert durch Cisplatin, negativ beeinflussen und demnach zu einem geringeren Anstieg des ATP-Gehalts nach Inkubation mit Cisplatin führen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der erhöhte ATP-Gehalt infolge einer chronischen Cisplatinexposition in A2780cis-Zellen mit der Resistenzentwicklung zusammenhängen könnte. Bestätigt werden diese Ergebnisse dadurch, dass cisplatinsensitive Zellen als Antwort auf toxische Cisplatinkonzentrationen den intrazellulären ATP-Gehalt erhöhen. Dieser ist per se in den resistenten Zellen erhöht und könnte beispielsweise die Reparatur von Platin-DNA-Addukten oder den Efflux von zytotoxischen Substanzen über ATP-abhängige Transporter begünstigen [48,122,125].

Ausgehend von der obengenannten Vermutung und der Annahme, dass eine reduzierte Platinkumulation ein häufig beobachteter Resistenzmechanismus in cisplatin-resistenten Zellen ist, lag es nahe, die Energieabhängigkeit der Influx- und Effluxprozesse von Cisplatin zu untersuchen.

### 5.2.2 Einfluss der ATP-Depletion

Durch Einsatz des  $F_0F_1$ -ATP-Synthase-Inhibitors Oligomycin konnte der intrazelluläre ATP-Gehalt reduziert werden. Bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M Oligomycin unter glucosefreien Bedingungen wurde der ATP-Gehalt in A2780- um 55,8 % und in A2780cis-Zellen um 40,6 % verringert. Die Reduktion von intrazellulärem ATP in Anwesenheit von Oligomycin ging mit einer signifikanten Abnahme der Kumulation von Cisplatin in den sensitiven Zellen einher. Im Gegensatz hierzu wurde der intrazelluläre Platingehalt in den resistenten Zellen nur zu einem geringeren Ausmaß unter Einfluss von Oligomycin reduziert. Das letztgenannte Ergebnis war zudem nicht statistisch signifikant und könnte auf den höheren basalen ATP-Gehalt in A2780cis-Zellen zurückgeführt werden. Es ist somit wahrscheinlich, dass Cisplatin über energieabhängige Influxprozesse in sensitive Ovarialkarzinomzellen aufgenommen wird. Diese Vermutung stimmt mit den Ergebnissen weiterer Autoren überein, welche ebenfalls den Einfluss unterschiedlicher metabolischer Inhibitoren auf die Platinkumulation in verschiedenen Tumorzelllinien untersucht haben [91-94]. Allerdings wurden in diesen Arbeiten Inhibitoren der mitochondrialen Elektronentransportkette (Komplex I – IV), wie beispielsweise Antimycin A (Inhibitor von Komplex III) oder Natriumazid (Inhibitor von Komplex IV) eingesetzt. Eine Hemmung der Elektronentransportkette kann jedoch zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials führen [137,138]. Diese Prozesse können die Apoptose der Zelle induzieren [44,57,139,284]. Im Gegensatz dazu finden sich Hinweise in der Literatur, dass Oligomycin, ein Inhibitor der oxidativen Phosphorylierung, eine antiapoptotische Wirkung zeigt [287,288]. Aus diesem Grund scheint es geeigneter, Oligomycin und zusätzlich glucosefreies Medium zu verwenden, um die ATP-Produktion über die Glykolyse zu verhindern.

Da eine reduzierte Platinkumulation durch eine verringerte Aufnahme von Cisplatin in die Zelle und/oder verstärkten Efflux von Cisplatin aus der Zelle erklärt werden kann, wurde in einem weiteren Versuch der Einfluss des letztgenannten Transportprozesses auf die Platinkumulation untersucht. Effluxversuche unter ATP-reduzierten und glucosefreien Bedingungen zeigten in beiden Zelllinien keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu der Kontrolle. Demzufolge kann die verminderte Platinkumulation durch eine Hemmung energieabhängiger Influxprozesse erklärt werden. Diese Vermutung wird unterstützt durch frühere Effluxversuche von Zisowsky, die zeigten, dass in Anwesenheit von Glucose keine Unterschiede in der Effluxrate zwischen den beiden Zelllinien existieren [102]. Demnach können Veränderungen in

einem aktiven Effluxsystem nicht als Resistenzmechanismus in A2780cis-Zellen angesehen werden. Aus diesem Grund wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Untersuchung ATP-abhängiger Influxprozesse gelegt. Jedoch ist anzumerken, dass diese Schlussfolgerung spezifisch für das in dieser Studie untersuchte Zelllinienpaar zu sein scheint. In anderen humanen Tumorzelllinien konnte unter ATP-reduzierten Bedingungen eine vermehrte Platinkumulation beobachtet werden, was auf einen aktiven Efflux zurückgeführt wurde [86,188].

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass Cisplatin teilweise über energieabhängige Transportprozesse in die sensitive Ovarialkarzinomzelllinie aufgenommen wird. In den resistenten Zellen scheinen ATP-abhängige Transportprozesse von Cisplatin in die Zelle hinein eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Eine positive Korrelation zwischen der Cisplatinzytotoxizität und -kumulation wurde in verschiedenen Tumorzelllinien beobachtet [289]. Es wäre zu erwarten, dass eine Abnahme des intrazellulären Platingehalts unter Einfluss von Oligomycin auch zu einer Reduktion der Zytotoxizität von Cisplatin unter den gleichen Bedingungen führt. Entgegen den Erwartungen wurde diese Annahme jedoch in keiner der beiden untersuchten Zelllinien bestätigt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Zytotoxizitätsversuche über 72 h in glucosehaltigem Nährmedium durchgeführt wurden, um ein Absterben der Zellen zu verhindern, wohingegen für die Influxversuche glucosefreies Medium verwendet wurde. Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein Kurzzeit-MTT-Assay analog zu den Influxbedingungen (glucosefrei) zur Überprüfung dieser Hypothese eingesetzt. Auch hier konnte kein Einfluss von Oligomycin auf die Zytotoxizität von Cisplatin beobachtet werden. Da die Zytotoxizität von Cisplatin hauptsächlich über die Bildung von Platin-DNA-Addukten vermittelt wird [1,24,34] und für den Prozess der DNA-Reparatur ATP benötigt wird [48,122,125], liegt die Vermutung nahe, dass unter ATP-Depletion die Reparaturrate von Platin-DNA-Addukten niedriger ist und somit der Effekt der geringeren Platinkumulation kompensiert wird. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die vesikuläre Sequestrierung von Cisplatin über den ATP-abhängigen Kupfertransporter ATP7A, die unter anderem zur Inaktivierung von Cisplatin beiträgt, verhindert wird [109,290]. Infolge des intrazellulären ATP-Mangels könnte weniger Cisplatin über ATP7A transportiert werden. Somit könnte Cisplatin zu einem größeren Teil in den Zellkern gelangen und dort über die DNA-Bindung einen zytotoxischen Effekt auslösen [39].

### 5.2.3 Einfluss von extrazellulärem ATP

In den vorher beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass unter energie-reduzierten Bedingungen der Influx von Cisplatin in die sensitiven Tumorzellen erniedrigt ist. Folglich müsste die Zugabe von extrazellulärem ATP zu dem Inkubationsmedium zu einer erhöhten Kumulation von Cisplatin führen. Diese Vermutung bestätigte sich für die A2780-Zellen, wenn Cisplatin simultan mit ATP über einen Zeitraum von 60 min inkubiert wurde. Übereinstimmend wurde auch schon von anderen Autoren berichtet, dass extrazelluläres ATP die Kumulation von verschiedenen antitumoralen Substanzen in unterschiedlichen Tumorzelllinien erhöht [169,170,177]. Überraschenderweise widerspricht dieser Befund jedoch den früheren Ergebnissen von Rotte et al., der diesen Effekt im gleichen Zelllinienpaar nicht beobachten konnte [187]. Betrachtet man die experimentellen Bedingungen näher, so stellt man fest, dass die Zellen in unseren Versuchen über 60 min mit ATP und Cisplatin koinkubiert worden sind, wohingegen Rotte et al. eine Inkubationsdauer von 24 h wählte. Über diesen Zeitraum könnte ATP durch membranständige Ektonukleotidasen zu ADP, AMP oder Adenosin abgebaut worden sein [166,181,182]. Die hydrolytischen Abbauprodukte von ATP haben möglicherweise nicht mehr das Potential, die Membranpermeabilität zu modifizieren oder aber als Substrat für energieabhängige Prozesse zu dienen. Interessanterweise führte eine Präinkubation mit 300  $\mu$ M ATP über 72 h und anschließender Inkubation mit Cisplatin zu einem deutlich erhöhten intrazellulären Platingehalt in Lungenkarzinomzellen [172]. Auch wenn die Autoren eine mögliche Interaktion von ATP mit Cisplatintransportern diskutieren, ist es wahrscheinlicher, dass über den untersuchten Zeitraum andere zelluläre Prozesse (z.B. intrazelluläre Signalwege) aktiviert werden. Der von mehreren Autoren postulierte Zusammenhang, dass erst nach einer intrazellulären ATP-Depletion Effekte von extrazellulärem ATP auf die Platinaufnahme erzielt werden, wurde für die beiden Ovarialkarzinomzelllinien widerlegt [176,291,292]. Darüber hinaus führte eine zehnminütige Koinkubationszeit von Cisplatin und ATP zu keiner Veränderung des intrazellulären Platingehalts in beiden Zelllinien. Diese Inkubationszeit ist vermutlich nicht ausreichend, um Effekte von extrazellulärem ATP auf die zelluläre Platinkumulation messen zu können.

Die Tatsache, dass die Zugabe von extrazellulärem ATP die Aufnahme von Cisplatin erhöhen kann, ist durch unterschiedliche Prozesse zu erklären. Zum einen ist es möglich, dass ATP durch Permeabilisierung der Zellmembran die Kumulation von antitumoralen Substanzen erhöht, zum anderen kann ATP als Substrat für ATP-

abhängige Influxtransporter dienen, die an der zellulären Aufnahme von Platinverbindungen beteiligt sind. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind die energieabhängigen Transportprozesse bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein möglicher Transporter, der an der Kumulation von Cisplatin beteiligt sein könnte, ist die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase [33,87,93]. Dessen Rolle bei der Cisplatinresistenz wird für das Zelllinienpaar A2780/A2780cis im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

Zusammengefasst bestätigen die Ergebnisse, dass die Kumulation von Cisplatin in A2780-Zellen zumindest teilweise von intrazellulärem und extrazellulärem ATP abhängig ist, wohingegen ATP-abhängige Transportprozesse in A2780cis-Zellen von untergeordneter Bedeutung sind. Diese Eigenschaft könnte zu einem Kumulationsdefekt in den resistenten A2780cis-Zellen führen, die zur Resistenz gegenüber Cisplatin beiträgt.

### 5.3 Bedeutung der $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase für die Platinsensitivität

Der in den oben beschriebenen Kumulationsversuchen verwendete ATP-Depletor Oligomycin weist unterschiedliche Wirkungsmechanismen auf. Neben der Hemmung der mitochondrialen  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPase, welche zu einer Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts führt, interagiert Oligomycin auch mit der transmembranären  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Diese Interaktion resultiert in einer verringerten Aktivität dieses Transportproteins [165,267,293]. Wie in der Einleitung erwähnt, katalysiert dieses Protein den aktiven Transport von Natrium- und Kaliumionen durch die Zellmembran. Zu diesem Zweck wird Energie durch Hydrolyse von ATP an der Membraninnenseite bereitgestellt [150]. Ein Mangel an intrazellulärem ATP hemmt folglich die Aktivität der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Um aufzuklären, ob die Abnahme des intrazellulären Platingehalts in Anwesenheit von Oligomycin auf den ATP-Mangel in der Zelle zurückzuführen ist oder auf eine mögliche Interaktion mit der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, wurden weitere Influxversuche mit Ouabain, einem spezifischen Inhibitor dieses Transportproteins, durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Ouabain in den sensitiven Zellen konzentrationsabhängig einen inhibitorischen Effekt auf die Aufnahme von Cisplatin hat, der bei 5  $\mu\text{M}$  Ouabain maximal ist (Reduktion des intrazellulären Platingehalts um 30 %). Im Gegensatz dazu wurde in den resistenten Zellen keine signifikante Veränderung des intrazellulären Platingehalts unter Einfluss von Ouabain beobachtet. Auch in anderen cisplatin-sensitiven Tumorzelllinien führte Ouabain in Konzentrationen im nano- bis

mikromolaren Bereich zu einer Abnahme des intrazellulären Platingehalts im Gegensatz zur jeweiligen cisplatinresistenten Variante [85,188,285]. Diese Konzentrationen liegen jedoch weit oberhalb der ermittelten  $EC_{50}$ -Werte für das Zelllinienpaar A2780/A2780cis. Zytotoxische Effekte von Ouabain (z.B. Störung des elektrochemischen Gradienten) können dieses Ergebnis beeinträchtigt haben. Aus diesem Grund wurde bei der Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Platinkumulation unter Einfluss von Ouabain eine Konzentration von 50 nM eingesetzt. Bei dieser Konzentration war die Vitalität der beiden Zelllinien nur geringfügig eingeschränkt. In Analogie zu den Influxversuchen mit Oligomycin wurde auch hier nur in den sensitiven Zellen ein signifikanter Einfluss auf die Platinkumulation beobachtet. Demnach scheint ein Aufnahmemechanismus von Cisplatin in A2780-Zellen abhängig von der Aktivität der  $Na^+,K^+$ -ATPase zu sein. Darüber hinaus postulieren Gately und Howell, dass die  $Na^+,K^+$ -ATPase kein direkter Transporter für Cisplatin ist, jedoch einen elektrochemischen Gradienten an der Zellmembran aufrechterhält, der bedeutend für die Funktion weiterer Transporter ist, die die Kumulation von Cisplatin regulieren [87]. Insbesondere wird vermutet, dass eine Unterbrechung des Natriumionengradienten zu einem verminderten Cisplatininflux führt [85]. Spezifische Transporter oder Ionenkanäle in der Plasmamembran, die abhängig von diesem Gradienten sind, konnten jedoch bis heute noch nicht identifiziert werden [33].

Vor kurzem publizierte Ergebnisse liefern neue Einblicke in den Zusammenhang zwischen der  $Na^+,K^+$ -ATPase, dem Natriumionengradienten und dem intrazellulären Chloridgehalt, der in cisplatinresistenten Lungenkarzinomzellen im Vergleich zu den parentalen Zellen erhöht war [36]. Diskutiert wurde die Beteiligung des  $Na^+,K^+,2Cl^-$  (NKCC)-Kotransporters an der Regulation des intrazellulären Chloridgehalts. Die Aktivität dieses Transporters ist abhängig vom Natriumionengradienten der  $Na^+,K^+$ -ATPase. Interessanterweise konnte durch eine Erniedrigung des intrazellulären Chloridgehalts die Kumulation von Cisplatin in die resistenten Zellen gesteigert werden. Darüber hinaus erhöhte eine Behandlung mit Ouabain die intrazelluläre Chloridkonzentration der cisplatin sensitiven Lungenkarzinomzellen. Übereinstimmend mit diesen Befunden führte in A2780-Zellen eine Behandlung mit Ouabain zu einer niedrigeren Kumulation von Cisplatin. Inwieweit die intrazelluläre Chloridkonzentration in Verbindung mit der zellulären Aufnahme von Cisplatin steht, ist noch zu klären. Berichtet wurde auch, dass VSOR (*volume-sensitive outwardly-rectifying*)  $Cl^-$ -Kanäle eine Rolle in der cisplatininduzierten Apoptose und Cisplatinresistenz in verschiedenen Tumorzellen spielen [294,295]. Diese interessanten

Ansätze sollten in nachfolgenden Versuchen für das Zelllinienpaar A2780/A2780cis weiter untersucht werden.

Der intrazelluläre Platingehalt war in den sensitiven Zellen in Anwesenheit von Oligomycin stärker erniedrigt als unter Behandlung mit Ouabain. Die Vermutung liegt nahe, dass Oligomycin ein stärkerer Inhibitor der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ist als Ouabain. In der Literatur finden sich jedoch gegenteilige Aussagen [144,149]. Skou und Esmann berichten, dass Oligomycin im Gegensatz zu den herzwirksamen Glykosiden die Aktivität der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase nicht vollständig inhibiert [149]. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte von Oligomycin für den Natrium-Kaliumionen-Austausch und die ATPase-Aktivität werden an isolierter  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aus Ratten mit  $1,2 \mu\text{M}$  und  $2,2 \mu\text{M}$  angegeben [144]. Effekte auf die Kumulation von Cisplatin konnten jedoch schon bei Oligomycin-konzentrationen unterhalb dieser  $\text{IC}_{50}$ -Konzentration beobachtet werden. Die reduzierte Aufnahme von Cisplatin unter Einfluss von Oligomycin kann demnach nur teilweise durch eine Hemmung der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase erklärt werden. Ouabain hingegen ist ein spezifischer Inhibitor der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, der mit einer  $\text{IC}_{50}$  von  $10 \text{ nM}$  an die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit bindet [296]. Die zur Untersuchung des Influx verwendete Konzentration von  $50 \text{ nM}$  Ouabain ist demnach ausreichend, um die Aktivität der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase fast vollständig zu inhibieren, ohne die Vitalität der Zellen maßgeblich zu beeinträchtigen. Zudem konnte mittels des ATP-Biolumineszenz-Assays gezeigt werden, dass Ouabain in einer Konzentration von  $50 \text{ nM}$  weder in glucosefreiem noch in glucosehaltigem Medium den intrazellulären ATP-Gehalt in beiden Tumorzelllinien reduziert. Dies unterstützt die Aussage, dass die Reduktion der zellulären Platin-aufnahme unter Einfluss von Ouabain allein durch die inhibitorische Wirkung von Ouabain auf die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase zu erklären ist. Somit scheinen neben der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase-vermittelten Kumulation noch weitere ATP-abhängige Transportprozesse an der zellulären Kumulation von Cisplatin beteiligt zu sein. Diese energieabhängigen Mechanismen müssen jedoch noch identifiziert werden.

Um die Rolle der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in der Platinresistenz weiter zu charakterisieren, wurden Kurzzeit-Inkubationsversuche mit Ouabain und Cisplatin analog zu den Influxbedingungen durchgeführt, wobei die mit Ouabain behandelten Zellen eine signifikant geringere Vitalität aufwiesen, als die unbehandelten Zellen. Dieser Effekt ist jedoch auf den vitalitätsbeeinträchtigenden Effekt von  $50 \text{ nM}$  Ouabain allein zurückzuführen.

Des Weiteren waren die cisplatinresistenten Zellen sensitiver gegenüber Ouabain als die sensitiven Zellen (Faktor 2). Dieser Aspekt stimmt mit früheren Ergebnissen von Ohmori et al. überein, die auch eine höhere Sensitivität der cisplatinresistenten



Lungenkarzinomzellen im Vergleich zu den sensitiven Zellen beobachtet. Die Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass die höhere Sensitivität gegenüber Ouabain eine mögliche Konsequenz der reduzierten Aktivität oder Expression der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in den cisplatinresistenten Zellen sein könnte [266]. Eine verringerte Expression der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$  Untereinheit wurde auch im Rahmen dieser Arbeit in den resistenten A2780cis-Zellen nachgewiesen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit früheren Ergebnissen in anderen resistenten Tumorzelllinien [85,93,285,297]. Eine Inkubation der Zellen mit Oligomycin, Ouabain oder Cisplatin für eine Stunde oder eine kombinierte Behandlung mit den beiden letztgenannten Substanzen führte zu keiner Veränderung des Expressionslevels in der resistenten Ovarialkarzinomzelllinie. Die sensitiven Zellen zeigten jedoch eine Verringerung der Expression der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$  nach Inkubation mit diesen Substanzen. Diese Ergebnisse bestätigen eine mögliche Beteiligung der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase an der Cisplatinresistenz. Die verringerte Platinkumulation von Cisplatin in A2780cis-Zellen könnte zumindest teilweise auf eine geringere Expression der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase zurückzuführen sein.

Nach derzeitigem Kenntnisstand, ist dieses die erste systematische Arbeit, die die Beteiligung von intrazellulärem ATP an der Platinsensitivität untersucht. Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass Cisplatin zumindest teilweise über energieabhängige Transportprozesse in die sensitiven Ovarialkarzinomzellen aufgenommen wird, wohingegen die Aufnahme von Cisplatin in A2780cis-Zellen eine geringere Abhängigkeit von intrazellulären Energiequellen aufweist. Das könnte jedoch auch durch den höheren basalen ATP-Gehalt der unbehandelten resistenten Zellen bedingt sein. Die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase scheint teilweise, aber nicht vollständig an der energieabhängigen Kumulation von Cisplatin in der Zelllinie A2780 beteiligt zu sein. In A2780cis-Zellen ist die Expression dieses Transportproteins verringert und als mögliche Folge davon die Platinaufnahme reduziert. Demnach ist die Platinaufnahme über die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in den resistenten Zellen von untergeordneter Bedeutung. Weitere Studien sollten auf die Aufklärung weiterer ATP-abhängiger Prozesse, wie z.B. intrazelluläre Signalwege und deren Beteiligung an der Platinkumulation und -resistenz eingehen.

