
Aus dem Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) [IFZ]
der Universität Essen

“Molekulare Dosimetrie Platin-induzierter DNA-Läsionen“

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt
dem Fachbereich
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
der Universität-Gesamthochschule Essen

von
Bernd Liedert
aus Gelsenkirchen

Essen, im Juli 2001

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) [IFZ] der Universität Essen unter Leitung von PD. Dr. J. Thomale durchgeführt.

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von 1996-1998 durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Projektes „Entwicklung monoklonaler Antikörper und immunanalytischer Verfahren zur molekularen Dosimetrie Cis-, Carbo- und Lobaplatin-induzierter DNA-Addukte“ gefördert. Ab 1999 erfolgte die Förderung durch die DFG-Forschergruppe „Tumorselektive Therapie und Therapieresistenz: Grundlagen und Klinik“

1. Gutachter: PD. Dr. J. Thomale

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Obe

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Dr. H.-W. Denker

Tag der mündlichen Prüfung: 25.9.2001

Inhaltverzeichnis

	ZUSAMMENFASSUNG	1
1	EINFÜHRUNG UND STAND DER FORSCHUNG	4
1.1	Zur klinischen Bedeutung von Platin-Verbindungen	4
1.1.1	Indikation	4
1.1.2	Nebenwirkungen	4
1.1.3	Resistenz	5
1.2	Analytische Verfahren zum Nachweis von Pt-DNA Addukten	5
1.2.1	¹ H-NMR - Analyse chromatographisch isolierter Pt-DNA Addukte	7
1.2.2	PCR und "Host Cell Reactivation Assay"	7
1.2.3	Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) Inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS) ³² P-Postlabelling	7
1.2.4	Immunanalytik von Pt-DNA Addukten	8
1.2.4.1	Immunisierungsstrategien zur Gewinnung von Antikörpern gegen Cisplatin-induzierte Pt-DNA Addukte	8
1.2.4.2	Kompetitiver ELISA und Immunhistochemie	8
1.2.4.3	Sensitivität verschiedener analytischer Verfahren	9
1.3	Pharmakokinetik und Pharmakodynamik	10
1.3.1	Resistenzvermittlung über Wirkstoffexport	10
1.3.2	Intrazelluläre Detoxifizierung	12
1.3.3	Bildung von Platin - DNA Addukten	12
1.3.3.1	Gewebespezifität der Adduktbildung	12
1.3.3.2	Häufigkeitsverteilung der DNA-Läsionen nach Exposition mit <i>Cis-</i> oder <i>Carboplatin</i>	13
1.3.3.3	Addukt-induzierte Veränderung der DNA-Architektur	13

1.3.4	Nukleotid Exzisionsreparatur von Pt-DNA Addukten	13
1.3.4.1	Addukt-Spezifität der Nukleotid Exzisionsreparatur	14
1.3.4.2	Interindividuelle Unterschiede in der Prozessierung von Chemotherapie induzierten Pt-DNA Addukten	14
1.3.4.3	Bedeutung einzelner Komponenten der NER-Reparatur für die Platin- Sensitivität von Zellen und Geweben	15
1.3.4.4	Maskierung von Pt-DNA Addukten durch „Damage Recognition“-Proteine	15
1.3.4.5	Gen-spezifische Reparatur von Pt-DNA Addukten	16
1.3.5	“Replicative Bypass“ von Pt-DNA Addukten	16
1.3.6	Addukt-Toleranz und Apoptose	16
1361	Die Rolle der „Mismatch“-Reparatur-Proteine als Apoptose – Induktoren	17
1.4	Prognostische Aussagekraft von Pt - DNA Addukt – Messungen	18
1.4.1	Zusammenhang von Chemotherapie-induziertem Adduktgehalt und Therapieerfolg	18
1.4.2	Prädiktive Korrelation des Pt-DNA Addukt Gehalts nach <i>Cisplatin</i> - Chemotherapie und nach <i>ex vivo</i> -Exposition	19
1.5	Chemoprotektion und Resensitivierung	20
1.5.1	Chemoprotektoren	20
1.5.2	Modulation von Pt-DNA Adduktbildung, -elimination und –toleranz	20
1.5.3	Neue Platinkomplexe	20
1.5.4	Intervention mit Antisense-Konstrukten und Gen-therapeutische Ansätze zur Revertierung einer Cisplatin-Resistenz	21
1.6	Ziel der Arbeit	21
2	ERGEBNISSE & KOMMENTARE	22
2.1	Generierung von Monoklonalen Antikörpern gegen <i>Cis</i> - bzw. – <i>Carboplatin</i> induzierte Pt-DNA-Addukte	22
2.1.1	in vitro-Platinierung von DNA	22

2.1.2	Entwicklung eines Enzym-Immunoassays (ELISA) zur Messung des Antikörpertiters im Serum und der immunologischen Aktivität von Hybridomüberständen	24
2.1.3	Immunisierung mit Konjugaten aus <i>Cisplatin</i> -exponierter Kalbsthymus-DNA und methyliertem BSA	24
2.1.4	Durchsuchen von Fusionsansätzen nach anti-(Pt-DNA) MAK-produzierenden Klonen: "Klassische" und Affinitäts-forcierte Methode	26
2.1.5	Reinigung monoklonaler Antikörper	29
2.2	Adduktspezifität von MAK gegen Pt-DNA Addukte	33
2.2.1	Entwicklung und Durchführung eines kompetitiven Enzym-Immunoassays	33
2.2.1.1	Pt-DNA als Inhibitor	33
2.2.1.2	Pt-Desoxynukleotide als Inhibitoren	35
2.2.2	"Retrospektive" Charakterisierung der MAK-Spezifität mit dem Postlabelling-Verfahren"	37
2.2.2.1	Generierung der Pt-DNA Fragmente	37
2.2.2.1	Filterbindung von MAK-(Pt-Addukt)- Komplexen	37
2.2.2.3	Identifizierung von Pt-DNA Addukten mit dem "Postlabelling"-Verfahren"	37
2.3	Etablierung und Optimierung des Immuncytologischen Assays (ICA) zum Nachweis Cis- bzw. Carboplatin induzierter Pt-DNA-Addukte auf Einzelzellebene	42
2.3.1	Immobilisierung von Zellen und Gewebeschnitten	42
2.3.2	Denaturierung	42
2.3.3	Proteolyse	42
2.3.4	Signalkaskade	44
2.3.5	Penetration der signalgebenden Komponenten des ICA	44
2.3.6	Messung	44
2.3.7	Linearität und Empfindlichkeit	46

2.4	Zellkultur - Modelle für <i>Cisplatin</i> -Resistenz	48
2.4.1	Humane Melanomzellen mit hoher oder niedriger Cisplatin-Empfindlichkeit	48
2.4.2	<i>Cisplatin</i> -empfindliche bzw. resistente Ovarialkarzinomzellen	51
2.5	Prozessierung von Pt-DNA Addukten in murinen Reparatur- Knockout-Modellen	52
2.5.1	Zelltyp-spezifische Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten in der NER-kompetenten "C57 Bl / 6" Maus	52
2.5.2	Akuttoxizität von <i>Cisplatin</i> im XPA- und XPC- Knockout Mausmodell	56
2.5.3	Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten nach subtoxischer Applikation von <i>Cisplatin</i> im XPA- und XPC- Knockout Mausmodell	56
2.6	Immunfärbung von Pt-DNA Addukten in Lymphozyten und in Biopsiematerial von Patienten unter <i>Cisplatin</i> -Therapie	60
2.6.1	Pilotstudien zur Optimierung von Probennahme und Aufarbeitung	61
3	DISKUSSION	65
3.1	Die Einzelzellanalytik von Pt-DNA Addukten ist Voraussetzung für eine individualisierte Platin-Chemotherapie	65
3.1.1	Klinischer Einsatz von Platin-Komplexen	65
3.1.2	Resistenzen und Nebenwirkungen als pharmakologische Herausforderungen	65
3.1.3	Zelltyp-spezifische Prozessierung von Pt-DNA Addukten bestimmt die Zytotoxizität im Normal- und Tumorgewebe	65
3.1.4	Prognostischer Aussagekraft zellulärer Parameter für die Platin-Chemotherapie	66
3.1.5	Ziele	66
3.2	Generierung von Monoklonalen Antikörpern gegen <i>Cisplatin</i> -induzierte Pt-DNA-Addukte	67
3.2.1	Immunisierungsstrategien	67
3.2.2	Identifizierung und immuno-magnetische Selektion von anti-(Pt-DNA)- Hybridomklonen	68

3.3	Charakterisierung von anti-(Pt-DNA) MAK	69
3.3.1	Bedeutung der Addukt-spezifischen Toxizität	69
3.3.2	Charakterisierung von Antikörpern mit dem kompetitiven ELISA	70
3.3.3	Charakterisierung der MAK-Spezifität mit dem “retrospektiven” Postlabelling-Verfahren	71
3.4	Der Immuncytologischen Assay (ICA) zum Nachweis von Pt-DNA- Addukten auf Einzelzellebene	72
3.4.1	Vergleichende Bewertung alternativer analytischer Verfahren zur Messung von Pt-DNA Addukten	72
3.5	Zellkultur - Modelle für Cisplatin-Resistenz	74
3.6	Prozessierung von Pt-DNA Addukten im murinen XPA- und XPC- Knockout-Modell	76
3.6.1	Zelltyp-spezifische Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten in der NER-kompetenten “C57 Bl / 6” Maus	76
3.6.2	Akuttoxizität von <i>Cisplatin</i> im XPA- und XPC- Knockout Mausmodell	77
3.6.3	Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten nach subtoxischer Applikation von <i>Cisplatin</i> im XPA- und XPC- Knockout Mausmodell	79
3.7	Prognostische Aussagekraft von Pt - DNA Addukt - Messungen in Lymphozyten und in Biopsien von Patienten unter <i>Cisplatin</i> Therapie	81
3.7.1	Immunhistochemische Quantifizierung von Pt-DNA Addukten in Normal und Tumorgeweben nach Biopsien	81
3.7.2	Aussagekraft des Pt-DNA Adduktgehaltes in Lymphozyten für den Therapieerfolg	82
3.8	Ausblick: Zukünftige Bedeutung der Pt-DNA Adduktanalytik für die individualisierte Chemotherapie	83
4	EXPERIMENTELLER TEIL	84
4.1	Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen <i>Cis</i> - bzw. <i>Carboplatin</i> -induzierte Pt-DNA-Addukte	84
4.1.1	Antigensynthese: Konjugate aus <i>Cisplatin</i> -exponierter Kalbsthymus- DNA und mBSA	84

4.1.2	Immunisierung	84
4.1.3	Entwicklung eines Enzym-Immunoassays (ELISA) zur Messung des Antikörpertiters im Serum und der immunologischen Aktivität von Hybridomüberständen	84
4.1.4	Zell-Fusion	85
4.1.5	Haltungsbedingungen für Hybridome	86
4.1.6	Reklonierung der Hybridome	86
4.1.7	Reinigung monoklonaler Antikörper	86
4.1.7.1	Quantifizierung von Immunglobulinen	87
4.1.7.2	Typisierung von Immunglobulinen	87
4.1.8	Immunomagnetisches Screening von Hybridomkulturen	88
4.1.8.1	Immunfluoreszenz-Nachweis Zellmembran-ständiger Antikörper	88
4.1.8.2	Beschichtung von Magnetobeads mit Pt-DNA	88
4.1.8.3	Zellseparation	89
4.2	Adduktspezifität von MAK gegen <i>Cis</i> -bzw. <i>Carboplatin</i> -induzierte DNA-Addukte	89
4.2.1	Entwicklung eines kompetitiven Enzym-Immunoassays zur Charakterisierung von anti-(Pt-DNA) MAK	89
4.2.1.1	Pt-DNA Präparationen als Inhibitoren	90
4.2.1.2	Pt-Desoxynukleotide als Inhibitoren	91
4.2.1.3	Durchführung des kompetitiven Enzym-Immunoassays	91
4.2.2	“Retrospektive” Charakterisierung der MAK-Spezifität mit dem Postlabelling-Verfahren	91
4.2.2.1	Filterbindung	92
4.2.2.2	Postlabelling von Pt-DNA Intrastrang-Addukten	92
4.3	Etablierung und Optimierung des Immuncytologischen Assays (ICA) zum Nachweis <i>Cis</i> - bzw. <i>Carboplatin</i> induzierter Pt-DNA-Addukte auf Einzelzellebene	93
4.3.1	Zell-Immobilisierung	93
4.3.2	Immuncytologischer Assays (ICA)	93

4.4	Zellkultur - Modelle für erworbene <i>Cisplatin</i> -Resistenz	95
4.4.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	95
4.4.1.1	Kryokonservierung von Zellen	95
4.4.1.2	Mediumwechsel	95
4.4.1.3	Mykoplasmentest	95
4.4.1.4	Passagieren von Monolayer-Kulturen	95
4.4.2	Haltungsbedingungen für "Jurkat", "MeWo" und "MeWo Cis 1"- Zellen	95
4.4.3	Haltungsbedingungen für Ovarialkarzinomzellen	95
4.4.4	Platinbehandlung von Zellen	96
4.4.5	SYBR Green I- Proliferationstest	97
4.4.6	MTT- Zellvitalitäts-Test	97
4.4.7	FACS-Zellzyklusanalyse	98
4.5	Tiermodelle zur Prozessierung von Pt-DNA Addukten	98
4.5.1	Isolierung von DNA	98
4.5.2	Genotypisierung der XPA – Knockout Mäuse	98
4.5.3	Behandlung der Tiere	101
4.5.4	Isolierung von T-Lymphozyten aus Blutproben mit Magneto-Beads	101
4.5.5	Organentnahme	101
4.5.6	Kryoschnitte	101
4.6	Immunfärbung von Pt-DNA Addukten in humanen Lymphozyten und Biopsiematerial	102
4.6.1	Isolierung der T-Lymphozyten	102
4.6.2	Biopsieproben	102
4.7	Allgemeine Methoden	102
4.7.1	<i>in vitro</i> -Platinierung von Kalbsthymus-DNA	102
4.7.2	Synthese von Desoxynukleotiden mit definierten Pt-DNA Addukten	104
4.7.3	DNA – Quantifizierung	105
4.7.4	Quantifizierung von Desoxynukleotiden	105

4.7.5	Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)	105
4.7.6	Proteinbestimmung	106
4.7.7	Chromatographische Verfahren	107
4.7.7.1	Entsalzung über Gelfiltration	107
4.7.7.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie über "T- Gel"	107
4.7.7.3	Chromatographie über "Protein G"	108
4.7.7.4	Chromatographischer Nachweis von Pt-DNA Intrastrang-Addukten	108
4.7.7.5	Radiochromatographie	110
4.7.8	Elektrophoretische Verfahren	110
4.7.8.1	Polyacrylamid-Gelsysteme	110
4.7.8.1.1	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Desoxynukleotide	110
4.7.8.1.2	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese für Proteine	111
4.7.8.2	Agarose-Gel	112
4.7.9	Hämatoxylin - Eosin (HE) - Färbung von Kryoschnitten	112
4.7.10	Tierhaltung	113
5	LITERATUR	114
6	ANHANG	133
6.1	Geräte	133
6.2	Technisches Zubehör	134
6.3	PC-Programme	134
6.4	Chemikalien	134
6.5	Radiochemikalien	135
6.6	Puffer und Lösungen	135
6.7	Kits	135
6.8	Molekulargewichtsstandards	135
6.9	Enzyme	135