#### 5.4 Bedeutung der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade für die Platinsensitivität

Der zytoplasmatische Raf/MEK/ERK-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Tumorzellen. Extrazelluläre Signale werden durch eine Kaskade spezifischer Phosphorylierungen, für die ATP benötigt wird, in den Zellkern weitergeleitet. Beispielsweise verfügt die an dieser Signaltransduktion beteiligte Raf-Kinase über eine ATP-Bindungsstelle. Während der Phosphorylierung, die zur Aktivierung des nachgeschalteten MEK/ERK-Signalweges führt, bindet ATP an diese Bindungsstelle. Durch Einsatz des Multikinase-Inhibitors Sorafenib, der unter anderem spezifisch mit der ATP-Bindungsstelle der Kinasen Raf-1 ( $IC_{50}$ : 6 nM) und B-Raf ( $IC_{50}$ : 25 nM) interagiert, kann die Phosphorylierung des MEK/ERK-Signalweges inhibiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein reduzierter intrazellulärer ATP-Gehalt die Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege erschwert und im Gegensatz dazu erhöhte intrazelluläre ATP-Konzentrationen die Aktivierung des Signalweges begünstigen. Darüber hinaus ist es wichtig, zu betonen, dass die Signalwege der MAP-Kinasen für die Cisplatin-sensitivität von Bedeutung sind [59,77]. In verschiedenen Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass Cisplatin zu einer Erhöhung der Aktivität von ERK führt [65,66,73,75]. Wenn diese Aktivierung durch ERK-Inhibitoren verhindert wird, dann führt eine Behandlung mit Cisplatin zelltypspezifisch entweder zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber der cisplatininduzierten Apoptose oder zur Resistenz der Zellen gegenüber Cisplatin [70,298].

Um die Auswirkung einer Blockade des Raf/MEK/ERK-Signalweges auf die Platinsensitivität des Zelllinienpaares A2780/A2780cis zu beurteilen, wurden Kumulations- und Zytotoxizitätsversuche in Anwesenheit von Sorafenib durchgeführt. Sorafenib selbst zeigt antiproliferative Eigenschaften im mikromolekularen Bereich in den in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien, wobei die Unterschiede der  $EC_{50}$ -Werte von Sorafenib zwischen den beiden Zelllinien eher gering waren. Auch für andere humane Tumorzelllinien wurden  $EC_{50}$ -Werte von Sorafenib in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 – 20  $\mu$ M beschrieben [236,299,300]. *In vitro* ist dieser antitumorale Effekt von Sorafenib auf eine Hemmung der ERK-Signalkaskade zurückzuführen. Die zytotoxische Wirkung von Cisplatin wird zu einem großen Teil über die Bildung von Platin-DNA-Addukten vermittelt. Durch Kombination von Sorafenib mit Platinverbindungen könnte die Effektivität der antitumoralen Therapie durch Ausnutzung zweier unterschiedlicher Wirkungsmechanismen gesteigert werden. In klinischen Studien (Phase I – III) wird seit einigen Jahren die zusätzliche Gabe von

Sorafenib zu einer Chemotherapie bestehend aus Carboplatin und Paclitaxel zur Therapie verschiedener Tumorarten getestet. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich [214,231,233,234].

Ergebnisse einer *In-vitro*-Studie an zwei verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien geben erste Hinweise, dass Sorafenib auf zellulärer Ebene mit den Platinkomplexen interagiert. Die Koinkubation von Sorafenib mit entweder Oxaliplatin oder Cisplatin führte zu einer signifikanten Reduktion der zellulären Platinkumulation und der DNA-Platinierung [236]. Da die Zellen mit beiden antitumoralen Substanzen gleichzeitig behandelt wurden, ist es nicht auszuschließen, dass eine Reaktion zwischen den Kombinationspartnern im Zellkulturmedium stattgefunden hat. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten  $^{195}\text{Pt}$ -NMR-Spektroskopie konnte eine chemische Interaktion zwischen Cisplatin und Sorafenib bei Koinkubation jedoch ausgeschlossen werden. Die Platinkomplexe Carboplatin und Oxaliplatin weisen eine geringere Reaktivität im Vergleich zu Cisplatin auf, wonach auch hier keine Interaktionen mit dem Multikinase-Inhibitor zu erwarten sind. Der verringerte intrazelluläre Platingehalt in Anwesenheit von Sorafenib ist demnach nicht auf eine Reaktion der beiden Substanzen und den dadurch bedingten Aktivitätsverlust der Platinkomplexe zurückzuführen. Anzumerken ist außerdem, dass für die Influxversuche in der obengenannten Arbeit eine für die verwendeten Tumorzelllinien toxische Sorafenibkonzentration ( $24\ \mu\text{M}$ ;  $\text{EC}_{50}$ :  $8,9\ \mu\text{M}$ ) eingesetzt wurde. Demnach könnte eine Reduktion des intrazellulären Platingehalts auch durch zytotoxische Effekte bedingt sein. Als kritisch anzusehen ist zudem, dass die therapeutischen Plasmakonzentrationen von Sorafenib in einem Bereich von  $4 - 16\ \mu\text{M}$  Sorafenib liegen [301]. Es ist demnach unwahrscheinlich, dass eine Sorafenib-Plasmakonzentration in Höhe von  $24\ \mu\text{M}$  auch *in vivo* erreicht wird.

Ausgehend von diesen vorausgehenden Ergebnissen wurden die tatsächlich zugrunde liegenden Interaktionsmechanismen der Kombination der Platinkomplexe mit einer klinisch relevanten Konzentration von Sorafenib genauer betrachtet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Heim et al. war auch in der sensitiven Ovarialkarzinomzelllinie A2780 die zelluläre Aufnahme von Cisplatin nach Präinkubation mit  $5\ \mu\text{M}$  Sorafenib um bis zu  $40\ \%$  reduziert. Mittels MTT-Assay konnte gezeigt werden, dass diese Konzentration die Vitalität der Zellen nicht maßgeblich einschränkt. Zudem zeigte sich, dass die Reduktion des intrazellulären Platingehalts nach Inkubation mit Cisplatin abhängig von der eingesetzten Sorafenibkonzentration ist, wobei ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $0,99\ \mu\text{M}$  Sorafenib für A2780-Zellen ermittelt wurde. Erstmals wurde in dieser Arbeit der Einfluss des Multikinase-Inhibitors Sorafenib auf

die Platinkumulation einer cisplatinresistenten Tumorzelllinie untersucht. Interessanterweise zeigte eine Behandlung mit Sorafenib weder konzentrations- noch zeitabhängig eine signifikante Reduktion des intrazellulären Platingehalts in A2780cis-Zellen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die durch Sorafenib vermittelten Effekte für die zelluläre Aufnahme von Cisplatin in die resistenten Ovarialkarzinomzellen nicht von Bedeutung sind.

Während Cisplatin häufig für Studien an Tumorzelllinien verwendet wird, um die Resistenzmechanismen der Platinverbindungen aufzuklären, wird der Platinkomplex Carboplatin aufgrund der niedrigeren Toxizität häufig in der klinischen Praxis eingesetzt. Wie bereits erwähnt, zeigten klinische Studien, die die Wirksamkeit der Kombination Carboplatin und Paclitaxel mit Sorafenib in der Therapie verschiedener Tumorarten untersuchten, uneinheitliche Ergebnisse [214,231,233,234]. Vor diesem Hintergrund erschien es von bedeutender klinischer Relevanz, auch den Einfluss von Sorafenib auf die Kumulation von Carboplatin zu untersuchen. Influxversuche in dem Zelllinienpaar A2780/A2780cis zeigten, dass unter Einfluss von Sorafenib der intrazelluläre Platingehalt nach Inkubation mit Carboplatin ebenfalls nur in A2780-Zellen reduziert war, und zwar im gleichen Ausmaß wie schon im Falle von Cisplatin beobachtet wurde. Hervorzuheben ist jedoch, dass eine Präinkubation mit 4,22  $\mu\text{M}$  Sorafenib notwendig war, um die zelluläre Aufnahme von Carboplatin um die Hälfte zu reduzieren, wohingegen bei Cisplatin eine geringere Sorafenibkonzentration (0,99  $\mu\text{M}$ ) ausreichend war. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der unterschiedlichen Reaktivität der beiden Platinverbindungen, die ein wichtiger Faktor für die Aufnahme der Platinkomplexe in Tumorzellen darstellt. Frühere Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Reaktivität gegenüber dAMP und dGMP in der Reihenfolge Cisplatin > Oxaliplatin > Carboplatin abnimmt [248]. Dies spiegelt sich auch in den in dieser Arbeit ermittelten  $\text{EC}_{50}$ -Werten für Carboplatin und Cisplatin wider. In beiden Zelllinien sind 10-fach höhere Carboplatinkonzentrationen im Vergleich zu Cisplatin nötig, um den gleichen zytotoxischen Effekt auszulösen. Es erscheint möglich, dass der Hemmeffekt von Sorafenib auf die Platinaufnahme mit der Reaktivität der Platinkomplexe korreliert. Weitere konzentrationsabhängige Influxversuche mit Oxaliplatin, welche zukünftig in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt werden, sollen zur Klärung dieses Sachverhaltes beitragen.

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass Sorafenib sowohl die zelluläre Aufnahme von Cisplatin als auch von Carboplatin in die sensitiven Ovarialkarzinomzellen reduziert, während die zelluläre Platinaufnahme in A2780cis-Zellen unbeeinflusst bleibt. Die

zugrunde liegenden Mechanismen der verminderten Platinaufnahme unter Einfluss von Sorafenib sind jedoch noch ungeklärt. Zu vermuten ist eine Interaktion von Sorafenib mit den Transportern, die an der zellulären Aufnahme der Platinverbindungen beteiligt sind. Die Bedeutung der Interaktion der Tyrosinkinase-Inhibitoren (als Substrat oder Inhibitor) auf Transporterebene wird erst seit kurzem eingehender erforscht [302,303]. Minematsu und Giacomini untersuchten beispielsweise den inhibitorischen Effekt verschiedener Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) auf die Aufnahme von Metformin, einem repräsentativen Substrat der SLC (*solute carrier*)-Transporter OCT1 – 3. Sorafenib stellte sich als ein sehr schwacher Inhibitor dieser OCT-Transporter heraus ( $IC_{50} > 30 \mu\text{M}$ ). Bestätigt wurden diese Ergebnisse von Hu et al., die ebenfalls zeigten, dass Sorafenib nicht von den Influxtransportern der SLC-Familie (OAT (organischer Anionentransporter) und OCT) in die Zelle transportiert wird [303]. Wie zuvor erwähnt, bindet Sorafenib kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle der Raf-Kinase. Da auch andere Transporter, wie beispielsweise die ATPasen über eine ATP-Bindungsstelle verfügen, liegt die Vermutung nahe, dass Sorafenib, trotz der hohen Affinität zu seinen Zielstrukturen, auch eine Affinität zu diesen ATP-abhängigen Transportern aufweist. Heim et al. diskutierten in ihrer Arbeit, dass Sorafenib mit der membranständigen  $\text{H}^+$ -ATPase interagiert und dadurch bedingt zu einer Störung des Protonengradienten der Plasmamembran führt, der verantwortlich für die zelluläre Aufnahme der Platinkomplexe über den Kupfertransporter CTR1 ist [236,304]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der ATP-abhängigen  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase zu einem verringerten intrazellulären Platingehalt in der Zelllinie A2780 führt. Auch eine Interaktion von Sorafenib mit diesem Transporter könnte die verringerte Platinaufnahme bedingt haben. Erwähnenswert ist, dass in dieser Arbeit eine geringere Expression der  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase in den cisplatinresistenten Zellen im Vergleich zu den sensitiven Zellen beobachtet werden konnte. Dies könnte zugleich erklären, warum Sorafenib in den resistenten Zellen die Platinaufnahme nicht beeinflusst. Eine Inhibition der Funktion von ABC-Transportern durch Sorafenib wurde bereits berichtet [303]. Allerdings wurden zur Affinität von Sorafenib zu anderen Zielstrukturen bislang keine Studien durchgeführt. Dieses könnte jedoch einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der Interaktionsmechanismen von Sorafenib auf Transporterebene leisten.

Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass durch Inhibition der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade die zelluläre Platinkumulation beeinflusst wird. Amrán et al. zeigten, dass durch Anwesenheit der MEK/ERK-Inhibitoren PD98059 und U0126 die zelluläre

Kumulation von Cisplatin in humanen myeloischen Leukämiezellen reduziert wird [68]. Die beteiligten Mechanismen und Zielstrukturen konnten jedoch bislang noch nicht identifiziert werden. Es ist möglich, dass die Expression verschiedener Transporter, die an der Aufnahme von Cisplatin und Carboplatin beteiligt sind, über diese Signalkaskade reguliert werden. Eine erhöhte Transkription des Gens MDR1, welches für den Effluxtransporter P-Gp kodiert, wurde bereits als Folge der Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalweges in der Literatur beschrieben [305]. Jedoch ist dieses Protein am Transport von Cisplatin aus der Zelle nicht beteiligt [33]. Im Fokus weiterer Studien sollte die Aufklärung der beteiligten Zielstrukturen liegen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass Sorafenib in klinisch relevanten Konzentrationen die Funktion der Mitochondrien in verschiedenen Zelllinien beeinflusst und als Resultat den intrazellulären ATP-Gehalt reduziert [220,221]. Dieser Effekt wird auch für die zytotoxische und antiproliferative Wirkung von Sorafenib verantwortlich gemacht. Als möglicher Mechanismus wird eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung angesehen, indem Sorafenib den Komplex V der Atmungskette mit einer  $IC_{50}$  von  $5,1 \mu\text{M}$  und die Komplexe II + III mit einer  $IC_{50}$  von jeweils  $3 \mu\text{M}$  inhibiert [220]. Eine  $IC_{50}$  in dieser Größenordnung wurde auch für die halbmaximale Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts durch Sorafenib in den Zelllinien A2780 und A2780cis unter glucosefreien Bedingungen ermittelt. Erstaunlicherweise verringern klinisch relevante Sorafenibkonzentrationen den intrazellulären ATP-Gehalt in der sensitiven Zelllinie auch unter glucosehaltigen Bedingungen, jedoch zu einem geringeren Prozentsatz (ca. 15 – 25 % bezogen auf die Kontrolle). Das Ausmaß der ATP-Reduktion ist dabei abhängig von der Inkubationsdauer und der eingesetzten Sorafenibkonzentration. Dieses Ergebnis steht jedoch in einem gewissen Widerspruch zu vorherigen Ergebnissen, in denen gezeigt werden konnte, dass Oligomycin unter glucosehaltigen Bedingungen keinen Einfluss auf den ATP-Gehalt in diesem Zelllinienpaar zeigt, jedoch unter glucosefreien Bedingungen. Es ist möglich, dass Sorafenib durch Inhibition mehrerer Komplexe der Atmungskette effektiver die mitochondriale ATP-Produktion blockiert, sodass die Tumorzellen den ATP-Gehalt durch verstärkte Glykolyse nicht vollständig wiederherstellen können. Auch in anderen Tumorzellen, die die Möglichkeit haben ATP über die Glykolyse zu generieren, wurde eine Reduktion des ATP-Gehalts um 12 – 32 % nach Inkubation (3 und 6 h) mit verschiedenen Sorafenibkonzentrationen ( $4 - 16 \mu\text{M}$ ) festgestellt [221]. In A2780cis-Zellen wurde dieser Effekt jedoch nicht beobachtet, was

wahrscheinlich auf einen höheren basalen ATP-Gehalt der resistenten Zellen zurückzuführen ist.

Aufgrund der Tatsache, dass eine vierstündige Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib unter glucosehaltigen Bedingungen den intrazellulären ATP-Gehalt um ca. 23 % signifikant verringert und in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts zu einer Abnahme der Platinkumulation führt, könnte dies auch eine mögliche Erklärung für die verringerte Platinaufnahme in A2780-Zellen nach Präinkubation mit Sorafenib sein. Dieser Zusammenhang scheint plausibel, da Sorafenib in den resistenten Zellen weder den intrazellulären ATP-Gehalt noch die zelluläre Platinkumulation beeinflusst. Allerdings fällt in beiden ovariellen Tumorzelllinien auf, dass bei steigenden Sorafenibkonzentrationen ( $> 10 \mu\text{M}$ ) sowohl der intrazelluläre ATP-Gehalt als auch der intrazelluläre Platingehalt zunimmt. Fiume et al. zeigten in Leberkarzinomzelllinien, dass höhere Sorafenibkonzentrationen (8 und 16  $\mu\text{M}$ ) die aerobe Glykolyse in diesen Zellen stimulieren ( $p < 0,01$ ) und somit den intrazellulären ATP-Gehalt erhöhen [221]. Dieser Effekt könnte auch in dem Zelllinienpaar A2780/A2780cis eine Erhöhung des ATP-Gehalts bedingt haben. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass extrazelluläres ATP die Platinaufnahme in A2780-Zellen erhöht, wohingegen der intrazelluläre Platingehalt in A2780cis-Zellen unbeeinflusst bleibt. Der Anstieg des intrazellulären Platingehalts infolge eines erhöhten zellulären ATP-Gehalts lässt sich demnach nur für die sensitiven Zellen mit dieser Erklärung vereinbaren. Des Weiteren ist diese Beobachtung wahrscheinlich durch zytotoxische Effekte der eingesetzten Sorafenibkonzentrationen zu erklären. Wie in Kap. 4.6.2.1 beschrieben, führte bereits eine vierstündige Behandlung mit 7,5  $\mu\text{M}$  Sorafenib zu einer maßgeblichen Einschränkung der Vitalität in beiden Zelllinien. Diese kann eine erhöhte Membranpermeabilität und infolgedessen eine gesteigerte passive Diffusion von Cisplatin bedingen.

Die Tatsache, dass unter Einfluss von Sorafenib, selbst unter glucosehaltigen Bedingungen, der ATP-Gehalt in A2780-Zellen verringert wird sowie die zelluläre Platinaufnahme reduziert wird, bekräftigt die in den Kapiteln 5.2 und 5.3 getroffene Aussage, dass ATP-abhängige Prozesse an der Kumulation von Cisplatin in A2780-Zellen beteiligt sind. Es ist jedoch zu erwähnen, dass Sorafenib im Vergleich zu Oligomycin den ATP-Gehalt unter den Bedingungen des Kumulationsversuchs zu einem geringeren Ausmaß reduziert, wohingegen das Ausmaß der Reduktion des intrazellulären Platingehalts (20 – 50 %) vergleichbar ist. Neben dem ATP-reduzierenden Effekt von Sorafenib, scheinen demnach weitere Mechanismen zu einer



verringerten Platinkumulation unter Einfluss von Sorafenib in A2780-Zellen zu führen. Allerdings bleibt unklar, ob dieser Effekt durch eine direkte Interaktion von Sorafenib mit membranständigen Transportern oder durch Beeinflussung des intrazellulären Raf-Signalweges bedingt wird. Die Aufklärung dieser Mechanismen könnte ferner einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der verminderten Platinaufnahme in den resistenten Zellen leisten.

In Anbetracht der Beobachtung, dass Sorafenib die zelluläre Aufnahme von Cisplatin und Carboplatin in A2780-Zellen reduziert, ist auch eine Verringerung der Zytotoxizität gegenüber diesen Platinkomplexen unter Einfluss von Sorafenib zu erwarten. In myeloischen Leukämiezellen wurde bereits gezeigt, dass eine reduzierte Platinkumulation unter Einfluss von MEK/ERK-Inhibitoren die apoptotische Wirkung von Cisplatin vermindert [68]. Eine Koinkubation von 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib mit Cisplatin über 72 h führte zu einem vollständigen Absterben der Zellen, sodass dieser Versuch nicht ausgewertet werden konnte. Kurzzeit-Inkubationsversuche mit Sorafenib, die analog zu dem Influxversuch durchgeführt wurden, zeigten keinen Unterschied in der Zellvitalität zwischen den mit Sorafenib behandelten und unbehandelten Ovarialkarzinomzellen. Als denkbare Erklärung für diese Beobachtung können die bereits in Kap. 5.2 diskutierten Mechanismen angesehen werden. Es ist möglich, dass der Effekt der reduzierten Platinaufnahme auf die Zellvitalität durch eine verringerte Reparaturrate der Platin-DNA-Addukte infolge eines ATP-Mangels kompensiert wird. Des Weiteren ist es möglich, dass die gewählte Inkubationsdauer zu kurz war, um einen Effekt auf die Zellvitalität bzw. Zytotoxizität zu erzielen. Weitere Langzeit-Zytotoxizitätsversuche mit Sorafenibkonzentrationen, die höher als 1  $\mu\text{M}$  (kein Effekt auf die Platinkumulation) und niedriger als 5  $\mu\text{M}$  (Absterben der Zellen bei Koinkubation mit Cisplatin über 72 h) sind, sollten durchgeführt werden, um den Einfluss von Sorafenib auf die Zytotoxizität näher zu charakterisieren.