6.10	Antikörper	135
6.11	Nukleinsäuren	136
6.12	PCR-Primer	136
6.13	Zell-Linien & Nährmedien	136
6.14	Versuchstierstämme	136
6.15	Abkürzungsverzeichnis	137

Zusammenfassung

In der internistischen Onkologie gehören die Substanzen *Cis-* und *Carboplatin* seit Jahren zu den wirksamsten Zytostatika bei der Behandlung solider Tumoren. Die molekularen Mechanismen der therapeutischen Wirkungen und Nebenwirkungen dieser Verbindungen, sowie die Ursache(n) eines Therapieversagens sind multifaktoriell und in ihrer Komplexität bisher weitgehend unverstanden geblieben. Die Aufklärung dieser pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Prozesse ist die Grundlage jeder chemoprotektiven bzw. resensitivierenden Intervention und damit des Fernziels einer individualisierten Chemotherapie.

Die Einwirkung von *Cis-* bzw. *Carboplatin* auf die zelluläre DNA ist interindividuell und Zelltyp-spezifisch sehr unterschiedlich. Unter anderem kontrollieren die Nierenfunktion, der Wirkstoffimport- und -export über die Zellmembran, sowie zytoplasmatische Detoxifizierungsprozesse das Ausmaß der initialen Pt-DNA Adduktbildung. Ähnlich heterogen ist die Leistungsfähigkeit der zellulären DNA-Reparatursysteme und schließlich die Toleranz der Zellen gegenüber bestehenden Läsionen. Wie die klinische Bedeutung dieser Faktoren für eine primäre oder erworbene Platin-Resistenz zu bewerten ist, kann bislang nicht beantwortet werden.

Im Rahmen klinisch realisierbarer Pt-Dosen ist die Möglichkeit, Tumorzellen zur Auslösung der Apoptose zu provozieren, wahrscheinlich das entscheidende Kriterium für ihre therapeutische Ansprechbarkeit. Bisher ist ungeklärt, welchen Anteil die einzelnen, strukturell verschiedenen Pt-DNA Addukte an diesem zytotoxischen Potential von *Cis-* und *Carboplatin* haben.

Da Bildung und Elimination dieser Addukte im Zentrum des pharmakologischen Geschehens stehen, ist die Entwicklung einer hinreichend empfindlichen Methode zur quantitativen Bestimmung definierter Platin-DNA-Läsionen auf dem Niveau individueller Zellen, d. h. eine molekulare Dosimetrie, der erfolgversprechenste Weg zur Beantwortung der offenen Fragen. In dieser Arbeit wurden mit dem Ziel einer immunhistochemischen Einzelzell-Analytik monoklonale Antikörper gegen die verschiedenen Pt-DNA Addukte generiert und charakterisiert.

Cisplatin-induzierte DNA Addukte sind in einen stereochemischen Kontext eingebunden, der offenbar weit über die koordinativen Bindungen der eigentlichen Läsion hinausreicht. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Nachahmung dieser Raumordnung mit platinieren Oligonukleotiden nicht möglich ist. Daher führt der „klassische“ Weg zur Generierung von spezifischen monoklonalen Antikörpern, d. h. die Immunisierung mit einem strukturell eindeutigen Antigen, nicht zum gewünschten Ziel. Aus diesem Grund wurde hier ein ganz neues Verfahren entwickelt: Die Immunaktivität der geimpften Tiere wurde mit platinierter DNA als Antigen zunächst gegen ein komplexes Epitopgemisch, d. h. gegen die Summe aller Addukte gerichtet. Anti-(Pt-DNA) positive Hybridome wurden nach der Fusion mit einem immunomagnetischen Separationsverfahren isoliert und kloniert.

Zur Charakterisierung ihrer Epitop-Spezifität wurden in einem weiteren Schritt den so generierten MAK auf DNA-Fragmenten vereinzelte Pt-Addukte zur Bindung angeboten. Die vom jeweiligen Antikörper erkannten Epitope wurden dann über ein Festphasen-Adsorptionsverfahren isoliert und die Platin-Addukte mit Hilfe einer ^{32}P -Postlabelling-assoziierten Radiochromatographie strukturell identifiziert.

Weit über die Platinanalytik hinaus bietet das in dieser Arbeit erstmals entwickelte „retrospektive“ Verfahren Zugang zu Strukturen, die von DNA-reaktiven Proteinen (wie z. B. Komponenten des DNA-Reparatursystems, von Faktoren der Genregulation oder von Strukturelementen der Chromatinarchitektur) im nativen Kontext erkannt und gebunden werden.

Mit Hilfe dieser MAK wurde dann ein Immunfluoreszenz-Nachweisverfahren entwickelt, mit dem es möglich ist, die einzelnen Pt-DNA Addukte in den Kernen von Normal- oder Tumorzellen zu quantifizieren. Die Methode bedarf im Prinzip nur weniger Einzelzellen, so daß bereits erfolgreiche Pilot-Untersuchungen an Biopsien von Magentumorpatienten unter *Cisplatin*-Chemotherapie durchgeführt werden konnten. Bezogen auf den einzelnen Zellkern liegt die Nachweisempfindlichkeit für die einzelnen Pt-Addukte im Sub-Atomol Bereich ($< 10^{18}$ Mol) und erlaubt daher auch Messungen, die im zeitlichen Abstand von Wochen nach der Applikation vorgenommen werden.

Cisplatin-Unempfindlichkeit von Tumoren kann vielfältige zellbiologische Ursachen haben, die in Zellkulturmodellen mit Paaren von sensitiven bzw. resistenten Zellen herausgetrennt aus der Komplexität eines Organismus analysiert werden können. In dieser Arbeit wurden humane Melanom- bzw. Ovarialkarzinomzellen untersucht, die sich in der Expression des ABC-Membrantransporters cMOAT unterschieden, der *Cisplatin*-Glutathionkomplexe aus der Zelle exportiert. Es konnte gezeigt werden, daß sich der Pt-Adduktgehalt in der genomischen DNA der Zellen umgekehrt proportional zur Expression und damit zur Aktivität der Membranpumpe verhielt. In den verschiedenen Zellen resultiert Äquitoxizität für Expositionskonzentrationen, welche gleiche Adduktspiegel induzieren. Auch die Platin-assoziierten Zellzyklusveränderungen zeigten sich als direkte Konsequenz der Pt-DNA Läsionen. Durch Transfektion mit cMOAT-Konstrukten oder anti-cMOAT-Ribozymen konnte die *Cisplatin*-Exportkapazität der Zellen, die Adduktbildung und damit die Toxizität verändert werden.

Da der Nukleotid Exzisions Reparatur (NER) Weg als wichtigster Mechanismus in der Prozessierung von Pt-DNA Läsionen angesehen wird, wurde in dieser Arbeit ferner der Beitrag der „Schadens-Erkennungsproteine“ XPA und XPC in entsprechenden murinen Knockout-Modellen untersucht. Verglichen mit den Wildtyp-Mäusen und XPC^{-/-}-Mäusen zeigten die XPA-Knockout Mäuse eine extreme Empfindlichkeit gegen *Cisplatin*.

Durch die Messungen von *in vivo* Reparatur Kinetiken wurde zum ersten Mal demonstriert, daß die Hypersensitivität mit einer nahezu kompletten Inkompetenz der NER-defizienten Mäuse einhergeht, spezifische Pt-DNA Addukte wie Pt-GG Intrastrang Läsionen aus verschiedenen Zelltypen zu entfernen.

DNA-Platinierungsprodukte werden durch XPA offensichtlich bereits auf der Stufe der frühen, intermediär auftretenden monovalenten Addukte prozessiert, so daß der funktionelle Ausfall zu einer exzessiven Bildung der bivalenten Intrastrang Addukte führt.

Der erstaunlich geringe Addukt-Gehalt in Lymphozyten, der in dieser Arbeit sowohl im Mausmodell wie auch in Patientenproben nachgewiesen wurde, beruht nicht auf der Fähigkeit dieser Zellen, solche frühen Eliminationen besonders effektiv zu realisieren: Obwohl der Addukt-Gehalt der XPA⁻-Lymphozyten erwartungsgemäß höher lag als der bei NER-kompetenten Tieren, erreichten die Maxima nie das Ausmaß, das beispielsweise in Zellen von Niere oder Leber gefunden wurde. Deshalb muß ein anderer, noch unbekannter Mechanismus für die geringe Belastung der hämatopoetischen Zellen vermutet werden.

In einer Pilotstudie wurden Magenkarzinom-Patienten *Cisplatin*-Therapie-begleitend auf die Bildung und Elimination spezifischer Pt- DNA Addukte untersucht. In peripheren Lymphozyten zeigte sich, daß der Pt-GG Gehalt über einen Zeitraum von 48 h nach Applikation kontinuierlich zunahm. Die Biopsien von Normal- und Tumorgewebe waren vor allem durch Zelltyp-spezifische Addukt-Belastung gekennzeichnet. Dieser Befund unterstreicht nachdrücklich die Notwendigkeit der Einzellanalytik. Schlußfolgerungen bezüglich der interindividuellen Unterschiede und der Aussagekraft der Messungen für den Therapieerfolg können aufgrund der ausstehenden Reihenuntersuchungen und Verlaufskontrollen bisher noch nicht formuliert werden.

Diese Analysen sollen mittelfristig zur Klärung der Frage beitragen, welche Bedeutung Bildung und Elimination bzw. Persistenz spezifischer Pt-DNA-Addukte für den Erfolg oder das Versagen einer Tumorthherapie mit Platin-Verbindungen haben und inwieweit an Lymphozyten erhobene Befunde repräsentativ auch für das Geschehen in anderen Zelltypen und besonders im Tumor sind. Außerdem wird es möglich sein, *Cisplatin*-synergistisch wirkende Substanzen wie z. B. Fludarabin, 5-Fluoruracil oder die Inhibitoren des EGF-Rezeptors bezüglich ihres Einflusses auf die Pt-DNA Addukte besser zu verstehen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit den in dieser Arbeit entwickelten Werkzeugen erstmals die genauen Wirkmechanismen der Platin-Zytostatika analytisch sind und damit molekulare Resistenzparameter in experimentellen Systemen und in klinischen Proben definiert werden können.

1 EINFÜHRUNG UND STAND DER FORSCHUNG

1.1 Zur klinischen Bedeutung von Platin-Verbindungen

1.1.1 Indikation

Der in seiner antineoplastischen Bedeutung erstmals 1965 von Rosenberg et al. erkannte Platinkomplex *Cisplatin* (cis-Diammindichloroplatin [II]) zählt zu den wichtigsten Zytostatika bei der Behandlung insbesondere von Hoden- und Ovarialkarzinomen (Higby et al., 1974).

1988 wurde in der Bundesrepublik *Carboplatin* (cis-Diammin-(1,1-dicarboxylatocyclobutan)-platin [II]) zugelassen, für welches bei vergleichbarer Wirksamkeit gegenüber soliden Tumoren eine im allgemeinen bessere Verträglichkeit dokumentiert wurde (Lebwohl & Canetta, 1998).

In den letzten Jahren haben beide Platinverbindungen weitgehenden Eingang in die Therapieprotokolle von Endometrium-, Zervix-, Blasen- und Prostatakarzinomen, von Osteosarkomen, sowie von Tumoren im Kopf- und Halsbereich gefunden (Petsko, 1995). Die Wirksamkeit der Substanzen konnte zudem für das kleinzellige und das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (Eberhardt et al., 1998; Havemann & Wolf, 1997) nachgewiesen werden und wird auch im Rahmen der Magenkarzinom-Therapie genutzt (Kath et al., 2000; Konishi et al., 1998).

Für einige Zytostatika-Kombinationen, beispielsweise der von *Cisplatin* und *5-Fluorouracil* beobachtet man eine über den additiven Synergismus hinausgehende Wirkungsverstärkung. Entsprechend formulierte Behandlungskonzepte sind daher in der Regel effizienter als die Monotherapie (Fujishima et al., 1997).

1.1.2 Nebenwirkungen

Neben der antineoplastischen Wirksamkeit beobachtet man für beide Platinverbindungen eine interindividuell unterschiedlich ausgeprägte systemische Toxizität (Kollmannsberger et al., 1999).

Eine Dosis-Eskalation der *Cisplatin*-Therapie wird insbesondere durch die Nephrotoxizität begrenzt, welche sich bei 15 – 30 % der Patienten sowohl in glomerulären wie auch in tubulären Schäden artikuliert (Cornelison & Reed, 1993). Die funktionelle Beeinträchtigung führt zu Protein- und Glukosurie, zu einem Anstieg von Harnstoff- und Kreatininkonzentration im Blut, zu Hypokaliämie und –calciämie und birgt die Gefahr eines akuten Nierenversagens (Lau, 1999).

Die *Cisplatin*-assoziierte Neurotoxizität resultiert vor allem aus einer Schädigung des peripheren Nervensystems, insbesondere der sensiblen Ganglien (Meijer et al., 1999) und kann sich in einer Polyneuropathie äußern. Mit unterschiedlicher Intensität können Parästhesien, afferente Ataxien, Areflexien und Paresen auftreten (Cano et al., 1998).

Ein teilweiser Verlust der extrem *Cisplatin*-empfindlichen Haarzellen des Innenohrs führt häufig zu Einbußen im Hörvermögen, besonders im Frequenzbereich über 4000 Hz (Smooenburg et al., 1999).

Carboplatin zeigt in äquitoxischen Dosen eine eindeutig niedrigere Nephrotoxizität (Lebwohl & Canetta, 1998), Neurotoxizität (Luo et al., 1999) und Ototoxizität (Delb et al., 1993). Dosis-limitierend ist die im Vergleich zum *Cisplatin* stärkere Myelotoxizität, welche die hämatologischen Nebenwirkungen wie Leukopenie, Thrombozytopenie und Anämie erklärt (Lokisch & Anderson, 1998).

Aufgrund des im Tierversuch nachweisbaren kanzerogenen Potentials sind für beide Platinverbindungen Chemotherapie-induzierte sekundäre Neoplasien, insbesondere Leukämien nicht völlig auszuschließen (Kempf & Ivankovic, 1986).

1.1.3 Resistenz

Manche Tumore, insbesondere Lungentumore können sich schon zu Beginn einer *Cisplatin*-Chemotherapie resistent verhalten, während andere Tumore wie z. B. Ovarialkarzinome den Resistenzphänotyp häufig erst unter Therapiedruck entwickeln (Reed et al., 1993).