Dass eine spezifische Inhibition der Proteinkinase MEK auch zu einer Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit in verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien (unter anderem der Zelllinie A2780) führen kann, wurde von mehreren Autoren belegt [66,71,72,306]. Dieser Effekt konnte interessanterweise sowohl in cisplatinempfindlichen als auch in cisplatinresistenten Tumorzellen beobachtet werden. Die Tatsache, dass eine Hemmung der MEK eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin bewirkt, lässt eine synergistische Wirkung der Kombination von Cisplatin mit einem MEK-Inhibitor vermuten. Da Sorafenib durch Inhibition der Raf-Kinase auch die nachfolgende Aktivierung von MEK und ERK hemmt, wäre auch hier ein Synergismus denkbar. Entgegen dieser

Vermutung wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Bestimmung des Kombinationsindex nach Chou die Art der pharmakologischen Interaktion in A2780-Zellen als antagonistisch und in A2780cis-Zellen als moderat antagonistisch charakterisiert. Dabei erfolgte eine gleichzeitige Exposition von Sorafenib mit entweder Cisplatin oder Carboplatin. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Befunde von Heim et al., die ebenfalls eine antagonistische Interaktion von Cisplatin und Oxaliplatin in Kombination mit Sorafenib mittels Isobologramm-Analyse in verschiedenen Kolonkarzinomzellen ermitteln konnten [236]. Die Art der Interaktion war dabei unabhängig von dem verwendeten Inkubationsschema. Die beobachtete antagonistische Interaktion von Sorafenib und Cisplatin lässt sich für die Zelllinie A2780 mit den Ergebnissen aus den Kumulationsversuchen mit Cisplatin unter Einfluss von Sorafenib vereinbaren. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass der Antagonismus durch eine reduzierte zelluläre Cisplatin Aufnahme erklärt werden kann. Im Widerspruch hierzu konnte auch in den resistenten Zellen eine moderat antagonistische Kombinationswirkung von Sorafenib mit Cisplatin ermittelt werden. Dieser Antagonismus ist im Vergleich zu den sensitiven Zellen nicht so stark ausgeprägt, aber dennoch statistisch signifikant. Vor dem Hintergrund, dass die zelluläre Aufnahme der Platinkomplexe in A2780cis-Zellen nicht durch Sorafenib beeinflusst wird, kann der antagonistische Effekt in dieser Zelllinie nicht allein durch eine Verringerung des intrazellulären Platingehalts erklärt werden. Auch die antagonistische Wirkung einer Kombination von Sorafenib mit Carboplatin kann nicht durch eine reduzierte Kumulation von Carboplatin in beiden Zelllinien erklärt werden, da der im Influxversuch ermittelte  $IC_{50}$ -Wert von Sorafenib höher ist, als die im Rahmen der Kombinationsanalyse maximal eingesetzte Sorafenibkonzentration. Die Vermutung liegt nahe, dass der antagonistische Effekt aus einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren resultiert, deren einzelne Betrachtung für die Erklärung des Antagonismus nicht ausreichend ist. Da in dieser Arbeit die Untersuchung des Einflusses von Sorafenib auf die Platinkumulation in dem Ovarialkarzinomzelllinienpaar im Vordergrund stand, sind Aussagen über die Beteiligung der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade und wichtiger Effektorproteine an der antagonistischen Kombinationswirkung rein spekulativ. Weitere Versuche sind notwendig, um die zugrunde liegenden Mechanismen der antagonistischen Kombinationswirkung näher zu charakterisieren.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse leisten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Kombinationswirkung von Sorafenib mit Cisplatin oder Carboplatin in

ovariellen Tumorzelllinien. In klinischen Phase-I-III-Studien zeigte die zusätzliche Gabe von Sorafenib zu der platinbasierten Chemotherapie keinen klinischen Nutzen und teilweise eine erhöhte Mortalität [214,234,235]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der in dieser Arbeit ermittelten antagonistischen Kombinationswirkung sowie einer reduzierten Platinkumulation in der Zelllinie A2780. Unter der Annahme, dass ein geringerer intrazellulärer Platingehalt auch mit einer niedrigeren Platin-DNA-Adduktbildung und Zytotoxizität von Platinkomplexen korreliert, liefern diese *In-vitro*-Ergebnisse einen möglichen Erklärungsansatz für die negativen Studienergebnisse.

Kritisch anzumerken ist, dass die *In-vitro*-Bedingungen nicht exakt die Situation *in vivo* widerspiegeln, was einen direkten Vergleich erschwert. Dennoch sind die Bedingungen nicht zu sehr unterschiedlich. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass der  $IC_{50}$ -Wert, der bei den Influxversuchen ermittelt wurde, auch *in vivo* erreicht wird [301]. Basierend auf der Tatsache, dass die maximale Sorafenibkonzentration nach mehrfacher Dosierung 20  $\mu$ M (Tag 19) und die Eliminationshalbwertszeit 30 h beträgt, ist es möglich, dass die Plasmakonzentration von Sorafenib an Tag 1 des nachfolgenden Zyklus ( $\sim 3,8 \mu$ M) ausreichend ist, um einen antagonistischen Effekt zu bedingen. Zu bedenken ist jedoch, dass in der antitumoralen Therapie *in vivo* auch die durch Hemmung des VEGFR- und PDGFR-vermittelte antiangiogenetische Wirkung von Sorafenib zum Tragen kommt. Zudem bleibt weiterhin unklar, warum es zu unterschiedlichen Studienergebnissen zwischen den verschiedenen Tumorentitäten bzw. histologischen Subtypen des NSCLC (Plattenepithelkarzinom vs. Adenokarzinom) kam. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit könnte man vermuten, dass die mit dem negativen Studienergebnis verbundenen Tumorzellen Transporter exprimieren, die zum einen an der Aufnahme von Platinverbindungen beteiligt sind und zum anderen durch Sorafenib beeinflusst werden. Es ist jedoch auch möglich, dass diese Zellen einen veränderten Energiemetabolismus aufzeigen und der ATP-Gehalt in diesen Zellen zu einem größeren Ausmaß von Sorafenib beeinflusst wird. Darüber hinaus sind Veränderungen innerhalb des Raf/MEK/ERK-Signalweges eine denkbare Ursache. Diese Vermutungen sind jedoch rein spekulativ, sodass weitere Untersuchungen erforderlich sind, um die exakten Interaktionsmechanismen aufzuklären, um somit die klinische Relevanz der Interaktion besser abzuschätzen und die Effektivität der kombinierten Chemotherapie zu optimieren.

## 5.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde zur weiteren Aufklärung der Resistenzmechanismen von Cisplatin (und Carboplatin) das Ovarialkarzinomzelllinienpaar A2780/A2780cis verwendet. Da Cisplatin und Carboplatin in der derzeitigen Therapie dieser Tumor-erkrankung immer noch einen hohen Stellenwert besitzen, sind die Ergebnisse dieser Arbeit von hoher klinischer Relevanz. Zu bewältigende Limitationen des Behandlungserfolgs einer platinbasierten Chemotherapie sind neben der dosislimitierenden Toxizität auch die Entwicklung von Resistenz der Tumorzellen gegenüber den Platin-komplexen. Basierend auf der Aufklärung und der Kenntnis verschiedener an der Resistenz beteiligter Mechanismen wurden in den letzten Jahren viele interessante Forschungsansätze verfolgt, um die Chemoresistenz von Tumorpatienten zu überwinden. Die Identifikation entscheidender molekularer Signalwege in der Tumorgenese des Ovarialkarzinoms, die zu der Entwicklung zielgerichteter Therapeutika führte, stellt einen erfolgversprechenden Ansatz dar. Zu diesen zählen beispielsweise die Tyrosinkinase-Inhibitoren. Obwohl diese den Vorteil einer besseren Spezifität und Selektivität gegenüber Tumorzellen und somit auch geringere toxische Wirkungen an gesunden Zellen aufweisen, ist der Nutzen einer Monotherapie gering [5]. Aus diesem Grund werden Tyrosinkinase-Inhibitoren häufig als Zusatz zu einer bereits bestehenden und etablierten Chemotherapie eingesetzt, um die Effektivität zu steigern. Die klinische Wirksamkeit der Kombination eines Tyrosinkinase-Inhibitors mit einer platinbasierten Standardtherapie wurde in den letzten Jahren verstärkt in verschiedenen Phase-I-III-Studien getestet [189,307].

Wenn neue onkologische Wirkstoffe entwickelt werden, sind umfangreiche präklinische Untersuchungen die Voraussetzung für die Durchführung von klinischen Studien an Patienten. Anhand der Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit Sorafenib an ovariellen Tumorzelllinien wird deutlich, dass dies ebenfalls für neue Kombinationen bereits zugelassener Wirkstoffe in der antitumoralen Therapie gelten sollte. Die FDA hat kürzlich einen Richtlinienentwurf für die Durchführung von klinischen Studien zur Testung einer Kombination von zwei oder mehreren Wirkstoffen veröffentlicht [308]. Dieser Entwurf beschreibt sowohl die Kriterien, die eine Kombination verschiedener Wirkstoffe rechtfertigen, als auch Empfehlungen für präklinische und klinische Entwicklungsstrategien zur Durchführung von Kombinationsstudien. Obwohl sich diese Richtlinie nur auf neue, noch nicht zugelassene Wirkstoffe bezieht, könnte diese auch von großer Bedeutung für die Kombination bereits zugelassener Arzneistoffe sein. Verstärkte Tumorprogression,

erhöhte Toxizität und auch Mortalität können die Folge sein, wenn man die pharmakologische Wirkung einer neuen Wirkstoffkombination ignoriert. Die negativen Studienergebnisse für die Kombination von Sorafenib mit Carboplatin und Paclitaxel können dafür als eindrucksvolles Beispiel angesehen werden [214,234,235]. Demnach erscheint es unvermeidlich, vor der klinischen Testung einer Kombinationstherapie an Patienten, die Art einer pharmakologischen Interaktion in präklinischen Studien umfassend zu charakterisieren. Ein besseres Verständnis potentieller und tatsächlicher Interaktionen auf zellulärer Ebene kann dazu beitragen, dass antitumorale Substanzen effizienter und sicherer kombiniert werden können.

Zur Beurteilung von Kombinationswirkungen in der Tumorthherapie sind die Isobologramm-Analyse und die Bestimmung des Kombinationsindex nach Chou und Talalay am weitesten verbreitet [242,309,310]. Diese Methoden sind geeignet, um zuverlässig die Art der vorliegenden pharmakologischen Interaktion zweier Wirkstoffe als antagonistisch, additiv oder synergistisch einzuschätzen. Heim et al. zeigte an verschiedenen Kolonkarzinomzellen mit Hilfe einer Isobologramm-Analyse, dass die pharmakologische Interaktion zwischen Sorafenib und Cisplatin oder Oxaliplatin unabhängig von dem verwendeten Inkubationsprotokoll als antagonistisch einzustufen ist [236]. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Bestimmung des Kombinationsindex an Ovarialkarzinomzelllinien reproduziert werden. Insbesondere vor dem Hintergrund der negativen Ergebnisse der Phase-II-III-Studien erscheint die präklinische Charakterisierung der Kombinationswirkung zweier oder mehrerer Wirkstoffe sinnvoll. Bei Hinweisen auf eine antagonistische Interaktion können somit klinische Studien an Patienten mit negativem Studienergebnis vermieden und somit Kosten eingespart werden. Diese Untersuchungen liefern jedoch nur eine Aussage zu der Art der Interaktion.

Interaktionen können nicht nur bei der Kombination der Platinkomplexe mit zielgerichteten Therapeutika eine Rolle spielen. Weitere Faktoren, wie Komorbidität und Polypharmazie, die heutzutage in der klinischen Praxis häufig vorkommen, können ebenfalls die Verträglichkeit und Effektivität der platinbasierten Chemotherapie beeinflussen. Die Bedeutung der Interaktion von Arzneistoffen auf der Transporterebene und deren mögliche Auswirkung auf die Pharmakokinetik antitumoraler Substanzen werden in den letzten Jahren zunehmend untersucht [311]. Eine verminderte zelluläre Kumulation von Platinverbindungen kann als Folge einer möglichen Interaktion eines bestimmten Transporters mit der Komedikation resultieren, welche die Aktivität dieses Transporters beeinflussen kann. In dieser

Arbeit konnte gezeigt werden, dass das herzwirksame Glykosid Ouabain, ein spezifischer Inhibitor der ubiquitären  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, die Aufnahme von Cisplatin in die sensitive Ovarialkarzinomzelllinie reduziert. Häufig zur Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzte herzwirksame Glykoside (wie z.B. Digoxin und Beta-Acetyldigoxin) vermitteln ihre positiv inotrope Wirkung ebenfalls über eine Hemmung der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase der Herzmuskelzellen [150]. Werden diese zur Therapie der Herzinsuffizienz bei Tumorpatienten, die eine platinhaltige Chemotherapie erhalten, eingesetzt, könnte die Wirksamkeit der antitumoralen Therapie durch Beeinflussung der Platinaufnahme in die Tumorzellen maßgeblich beeinträchtigt werden.

## 5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Erkenntnisse über die Bedeutung von ATP-abhängigen Prozessen für die zelluläre Kumulation von Cisplatin in den Tumorzelllinien A2780 und A2780cis gewonnen werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cisplatin teilweise durch energieabhängige Prozesse in die sensitiven A2780-Zellen aufgenommen wird, während der Transport von Cisplatin in die resistenten A2780cis-Zellen weniger von intrazellulären Energiequellen abhängig ist. Ein wichtiger Befund dieser Arbeit ist, dass neben der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase-vermittelten Aufnahme von Cisplatin in die Zelle, zusätzlich weitere, bis heute unbekannte, ATP-abhängige Transportproteine bzw. zelluläre Prozesse an der zellulären Platinkumulation in der Zelllinie A2780 beteiligt sind. Im Fokus weiterer Studien sollte daher die Identifizierung, funktionelle Charakterisierung und Expressionsanalyse dieser Transportsysteme bzw. Prozesse stehen. Einen innovativen Forschungsansatz bietet die Untersuchung von Ionenkanälen (insbesondere der  $\text{Cl}^-$ -Ionenkanäle), deren Beteiligung an der Platinresistenz durch spezifische Blockade oder gezielte Beeinflussung der intra- und extrazellulären Ionenkonzentration identifiziert werden kann. Durch Kenntnis dieser Transportmechanismen lassen sich neue Strategien zur Überwindung der Platinresistenz entwickeln.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit durch gezielte Hemmung des ATP-abhängigen Raf/MEK/ERK-Signalweges mittels Sorafenib die Aufnahme von Cisplatin und Carboplatin in die sensitiven Zellen, nicht jedoch in die resistenten Zellen, deutlich verringert werden. Die ursächlichen Mechanismen für diesen Effekt konnten

allerdings nicht geklärt werden. Einige Transportproteine verfügen ebenso wie die Proteinkinasen über eine ATP-Bindungsstelle. Mit Hilfe von Molecular Modeling oder Radioligand-Bindungsstudien könnten Informationen über die Affinität des Multi-kinase-Inhibitors Sorafenib zu anderen ATP-abhängigen Transportproteinen gewonnen werden, die an dem Transport von Platinkomplexen beteiligt sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit gelang darüber hinaus der Nachweis einer antagonistischen Kombinationswirkung von Sorafenib mit sowohl Carboplatin als auch Cisplatin in beiden Ovarialkarzinomzelllinien. Bislang gibt es wenige Informationen darüber, in welcher Weise Tyrosinkinase-Inhibitoren und Platinkomplexe auf der Ebene der intrazellulären Signalkaskaden interagieren. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass in den letzten Jahren vermehrt zielgerichtete Arzneistoffe in Kombination mit einer platinbasierten Chemotherapie eingesetzt werden, scheint es zwingend erforderlich, den Mechanismus der pharmakologischen Interaktion näher zu charakterisieren. Insbesondere kommt dabei der weiteren Erforschung des Raf/MEK/ERK-Signalweges eine große Bedeutung zu. Publierte Ergebnisse belegen bereits einen Zusammenhang zwischen dieser Signalkaskade und der Resistenz verschiedener Tumorzellen gegenüber Cisplatin. Die verantwortlichen Mechanismen sind jedoch bis heute noch nicht vollständig geklärt. Anhand einer an cisplatinsensitiven und -resistenten Zelllinien durchgeführten Expressions- und Aktivitätsanalyse ausgewählter Kinasen und wichtiger „*downstream*“-Effektoren dieser Signalkaskade könnten wichtige Erkenntnisse zur Rolle dieses Signalweges in der Platinresistenz gewonnen werden. Darüber hinaus scheint es sinnvoll, die Expression auch nach Exposition mit Cisplatin allein oder in Kombination mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor in diesem Zelllinienpaar zu untersuchen. Durch Identifizierung der an der Platinresistenz beteiligten Signalmoleküle können neue Therapiestrategien zur Resistenzüberwindung entwickelt werden, um in Zukunft platinresistente Tumore selektiver und effektiver behandeln zu können.



## 6. Zusammenfassung

Eine reduzierte zelluläre Kumulation von Cisplatin ist ein häufig beobachteter Mechanismus der Platinresistenz. Es wird vermutet, dass neben der passiven Diffusion auch verschiedene energieabhängige Proteine, welche die Hydrolyse von ATP als Energiequelle nutzen, an dem Transport von Cisplatin, sowohl in die Zelle hinein als auch aus der Zelle heraus, beteiligt sind. Diese Transporter sind bis heute noch nicht vollständig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von intra- und extrazellulärem ATP an der Cisplatinresistenz in cisplatin-sensitiven und -resistenten Ovarialkarzinomzelllinien erstmals systematisch untersucht. Zur Quantifizierung des intrazellulären ATP-Gehalts wurde eine biolumineszenzbasierte Methode optimiert und hinsichtlich Linearität, Präzision, Richtigkeit und Wiederfindung validiert. Es wurde gezeigt, dass der intrazelluläre ATP-Gehalt in den unbehandelten resistenten Zellen signifikant höher im Vergleich zu den parentalen Zellen ist. Dies deutet darauf hin, dass ATP eine Rolle in der Cisplatinresistenz spielt. Bekräftigt wird diese Aussage dadurch, dass in den sensitiven Zellen ein deutlicher Anstieg des intrazellulären ATP-Gehalts innerhalb der ersten Stunden einer Behandlung mit Cisplatin beobachtet wurde.

Im Fokus dieser Arbeit lag insbesondere die Untersuchung der Bedeutung ATP-abhängiger Prozesse für die zelluläre Kumulation von Platinkomplexen. Der intrazelluläre Platingehalt war in den sensitiven Zellen in Anwesenheit des metabolischen Inhibitors Oligomycin signifikant reduziert und in Anwesenheit von extrazellulärem ATP erhöht. Im Gegensatz dazu scheint die zelluläre Aufnahme von Cisplatin in die resistenten Zellen eine untergeordnete Abhängigkeit von intra- und extrazellulärem ATP aufzuweisen. Untersuchungen zum Efflux von Cisplatin unter Einfluss von Oligomycin zeigten in beiden Zelllinien keine Effekte auf den intrazellulären Platingehalt. Demnach können Veränderungen innerhalb des aktiven Efflux-transportsystems nicht als relevanter Resistenzmechanismus in A2780cis-Zellen angesehen werden. Die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, ein ATP-abhängiges Transmembranprotein, scheint direkt oder indirekt an der Aufnahme von Cisplatin in die sensitiven Zellen beteiligt zu sein. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch Influxversuche in Anwesenheit des spezifischen  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase-Inhibitors Ouabain belegt werden. Eine verringerte Expression der ATPase in der cisplatinresistenten Zelllinie kann zumindest teilweise als Erklärung für die reduzierte Platinkumulation angesehen werden und leistet demnach einen Beitrag zur Cisplatinresistenz der A2780cis-Zellen.

Interessanterweise ist der intrazelluläre Platingehalt in A2780-Zellen in Anwesenheit von Oligomycin stärker erniedrigt als unter Einfluss von Ouabain. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass neben dem  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase-vermittelten Transport weitere energieabhängige Prozesse vorhanden sind, die die zelluläre Aufnahme von Cisplatin regulieren.

Sorafenib, ein Inhibitor der ATP-abhängigen Raf/MEK/ERK-Signalkaskade, führte ebenfalls zu einer Reduktion der zellulären Kumulation von Cisplatin sowie Carboplatin in den sensitiven Ovarialkarzinomzellen. Die in dieser Arbeit aufgezeigte ATP-reduzierende Wirkung von Sorafenib auf die A2780-Zellen liefert einen möglichen Erklärungsansatz für die verminderte Kumulation der beiden Platinverbindungen in diesen Zellen. Allerdings bleiben weitere Mechanismen, insbesondere die Bedeutung der Inhibition des Raf/MEK/ERK-Signalweges für die Platinaufnahme ungewiss und bedürfen eingehenderer Untersuchungen.