Da *Cisplatin*-unempfindliche Tumore in der Regel auch *Carboplatin*-resistent sind (Lebwohl & Canetta, 1998), begrenzen sowohl inhärente als auch induzierte Resistenzen den Erfolg einer Platin-Therapie (Perez, 1998; Timmer-Bosscha et al., 1992; Trimmer & Essigmann, 1999).

Die klinische Therapie-Resistenz von Malignomen ist sehr wahrscheinlich bedingt durch das Auftreten verschiedener, oft synergistisch wirkender, systemischer und zellulärer Mechanismen (Crul et al., 1997; Details 1.3). Die Aufklärung dieses komplexen Zusammenspiels ist unabdingbare Grundlage jeder re-sensitivierenden, pharmakologischen oder genterapeutischen Intervention (1.6).

1.2 Analytische Verfahren zum Nachweis von Pt-DNA Addukten

Cis- und *Carboplatin* vermitteln ihr antineoplastisches Potential, indem sie mit unterschiedlicher Häufigkeitsverteilung bivalente Pt-DNA Intrastrang-Addukte vom Typ $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{d}(\text{pGpG})$, $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{d}(\text{pApG})$ und $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{d}(\text{pGpXpG})$ sowie $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{d}(\text{GMP})_2$ Interstrang-Addukte induzieren (Blommaert et al., 1995b; Fichtinger-Schepman et al., 1985a).

Diese DNA-Addukte (Abb. 1) können direkt durch Inhibition von Replikation und Transkription und indirekt durch die Auslösung des programmierten Zelltodes (Apoptose) zum Absterben der Zielzellen führen (1.3).

Um die zellbiologischen Grundlagen der antineoplastischen Platin-Wirkung, möglicher Resistenzen und der Nebenwirkungen untersuchen zu können ergab sich sehr bald die Notwendigkeit einer quantitativ-analytischen Erfassung der entsprechenden DNA-Läsionen. Die dazu bisher entwickelten und eingesetzten Methoden sind im Folgenden kurz dargestellt.

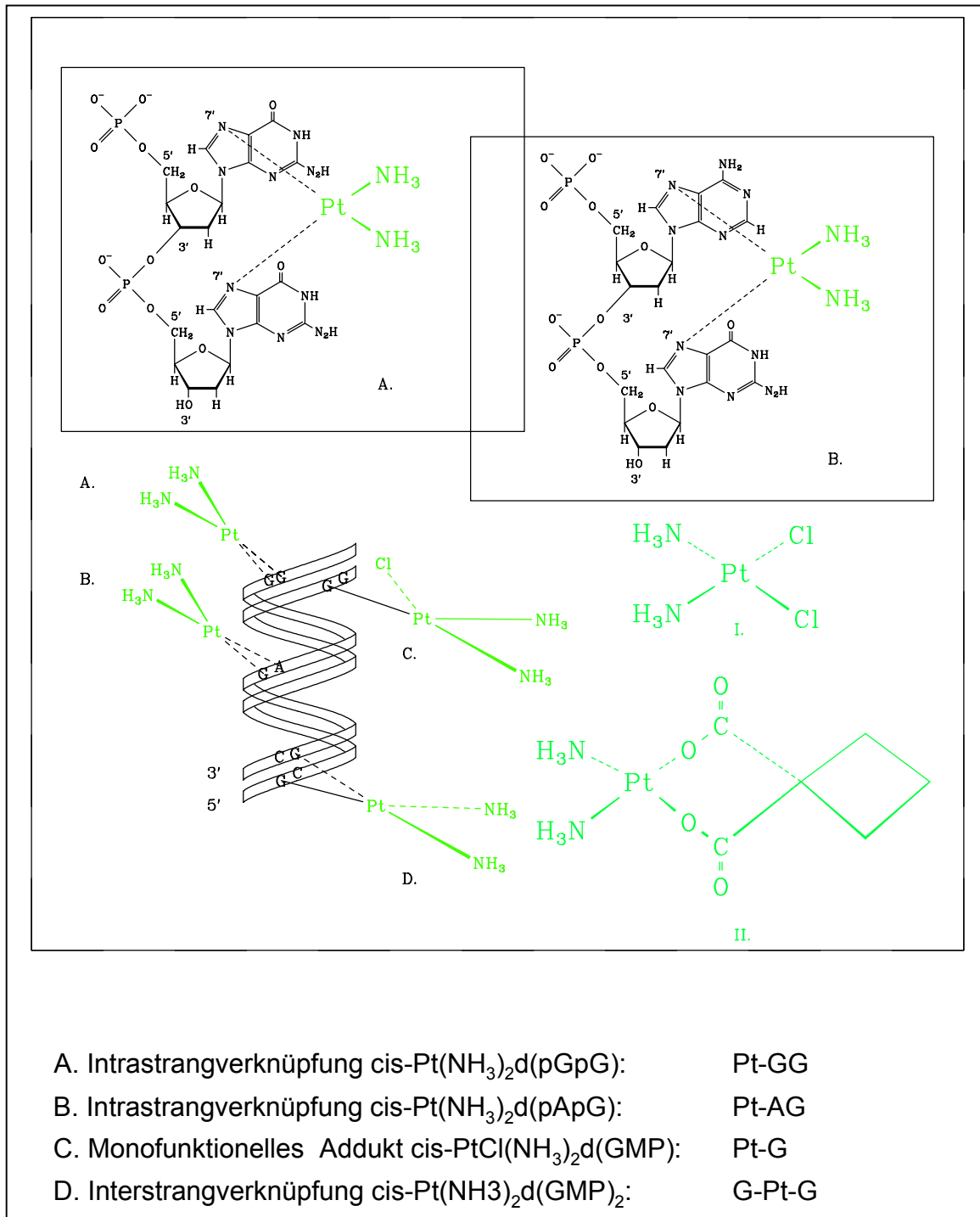


Abb. 1 Cis - (I.) bzw. Carboplatin (II.)-induzierte Pt-DNA Addukte

1.2.1 ¹H-NMR - Analyse chromatographisch isolierter Pt-DNA Addukte

Eine erste Identitätsklärung der *Cisplatin*-induzierten DNA-Addukte erfolgte durch Fichtinger-Schepman et al. 1982 (1.3.1.4.1). Hydrolysate von *in vitro* *Cis*- bzw. *Carboplatin*-exponierter DNA wurden chromatographisch aufgetrennt und die Pt-haltigen Fraktionen nachfolgend mit Hilfe der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (¹H-NMR) charakterisiert. Da für die Kernresonanz relativ große Absolutmengen an Analyt benötigt werden, ist das Verfahren für Zellkultur- und *in vivo* Experimente wenig geeignet. Die chromatographische Auftrennung hydrolysiertes Pt-DNA wurde später zur Basis einer Antikörper-gestützten Adduktanalytik (1.3.1.4.1).

1.2.2 PCR und "Host Cell Reactivation Assay"

Die Blockade der *Taq*-Polymerase durch Pt-DNA Addukte kann mit Hilfe der „single strand ligation PCR“ (Grimaldi et al., 1994a) zum qualitativen Nachweis genutzt werden. Nach demselben Prinzip arbeitet die „strand specific quantitativ PCR“ (Bingham et al., 1996; Grimaldi et al., 1994), mit der Aussagen zum Pt-DNA Adduktgehalt in definierten Genen möglich ist (1.3.1.7). Das Verfahren ist aufgrund seiner geringen Nachweisempfindlichkeit nur für Zellkulturexperimente nutzbar, da hier erheblich höhere Expositionskonzentrationen verwirklicht werden können als bei *in vivo*-Experimenten oder im Rahmen der Chemotherapie.

In Zellkultur ist die Adduktprozessierung indirekt durch die „host cell reactivation“ Addukt-spezifisch platinierter Plasmide meßbar (Mello et al., 1995; Yarema et al., 1994 & 1995; Zeng-Rong et al., 1995). Die von erfolgreicher Deplatinierung abhängige Expression des Reportergens wird dabei als Maß für die Fähigkeit der Zelle zur DNA-Reparatur gewertet. *In vivo* Untersuchungen sind hiermit jedoch nicht möglich.

1.2.3 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS)

³²P-Postlabelling

Die Atomabsorptionsspektroskopie erlaubt die Bestimmung des Gesamtplatingehaltes in isolierter DNA (Reed et al., 1990 a, b; & 1993). Eine auf spezifische Addukte begrenzte Messung ist nur möglich, wenn die DNA vorher hydrolysiert und chromatographisch aufgetrennt wurde. Die Methode ist empfindlich genug, um Chemotherapie-induzierte Pt-DNA Addukte zu erfassen (1.2.4.4.; 1.3.1.5.2; 1.4). Um etwa eine Größenordnung sensitiver, qualifiziert sich die „inductively coupled plasma mass spectroscopy“ für die Messung von Gesamtplatin im Rahmen von Langzeitkinetiken (Bonetti et al., 1996).

Das von Blommaert & Saris (1995) entwickelte und von Farah et al. (2000), Pluim et al. (1999) und Welters et al. (1997 & 1999a, b) optimierte ³²P-Postlabelling-Verfahren für Pt-DNA Addukte ist in der Lage, Pt-GG und Pt-AG in isolierter DNA getrennt zu quantifizieren. Die Methode ist sehr empfindlich und damit auch für klinische Proben geeignet (1.2.4.4.; 1.3.1.5.2; 1.4). Wie bei der AAS und der ICP-MS sind Zelltyp-spezifische Messungen nur an homogenen Geweben bzw. in sortierten Zellfraktionen möglich.

1.2.4 Immunanalytik von Pt-DNA Addukten

Der immunanalytische Nachweis von Chemotherapie-induzierten DNA-Modifikationen basiert auf den Arbeiten von Halloran & Parker (1966), welche Carbodiimid-gekoppelte DNA-Proteinkomplexe verimpften und so die ersten polyklonalen anti-DNA Seren gewinnen konnten.

1.2.4.1 Immunisierungsstrategien zur Gewinnung von Antikörpern gegen *Cisplatin*-induzierte Pt-DNA Addukte

Durch Verimpfung eines *in vitro* platinieren DNA – Methy-BSA – Konjugates gelang Poirier et al. (1982) erstmalig die Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen die Gesamtheit der *Cisplatin*-induzierten DNA-Läsionen.

Erste Ansätze zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern (MAK) gegen *Cisplatin*-induzierte DNA-Addukte stammen von Sundquist et al. (1987) und Chao et al. (1994), welche sich des von Poirier et al. (1982) eingeführten Immunisierungsprozederes bedienen. Fichtinger-Schepman et al. (1985a & 1987a) etablierten ein alternatives Immunisierungskonzept, indem sie polyklonale, Addukt-spezifische Seren gegen platinierter, Protein-gekoppelte Dinukleotide erzeugten.

1.2.4.2 Kompetitiver ELISA und Immunhistochemie

Die ersten immunanalytischen Versuche zur Quantifizierung *Cis*- und *Carbplatin*-induzierter Pt-DNA Addukte wurden mit Hilfe eines kompetitiven ELISA an isolierter DNA durchgeführt (Poirier et al. 1982). Der von Fichtinger-Schepman et al. (1985a & 1987) etablierte kompetitiver ELISA an chromatographisch getrennten Pt-DNA Hydrolysaten ist wesentlich aufwendiger, dafür allerdings Addukt-spezifisch.

Erste immunhistochemische Untersuchungen an *Cis*- bzw. *Carboplatin*-exponierten Zellen wurden mit den polyklonalen anti-Pt-DNA Seren von Terheggen et al. (1987 & 1991a, b) durchgeführt. Erstmalig bestand damit die Möglichkeit, Zelltyp-assozierte Unterschiede in der Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten auf Einzelzellebene nachzuweisen, wie Blommaert et al. (1996) mit ihren Untersuchungen an murinen Nierenschnitten aufzeigen konnten.

Seiler et al. (1993) entwickelte am Institut für Zellbiologie, Essen ein Immunfluoreszenzverfahren, den „Immuncytologischen Assay (ICA)“ um Methyl- und Ethylnitrosoharnstoff-induzierte DNA Addukte auf Einzelzellebene zu quantifizieren. Das Signal des TRITC-markierten Zweitantikörpers wird dabei mit Hilfe einer digitalen Bildverarbeitung auf den über DAPI-Fluoreszenz simultan gemessenen DNA-Gehalt normiert.

Meijer et al., (1997 & 1999) adaptierten die Methode für ihr anti-Pt-DNA Serum.

	Addukt- spezifische Messung	Einzelzell- Messung	Genspezifische Messung	Empfindlichkeit
- FPCL / ¹ H-NMR	+	-	-	-
- AAS	-	-	-	+
- ICP-MS	-	-	-	++
- PCR	+	-	+	-
- ³² P-Postlabelling	+	-	-	++++
- ELISA	-	-	-	++++
- FPLC / ELISA	+	-	-	++++
- Immunhistochemie	-	+	-	+++++

Abb. 2 Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung *Cis*- bzw. *Carboplatin*-induzierter Pt-DNA-Addukte

1.2.4.3 Sensitivität verschiedener analytischer Verfahren

Da Addukt-Messungen auch in schwach belasteten Geweben und lange nach letztmaliger Platin-Applikation möglich sein sollen, hängt die Brauchbarkeit entsprechender analytischer Methoden ganz wesentlich von der Sensitivität ab. Diese ist für für immunanalytische Methoden in der Regel sehr hoch (Abb. 2).

Völlig unbefriedigend ist bisher jedoch die Vergleichbarkeit verschiedener Platin-Nachweisverfahren und der daraus resultierenden Daten: In analogen Modell-Systemen werden die Pt-DNA Addukte mit Meßwertunterschieden von bis zu drei Größenordnungen quantifiziert (Bonetti et al., 1996; Fichtinger-Schepman et al., 1989; Mustonen et al., 1989; Parker et al., 1991; Poirier et al., 1992; Reed et al., 1987).

1.3 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

Das Ausmaß der Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten sowie die Toleranz gegenüber ihrer Persistenz ist Gewebe- und Zelltyp-spezifisch sehr unterschiedlich. Außerdem kann sich unter dem Selektionsdruck einer Chemotherapie der initiale Phänotyp einer Zelle im Zeitverlauf ändern. Vergleicht man identische Normal- bzw. Tumorgewebe, so finden sich zudem eindeutige interindividuelle Heterogenitäten bezüglich des Adduktgehaltes.

Die Beobachtungen erklären sich aus einer Vielzahl von pharmakokinetischen und Zellbiologischen Vorgängen, die zwischen Applikation und Platin-Wirkung greifen und deren Regulation durch den individuellen genetischen Hintergrund determiniert ist (Abb. 3).

Nierenfunktion und Organ-Durchblutung (Schellens et al., 1996), Wirkstoffimport- und -export über die Zellmembran (Borst et al., 1999), sowie zytoplasmatische Detoxifizierungsprozesse kontrollieren das Ausmaß der initialen Pt-DNA Adduktbildung (Chao, 1996). Die Leistungsfähigkeit der DNA-Reparatursysteme entscheidet über die Effizienz der Adduktelimination (Kelland, 1994), die Toleranz der Zellen gegenüber bestehenden Läsionen und damit über die Zytotoxizität (Fajac et al., 1996; Ormerod et al., 1996).