Zielgerichtete Therapeutika, wie z.B. Sorafenib, werden in der klinischen Praxis zunehmend in Kombination mit einer platinhaltigen Standard-Chemotherapie eingesetzt, um die Überlebensrate von Tumorpatienten zu steigern. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten *In-vitro*-Kombinationsuntersuchung von Sorafenib mit entweder Cisplatin oder Carboplatin konnte eine antagonistische Interaktion in beiden Ovarialkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die genauen zellulären Mechanismen der antagonistischen Wirkung aufzuklären und deren klinische Relevanz zu bewerten. Anhand dieser Ergebnisse wird dennoch deutlich, dass eine Kombinationstherapie nicht unbedingt zu einer Erhöhung der klinischen Tumoransprechrates führen muss und mit Vorsicht betrachtet werden sollte. Die Aufklärung der potentiellen und tatsächlichen Kombinationswirkung verschiedener Arzneistoffe auf zellulärer Ebene würde daher einen wichtigen Beitrag zu einem effektiveren Einsatz der antitumoralen Substanzen leisten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der komplexen zellulären Mechanismen beitragen, die der Platinresistenz zugrunde liegen. Die genaue Kenntnis der einzelnen Resistenzmechanismen ist jedoch allein nicht ausreichend, um die Platinresistenz zu überwinden. Vielmehr ist es von großer Bedeutung einen systembiologischen Forschungsansatz zu verfolgen und die Zelle in ihrer Gesamtheit zu betrachten. Insbesondere die gründliche Erforschung des komplexen Netzwerks von Signalwegen, die für die Platinsensitivität von Bedeutung sind, stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Resistenzüberwindung in der therapeutischen Praxis dar.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Klein AV, Hambley TW. Platinum drug distribution in cancer cells and tumors. *Chem Rev* 2009; 109:4911-20.
- [2] Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969; 222:385-6.
- [3] Highley M CA, Calvert A. Clinical experience with cisplatin and carboplatin. In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum based drugs in cancer therapy* - Humana Press, Totowa, New Jersey 2000;171-94.
- [4] Burger H, Loos WJ, Eechoute K, Verweij J, Mathijssen RH, Wiemer EA. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist Updat* 2011; 14:22-34.
- [5] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:573-84.
- [6] DrugDex: Monographie Cisplatin. Verfügbar unter: <http://www.thomsonhc.com>, letzter Zugriff: November 2011.
- [7] Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007; 33:9-23.
- [8] Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 2008; 73:994-1007.
- [9] MASCC/ESMO. Antiemetic Guidelines 2011. Deutsche Übersetzung. Letztes Update: April 2011, verfügbar unter: [www.mascc.org](http://www.mascc.org), letzter Zugriff: November 2011.
- [10] Albers JW, Chaudhry V, Cavaletti G, Donehower RC. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; CD005228.
- [11] Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1806:172-82.
- [12] Markman M. Antiangiogenic drugs in ovarian cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2009; 10:2269-77.
- [13] Lage H, Denkert C. Resistance to chemotherapy in ovarian carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2007; 176:51-60.
- [14] AWMF-Leitlinie: Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. Letztes Update: Mai 2007, verfügbar unter: [www.awmf.org](http://www.awmf.org), letzter Zugriff: November 2011.
- [15] Agarwal R, Linch M, Kaye SB. Novel therapeutic agents in ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32:875-86.
- [16] DrugDex: Monographie Carboplatin. Verfügbar unter: <http://www.thomsonhc.com>, letzter Zugriff: November 2011.

- [17] Wagstaff AJ, Ward A, Benfield P, Heel RC. Carboplatin. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of cancer. *Drugs* 1989; 37:162-90.
- [18] Aabo K, Adams M, Adnitt P, Alberts DS, Athanazziou A, Barley V et al. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group. *Br J Cancer* 1998; 78:1479-87.
- [19] The International Collaborative Ovarian Neoplasm (ICON) Group: Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. *Lancet* 2002; 360:505-15.
- [20] Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, Fossella FV, Schiller JH, Paesmans M et al. Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:847-57.
- [21] Gore ME, Fryatt I, Wiltshaw E, Dawson T, Robinson BA, Calvert AH. Cisplatin/carboplatin cross-resistance in ovarian cancer. *Br J Cancer* 1989; 60:767-9.
- [22] Vella N, Aiello M, Russo AE, Scalisi A, Spandidos DA, Toffoli G et al. 'Genetic profiling' and ovarian cancer therapy (review). *Mol Med Report* 2011; 4:771-7.
- [23] Graham J, Mushin M, Kirkpatrick P. Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:11-2.
- [24] Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:307-20.
- [25] Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 2002; 1:227-35.
- [26] Stordal B, Pavlakis N, Davey R. Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2007; 33:347-57.
- [27] Ray-Coquard I, Weber B, Cretin J, Haddad-Guichard Z, Levy E, Hardy-Bessard AC et al. Gemcitabine-oxaliplatin combination for ovarian cancer resistant to taxane-platinum treatment: a phase II study from the GINECO group. *Br J Cancer* 2009; 100:601-7.
- [28] DrugDex: Monographie Oxaliplatin. Verfügbar unter: <http://www.thomsonhc.com>, letzter Zugriff: November 2011.
- [29] Kweekel DM, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy. *Cancer Treat Rev* 2005; 31:90-105.
- [30] Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans* 2010; 39:8113-27.
- [31] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2011. Epub ahead of print.

- [32] Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 63:12-31.
- [33] Hall MD, Okabe M, Shen DW, Liang XJ, Gottesman MM. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48:495-535.
- [34] Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22:7265-79.
- [35] Jennerwein M, Andrews PA. Effect of intracellular chloride on the cellular pharmacodynamics of cis-diamminedichloroplatinum(II). *Drug Metab Dispos* 1995; 23:178-84.
- [36] Salerno M, Yahia D, Dzamitika S, de VE, Pereira-Maia E, Garnier-Suillerot A. Impact of intracellular chloride concentration on cisplatin accumulation in sensitive and resistant GLC4 cells. *J Biol Inorg Chem* 2009; 14:123-32.
- [37] Warnke U, Gysler J, Hofte B, Tjaden UR, van der GJ, Kloft C et al. Separation and identification of platinum adducts with DNA nucleotides by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Electrophoresis* 2001; 22:97-103.
- [38] Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther* 1987; 34:155-66.
- [39] Scheeff ED, Briggs JM, Howell SB. Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 1999; 56:633-43.
- [40] Murata T, Hibasami H, Maekawa S, Tagawa T, Nakashima K. Preferential binding of cisplatin to mitochondrial DNA and suppression of ATP generation in human malignant melanoma cells. *Biochem Int* 1990; 20:949-55.
- [41] Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001; 59:657-63.
- [42] Meijer C, van Luyn MJ, Nienhuis EF, Blom N, Mulder NH, de Vries EG. Ultrastructural morphology and localisation of cisplatin-induced platinum-DNA adducts in a cisplatin-sensitive and -resistant human small cell lung cancer cell line using electron microscopy. *Biochem Pharmacol* 2001; 61:573-8.
- [43] Yang Z, Schumaker LM, Egorin MJ, Zuhowski EG, Guo Z, Cullen KJ. 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* 2006; 12:5817-25.
- [44] Liang BC, Ulliyatt E. Increased sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis with mitochondrial DNA depletion. *Cell Death Differ* 1998; 5:694-701.

- [45] Park SY, Chang I, Kim JY, Kang SW, Park SH, Singh K et al. Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2004; 279:7512-20.
- [46] Blommaert FA, van Dijk-Knijnenburg HC, Dijt FJ, den EL, Baan RA, Berends F et al. Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells. *Biochemistry* 1995; 34:8474-80.
- [47] Chaney SG, Vaisman A. Specificity of platinum-DNA adduct repair. *J Inorg Biochem* 1999; 77:71-81.
- [48] Zamble DB, Lippard SJ. The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA. In: Lippert B (Hrsg.): *Cisplatin*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Wiley-VCH, Zürich/Weinheim, 1999; 73-110.
- [49] Brabec V, Kasparkova J. Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat* 2005; 8:131-46.
- [50] Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1291-5.
- [51] Junop MS, Obmolova G, Rausch K, Hsieh P, Yang W. Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Mol Cell* 2001; 7:1-12.
- [52] Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:681-710.
- [53] Yang W. Structure and mechanism for DNA lesion recognition. *Cell Res* 2008; 18:184-97.
- [54] Martin DS, Bertino JR, Koutcher JA. ATP depletion + pyrimidine depletion can markedly enhance cancer therapy: fresh insight for a new approach. *Cancer Res* 2000; 60:6776-83.
- [55] Shahzad MM, Lopez-Berestein G, Sood AK. Novel strategies for reversing platinum resistance. *Drug Resist Updat* 2009; 12:148-52.
- [56] Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, de JS. Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ* 2003; 10:808-22.
- [57] Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005; 4:139-63.
- [58] Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG, Jr., Levrero M et al. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999; 399:806-9.
- [59] Brozovic A, Osmak M. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Lett* 2007; 251:1-16.

- [60] Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75:50-83.
- [61] Intracellular Signal Transduction: the Protein Cascades of the MAP Kinase Pathways. In: Krauss G (Hrsg.): *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. 3. Auflage. Verlag Wiley-VCH, Weinheim, 2003; 383-93.
- [62] Wang Z, Xu J, Zhou JY, Liu Y, Wu GS. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance. *Cancer Res* 2006; 66:8870-7.
- [63] Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; 26:3291-310.
- [64] Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007; 26:3100-12.
- [65] Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275:39435-43.
- [66] Cui W, Yazlovitskaya EM, Mayo MS, Pelling JC, Persons DL. Cisplatin-induced response of c-jun N-terminal kinase 1 and extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in a series of cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* 2000; 29:219-28.
- [67] Persons DL, Yazlovitskaya EM, Pelling JC. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J Biol Chem* 2000; 275:35778-85.
- [68] Amran D, Sancho P, Fernandez C, Esteban D, Ramos AM, de BE et al. Pharmacological inhibitors of extracellular signal-regulated protein kinases attenuate the apoptotic action of cisplatin in human myeloid leukemia cells via glutathione-independent reduction in intracellular drug accumulation. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1743:269-79.
- [69] Sanchez-Perez I, Murguia JR, Perona R. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* 1998; 16:533-40.
- [70] Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 2006; 58:621-31.
- [71] Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Ikegami H, Kimura A, Matsuoka T et al. Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line. *J Biol Chem* 1999; 274:31648-54.
- [72] Persons DL, Yazlovitskaya EM, Cui W, Pelling JC. Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1007-14.



- [73] Mandic A, Viktorsson K, Heiden T, Hansson J, Shoshan MC. The MEK1 inhibitor PD98059 sensitizes C8161 melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Melanoma Res* 2001; 11:11-9.
- [74] Woessmann W, Chen X, Borkhardt A. Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 50:397-404.
- [75] Schweyer S, Soruri A, Meschter O, Heintze A, Zschunke F, Miosge N et al. Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. *Br J Cancer* 2004; 91:589-98.
- [76] Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Ea CK, Cheng AL. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:1423-30.
- [77] Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang Q, Tian L, Wang Y et al. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003; 278:19245-56.
- [78] Brozovic A, Fritz G, Christmann M, Zisowsky J, Jaehde U, Osmak M et al. 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* 2004; 112:974-85.
- [79] Hayakawa J, Depatie C, Ohmichi M, Mercola D. The activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)-dependent enhanced DNA repair. *J Biol Chem* 2003; 278:20582-92.
- [80] Li F, Meng L, Zhou J, Xing H, Wang S, Xu G et al. Reversing chemoresistance in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells: a role of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335:1070-7.
- [81] Losa JH, Parada CC, Viniegra JG, Sanchez-Arevalo L, V, Cajal S, Sanchez-Prieto R. Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. *Oncogene* 2003; 22:3998-4006.
- [82] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410:37-40.
- [83] Kelland LR. New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993; 15:191-219.
- [84] Mann SC, Andrews PA, Howell SB. Short-term cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990; 25:236-40.
- [85] Andrews PA, Mann SC, Huynh HH, Albright KD. Role of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase in the accumulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1991; 51:3677-81.

- [86] Fujii R, Mutoh M, Niwa K, Yamada K, Aikou T, Nakagawa M et al. Active efflux system for cisplatin in cisplatin-resistant human KB cells. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85:426-33.
- [87] Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 1993; 67:1171-6.
- [88] Zisowsky J. Charakterisierung der Platinsensitivität von cisplatinempfindlichen und -resistenten Tumorzellen. Universität Bonn: Dissertation; 2004.
- [89] Dobson PD, Lanthaler K, Oliver SG, Kell DB. Implications of the dominant role of transporters in drug uptake by cells. *Curr Top Med Chem* 2009; 9:163-81.
- [90] Dornish JM, Melvik JE, Pettersen EO. Reduced cellular uptake of cis-dichlorodiammine-platinum by benzaldehyde. *Anticancer Res* 1986; 6:583-8.
- [91] Shen DW, Goldenberg S, Pastan I, Gottesman MM. Decreased accumulation of [<sup>14</sup>C]carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. *J Cell Physiol* 2000; 183:108-16.
- [92] Andrews PA, Velury S, Mann SC, Howell SB. cis-Diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1988; 48:68-73.
- [93] Kishimoto S, Kawazoe Y, Ikeno M, Saitoh M, Nakano Y, Nishi Y et al. Role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 subunit in the intracellular accumulation of cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57:84-90.
- [94] Ma J, Maliepaard M, Kolker HJ, Verweij J, Schellens JH. Abrogated energy-dependent uptake of cisplatin in a cisplatin-resistant subline of the human ovarian cancer cell line IGROV-1. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 41:186-92.
- [95] Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol* 2010; 77:887-94.
- [96] Pena MM, Puig S, Thiele DJ. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem* 2000; 275:33244-51.
- [97] Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R et al. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2004; 66:817-23.
- [98] Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:14298-302.
- [99] Ishida S, McCormick F, Smith-McCune K, Hanahan D. Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. *Cancer Cell* 2010; 17:574-83.
- [100] Safaei R. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett* 2006; 234:34-9.

- [101] Safaei R, Howell SB. Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53:13-23.
- [102] Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M et al. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol* 2007; 73:298-307.
- [103] Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319:879-86.
- [104] Helleman J, Burger H, Hamelers IH, Boersma AW, de Kroon AI, Stoter G et al. Impaired cisplatin influx in an A2780 mutant cell line: evidence for a putative, cis-configuration-specific, platinum influx transporter. *Cancer Biol Ther* 2006; 5:943-9.
- [105] Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M et al. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4661-9.
- [106] Katano K, Safaei R, Samimi G, Holzer A, Rochdi M, Howell SB. The copper export pump ATP7B modulates the cellular pharmacology of carboplatin in ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2003; 64:466-73.
- [107] Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T et al. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res* 2000; 60:1312-6.
- [108] Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M et al. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res* 2002; 62:6559-65.
- [109] Kalayda GV, Wagner CH, 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* 2008; 8:175.
- [110] Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 1999; 55:929-37.
- [111] Chen ZS, Tiwari AK. Multidrug Resistance Proteins (MRPs/ABCCs) in Cancer Chemotherapy and Genetic Diseases. *FEBS J* 2011; 278:3226-45.
- [112] Liu FS. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy-a quick review. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009; 48:239-44.
- [113] Ohmichi M, Hayakawa J, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y. Mechanisms of platinum drug resistance. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26:113-6.

- [114] Ishikawa T, li-Osman F. Glutathione-associated cis-diamminedichloro-platinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* 1993; 268:20116-25.
- [115] Chen HH, Kuo MT. Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs* 2010; vol. 2010, article ID 430939.
- [116] Ferry KV, Hamilton TC, Johnson SW. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1305-13.
- [117] Li Q, Yu JJ, Mu C, Yunmbam MK, Slavsky D, Cross CL et al. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2000; 20:645-52.
- [118] Branch P, Masson M, Aquilina G, Bignami M, Karran P. Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells. *Oncogene* 2000; 19:3138-45.
- [119] Peng DJ, Wang J, Zhou JY, Wu GS. Role of the Akt/mTOR survival pathway in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394:600-5.
- [120] Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:502-16.
- [121] Dorward A, Sweet S, Moorehead R, Singh G. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: redox balance, cell cycle, and drug resistance. *J Bioenerg Biomembr* 1997; 29:385-92.
- [122] Stolfi RL, Colofiore JR, Nord LD, Koutcher JA, Martin DS. Biochemical modulation of tumor cell energy: regression of advanced spontaneous murine breast tumors with a 5-fluorouracil-containing drug combination. *Cancer Res* 1992; 52:4074-81.
- [123] Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997; 185:1481-6.
- [124] Eguchi Y, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Shimizu S, Tsujimoto Y. ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction. *Cancer Res* 1999; 59:2174-81.
- [125] Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25:4633-46.
- [126] Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 1997; 77:731-58.
- [127] Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18:598-608.
- [128] Ihrlund LS, Hernlund E, Khan O, Shoshan MC. 3-Bromopyruvate as inhibitor of tumour cell energy metabolism and chemopotentiator of platinum drugs. *Mol Oncol* 2008; 2:94-101.

- [129] Lim HY, Ho QS, Low J, Choolani M, Wong KP. Respiratory competent mitochondria in human ovarian and peritoneal cancer. *Mitochondrion* 2011; 11:437-43.
- [130] Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1604:77-94.
- [131] Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1807:1507-38.
- [132] Balaban RS. Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol* 1990; 258:C377-C389.
- [133] Pedersen PL, Amzel LM. ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. *J Biol Chem* 1993; 268:9937-40.
- [134] Pedersen PL. ATP synthase. The machine that makes ATP. *Curr Biol* 1994; 4:1138-41.
- [135] Senior AE, Nadanaciva S, Weber J. The molecular mechanism of ATP synthesis by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1553:188-211.
- [136] Scatena R, Bottoni P, Pontoglio A, Mastrototaro L, Giardina B. Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17:1533-45.
- [137] Han M, Im DS. Effects of mitochondrial inhibitors on cell viability in U937 monocytes under glucose deprivation. *Arch Pharm Res* 2008; 31:749-57.
- [138] Watabe M, Nakaki T. ATP depletion does not account for apoptosis induced by inhibition of mitochondrial electron transport chain in human dopaminergic cells. *Neuropharmacology* 2007; 52:536-41.
- [139] Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem* 2001; 276:4588-96.
- [140] Lardy HA, Witonsky P, Johnson D. Antibiotics as tools for metabolic studies. IV. Comparative effectiveness of oligomycin A, B, C, and rutamycin inhibitors of phosphoryl transfer reactions in mitochondria. *Biochemistry* 1965; 4:552-4.
- [141] Barrow SL, Voronina SG, da S, X, Chvanov MA, Longbottom RE, Gerasimenko OV et al. ATP depletion inhibits Ca<sup>2+</sup> release, influx and extrusion in pancreatic acinar cells but not pathological Ca<sup>2+</sup> responses induced by bile. *Pflugers Arch* 2008; 455:1025-39.
- [142] Masaki N, Thomas AP, Hoek JB, Farber JL. Intracellular acidosis protects cultured hepatocytes from the toxic consequences of a loss of mitochondrial energization. *Arch Biochem Biophys* 1989; 272:152-61.
- [143] Simbula G, Glascott PA, Jr., Akita S, Hoek JB, Farber JL. Two mechanisms by which ATP depletion potentiates induction of the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol* 1997; 273:C479-C488.

- [144] Arato-Oshima T, Matsui H, Wakizaka A, Homareda H. Mechanism responsible for oligomycin-induced occlusion of Na<sup>+</sup> within Na/K-ATPase. *J Biol Chem* 1996; 271:25604-10.
- [145] Cho JH, Balasubramanyam M, Chernaya G, Gardner JP, Aviv A, Reeves JP et al. Oligomycin inhibits store-operated channels by a mechanism independent of its effects on mitochondrial ATP. *Biochem J* 1997; 324:971-80.
- [146] Pedersen PL. Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39:349-55.
- [147] Palmgren MG, Nissen P. P-type ATPases. *Annu Rev Biophys* 2011; 40:243-66.
- [148] Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 1994; 269:19659-62.
- [149] Skou JC, Esmann M. The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 1992; 24:249-61.
- [150] Rose AM, Valdes R, Jr. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin Chem* 1994; 40:1674-85.
- [151] Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol* 2003; 65:817-49.
- [152] Bando T, Fujimara M, Kasahara K, Matsuda T. Significance of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase on intracellular accumulation of *cis*-diamminedichloroplatinum (II) in human non-small-cell but not in small-cell-lung cancer cell lines. *Anticancer Res* 1998; 18:1085-90.
- [153] Blok LJ, Chang GT, Steenbeek-Slotboom M, van Weerden WM, Swarts HG, De Pont JJ et al. Regulation of expression of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer. *Br J Cancer* 1999; 81:28-36.
- [154] Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 2002; 71:511-35.
- [155] Tummala R, Wolle D, Barwe SP, Sampson VB, Rajasekaran AK, Pendyala L. Expression of Na,K-ATPase-β<sub>1</sub> subunit increases uptake and sensitizes carcinoma cells to oxaliplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64:1187-1194.
- [156] Ogawa H, Shinoda T, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:13742-7.
- [157] Sandtner W, Egwolf B, Khalili-Araghi F, Sanchez-Rodriguez JE, Roux B, Bezanilla F et al. Ouabain binding site in a functioning Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. *J Biol Chem* 2011; 286:38177-83.
- [158] Kometiani P, Li J, Gnudi L, Kahn BB, Askari A, Xie Z. Multiple signal transduction pathways link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1998; 273:15249-56.