Häufig widersprechen sich die publizierten Schlußfolgerungen bezüglich der relativen Bedeutung einzelner Komponenten des Pt-DNA Prozessierungsapparates.

Eine Erklärung hierfür liegt in der Heterogenität der diesen Daten zugrunde liegenden Zellkulturmodellen. Oft führen schon einfache Modifikationen der Kulturbedingungen zu dramatischen Veränderungen im Expressionsstatus Chemotherapie-relevanter Gene. So zeigten z. B. Welters et al. 1999a, daß die Implantation von Tumorzellen auf die Nacktmaus zumeist mit einer Veränderung der zellulären *Cisplatin*-Empfindlichkeit einhergeht. Tendenz und Ausmaß sind dabei Klon-spezifisch und nicht vorhersagbar.

Ein weiterer Grund für möglichen Dissens liegt in der Einschränkung der meisten Studien auf eine molekularbiologische oder proteinchemische Untersuchungsmethode. Dies führt zu einer engen Begrenzung des Aussagegehaltes solcher Experimente (Crul et al., 1997).

1.3.1 Resistenzvermittlung über Wirkstoffexport

Der intrazelluläre Platingehalt einer Zelle wird durch das Gleichgewicht von Wirkstoffimport und -export bestimmt. Während das Vorhandensein aktiver Importmechanismen für *Cis*- bzw. *Carboplatin* noch immer ergebnisoffen diskutiert wird, kennt man zumindest ein Membranprotein, welches ATP-abhängig Platinkomplexe vom Zytosol in den Extrazellulärraum pumpt: MRP 2 ("Multidrug Resistance Protein") oder cMOAT ("Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter") ist ein Membranprotein, das zur Gruppe der ABC (ATP Binding Cassette) Transporter gehört.

MRP 2 konnte in Leber- Lungen-, Magen- und Kolorektaltumoren nachgewiesen werden, sowie in 95% aller untersuchten Nierenkarzinome (Klein et al., 1999). Eine Überexpression kann durch die Platinchemotherapie induziert werden (Demeule et al., 1999). Matsunaga et al., (1998) zeigten an Lebertumoren, daß ein relativ hoher cMOAT-Spiegel gleichbedeutend mit einer schlechten Prognose ist.

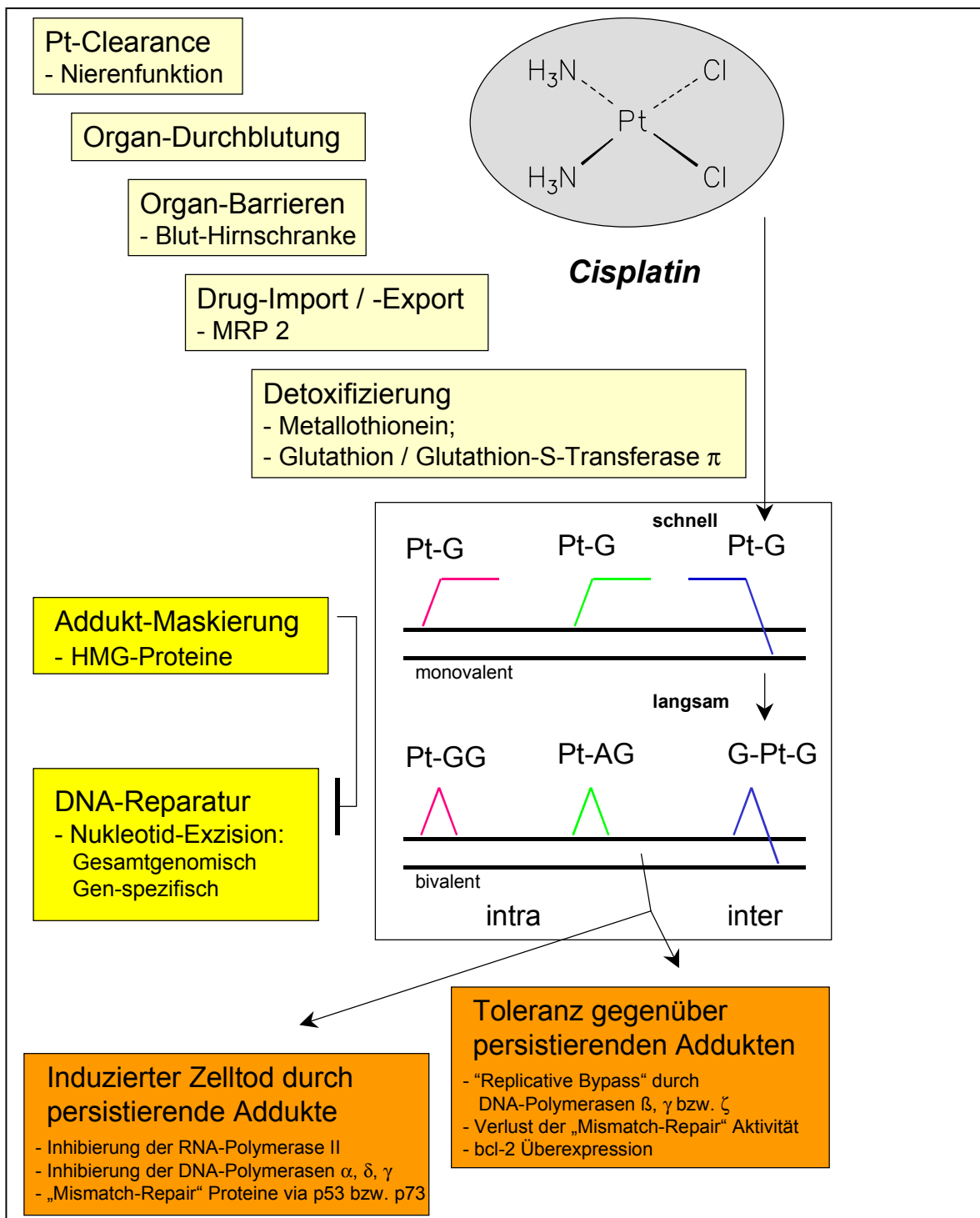


Abb. 3 *Cisplatin* -Toxizität als Quintessenz aus Pt-DNA Adduktbildung, -elimination und -toleranz

1.3.2 Intrazelluläre Detoxifizierung

Als starke Elektrophile reagieren Pt^{2+} -Komplexe nicht nur mit DNA, sondern auch mit nukleophilen Zentren in Peptiden und Proteinen, insbesondere mit Sulfhydrylgruppen von zytoplasmatischem Glutathion und Metallothionein (Chao, 1996).

Eine solche Konkurrenz führt zu verminderter Pt-DNA Adduktbildung und damit zu einer Detoxifizierung des Wirkstoffes.

Gemäß dieses Konzeptes konnte bei einige Zell-Linien ein erhöhter Glutathion-Spiegel mit einer verminderten Platinempfindlichkeit in Übereinstimmung gebracht werden (Meijer et al., 1992). Nicht immer jedoch konnte durch die Depletion des Tripeptids mit Buthionin-S,R-Sulfoximin eine Re-Sensitivierung erzielt werden (de Graeff et al., 1988). Die Resistenzvermittlung durch Glutathion ist offensichtlich ein multifaktorieller Vorgang, der unter anderem von der Aktivität der Konjugat-bildenden Glutathion S-Transferase und der Effizienz der nachgeschalteten Exportprozesse (1.3.1) abhängt (Ishikawa et al., 1993; Timmer-Bosscha et al., 1993).