- [159] Li Z, Zhang Z, Xie JX, Li X, Tian J, Cai T et al. Na/K-ATPase mimetic pNaKtide peptide inhibits the growth of human cancer cells. *J Biol Chem* 2011; 286:32394-403.
- [160] Mohammadi K, Kometiani P, Xie Z, Askari A. Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to ERK1/2. *J Biol Chem* 2001; 276:42050-6.
- [161] Xie Z, Cai T. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv* 2003; 3:157-68.
- [162] Newman RA, Yang P, Pawlus AD, Block KI. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol Interv* 2008; 8:36-49.
- [163] Wang Z, Zheng M, Li Z, Li R, Jia L, Xiong X et al. Cardiac glycosides inhibit p53 synthesis by a mechanism relieved by Src or MAPK inhibition. *Cancer Res* 2009; 69:6556-64.
- [164] Xu ZW, Wang FM, Gao MJ, Chen XY, Hu WL, Xu RC. Targeting the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 subunit of hepatoma HepG2 cell line to induce apoptosis and cell cycle arresting. *Biol Pharm Bull* 2010; 33:743-51.
- [165] Homareda H, Ishii T, Takeyasu K. Binding domain of oligomycin on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Eur J Pharmacol* 2000; 400:177-83.
- [166] Deli T, Csernoch L. Extracellular ATP and cancer: an overview with special reference to P2 purinergic receptors. *Pathol Oncol Res* 2008; 14:219-31.
- [167] White N, Burnstock G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27:211-7.
- [168] Hatta Y, Itoh T, Baba M, Miyajima T, Shimojima H, Sawada U et al. Purging in autologous hematopoietic stem cell transplantation using adenosine triphosphate (ATP) and 4-hydroperoxycyclophosphamide (4-HC). *Leuk Res* 2002; 26:477-82.
- [169] Hatta Y, Takahashi M, Enomoto Y, Takahashi N, Sawada U, Horie T. Adenosine triphosphate (ATP) enhances the antitumor effect of etoposide (VP16) in lung cancer cells. *Oncol Rep* 2004; 12:1139-42.
- [170] Maymon R, Bar-Shira MB, Cohen-Armon M, Holtzinger M, Leibovici J. Enhancing effect of ATP on intracellular adriamycin penetration in human ovarian cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1201:173-8.
- [171] Schäfer R, Sedehizade F, Welte T, Reiser G. ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285:L376-L385.
- [172] Swennen EL, Ummels V, Buss I, Jaehde U, Bast A, Dagnelie PC. ATP sensitizes H460 lung carcinoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Chem Biol Interact* 2010; 184:338-45.
- [173] Lasso de la Vega MC, Terradez P, Obrador E, Navarro J, Pellicer JA, Estrela JM. Inhibition of cancer growth and selective glutathione depletion in Ehrlich tumour cells in vivo by extracellular ATP. *Biochem J* 1994; 298:99-105.



- [174] Obrador E, Navarro J, Mampo J, Asensi M, Pellicer JA, Estrela JM. Glutathione and the rate of cellular proliferation determine tumour cell sensitivity to tumour necrosis factor in vivo. *Biochem J* 1997; 325:183-9.
- [175] Palomares T, Bilbao P, del OM, Castro B, Calle Y, Alonso-Varona A. In vitro and in vivo comparison between the effects of treatment with adenosine triphosphate and treatment with buthionine sulfoximine on chemosensitization and tumour growth of B16 melanoma. *Melanoma Res* 1999; 9:233-42.
- [176] Kitagawa T, Akamatsu Y. Control of passive permeability of Chinese hamster ovary cells by external and intracellular ATP. *Biochim Biophys Acta* 1981; 649:76-82.
- [177] Mure T, Sano K, Kitagawa T. Modulation of membrane permeability, cell proliferation and cytotoxicity of antitumor agents by external ATP in mouse tumor cells. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83:121-6.
- [178] Arav R, Friedberg I. Combined effects of ATP and its analogs on the membrane permeability in transformed mouse fibroblasts. *FEBS Lett* 1996; 387:149-51.
- [179] Wiley JS, Dubyak GR. Extracellular adenosine triphosphate increases cation permeability of chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood* 1989; 73:1316-23.
- [180] Conigrave AD, van der WL, Holt L, Jiang L, Wilson P, Christopherson RI et al. Extracellular ATP-dependent suppression of proliferation and induction of differentiation of human HL-60 leukemia cells by distinct mechanisms. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1585-91.
- [181] Schneider C, Wiendl H, Ogilvie A. Biphasic cytotoxic mechanism of extracellular ATP on U-937 human histiocytic leukemia cells: involvement of adenosine generation. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1538:190-205.
- [182] Seetulsingh-Goorah SP, Stewart BW. Growth inhibition of HL-60 cells by extracellular ATP: concentration-dependent involvement of a P2 receptor and adenosine generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250:390-6.
- [183] Rapaport E. Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. *J Cell Physiol* 1983; 114:279-83.
- [184] Vandewalle B, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. Effect of extracellular ATP on breast tumor cell growth, implication of intracellular calcium. *Cancer Lett* 1994; 85:47-54.
- [185] Weisman GA, Lustig KD, Lane E, Huang NN, Belzer I, Friedberg I. Growth inhibition of transformed mouse fibroblasts by adenine nucleotides occurs via generation of extracellular adenosine. *J Biol Chem* 1988; 263:12367-72.
- [186] Shabbir M, Burnstock G. Purinergic receptor-mediated effects of adenosine 5'-triphosphate in urological malignant diseases. *Int J Urol* 2009; 16:143-50.
- [187] Rotte A, Garmann D, Buss I, Jaehde U. Effect of extracellular ATP on cisplatin-induced cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells. *Chemotherapy* 2010; 56:1-8.

- [188] Sharp SY, Rogers PM, Kelland LR. Transport of cisplatin and bis-acetato-  
ammine-dichlorocyclohexylamine Platinum(IV) (JM216) in human ovarian  
carcinoma cell lines: identification of a plasma membrane protein associated  
with cisplatin resistance. *Clin Cancer Res* 1995; 1:981-9.
- [189] Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J  
Pharmacol Exp Ther* 2005; 315:971-9.
- [190] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F et al.  
Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation  
and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773:1263-84.
- [191] Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase - Role and significance in cancer.  
*Int J Med Sci* 2004; 1:101-15.
- [192] Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103:211-  
25.
- [193] Broekman F, Giovannetti E, Peters GJ. Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted  
or single-targeted? *World J Clin Oncol* 2011; 2:80-93.
- [194] Barrena Medel NI, Wright JD, Herzog TJ. Targeted therapies in epithelial  
ovarian cancer. *J Oncol* 2010; 2010:314326.
- [195] Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics.  
*Mol Cancer Ther* 2005; 4:677-85.
- [196] Fachinformation Glivec®, Stand Mai 2011. Verfügbar unter:  
<http://www.fachinfo.de>, letzter Zugriff: Dezember 2011.
- [197] Fachinformation Iressa®, Stand August 2011. Verfügbar unter:  
<http://www.fachinfo.de>, letzter Zugriff: Dezember 2011.
- [198] Fachinformation Nexavar®, Stand Oktober 2011. Verfügbar unter:  
<http://www.fachinfo.de>, letzter Zugriff Dezember 2011.
- [199] Fachinformation Sprycel®, Stand Oktober 2011. Verfügbar unter:  
<http://www.fachinfo.de>, letzter Zugriff Dezember 2011.
- [200] Fachinformation Sutent®, Stand August 2011. Verfügbar unter:  
<http://www.fachinfo.de>, letzter Zugriff: Dezember 2011.
- [201] Fachinformation Tarceva®, Stand September 2011. Verfügbar unter:  
<http://www.fachinfo.de>, letzter Zugriff: Dezember 2011.
- [202] Fachinformation Tassigna®, Stand Juni 2011. Verfügbar unter:  
<http://www.fachinfo.de>, letzter Zugriff: Dezember 2011.
- [203] Fachinformation Tyverb®, Stand Mai 2011. Verfügbar unter:  
<http://www.fachinfo.de>, letzter Zugriff: Dezember: 2011.
- [204] Fachinformation Votrient®, Stand Februar 2011. Verfügbar unter:  
<http://www.fachinfo.de>, letzter Zugriff: Dezember 2011.
- [205] Rini BI. Sorafenib. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7:453-61.

- [206] Strumberg D, Clark JW, Awada A, Moore MJ, Richly H, Hendlisz A et al. Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors. *Oncologist* 2007; 12:426-37.
- [207] Takimoto CH, Awada A. Safety and antitumor activity of sorafenib (Nexavar) in combination with other anticancer agents: a review of clinical trials. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61:535-48.
- [208] DrugDex: Monographie Sorafenib. Verfügbar unter: <http://www.thomsonhc.com>, letzter Zugriff: November 2011.
- [209] Hahn O, Stadler W. Sorafenib. *Curr Opin Oncol* 2006; 18:615-21.
- [210] Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR): Sorafenib. Update: August 2011, verfügbar unter: [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), letzter Zugriff: November 2011.
- [211] McPhillips F, Mullen P, MacLeod KG, Sewell JM, Monia BP, Cameron DA et al. Raf-1 is the predominant Raf isoform that mediates growth factor-stimulated growth in ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 2006; 27:729-39.
- [212] Rosa DD, Clamp AR, Collinson F, Jayson GC. Antiangiogenic therapy for ovarian cancer. *Curr Opin Oncol* 2007; 19:497-505.
- [213] Matei D, Sill MW, Lankes HA, DeGeest K, Bristow RE, Mutch D et al. Activity of sorafenib in recurrent ovarian cancer and primary peritoneal carcinomatosis: a gynecologic oncology group trial. *J Clin Oncol* 2011; 29:69-75.
- [214] Pölcher M, Eckhardt M, Coch C, Wolfgarten M, Kubler K, Hartmann G et al. Sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66:203-7.
- [215] Azad NS, Posadas EM, Kwitkowski VE, Steinberg SM, Jain L, Annunziata CM et al. Combination targeted therapy with sorafenib and bevacizumab results in enhanced toxicity and antitumor activity. *J Clin Oncol* 2008; 26:3709-14.
- [216] Teoh DG, Secord AA. Antiangiogenic therapies in epithelial ovarian cancer. *Cancer Control* 2011; 18:31-43.
- [217] Welch SA, Hirte HW, Elit L, Schilder RJ, Wang L, Macalpine K et al. Sorafenib in combination with gemcitabine in recurrent epithelial ovarian cancer: a study of the Princess Margaret Hospital Phase II Consortium. *Int J Gynecol Cancer* 2010; 20:787-93.
- [218] Ramasubbaiah R, Perkins SM, Schilder J, Whalen C, Johnson CS, Callahan M et al. Sorafenib in combination with weekly topotecan in recurrent ovarian cancer, a phase I/II study of the Hoosier Oncology Group. *Gynecol Oncol* 2011; 123:499-504.
- [219] Yu C, Bruzek LM, Meng XW, Gores GJ, Carter CA, Kaufmann SH et al. The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene* 2005; 24:6861-9.

- [220] Will Y, Dykens JA, Nadanaciva S, Hirakawa B, Jamieson J, Marroquin LD et al. Effect of the multitargeted tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, sunitinib, and sorafenib on mitochondrial function in isolated rat heart mitochondria and H9c2 cells. *Toxicol Sci* 2008; 106:153-61.
- [221] Fiume L, Manerba M, Vettrano M, Di SG. Effect of sorafenib on the energy metabolism of hepatocellular carcinoma cells. *Eur J Pharmacol* 2011; 670:39-43.
- [222] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64:7099-109.
- [223] Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116:855-67.
- [224] Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:937-47.
- [225] Liu Y, Gray NS. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat Chem Biol* 2006; 2:358-64.
- [226] Kolch W, Kotwaliwale A, Vass K, Janosch P. The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4:1-18.
- [227] Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:835-44.
- [228] Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008; 7:3129-40.
- [229] Dal Lago L, D'Hondt V, Awada A. Selected combination therapy with sorafenib: a review of clinical data and perspectives in advanced solid tumors. *Oncologist* 2008; 13:845-58.
- [230] Kupsch P, Henning BF, Passarge K, Richly H, Wiesemann K, Hilger RA et al. Results of a phase I trial of sorafenib (BAY 43-9006) in combination with oxaliplatin in patients with refractory solid tumors, including colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 5:188-96.
- [231] Flaherty KT, Schiller J, Schuchter LM, Liu G, Tuveson DA, Redlinger M et al. A phase I trial of the oral, multikinase inhibitor sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel. *Clin Cancer Res* 2008; 14:4836-42.
- [232] Kim C, Lee JL, Choi YH, Kang BW, Ryu MH, Chang HM et al. Phase I dose-finding study of sorafenib in combination with capecitabine and cisplatin as a first-line treatment in patients with advanced gastric cancer. *Invest New Drugs* 2010. Epub ahead of print.

- [233] Okamoto I, Miyazaki M, Morinaga R, Kaneda H, Ueda S, Hasegawa Y et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs* 2010; 28:844-53.
- [234] Scagliotti G, Novello S, von PJ, Reck M, Pereira JR, Thomas M et al. Phase III study of carboplatin and paclitaxel alone or with sorafenib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:1835-42.
- [235] Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, Hogg D, Robert C, Hersey P et al. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol* 2009; 27:2823-30.
- [236] Heim M, Scharifi M, Zisowsky J, Jaehde U, Voliotis D, Seeber S et al. The Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 reduces cellular uptake of platinum compounds and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. *Anticancer Drugs* 2005; 16:129-36.
- [237] Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H, Grotzinger KR, Whang-Peng J, Louie KG et al. Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res* 1987; 47:414-8.
- [238] Masuda H, Ozols RF, Lai GM, Fojo A, Rothenberg M, Hamilton TC. Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 1988; 48:5713-6.
- [239] Mueller H, Kassack MU, 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* 2004; 9:506-15.
- [240] Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988; 48:589-601.
- [241] Motulsky HJ, Christopoulos A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. 2003, GraphPad Software Inc., San Diego CA, verfügbar unter: [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com), letzter Zugriff: Oktober 2011.
- [242] Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; 22:27-55.
- [243] Tanaka R, Ariyama H, Qin B, Shibata Y, Takii Y, Kusaba H et al. Synergistic interaction between oxaliplatin and SN-38 in human gastric cancer cell lines in vitro. *Oncol Rep* 2005; 14:683-8.
- [244] Perez EA, Hack FM, Fletcher TS, Chou TC. Modulation of intrinsic in vitro resistance to carboplatin by edatrexate in the A549 human nonsmall cell lung cancer cell line. *Oncol Res* 1994; 6:151-6.

- [245] Mohammed MQ, Photiou A, Shah P, Retsas S. Activity of platinum drugs against melanoma cell lines: is it modulated in vitro in the presence of tamoxifen? *Anticancer Res* 1995; 15:1319-26.
- [246] Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006; 58:621-81.
- [247] User Protocol: BCA Protein Assay Kit. Merck KGaA; 2009.
- [248] Garmann D. Reaktivität und zelluläre Aufnahme albuminbindender Platinkomplexe und neuer Oxaliplatin-Analoga. Universität Bonn: Dissertation; 2007.
- [249] US Department of Health and Human Services FDA, CDER and CVM. Guidance for Industry: Bioanalytical Method validation 2001.
- [250] Product Information: ATP Determination Kit. Molecular Probes™ Invitrogen; 2005.
- [251] Müller H. Funktionelle Untersuchungen des ABC-Transporters P-Glykoprotein. Universität Bonn: Dissertation; 2007.
- [252] Petty RD, Sutherland LA, Hunter EM, Cree IA. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J Biolumin Chemilumin* 1995; 10:29-34.
- [253] Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1993; 160:81-8.
- [254] Koeszegi T, Petrik J, Vladimir-Knezevic S, Nagy S. Co-determination of ATP and proteins in Triton X 100 non-ionic detergent-opened monolayer cultured cells. *Luminescence* 2007; 22:415-9.
- [255] Sweet S, Singh G. Changes in mitochondrial mass, membrane potential, and cellular adenosine triphosphate content during the cell cycle of human leukemic (HL-60) cells. *J Cell Physiol* 1999; 180:91-6.
- [256] Nieminen AL, Saylor AK, Herman B, Lemasters JJ. ATP depletion rather than mitochondrial depolarization mediates hepatocyte killing after metabolic inhibition. *Am J Physiol* 1994; 267:C67-C74.
- [257] Martin DS, Spriggs D, Koutcher JA. A concomitant ATP-depleting strategy markedly enhances anticancer agent activity. *Apoptosis* 2001; 6:125-31.
- [258] Kloft C, Appelius H, Siegert W, Schunack W, Jaehde U. Determination of platinum complexes in clinical samples by a rapid flameless atomic absorption spectrometry assay. *Ther Drug Monit* 1999; 21:631-7.
- [259] Pieck AC. Pharmakokinetik und Platin-DNA-Adduktbildung von Oxaliplatin. Universität Bonn: Dissertation; 2004.



- [260] Spanier C. Einfluss der Tyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und Sorafenib auf Influx und Toxizität von Cisplatin in Ovarialkarzinomzellen. Universität Bonn: Masterarbeit; 2010.
- [261] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
- [262] Krieger ML, Eckstein N, Schneider V, Koch M, Royer HD, Jaehde U et al. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. *Int J Pharm* 2010; 289:10-7.
- [263] Harper ME, Antoniou A, Villalobos-Menuy E, Russo A, Trauger R, Vendemelio M et al. Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J* 2002; 16:1550-7.
- [264] Tegeder I, Brautigam L, Seegel M, Al-Dam A, Turowski B, Geisslinger G et al. Cisplatin tumor concentrations after intra-arterial cisplatin infusion or embolization in patients with oral cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73:417-26.
- [265] Chernyak BV, Dedov VN, Gabai VL. Mitochondrial ATP hydrolysis and ATP depletion in thymocytes and Ehrlich ascites carcinoma cells. *FEBS Lett* 1994; 337:56-9.
- [266] Ohmori T, Morikage T, Sugimoto Y, Fujiwara Y, Kasahara K, Nishio K et al. The mechanism of the difference in cellular uptake of platinum derivatives in non-small cell lung cancer cell line (PC-14) and its cisplatin-resistant subline (PC-14/CDDP). *Jpn J Cancer Res* 1993; 84:83-92.
- [267] Esmann M. Oligomycin interaction with Na,K-ATPase: oligomycin binding and dissociation are slow processes. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1064:31-6.
- [268] Kurbacher CM, Cree IA, Bruckner HW, Brenne U, Kurbacher JA, Muller K et al. Use of an ex vivo ATP luminescence assay to direct chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs* 1998; 9:51-7.
- [269] Sevin BU, Perras JP. Tumor heterogeneity and in vitro chemosensitivity testing in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:759-66.
- [270] Lundin A, Hasenson M, Persson J, Pousette A. Estimation of biomass in growing cell lines by adenosine triphosphate assay. *Methods Enzymol* 1986; 133:27-42.
- [271] Boike GM, Petru E, Sevin BU, Averette HE, Chou TC, Penalver M et al. Chemical enhancement of cisplatin cytotoxicity in a human ovarian and cervical cancer cell line. *Gynecol Oncol* 1990; 38:315-22.
- [272] Kiesslich T, Benno OC, Krammer B, Plaetzer K. Fast and reliable determination of intracellular ATP from cells cultured in 96-well microplates. *J Biochem Biophys Methods* 2003; 57:247-51.
- [273] Nakata N, Ishida A, Tani H, Kamidate T. Cationic liposomes enhanced firefly bioluminescent assay of bacterial ATP in the presence of an ATP extractant. *Anal Sci* 2003; 19:1183-5.



- [274] Plaetzer K, Kiesslich T, Krammer B, Hammerl P. Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AlPcS<sub>4</sub>-PDT. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1:172-7.
- [275] Kricka LJ, De LM. Effect of solvents on the catalytic activity of firefly luciferase. *Arch Biochem Biophys* 1982; 217:674-81.
- [276] Hara KY, Mori H. An efficient method for quantitative determination of cellular ATP synthetic activity. *J Biomol Screen* 2006; 11:310-7.
- [277] Berghmans K, Ruiz-Cabello J, Simpkins H, Andrews PA, Cohen JS. Increase in the ATP signal after treatment with cisplatin in two different cell lines studied by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183:114-20.
- [278] Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett* 1996; 378:107-10.
- [279] Chau Q, Stewart DJ. Cisplatin efflux, binding and intracellular pH in the HTB56 human lung adenocarcinoma cell line and the E-8/O.7 cisplatin-resistant variant. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44:193-202.
- [280] Andrews PA, Albright KD. Mitochondrial defects in cis-diamminedichloro-platinum(II)-resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1992; 52:1895-901.
- [281] Ara G, Kusumoto T, Korbut TT, Cullere-Luengo F, Teicher BA. cis-Diamminedichloroplatinum(II) resistant human tumor cell lines are collaterally sensitive to PtCl<sub>4</sub>(Rh-123)<sub>2</sub>: evidence for mitochondrial involvement. *Cancer Res* 1994; 54:1497-502.
- [282] Zinkewich-Peotti K, Andrews PA. Loss of cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance in human ovarian carcinoma cells selected for rhodamine 123 resistance. *Cancer Res* 1992; 52:1902-6.
- [283] Isonishi S, Saitou M, Yasuda M, Ochiai K, Tanaka T. Enhancement of sensitivity to cisplatin by orobol is associated with increased mitochondrial cytochrome c release in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2003; 90:413-20.
- [284] Decaudin D, Geley S, Hirsch T, Castedo M, Marchetti P, Macho A et al. Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 1997; 57:62-7.
- [285] 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* 2008; 63:643-50.
- [286] Suh DH, Kim MK, No JH, Chung HH, Song YS. Metabolic approaches to overcoming chemoresistance in ovarian cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1229:53-60.
- [287] Novgorodov SA, Gudz TI, Mohr Y, Goncharenko EN, Yaguzhinsky LS. ATP-synthase complex: the mechanism of control of ion fluxes induced by cumene hydroperoxide in mitochondria. *FEBS Lett* 1989; 247:255-8.

- [288] Shchepina LA, Pletjushkina OY, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Fetisova EK, Izyumov DS et al. Oligomycin, inhibitor of the  $F_0$  part of  $H^+$ -ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene* 2002; 21:8149-57.
- [289] Eichholtz-Wirth H, Hietel B. The relationship between cisplatin sensitivity and drug uptake into mammalian cells in vitro. *Br J Cancer* 1986; 54:239-43.
- [290] Safaei R, Katano K, Larson BJ, Samimi G, Holzer AK, Naerdemann W et al. Intracellular localization and trafficking of fluorescein-labeled cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11:756-67.
- [291] Rozengurt E, Heppel LA. Reciprocal control of membrane permeability of transformed cultures of mouse cell lines by external and internal ATP. *J Biol Chem* 1979; 254:708-14.
- [292] Dicker P, Heppel LA, Rozengurt E. Control of membrane permeability by external and internal ATP in 3T6 cells grown in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77:2103-7.
- [293] Plesner L, Plesner IW. Kinetics of oligomycin inhibition and activation of  $Na^+/K^+$ -ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1076:421-6.
- [294] Min XJ, Li H, Hou SC, He W, Liu J, Hu B et al. Dysfunction of volume-sensitive chloride channels contributes to cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells. *Exp Biol Med (Maywood, N.J.)* 2011; 236:483-91.
- [295] Shimizu T, Lee EL, Ise T, Okada Y. Volume-sensitive  $Cl^-$  channel as a regulator of acquired cisplatin resistance. *Anticancer Res* 2008; 28:75-83.
- [296] Jewell EA, Lingrel JB. Comparison of the substrate dependence properties of the rat  $Na,K$ -ATPase  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\alpha 3$  isoforms expressed in HeLa cells. *J Biol Chem* 1991; 266:16925-30.
- [297] Ohmori T, Nishio K, Ohta S, Kubota N, Adachi M, Komiya K et al. Ouabain-resistant non-small-cell lung-cancer cell line shows collateral sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum(II) (CDDP). *Int J Cancer* 1994; 57:111-6.
- [298] 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* 2001; 7:775-83.
- [299] Li W, Zhai X, Ding L, Sun L, Chen X, Gong P et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of novel N-methyl-4-phenoxycolinamide derivatives. *Molecules* 2011; 16:5130-41.
- [300] Takezawa K, Okamoto I, Yonesaka K, Hatashita E, Yamada Y, Fukuoka M et al. Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in KRAS wild-type cells and C-RAF in KRAS mutant cells. *Cancer Res* 2009; 69:6515-21.

- [301] Strumberg D, Richly H, Hilger RA, Schleucher N, Korfee S, Tewes M et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors. *J Clin Oncol* 2005; 23:965-72.
- [302] Minematsu T, Giacomini KM. Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins. *Mol Cancer Ther* 2011; 10:531-9.
- [303] Hu S, Chen Z, Franke R, Orwick S, Zhao M, Rudek MA et al. Interaction of the multikinase inhibitors sorafenib and sunitinib with solute carriers and ATP-binding cassette transporters. *Clin Cancer Res* 2009; 15:6062-9.
- [304] Lee J, Pena MM, Nose Y, Thiele DJ. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem* 2002; 277:4380-7.
- [305] Caraglia M, Tassone P, Marra M, Budillon A, Venuta S, Tagliaferri P. Targeting Raf-kinase: molecular rationales and translational issues. *Ann Oncol* 2006; 17 Suppl 7:viii124-viii127.
- [306] Wang J, Zhou JY, Wu GS. ERK-dependent MKP-1-mediated cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67:11933-41.
- [307] Ulahannan SV, Brahmer JR. Antiangiogenic agents in combination with chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2011; 29:325-37.
- [308] US Department of Health and Human Services FDA and CDER. Guidance for Industry: Codevelopment of Two or More Unmarketed Investigational Drugs for Use in Combination, Draft 2010.
- [309] Zhao L, Wientjes MG, Au JL. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin Cancer Res* 2004; 10:7994-8004.
- [310] Tallarida RJ. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319:1-7.
- [311] Zhang L, Zhang YD, Zhao P, Huang SM. Predicting drug-drug interactions: an FDA perspective. *AAPS J* 2009; 11:300-6.

## Appendix

### Appendix A

#### Ergebnisse zur Charakterisierung der Platinsensitivität unter glucosefreien Bedingungen

##### A1 Zytotoxizität von Cisplatin

Zytotoxizität von Cisplatin in A2780- und A2780cis-Zellen in glucosehaltigem oder -freiem Medium nach Inkubation mit Cisplatin über 72 h. In der Tabelle ist jeweils die mittlere Absorption aus einem repräsentativen Experiment ( $n = 3$ ) aus einer Reihe von vier unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Die Absorption der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

log c [CDDP]	A2780				A2780cis			
	Absorption [%]		Absorption		Absorption [%]		Absorption	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Glucosehaltiges Medium								
Kontrolle	100,00	14,5	0,913	0,132	100,00	8,5	0,420	0,036
-9,5	104,27	1,7	0,952	0,016	105,88	2,5	0,444	0,011
-7,5	111,98	7,6	1,022	0,070	109,21	5,4	0,458	0,023
-6,5	102,23	7,3	0,933	0,067	105,16	5,3	0,441	0,022
-6,0	81,59	5,1	0,745	0,046	104,21	5,2	0,437	0,022
-5,5	44,74	3,8	0,408	0,035	99,29	3,7	0,417	0,016
-5,0	21,80	1,2	0,199	0,011	68,78	2,5	0,289	0,011
-4,5	3,21	0,1	0,029	0,001	10,17	1,0	0,043	0,004
-4,0	2,67	0,2	0,024	0,002	5,88	0,3	0,025	0,001
-3,5	2,74	0,2	0,025	0,002	5,40	0,5	0,023	0,002
Glucosefreies Medium								
Kontrolle	100,00	3,5	0,467	0,016	100,00	8,2	0,164	0,013
-9,5	100,43	17,4	0,469	0,081	97,77	3,6	0,161	0,006
-7,5	108,14	12,3	0,505	0,057	111,76	9,7	0,184	0,016
-6,5	112,43	4,9	0,525	0,023	115,21	8,0	0,189	0,013
-6,0	89,21	7,4	0,416	0,035	113,79	8,8	0,187	0,014
-5,5	63,36	4,7	0,296	0,022	120,49	8,0	0,198	0,013
-5,0	21,21	2,0	0,099	0,009	93,31	0,7	0,153	0,001
-4,5	4,64	0,2	0,022	0,001	13,59	0,9	0,022	0,002
-4,0	4,00	0,1	0,019	0,001	11,56	1,6	0,019	0,003
-3,5	3,93	0,1	0,018	0,001	10,34	1,2	0,017	0,002

## A2 Influx von Cisplatin

Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in A2780- und A2780cis-Zellen nach einstündiger Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin in glucosehaltigem oder -freiem Medium. In der Tabelle ist der mittlere Platingehalt aus drei bis vier unabhängigen Versuchstagen angegeben.

Bedingungen	A2780			A2780cis		
	Mittelwert	SD	n	Mittelwert	SD	n
glucosefrei	4,234	0,819	4	1,593	0,310	4
glucosehaltig	4,802	0,745	3	1,881	0,466	3

## Appendix B

### Ergebnisse zur Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts

#### B1 Optimierung und Validierung des ATP-Biolumineszenz-Assays

Einfluss von FKS, inaktiviertem FKS und PBS-Puffer auf die Lumineszenz in A2780- und A2780cis-Zellen. In der Tabelle ist die mittlere Lumineszenzeinheit [RLU] aus einem repräsentativen Versuchstag (gemessen in neun Replikaten) dargestellt.

Behandlung	A2780		A2780cis	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
FKS, inaktiviert	6972,31	1239,01	7016,95	805,81
FKS	4098,10	669,83	3490,90	904,22
PBS-Puffer	11255,98	1330,99	15879,69	1307,86

Korrelationskoeffizienten (*r*) und Geradengleichungen der an sechs verschiedenen Tagen aufgenommenen Kalibriergeraden.

Versuchstag	Geradengleichung	<i>r</i>
1	$y = 7930,9x - 68,5$	0,999613
2	$y = 9819,9x + 20,0$	0,999997
3	$y = 2050,2x + 44,5$	0,999381
4	$y = 10148,7x - 46,7$	0,999662
5	$y = 9995,2x - 448,4$	0,999945
6	$y = 2061,9x + 182,1$	0,999597

Präzision und Richtigkeit der an sechs verschiedenen Tagen aufgenommenen Kalibriergeraden.

ATP-Konzentration [ $\mu$ M]	Versuchstag						MW	SD	RSD [%]	RE [%]
	1	2	3	4	5	6				
0,1	0,10	0,10	0,09	0,10	0,11	0,09	0,10	0,01	9,18	2,63
0,2	0,19	0,20	0,18	0,19	0,21	0,17	0,19	0,01	6,70	4,85
0,5	0,49	0,50	0,51	0,51	0,50	0,48	0,50	0,01	2,16	0,29
1,5	1,45	1,51	1,60	1,56	1,46	1,61	1,53	0,07	4,49	-2,19
2,5	2,60	2,49	2,40	2,41	2,51	2,46	2,48	0,07	2,95	0,79
5,0	4,97	5,00	5,02	5,02	5,00	4,99	5,00	0,02	0,43	-0,01

## B2 Intrazellulärer ATP-Gehalt der verwendeten Zelllinien

ATP-Konzentration, Proteinkonzentration und ATP-Gehalt bezogen auf den zellulären Proteingehalt der unbehandelten A2780- und A2780cis-Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse der einzelnen Versuchstage ( $n = 28$ ).

Versuchstag	A2780			A2780cis		
	ATP [ $\mu\text{M}$ ]	Protein [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	ATP/Protein [ $\text{pmol}/\mu\text{g}$ ]	ATP [ $\mu\text{M}$ ]	Protein [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	ATP/Protein [ $\text{pmol}/\mu\text{g}$ ]
1	0,720	206,042	0,0035	0,837	215,158	0,0039
2	0,914	333,285	0,0027	0,800	250,425	0,0032
3	0,975	232,339	0,0042	0,900	228,777	0,0039
4	0,704	225,545	0,0031	0,745	183,697	0,0041
5	1,466	235,886	0,0062	1,157	169,888	0,0068
6	0,653	218,365	0,0030	0,653	114,334	0,0057
7	0,925	304,172	0,0030	0,742	253,078	0,0029
8	1,033	208,836	0,0049	1,124	263,808	0,0043
9	0,928	401,714	0,0023	0,837	178,240	0,0047
10	1,024	287,986	0,0036	0,737	271,453	0,0027
11	1,287	339,017	0,0038	1,036	296,756	0,0035
12	1,808	414,981	0,0044	1,752	328,734	0,0053
13	1,253	288,184	0,0043	1,239	276,229	0,0045
14	1,230	380,770	0,0032	1,205	340,365	0,0035
15	0,683	245,250	0,0028	0,762	206,294	0,0037
16	1,098	433,517	0,0025	0,924	340,275	0,0027
17	0,895	427,673	0,0021	0,985	374,099	0,0026
18	1,130	265,472	0,0043	0,916	178,400	0,0051
19	0,856	312,539	0,0027	0,688	143,104	0,0048
20	0,790	256,641	0,0031	0,751	193,845	0,0039
21	0,910	286,731	0,0032	0,764	304,777	0,0025
22	1,052	308,012	0,0034	1,112	293,066	0,0038
23	1,059	638,340	0,0017	1,041	487,360	0,0021
24	1,898	802,947	0,0024	1,609	537,799	0,0030
25	1,063	402,322	0,0026	0,771	270,089	0,0029
26	0,802	371,200	0,0022	0,936	202,866	0,0046
27	1,151	370,825	0,0031	1,071	309,630	0,0035
28	1,666	371,200	0,0045	1,450	182,366	0,0079



ATP-Gehalt [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 5, 25 oder 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin in glucosehaltigem bzw. mit 25 oder 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin in glucosefreiem Medium. In der Tabelle ist jeweils der mittlere ATP-Gehalt aus einer Reihe von drei bis vier unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

		<b>A2780</b>						<b>A2780cis</b>					
		Glucosehaltige Bedingungen											
Zeit [h]	5 $\mu\text{M}$ (n = 4)		25 $\mu\text{M}$ (n = 3)		100 $\mu\text{M}$ (n = 4)		5 $\mu\text{M}$ (n = 4)		25 $\mu\text{M}$ (n = 3)		100 $\mu\text{M}$ (n = 4)		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
0	93,6	10,4	77,3	13,2	102,2	5,8	79,7	17,3	81,3	16,5	102,9	8,5	
1	97,2	3,0	104,4	15,5	110,0	12,5	95,1	6,7	80,2	9,5	115,2	16,3	
2	102,7	8,3	97,0	5,8	108,2	8,6	96,0	13,3	80,5	4,9	114,2	12,8	
4	107,0	5,0	108,3	6,1	122,6	6,9	99,73	8,5	90,8	14,2	110,2	5,7	
6	107,4	10,9	118,4	12,6	125,0	10,8	103,6	12,7	100,1	17,2	112,5	5,4	
8	108,0	5,7	120,2	8,8	124,5	14,2	106,4	8,1	96,2	13,5	106,2	16,9	
10	112,0	7,0	123,5	14,1	119,3	15,6	107,4	9,3	100,8	19,9	104,9	11,4	
12	112,5	9,7	107,2	10,0	105,7	10,4	106,8	4,6	102,2	14,1	106,3	3,9	
13	101,4	5,8	103,5	22,2	86,5	17,9	104,2	1,9	113,2	17,2	110,6	3,2	
14	98,6	5,6	85,1	4,9	82,2	16,2	104,2	6,4	102,3	13,8	94,9	22,0	
16	102,3	4,5	79,1	5,6	68,3	14,8	111,2	5,4	109,2	11,6	90,8	17,4	
18	102,9	5,1	73,1	15,0	54,6	11,2	113,5	9,1	111,3	19,6	86,1	15,1	
20	100,0	6,2	64,3	9,1	33,4	7,6	109,4	8,2	113,0	8,3	77,4	10,7	
22	109,7	9,4	55,7	5,4	23,7	4,4	115,0	9,2	111,1	18,7	66,8	5,2	
24	103,7	6,2	48,6	7,0	20,1	6,8	112,9	10,3	112,6	19,3	49,3	9,6	
		Glucosefreie Bedingungen											
Zeit [h]	25 $\mu\text{M}$ (n = 3)		100 $\mu\text{M}$ (n = 3)		25 $\mu\text{M}$ (n = 3)		100 $\mu\text{M}$ (n = 3)						
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD					
0	105,5	6,3	109,2	6,1	98,5	7,4	104,7	7,9					
1	110,2	4,9	115,2	4,2	102,7	5,1	103,5	9,5					
2	110,2	5,5	115,7	10,1	102,6	5,2	101,6	11,2					
4	114,1	2,4	123,5	7,9	107,2	5,9	109,5	5,2					
6	118,4	2,0	122,0	6,2	107,0	2,4	114,6	9,0					
8	116,1	1,1	123,2	10,7	109,1	1,9	118,7	12,8					
10	118,5	8,4	118,8	8,7	111,4	0,8	116,1	14,6					
12	115,7	4,5	112,6	13,3	106,7	7,7	112,7	10,3					
13	119,7	2,0	114,4	22,6	103,9	10,1	112,3	6,7					
14	121,4	1,0	108,2	22,2	105,9	2,8	112,1	9,7					
16	121,8	4,8	97,2	22,6	106,8	0,9	110,7	9,8					
18	111,2	2,7	77,8	20,9	105,8	4,2	104,1	7,9					
20	105,9	6,1	64,1	17,0	107,3	7,3	97,3	8,2					
22	96,3	8,5	54,9	13,9	107,0	6,0	86,6	5,0					
24	85,9	11,8	49,3	13,4	101,4	9,8	75,9	8,7					

### B3 Zytotoxizität der ATP-Depletoren

Zytotoxizität von Oligomycin in A2780- und A2780cis-Zellen in glucosehaltigem Medium nach einer Inkubation über 72 h. In der Tabelle ist die mittlere Absorption eines repräsentativen Experiments ( $n = 3$ ) aus einer Reihe von elf unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Die Absorption der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

log c [Oligomycin]	A2780				A2780cis			
	Absorption [%]		Absorption		Absorption [%]		Absorption	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	100,00	1,8	0,922	0,016	100,00	6,0	0,672	0,040
-9,00	93,02	2,1	0,858	0,019	75,93	6,1	0,510	0,041
-8,60	30,94	0,5	0,285	0,005	41,79	2,4	0,281	0,016
-8,00	30,50	1,2	0,281	0,011	42,08	1,6	0,283	0,011
-7,30	30,50	0,4	0,281	0,004	41,44	1,4	0,278	0,009
-6,30	29,45	1,0	0,272	0,009	42,38	0,4	0,285	0,003
-6,00	30,03	1,4	0,277	0,013	45,61	2,4	0,306	0,016
-5,30	21,58	3,0	0,199	0,027	32,16	3,2	0,216	0,022
-5,12	4,66	0,5	0,043	0,005	5,46	2,2	0,037	0,015
-5,09	3,54	0,5	0,033	0,004	4,62	0,3	0,031	0,002

Zytotoxizität von 2,4-Dinitrophenol in A2780- und A2780cis-Zellen in glucosehaltigem Medium nach einer Inkubation über 72 h. In der Tabelle ist die mittlere Absorption eines repräsentativen Experiments ( $n = 3$ ) aus einer Reihe von sieben unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Die Absorption der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

log c [DNP]	A2780				A2780cis			
	Absorption [%]		Absorption		Absorption [%]		Absorption	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	100,00	5,8	0,624	0,036	100,00	1,4	0,553	0,008
-5,00	93,32	9,1	0,582	0,057	90,47	2,1	0,500	0,012
-4,60	80,34	9,6	0,501	0,060	79,37	7,5	0,439	0,041
-4,30	63,03	7,5	0,393	0,047	68,46	2,6	0,378	0,014
-4,12	51,07	7,1	0,319	0,045	55,07	2,2	0,304	0,012
-3,90	33,97	6,8	0,212	0,043	38,60	2,1	0,213	0,011
-3,60	16,93	2,5	0,106	0,015	23,58	0,7	0,130	0,004
-3,30	13,14	0,6	0,082	0,003	16,59	0,9	0,092	0,005
-3,12	14,53	0,8	0,091	0,005	16,59	0,5	0,092	0,003
-3,00	11,43	1,1	0,071	0,007	12,73	0,9	0,070	0,005

**B4 ATP-Depletion mit Oligomycin**

ATP-Gehalt [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 1  $\mu$ M Oligomycin in glucosehaltigem oder -freiem Medium über 2 h. In der Tabelle ist jeweils der mittlere ATP-Gehalt [%] von drei bis vier unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

<b>A2780</b>			<b>A2780cis</b>	
Zeit [min]	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Glucosehaltige Bedingungen (n = 3)				
0	106,10	1,1	90,95	9,9
5	105,56	6,6	95,45	5,1
10	107,62	5,8	99,08	10,5
20	107,53	4,5	98,99	10,1
40	102,57	2,8	104,34	5,2
60	108,83	8,5	108,57	6,7
80	105,48	5,7	107,75	6,7
120	103,24	4,9	104,24	2,1
Glucosefreie Bedingungen (n = 4)				
0	84,65	10,2	90,89	8,3
5	71,33	11,2	82,77	14,2
10	55,98	8,6	72,77	18,5
20	45,13	8,7	64,45	18,0
30	44,18	17,4	59,42	14,0
60	36,17	10,5	55,72	17,6
80	34,33	10,3	57,50	19,2
120	33,31	16,0	59,82	23,0

ATP-Gehalt [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Oligomycin-konzentrationen in glucosefreiem Medium über einen Zeitraum von bis zu 45 min. In der Tabelle ist jeweils der mittlere ATP-Gehalt [%] von drei bis vier unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

<b>A2780</b>			<b>A2780cis</b>	
Zeit [min]	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
1 nM Oligomycin (n = 3)				
0	99,15	4,1	100,25	6,2
15	98,58	3,3	106,63	6,4
30	100,57	3,8	103,48	11,0
45	102,52	1,3	105,02	8,9

(Fortsetz.) ATP-Gehalt [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Oligomycinkonzentrationen in glucosefreiem Medium über einen Zeitraum von bis zu 45 min. In der Tabelle ist jeweils der mittlere ATP-Gehalt [%] von drei bis vier unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

Zeit [min]	A2780		A2780cis	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
10 nM Oligomycin (n = 3)				
0	97,14	3,9	101,25	6,8
15	100,19	2,8	99,27	13,5
30	102,24	0,8	99,54	13,3
45	88,68	8,1	88,42	11,3
100 nM Oligomycin (n = 4)				
0	97,47	1,2	98,76	9,1
15	73,05	10,1	92,44	8,4
30	62,57	24,6	82,46	18,9
45	38,20	6,0	70,67	18,5
1 $\mu$ M Oligomycin (n = 3)				
0	95,89	7,8	96,04	8,5
15	58,32	7,5	78,07	8,8
30	38,43	2,7	73,17	4,1
45	31,74	2,1	67,04	8,4

Wiederherstellung des ATP-Gehalts nach Inkubation der A2780- und A2780cis-Zellen mit 1  $\mu$ M Oligomycin für 60 min in glucosefreiem Medium und anschließendem Austausch des oligomycinhaltigen Mediums durch glucosefreies Medium und weitere Inkubation bis zu 60 min. In der Tabelle ist der mittlere ATP-Gehalt [%] von drei bis fünf unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

Zeit [h]	A2780			A2780cis		
	Mittelwert	SD	n	Mittelwert	SD	n
0	36,97	10,6	5	45,68	9,3	5
2	40,61	7,1	4	44,29	8,4	4
5	56,34	7,5	3	50,65	8,7	3
7	60,52	8,8	3	56,56	8,9	3
10	81,47	9,1	3	75,95	6,0	3
20	87,81	8,5	3	86,58	5,4	3
30	82,82	6,1	3	79,84	9,4	3
40	74,02	10,7	3	74,59	14,5	3
50	80,12	7,9	3	73,98	14,8	3
60	80,87	2,9	3	80,00	9,4	3

Wiederherstellung des ATP-Gehalts nach Inkubation der A2780- und A2780cis-Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin für 60 min in glucosefreiem Medium und anschließendem Austausch des oligomycin-haltigen Mediums durch glucosehaltiges Medium und weitere Inkubation bis zu 60 min. In der Tabelle ist der mittlere ATP-Gehalt [%] von drei bis vier unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

Zeit [h]	A2780			A2780cis		
	Mittelwert	SD	n	Mittelwert	SD	n
0	39,61	5,7	4	56,30	9,1	4
10	78,41	6,3	3	91,84	14,3	3
20	88,59	14,7	3	87,07	12,3	3
30	88,65	8,1	3	83,47	2,9	3
40	95,25	18,0	3	89,90	14,1	3
50	92,94	9,1	3	88,69	8,3	3
60	93,70	6,2	3	89,94	4,9	3

## B5 ATP-Depletion mit 2,4-Dinitrophenol

ATP-Gehalt [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  DNP über einen Zeitraum von bis zu 50 min. In der Tabelle ist der mittlere ATP-Gehalt [%] aus einem Vorversuch (vermessen in Triplikaten) dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

Zeit [min]	A2780		A2780cis	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
5	105,67	13,6	119,95	38,0
10	107,92	1,2	124,37	38,5
20	98,81	3,6	118,71	20,6
30	108,65	1,4	125,77	29,6
40	105,25	4,7	135,43	22,8
50	102,50	4,3	102,40	29,7

ATP-Gehalt [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu$ M DNP über einen Zeitraum von bis zu 2 h. In der Tabelle ist der mittlere ATP-Gehalt [%] von drei bis vier unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

Zeit [min]	A2780			A2780cis		
	Mittelwert	SD	n	Mittelwert	SD	n
0	95,89	1,7	3	90,05	5,4	3
5	97,77	7,2	3	103,64	14,5	3
10	97,66	9,3	3	101,69	19,6	3
20	95,73	4,8	4	98,57	17,6	3
30	91,78	11,3	4	103,35	19,5	3
40	96,54	9,0	3	106,78	24,8	3
60	91,71	6,6	4	89,58	4,2	4
70	87,11	4,1	3	90,47	5,7	3
80	87,32	5,7	3	85,79	8,0	3
120	90,89	5,7	3	88,87	4,3	3

## Appendix C

### Ergebnisse zum Einfluss von intra- und extrazellulärem ATP auf die Platin-sensitivität

#### C1 Influx von Cisplatin

Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin und Präinkubation (0,5 h) mit 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin und anschließender Koinkubation mit Cisplatin in einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  über einen Zeitraum von bis zu 3 h in glucosefreiem Medium. In der Tabelle ist jeweils der mittlere Platingehalt aus drei bis fünf unabhängigen Versuchstagen angegeben.

Zeit [min]	A2780			A2780cis		
	Mittelwert	SD	n	Mittelwert	SD	n
100 $\mu\text{M}$ Cisplatin						
20	0,824	0,65	5	0,291	0,23	5
60	3,634	1,75	5	0,908	0,41	5
120	6,713	3,31	5	1,636	0,88	5
180	12,157	2,76	3	3,247	0,68	3
1 $\mu\text{M}$ Oligomycin, Präinkubation (0,5 h)						
20	0,467	0,24	5	0,182	0,14	5
60	1,561	0,79	5	0,641	0,36	5
120	3,627	2,15	5	1,122	0,70	5
180	8,559	3,04	3	2,837	1,32	3

Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin, nach Koinkubation von 100  $\mu\text{M}$  ATP und 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin und nach Präinkubation (30 min) mit 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin und anschließender Koinkubation mit Cisplatin und ATP (jeweils in einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ ) über 10 und 60 min. In der Tabelle ist jeweils der mittlere Platingehalt aus drei bis vier unabhängigen Versuchstagen angegeben.

Behandlung	A2780		A2780cis	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
10 Minuten (n = 3)				
Kontrolle	0,728	0,126	0,330	0,137
ATP	0,929	0,292	0,264	0,087
Oligomycin/ATP	0,753	0,200	0,261	0,079
60 Minuten (n = 4)				
Kontrolle	4,618	0,806	1,593	0,310
ATP	6,780	1,529	1,852	0,414
Oligomycin/ATP	5,496	1,480	1,565	0,196



## C2 Zytotoxizität von Cisplatin

Zytotoxizität von Cisplatin in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation ohne und mit Koinkubation mit 1  $\mu$ M Oligomycin über 72 h in glucosehaltigem Medium. In der Tabelle ist jeweils die mittlere Absorption aus einem repräsentativen Versuchstag ( $n = 3$ ) aus einer Reihe von sieben unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Die Absorption der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

log c [CDDP]	A2780				A2780cis			
	Absorption [%]		Absorption		Absorption [%]		Absorption	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Cisplatin								
Kontrolle	100,00	3,9	0,890	0,035	100,00	16,1	0,261	0,042
-9,5	93,22	4,1	0,829	0,037	94,25	3,9	0,246	0,010
-7,5	86,36	9,4	0,768	0,084	97,06	1,2	0,253	0,003
-6,5	77,89	7,9	0,693	0,070	99,23	1,2	0,259	0,003
-6,0	47,36	3,1	0,421	0,028	98,21	3,8	0,256	0,010
-5,5	29,26	4,2	0,260	0,037	90,92	3,3	0,237	0,009
-5,0	12,59	0,7	0,112	0,006	67,90	7,0	0,177	0,018
-4,5	2,62	0,1	0,023	0,001	12,79	0,4	0,033	0,001
-4,0	2,36	0,2	0,021	0,002	6,52	0	0,017	0
-3,5	2,55	0,2	0,023	0,002	6,14	0	0,016	0
1 $\mu$ M Oligomycin, Koinkubation (72 h)								
Kontrolle	100,00	7,3	0,326	0,024	100,00	3,5	0,523	0,018
-9,5	94,78	4,7	0,309	0,015	96,88	5,9	0,507	0,031
-7,5	92,02	3,1	0,300	0,010	100,45	3,4	0,525	0,018
-6,5	76,36	4,9	0,249	0,016	100,19	4,5	0,524	0,024
-6,0	61,82	2,0	0,201	0,007	97,51	5,3	0,510	0,028
-5,5	46,16	3,1	0,150	0,010	87,13	7,8	0,456	0,041
-5,0	22,21	4,8	0,072	0,016	63,03	3,1	0,330	0,016
-4,5	6,04	0,2	0,020	0,001	7,52	1,1	0,039	0,006
-4,0	5,53	0	0,018	0	4,33	0,3	0,023	0,002
-3,5	5,32	0,2	0,017	0,001	3,76	0,4	0,020	0,002

Vitalität [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach einstündiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin und nach Präinkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Oligomycin (0,5 h) und einstündiger Koinkubation mit Cisplatin in einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  unter glucosefreien Bedingungen. In der Tabelle ist die mittlere Absorption [%] von drei unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Die Absorption der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

Behandlung	A2780		A2780cis	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
100 $\mu\text{M}$ Cisplatin	94,48	0,9	99,11	5,2
1 $\mu\text{M}$ Oligomycin, Präinkubation (0,5 h)	93,95	2,3	101,21	11,7

### C3 Efflux von Cisplatin

Intrazellulärer Platingehalt in % bezogen auf die Kontrolle und in  $\mu\text{mol/g}$  Protein in A2780- und A2780cis-Zellen nach einstündiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin in glucosefreiem Medium und anschließender Inkubation mit cisplatinfreiem Medium bis zu 60 min. 30 min vor Ablauf der Inkubationszeit mit Cisplatin wurde glucosefreies Medium (Kontrolle) oder Oligomycin in einer finalen von 1  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Der mittlere Platingehalt nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit mit Cisplatin (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt. In der Tabelle ist jeweils der mittlere Platingehalt aus drei unabhängigen Versuchstagen angegeben.

Effluxzeit [min]	A2780				A2780cis			
	Intrazellulärer Platingehalt							
	[%]		[ $\mu\text{mol/g}$ Protein]		[%]		[ $\mu\text{mol/g}$ Protein]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
100 $\mu\text{M}$ Cisplatin								
0	100,00	32,8	3,565	1,17	100,00	19,7	1,274	0,25
2	99,17	11,9	3,536	0,43	88,21	14,7	1,124	0,19
5	96,57	5,0	3,443	0,18	92,55	17,4	1,179	0,22
10	81,69	10,4	2,913	0,37	83,29	2,3	1,061	0,03
60	80,40	4,6	2,867	0,17	77,94	5,5	0,993	0,07
1 $\mu\text{M}$ Oligomycin								
0	100,00	25,3	3,359	0,85	100,00	10,6	1,301	0,14
2	98,44	16,5	3,306	0,55	89,92	19,4	1,170	0,25
5	97,19	5,5	3,264	0,18	93,24	20,4	1,213	0,27
10	85,80	9,3	2,882	0,31	77,03	9,3	1,002	0,12
60	82,79	8,4	2,781	0,28	74,67	3,5	0,972	0,05

## Appendix D

### Ergebnisse zum Einfluss von Ouabain auf die Platinsensitivität

#### D1 Zytotoxizität von Ouabain

Zytotoxizität von Ouabain in A2780- und A2780cis-Zellen in glucosehaltigem Medium nach einer Inkubation über 72 h. In der Tabelle ist die mittlere Absorption aus einem repräsentativen Experiment ( $n = 3$ ) aus einer Reihe von sechs unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Die Absorption der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

log c [Ouabain]	A2780				A2780cis			
	Absorption [%]		Absorption		Absorption [%]		Absorption	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	100,00	3,4	1,062	0,036	100,00	1,1	0,662	0,008
-11,0	105,80	2,8	1,124	0,030	100,65	4,5	0,666	0,030
-10,3	108,25	2,0	1,150	0,021	107,25	1,7	0,710	0,011
-10,0	109,70	5,6	1,165	0,060	103,42	2,8	0,685	0,018
-9,0	108,19	10,0	1,149	0,106	98,24	3,8	0,650	0,025
-8,3	100,47	5,5	1,067	0,058	81,97	6,5	0,543	0,043
-8,0	93,91	8,5	0,998	0,090	64,00	3,8	0,424	0,025
-7,3	25,35	4,3	0,269	0,046	11,18	0,4	0,074	0,003
-7,0	11,08	1,1	0,118	0,012	5,34	0,2	0,035	0,002
-5,0	2,29	0,1	0,024	0,001	4,13	0,1	0,027	0,001

## D2 Influx von Cisplatin

Intrazellulärer Platingehalt in  $\mu\text{mol/g}$  Protein in A2780- und A2780cis-Zellen nach einstündiger Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin (Kontrolle) sowie nach Präinkubation (1 h) mit unterschiedlichen Ouabainkonzentrationen (0 – 1 mM) und anschließender einstündiger Koinkubation mit Cisplatin in einer finalen Konzentration von  $100 \mu\text{M}$ . In der Tabelle ist der mittlere Platingehalt aus drei bis acht unabhängigen Versuchstagen angegeben.

log c [Ouabain]	A2780			A2780cis		
	Intrazellulärer Platingehalt					
	[ $\mu\text{mol/g}$ Protein]			[ $\mu\text{mol/g}$ Protein]		
	MW	SD	n	MW	SD	n
Kontrolle	4,916	0,88	8	1,514	0,275	7
-8,60	4,819	1,40	5	1,777	0,544	5
-8,30	4,288	1,18	4	1,320	0,213	3
-8,00	4,666	1,04	6	1,573	0,298	3
-7,69	5,256	1,15	6	1,674	0,379	3
-7,30	4,581	0,82	7	1,511	0,280	6
-7,12	3,946	0,40	3	–	–	–
-7,07	4,008	0,85	3	–	–	–
-7,00	4,749	0,27	3	1,597	0,175	3
-6,30	3,320	0,81	4	1,512	0,239	4
-6,00	3,779	0,60	3	1,709	0,536	3
-5,30	3,391	1,03	6	1,733	0,856	6
-3,30	3,574	0,75	4	1,612	0,464	4
-3,00	3,598	0,81	4	1,795	0,507	5

–: Konzentration wurde nicht untersucht

Intrazellulärer Platingehalt [%] in A2780- und A2780cis-Zellen nach einstündiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin (Kontrolle) sowie nach Präinkubation (1 h) mit unterschiedlichen Ouabainkonzentrationen (0 – 1000  $\mu\text{M}$ ) und anschließender einstündiger Koinkubation mit Cisplatin in einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Der Platingehalt der nur mit Cisplatin behandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt. In der Tabelle ist der mittlere Platingehalt aus drei bis acht unabhängigen Versuchstagen angegeben.

Ouabainkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	A2780			A2780cis		
	Mittelwert	SD	n	Mittelwert	SD	n
Kontrolle	100,00	9,4	8	100,00	11,7	7
0,0025	102,10	26,3	4	100,15	12,2	3
0,005	97,77	18,3	4	97,41	5,6	3
0,01	96,70	14,0	4	92,50	9,2	3
0,05	96,15	13,7	7	98,86	6,2	6
0,1	87,59	7,5	3	94,38	4,9	3
0,5	75,79	7,2	4	110,79	13,5	4
5	70,63	15,7	4	87,99	17,0	3
500	82,91	12,9	4	115,08	17,8	4
1000	87,71	17,7	3	129,92	26,0	4

Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g}$  Protein] in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin sowie nach Präinkubation (1 h) mit 50 nM Ouabain und anschließender Koinkubation mit Cisplatin in einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  über einen Zeitraum von bis zu 4 h. In der Tabelle ist jeweils der mittlere Platingehalt aus vier bis sechs unabhängigen Versuchstagen angegeben.

Zeit [min]	A2780			A2780cis		
	Mittelwert	SD	n	Mittelwert	SD	n
100 $\mu\text{M}$ Cisplatin						
20	1,952	0,71	4	0,577	0,20	4
60	5,314	1,68	4	1,349	0,47	4
120	10,008	1,46	5	2,524	0,51	5
180	16,515	0,90	5	4,479	0,72	5
240	18,660	3,07	6	5,351	1,22	5
50 nM Ouabain, Präinkubation (1 h)						
20	1,299	0,13	4	0,392	0,07	4
60	4,589	0,83	4	1,416	0,50	4
120	7,501	0,98	5	2,448	0,56	5
180	14,128	0,89	5	4,069	0,90	5
240	18,155	2,96	6	5,168	0,87	5

### D3 Einfluss von Ouabain auf den intrazellulären ATP-Gehalt

ATP-Gehalt [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation ohne bzw. mit 50 nM Ouabain in glucosehaltigem oder -freiem Medium über einen Zeitraum von bis zu 2 h. In der Tabelle ist jeweils der mittlere ATP-Gehalt [%] von drei unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt. *p*-Werte sind Ergebnisse des Student's *t*-Tests für unabhängige Stichproben (Vergleich Zeitpunkt 0 vs. Zeitpunkt *x*).

Zeit [min]	A2780			A2780cis		
	Mittelwert	SD	<i>p</i> -Wert	Mittelwert	SD	<i>p</i> -Wert
Glucosehaltige Bedingungen						
0	98,63	3,4	n.v.	94,59	3,4	n.v.
5	91,82	5,6	n.s.	92,61	8,4	n.s.
10	97,15	2,3	n.s.	98,04	1,4	n.s.
20	100,17	6,3	n.s.	101,64	2,6	0,0467
30	98,77	4,7	n.s.	100,12	8,4	n.s.
60	103,43	4,2	n.s.	102,17	3,0	0,0455
80	97,60	2,6	n.s.	99,38	2,1	n.s.
120	95,61	2,4	n.s.	100,55	4,0	n.s.
Glucosefreie Bedingungen						
0	98,68	5,7	n.v.	93,60	13,1	n.v.
5	98,09	4,0	n.s.	98,01	10,7	n.s.
10	93,34	1,2	n.s.	94,92	2,5	n.s.
20	91,52	1,4	n.s.	97,65	1,5	n.s.
30	94,17	4,1	n.s.	99,01	5,6	n.s.
60	96,01	2,6	n.s.	99,33	1,7	n.s.
80	96,78	3,0	n.s.	95,51	3,9	n.s.
120	92,63	4,2	n.s.	92,94	4,9	n.s.

*n.s.*: nicht signifikant, *n.v.*: nicht verfügbar

### D4 Zytotoxizität von Cisplatin

Vitalität [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin (2 h), nach Inkubation mit 50 nM Ouabain (1 h) und nach Präinkubation (1 h) mit 50 nM Ouabain und anschließender zweistündiger Koinkubation mit Cisplatin in einer finalen Konzentration von 100  $\mu$ M. In der Tabelle ist die mittlere Absorption [%] von vier unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Die Absorption der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

Behandlung	A2780		A2780cis	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
100 $\mu$ M Cisplatin	98,12	5,2	94,83	3,9
50 nM Ouabain, Präinkubation (1 h)	82,16	3,4	76,62	5,3
50 nM Ouabain	89,51	3,3	85,79	4,8

**D5 Proteinexpression der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$** 

Densitometrische Analyse der Chemolumineszenz aus drei unabhängigen Western Blot-Analysen. In der Tabelle ist das relative Verhältnis der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$  zu  $\beta$ -Actin dargestellt ( $n = 3 - 6$ ; Student's t-Test für unabhängige Stichproben).

Behandlung	A2780				A2780cis			
	Mittelwert	SD	p-Wert	n	Mittelwert	SD	p-Wert	n
Kontrolle	1,910	0,575	n.v.	6	1,234	0,263	n.v.	6
1 h Cisplatin (5 $\mu$ M)	0,934	0,496	0,0413	3	1,416	0,470	n.s.	3
2 h Cisplatin (5 $\mu$ M)	1,478	0,153	n.s.	3	0,849	0,158	n.s.	3
1 h Ouabain (50 nM) + 2 h Cisplatin (5 $\mu$ M)	1,053	0,235	0,0463	3	1,260	0,506	n.s.	3
1 h Ouabain (50 nM)	0,996	0,297	0,0392	3	1,017	0,358	n.s.	3
1 h Oligomycin (1 $\mu$ M)	0,697	0,096	0,0098	3	1,355	0,306	n.s.	3

*n.s.: nicht signifikant, n.v.: nicht verfügbar*



## Appendix E

### Ergebnisse zum Einfluss von Sorafenib auf die Platinsensitivität

#### E1 Zytotoxizität von Sorafenib

Zytotoxizität von Sorafenib in A2780- und A2780cis-Zellen in glucosehaltigem Medium nach einer Inkubation über 72 h. In der Tabelle ist die mittlere Absorption aus einem repräsentativen Experiment ( $n = 3$ ) aus einer Reihe von 14 unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Die Absorption der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

log c [Sorafenib]	A2780				A2780cis			
	Absorption [%]		Absorption		Absorption [%]		Absorption	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	100,00	6,8	1,032	0,071	100,00	6,7	0,402	0,027
-8,00	105,91	8,8	1,093	0,091	101,08	14,4	0,407	0,058
-7,30	105,39	1,3	1,088	0,014	101,74	7,1	0,409	0,029
-7,00	102,33	4,7	1,056	0,049	105,55	15,1	0,425	0,061
-6,30	102,16	2,2	1,054	0,023	108,12	7,6	0,435	0,031
-6,00	83,43	6,2	0,861	0,064	91,05	1,6	0,366	0,006
-5,60	48,29	3,1	0,498	0,032	66,45	5,2	0,267	0,021
-5,30	18,15	3,1	0,187	0,032	16,74	0,1	0,067	0,001
-5,00	2,78	1,0	0,029	0,010	14,66	0,9	0,059	0,004
-4,82	1,65	0,1	0,017	0,001	4,06	0,4	0,016	0,002

#### E2 Influx von Cisplatin

Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in A2780- und A2780cis-Zellen nach Präinkubation mit bzw. ohne 4,374  $\mu\text{M}$  Sorafenib bis zu 6 h und einstündiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin. In der Tabelle ist der mittlere Platingehalt aus drei unabhängigen Versuchstagen angegeben.

Präinkubationszeit [h]	A2780		A2780cis	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
100 $\mu\text{M}$ Cisplatin				
0,5	5,999	2,02	1,221	0,38
2	5,518	1,34	1,663	0,53
4	5,613	1,98	1,704	1,05
6	7,008	4,80	1,993	1,43
4,374 $\mu\text{M}$ Sorafenib (Präinkubation)				
0,5	4,999	1,99	1,286	0,15
2	5,770	0,88	1,543	0,37
4	4,190	0,38	1,497	0,18
6	3,840	0,77	1,413	0,22

Intrazellulärer Platingehalt in % bezogen auf die Kontrolle und in  $\mu\text{mol/g}$  Protein in A2780- und A2780cis-Zellen nach einstündiger Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin ohne und mit vierstündiger Präinkubation mit unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen ( $0 - 75 \mu\text{M}$ ). In der Tabelle ist der mittlere Platingehalt aus zwei bis sechs unabhängigen Versuchstagen angegeben. Der Platingehalt der nur mit Cisplatin behandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich  $100 \%$  gesetzt.

log c [Sorafenib]	n	A2780				A2780cis			
		Intrazellulärer Platingehalt							
		[%]		[ $\mu\text{mol/g}$ Protein]		[%]		[ $\mu\text{mol/g}$ Protein]	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	5	100,00	14,6	3,069	0,45	100,00	16,5	0,897	0,15
-10,00	4	99,81	18,1	3,063	0,56	83,76	17,5	0,751	0,16
-9,00	4	107,27	22,4	3,292	0,69	94,84	20,4	0,850	0,18
-8,00	5	117,82	29,8	3,615	0,92	96,10	18,9	0,862	0,17
-7,30	4	98,58	19,1	3,025	0,59	91,07	15,8	0,817	0,14
-7,00	5	107,49	15,5	3,298	0,48	106,88	6,8	0,958	0,06
-6,00	4	93,78	21,0	2,878	0,64	88,92	22,0	0,797	0,20
-5,60	3	76,71	14,1	2,354	0,43	81,42	3,9	0,730	0,04
-5,30	4	72,59	12,3	2,227	0,38	88,32	5,3	0,792	0,05
-5,00	5	77,13	20,2	2,367	0,62	95,30	20,4	0,855	0,18
-4,30	6	86,51	27,4	2,655	0,84	151,59	30,3	1,359	0,27
-4,12	2	92,39	6,0	2,835	0,18	211,54	10,1	1,897	0,09

Intrazellulärer Platingehalt in % bezogen auf die Kontrolle und in  $\mu\text{mol/g}$  Protein in A2780- und A2780cis-Zellen nach einstündiger Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin ohne und mit vierstündiger Präinkubation mit unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen ( $0 - 50 \mu\text{M}$ ). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Reihe von vier unabhängigen Versuchstagen. Der Platingehalt der nur mit Cisplatin behandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich  $100 \%$  gesetzt.

log c [Sorafenib]	A2780				A2780cis			
	Intrazellulärer Platingehalt							
	[%]		$[\mu\text{mol/g Protein}]$		[%]		$[\mu\text{mol/g Protein}]$	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	100,00	17,0	2,515	0,427	100,00	31,7	0,772	0,245
-10,0	113,76	12,2	2,861	0,308	90,10	4,3	0,696	0,033
-9,0	107,00	5,0	2,691	0,127	84,09	7,9	0,650	0,061
-8,0	99,17	2,9	2,494	0,072	105,26	3,6	0,813	0,027
-7,3	105,33	5,5	2,650	0,139	100,41	1,7	0,776	0,013
-7,0	103,96	11,9	2,615	0,298	131,37	18,2	1,015	0,141
-6,0	102,06	6,2	2,567	0,157	83,21	23,6	0,643	0,183
-5,6	73,82	4,3	1,857	0,107	90,65	6,0	0,700	0,046
-5,3	77,21	8,4	1,942	0,211	105,78	2,7	0,817	0,021
-5,0	69,23	6,5	1,742	0,163	100,63	13,4	0,777	0,103
-4,3	79,19	14,8	1,992	0,372	146,38	20,0	1,131	0,155

Vitalität [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Sorafenibkonzentrationen über 4 h. In der Tabelle ist die mittlere Absorption [%] von sechs unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Die Absorption der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich  $100 \%$  gesetzt.

Sorafenibkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	A2780			A2780cis		
	Mittelwert	SD	p-Wert	Mittelwert	SD	p-Wert
2,5	103,12	9,5	n.s.	89,71	3,5	0,0205
5,0	91,44	7,6	n.s.	86,64	6,5	0,0129
7,5	82,02	15,5	n.s.	74,10	15,6	0,0204
10,0	60,67	9,5	0,0014	54,24	21,9	0,0068

n.s.: nicht signifikant

Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin (bis zu 3 h) sowie vierstündiger Präinkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib und anschließender Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin über einen Zeitraum von bis zu 3 h. In der Tabelle ist jeweils der mittlere Platingehalt aus drei unabhängigen Versuchstagen angegeben.

Zeit [min]	A2780		A2780cis	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
100 $\mu\text{M}$ Cisplatin				
10	0,439	0,06	0,287	0,06
20	1,093	0,55	0,366	0,12
60	3,587	0,72	1,076	0,29
120	10,767	1,74	2,759	0,42
180	14,469	2,07	4,045	0,40
5 $\mu\text{M}$ Sorafenib, Präinkubation (4 h)				
10	0,476	0,21	0,258	0,06
20	0,774	0,45	0,306	0,12
60	2,678	0,24	0,845	0,08
120	7,111	0,86	2,399	0,45
180	8,655	1,18	4,186	0,42

### E3 Zytotoxizität von Cisplatin

Vitalität [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin (1 h) sowie nach Präinkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib (4 h) und anschließender einstündiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin. In der Tabelle ist die mittlere Absorption [%] von drei unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Die Absorption der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

Behandlung	A2780		A2780cis	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
100 $\mu\text{M}$ Cisplatin	88,21	2,9	88,21	7,1
5 $\mu\text{M}$ Sorafenib, Präinkubation (4 h)	90,39	9,1	90,54	4,7

#### E4 Ermittlung der Kombinationsindices für Cisplatin und Sorafenib

In der Tabelle sind die  $(D)_1$ -,  $(D)_2$ - und CI-Werte nach Kombination von Sorafenib und Cisplatin in verschiedenen Kombinationsverhältnissen dargestellt ( $n = 17$ ).

[%] EC <sub>50</sub>	A2780			A2780cis		
	(D) <sub>1</sub> Sorafenib [µM]	(D) <sub>2</sub> Cisplatin [µM]	CI	(D) <sub>1</sub> Sorafenib [µM]	(D) <sub>2</sub> Cisplatin [µM]	CI
Fixe Cisplatinkonzentration						
2,5	2,219	0,050	0,940	2,869	0,380	0,944
10	2,600	0,220	1,177	3,266	1,540	1,147
20	2,878	0,430	1,389	3,541	3,070	1,335
40	2,290	0,860	1,346	2,323	6,140	1,145
60	3,137	1,290	1,896	2,727	9,210	1,474
70	n.b.	n.b.	n.b.	2,474	10,750	1,493
80	2,894	1,720	1,996	2,024	12,788	1,449
81	2,839	1,750	1,987	n.b.	n.b.	n.b.
90	n.b.	n.b.	n.b.	1,653	13,820	1,430
100	2,384	2,150	1,985	3,129	15,350	2,003
105	2,806	2,250	2,206	n.b.	n.b.	n.b.
120	3,064	2,580	2,466	2,844	18,42	2,112
Fixe Sorafenibkonzentration						
2,5	3,064	2,580	2,466	0,312	12,067	2,112
10	0,061	2,575	1,223	0,624	12,788	0,857
20	0,242	2,222	1,133	1,248	15,044	0,886
40	0,484	2,185	1,216	1,872	13,864	1,033
60	0,968	2,826	1,714	2,496	14,046	1,380
80	1,452	2,672	1,843	3,120	17,029	1,503
100	1,936	3,116	2,249	2,869	0,380	1,715
105	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
120	2,420	0,655	1,304	3,266	1,540	2,109
	<b>MW</b>		1,651	<b>MW</b>		1,413
	<b>SD</b>		0,46	<b>SD</b>		0,40
	<b>SE</b>		0,11	<b>SE</b>		0,10
	<b>Median</b>		1,714	<b>Median</b>		1,430
	<b>IQR</b>		0,77	<b>IQR</b>		0,52
	<b>95 %-Konfidenzintervall</b>		[1,413; 1,889]	<b>95 %-Konfidenzintervall</b>		[1,208; 1,617]

IQR: Interquartilsabstand, n.b.: nicht bestimmt, SE: Standardfehler

### E5 Einfluss von Sorafenib auf den intrazellulären ATP-Gehalt

ATP-Gehalt [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation ohne bzw. mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib über einen Zeitraum von bis zu 6 h unter glucosehaltigen Bedingungen. In der Tabelle ist der mittlere ATP-Gehalt [%] von vier unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt. Die p-Werte sind Ergebnisse des Student's t-Tests für unabhängige Stichproben (Vergleich Zeitpunkt 0 vs. Zeitpunkt x).

Zeit [h]	A2780			A2780cis		
	MW	SD	p-Wert	MW	SD	p-Wert
0	97,20	4,8	n.v.	95,36	14,8	n.v.
0,1	100,02	8,8	n.s.	94,24	13,7	n.s.
0,2	94,03	8,3	n.s.	94,95	6,2	n.s.
0,5	96,05	8,1	n.s.	92,17	7,9	n.s.
1	94,05	3,9	n.s.	95,20	5,3	n.s.
2	86,04	2,5	0,0060	97,17	5,7	n.s.
4	87,10	4,3	0,0201	98,40	13,5	n.s.
6	88,41	1,1	0,0113	95,90	10,0	n.s.

n.s.: nicht signifikant, n.v.: nicht verfügbar

ATP-Gehalt [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Sorafenibkonzentrationen (0,5 – 100  $\mu\text{M}$ ) über 4 h unter glucosefreien Bedingungen. In der Tabelle ist der mittlere ATP-Gehalt [%] aus einem repräsentativen Experiment ( $n = 3$ ) aus einer Reihe von vier unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

log c [Sorafenib]	A2780		A2780cis	
	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	100,00	2,06	100,00	4,30
-6,30	96,30	1,70	97,37	2,64
-6,00	94,37	1,25	99,28	2,68
-5,60	86,97	1,13	88,15	2,00
-5,30	45,13	8,85	68,31	3,57
-5,00	7,57	1,64	19,90	3,71
-4,30	14,48	1,02	22,97	1,39
-4,00	11,84	1,63	2,52	0,18

ATP-Gehalt [%] der A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Sorafenibkonzentrationen (0,5 – 10  $\mu$ M) über 4 h unter glucosehaltigen Bedingungen. In der Tabelle ist der mittlere ATP-Gehalt [%] von drei bis sechs unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der ATP-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

log c [Sorafenib]	A2780			A2780cis		
	MW	SD	n	MW	SD	n
Kontrolle	99,51	1,9	3	98,19	1,6	3
-6,30	99,40	2,4	3	96,57	2,6	3
-6,00	91,14	4,8	6	87,81	8,1	6
-5,60	84,44	9,6	6	76,49	18,4	6
-5,30	73,93	21,0	6	82,69	23,2	6
-5,00	96,46	31,6	6	92,48	24,6	6

## E6 Zytotoxizität von Carboplatin

Zytotoxizität von Carboplatin in A2780- und A2780cis-Zellen in glucosehaltigem Medium nach Inkubation über 72 h. In der Tabelle ist die mittlere Absorption aus einem repräsentativen Experiment ( $n = 3$ ) aus einer Reihe von 12 unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Die Absorption der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 100 % gesetzt.

log c [Carboplatin]	A2780				A2780cis			
	Absorption [%]		Absorption		Absorption [%]		Absorption	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	100,00	5,7	0,934	0,053	100,00	2,7	0,676	0,019
-7,0	103,03	5,4	0,962	0,050	103,21	4,1	0,697	0,028
-6,5	98,00	4,7	0,915	0,044	99,61	5,3	0,673	0,036
-6,0	95,43	4,6	0,891	0,043	102,61	4,3	0,693	0,029
-5,5	78,65	3,8	0,734	0,035	101,73	3,1	0,687	0,021
-5,0	57,52	2,7	0,537	0,026	99,06	1,1	0,669	0,008
-4,5	36,84	0,5	0,344	0,005	93,14	3,1	0,629	0,021
-4,0	2,78	0,2	0,026	0,002	49,24	2,6	0,333	0,018
-3,5	2,00	0,1	0,019	0,001	2,22	0,1	0,015	0,001
-3,0	1,64	0,1	0,015	0,001	1,83	0,1	0,012	0,001



## E7 Influx von Carboplatin

Intrazellulärer Platingehalt in % bezogen auf die Kontrolle und in  $\mu\text{mol/g}$  Protein in A2780- und A2780cis-Zellen nach zweistündiger Inkubation mit  $200 \mu\text{M}$  Carboplatin ohne und mit vierstündiger Präinkubation mit unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen ( $0 - 100 \mu\text{M}$ ). In der Tabelle ist der mittlere Platingehalt aus einer Reihe von zwei bis drei unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Der Platingehalt der nur mit Carboplatin behandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich  $100 \%$  gesetzt.

		A2780				A2780cis			
		Intrazellulärer Platingehalt							
		[%]		$[\mu\text{mol/g Protein}]$		[%]		$[\mu\text{mol/g Protein}]$	
log c [Sorafenib]	n	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle	3	100,00	4,7	4,284	0,20	100,00	26,0	1,210	0,31
-8,00	3	110,69	7,1	4,741	0,30	87,60	15,7	1,060	0,19
-7,00	3	111,52	7,4	4,777	0,32	96,85	12,1	1,172	0,15
-6,00	3	104,59	17,4	4,480	0,74	91,06	25,9	1,102	0,31
-5,60	3	98,13	2,4	4,204	0,10	85,92	7,6	1,040	0,09
-5,30	3	80,37	18,4	3,443	0,79	87,82	23,2	1,063	0,28
-5,00	3	55,13	7,5	2,362	0,32	78,69	11,3	0,953	0,14
-4,30	3	57,87	5,1	2,479	0,22	110,39	23,8	1,336	0,29
-4,12	2	71,89	17,3	3,079	0,74	132,45	18,7	1,603	0,23
-4,00	2	90,98	0,4	3,897	0,02	128,83	10,1	1,559	0,12

Intrazellulärer Platingehalt in % bezogen auf die Kontrolle und in  $\mu\text{mol/g}$  Protein in A2780- und A2780cis-Zellen nach zweistündiger Inkubation mit  $200 \mu\text{M}$  Carboplatin ohne und mit vierstündiger Präinkubation mit unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen ( $0 - 100 \mu\text{M}$ ). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Reihe von drei unabhängigen Versuchstagen. Der Platingehalt der nur mit Carboplatin behandelten Zellen (Kontrolle) wurde gleich  $100 \%$  gesetzt.

		A2780				A2780cis			
		Intrazellulärer Platingehalt							
		[%]		$[\mu\text{mol/g Protein}]$		[%]		$[\mu\text{mol/g Protein}]$	
log c [Sorafenib]		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontrolle		100,00	9,9	4,053	0,403	100,00	27,3	0,858	0,234
-8,00		121,03	15,0	4,906	0,609	100,77	17,5	0,865	0,150
-7,00		107,67	21,9	4,364	0,888	118,67	21,1	1,018	0,181
-6,00		97,28	11,8	3,943	0,479	87,25	34,9	0,749	0,300
-5,60		106,44	10,1	4,314	0,411	109,16	7,7	0,937	0,066
-5,30		72,10	10,7	2,922	0,433	99,82	8,8	0,857	0,076
-5,00		54,53	2,9	2,210	0,119	102,72	13,9	0,881	0,119
-4,30		69,94	7,8	2,835	0,316	117,94	9,3	1,012	0,080
-4,12		62,16	10,3	2,519	0,417	137,39	32,0	1,179	0,274
-4,00		95,52	13,7	3,872	0,555	205,51	48,2	1,764	0,414

Intrazellulärer Platingehalt [ $\mu\text{mol/g Protein}$ ] in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit 200  $\mu\text{M}$  Carboplatin (bis zu 3 h) sowie vierstündiger Präinkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib und anschließender Inkubation mit 200  $\mu\text{M}$  Carboplatin über einen Zeitraum von bis zu 3 h. In der Tabelle ist jeweils der mittlere Platingehalt aus einer Reihe von drei unabhängigen Versuchstagen dargestellt.

Zeit [min]	A2780		A2780cis	
	MW	SD	MW	SD
	200 $\mu\text{M}$ Carboplatin			
10	0,337	0,01	0,150	0,01
20	0,633	0,16	0,207	0,04
60	2,148	0,36	0,570	0,10
120	4,206	0,42	1,155	0,09
180	6,268	0,94	1,574	0,50
	5 $\mu\text{M}$ Sorafenib, Präinkubation (4 h)			
10	0,325	0,13	0,163	0,02
20	0,491	0,13	0,210	0,06
60	1,588	0,24	0,538	0,05
120	3,110	0,38	1,108	0,25
180	3,882	0,92	1,755	0,47

### E8 Ermittlung der Kombinationsindices für Carboplatin und Sorafenib

In der Tabelle sind die  $(D)_1$ -,  $(D)_2$ - und CI-Werte nach Kombination von Sorafenib und Carboplatin in verschiedenen Kombinationsverhältnissen dargestellt ( $n = 16$ ).

[%] $EC_{50}$	A2780			A2780cis		
	$(D)_1$	$(D)_2$	CI	$(D)_1$	$(D)_2$	CI
	Sorafenib [ $\mu$ M]	Carboplatin [ $\mu$ M]		Sorafenib [ $\mu$ M]	Carboplatin [ $\mu$ M]	
Fixe Carboplatinkonzentration						
2,5	2,016	0,670	0,858	2,656	3,340	0,876
10	3,218	2,690	1,430	3,170	13,370	1,116
20	2,911	5,380	1,403	2,625	26,750	1,042
40	4,403	10,770	2,220	2,414	53,490	1,174
60	3,258	16,150	1,947	2,359	80,240	1,356
80	2,755	21,540	1,939	3,016	106,990	1,767
100	3,065	26,920	2,267	5,106	133,740	2,637
120	1,868	32,310	1,973	5,245	160,480	2,881
Fixe Sorafenibkonzentration						
2,5	0,060	8,785	0,351	0,080	136,300	1,045
10	0,240	21,070	0,882	0,310	134,500	1,105
20	0,480	13,028	0,683	0,620	140,700	1,251
40	0,970	22,442	1,235	1,250	141,200	1,457
60	1,450	46,115	2,314	1,870	155,400	1,762
80	1,940	69,130	3,372	2,500	175,800	2,116
100	2,420	84,346	4,136	3,120	172,400	2,290
120	2,900	92,018	4,619	3,740	75,626	1,764
	<b>Mittelwert</b>		1,977	<b>Mittelwert</b>		1,602
	<b>SD</b>		1,21	<b>SD</b>		0,61
	<b>SE</b>		0,30	<b>SE</b>		0,15
	<b>Median</b>		1,943	<b>Median</b>		1,407
	<b>IQR</b>		1,23	<b>IQR</b>		0,83
	<b>95 %-Konfidenzintervall</b>		[1,334; 2,619]	<b>95 %-Konfidenzintervall</b>		[1,278; 1,926]

IQR: Interquartilsabstand, SE: Standardfehler