So zeigten Shiga et al., (1999), daß ein erhöhter Gehalt an Glutathion S-Transferase bei Kopf und Halstumoren ein Therapieversagen wahrscheinlicher macht.

Das durch Zink, Cadmium aber auch *Cisplatin* induzierbare Protein Metallothionein bindet einerseits die metallischen Noxen, andererseits sekundär entstehende, zytotoxische Sauerstoffradikale (Basu & Laso, 1990). Aufgrund seiner hohen Affinität zu Pt^{2+} könnte dieser Vorgang eine *Cisplatin*-Resistenz begründen (Minamino et al., 1996; Pattanaik et al., 1992; Siu et al., 1998). Häufig findet man Metallothionein-Überexpression in Folge aktivierender H-ras-Mutationen (Niimi et al., 1991), so daß sich der anteilige Beitrag einer metabolischen Inaktivierung zum Resistenzgeschehen nur schwer quantifizieren läßt und den prognostischen Wert einer alleinigen Metallothionein-Messung sehr einschränkt (Meijer et al., 2000).

1.3.3 Bildung von Platin - DNA Addukten

1.3.3.1 Gewebespezifität der Adduktbildung

Intermediär gebildete Pt^{2+} Hydroxo-Komplexe reagieren mit Guaninresten der zellulären DNA sehr schnell zu monovalenten Addukten, welche innerhalb von Stunden zu den beschriebenen bivalenten Intra- und Interstrang Addukten konvergieren (Bernges & Holler, 1991; Knox et al., 1986; s. Abb. 1).

Das Ausmaß der initialen Pt-DNA Adduktbildung ist Gewebe-spezifisch und hängt von der Bioverteilung des Wirkstoffs und den Zelltyp-abhängigen Transport- und Detoxifizierungsvorgängen ab (1.3.1 & 1.3.2). Nierenzellen weisen beim Menschen und in Nagermodellen in der Regel den höchsten Adduktgehalt auf (Johnsson et al., 1995; Mustonen et al., 1989). Mit einem auf die Niere bezogenen initialen Adduktgehalt von 30 – 40% ist die Leber das zweite Organ mit ausgeprägter Platin-Anreicherung (Johnsson et al., 1995; Fichtinger-Schepman et al., 1989; Mustonen et al., 1989).

Hodentumore reagieren außerordentlich empfindlich auf *Cisplatin*. Diese Tatsache erklärt sich nicht aus dem initial meßbaren DNA-Platingehalt in diesem Gewebe: Mustonen et al. (1989) bemaßen das Adduktniveau im Rattenhoden (in bezug auf die Nierenwerte) mit weniger als 4%.

Aufgrund einer von Johnsson et al. (1995) postulierten Blut-Hoden Barriere beschränkt sich die Addukt-Bildung vornehmlich auf das Interstitium und greift kaum auf die Zellen der Spermatogenese über.

Auch die Blut-Hirn Schranke erschwert den Wirkstoffzutritt, entsprechend niedrig sind Adduktgehalte sowohl in zentralen Neuronen als auch in Gliazellen.

1.3.3.2 Häufigkeitsverteilung der DNA-Läsionen nach Exposition mit *Cis-* oder *Carboplatin*

Da angenommen wird, daß *Cis-* und *Carboplatin* über den gleichen reaktiven Metaboliten wirksam werden, ist bisher völlig ungeklärt, weshalb das relative Verhältnis der induzierten Addukte initial unterschiedlich ist. Während nach *Cisplatin*-Exposition initial ca. 62 – 75 % der DNA-Läsionen als Pt-GG identifiziert wurden (Dijt et al., 1989; Fichtinger-Schepman et al., 1987b), wurde diese Struktur in *Carboplatin*-behandelten Zell-Linien und *in vivo* mit einer Häufigkeit von nur 30% nachgewiesen. Die Gehalte an Pt-AG und G-Pt-G-Interstrang Addukt sind dagegen mit bis zu 27%igem bzw. 4%igem Anteil fast doppelt so hoch wie nach *Cisplatin*, auch wurden hier deutlich mehr Pt-GXG Intrastrang-Addukte gefunden (Blommaert et al., 1995 & 1996; Fichtinger-Schepman et al., 1995).

1.3.3.3 Addukt-induzierte Veränderung der DNA-Architektur

Die molekulare Architektur der DNA ändert sich Addukt-spezifisch durch die Induktion von Flächenwinkeln, die eine Krümmung der Helix in Richtung auf die große DNA-Furche erzwingen (Kasparkova & Brabec 1995; Visse, 1994). Untersuchungen an isolierter DNA zeigten, daß sich durch Pt-GG der Neigungswinkel zwischen den beiden benachbarten Guaninbasen von 36° auf 49° vergrößert. Dies führt zu einer Biegung der Doppelstranghelix auf 78°. Das Platinatom ragt dabei in die große Furche der DNA hinein, gleichzeitig tritt eine Weitung der kleinen Furche über 8 Basenpaare auf (Gelasco & Lippard, 1998). Zusätzlich findet in diesem Bereich eine Konformationsänderung der DNA von der B in die A Form auf. Der Sequenz-Kontext der Addukte beeinflußt das Ausmaß dieser Strukturveränderung (Pilch et al., 2000).

1.3.4 Nukleotid Exzisionsreparatur von Pt-DNA Addukten

Eine große Anzahl von Untersuchungen legt die Vermutung nahe, daß DNA-Reparaturmechanismen die nach *Cis-* und *Carboplatin*-Exposition gebildeten monovalenten und bivalenten Pt-Läsionen mit Zelltyp-abhängiger, Addukt- und Gen-spezifischer Effizienz aus dem Genom entfernen können (Crul et al., 1997).

Auch hier gibt es jedoch, wie für die übrigen besprochenen Faktoren, mehr Widersprüche, als gesicherte Erkenntnisse, weil die überwiegende Zahl der Befunde aus in vitro-Untersuchungen stammt oder an Zell-Linien erhoben wurde.

Pt-DNA Intrastrang Addukte werden nach derzeitigem Wissensstand offenbar vorwiegend über den Nukleotid Exzisions Reparaturweg aus der Kern-DNA eliminiert (Sancar, 1996; van Steeg et al., 2000). Der Basen Exzisionsweg spielt für die Reparatur der bivalenten Addukte vermutlich keine Rolle (Ochs et al., 1999), inwieweit monovalente Addukte als Substrat erkannt werden, wird kontrovers diskutiert (Runger et al., 2000). Unbestritten scheint jedoch zu sein, daß die Leistungsfähigkeit des DNA-Reparaturapparates ein wesentliches Kriterium für die zelluläre Empfindlichkeit bzw. Resistenz gegenüber Platinkomplexen ist (Moorehead et al., 1996).

1.3.4.1 Addukt-Spezifität der Nukleotid Exzisionsreparatur

Die höchst unterschiedliche Strukturverzerrung der DNA durch 1,2 bzw. 1,3 Intrastrang-Addukte und G-Pt-G Interstrang-Addukte hat möglicherweise eine unterschiedliche Erkennbarkeit und Prozessierung durch Reparaturproteine zur Folge (van Vuuren, 1995).

In vitro-Experimente haben gezeigt, daß Pt-GG Intrastrang-Läsionen aus dem Gesamtgenom erheblich langsamer entfernt werden als die AG-Addukte, besonders schnell wird offensichtlich Pt-GXG aus der DNA eliminiert. (Huang et al., 1994; Szymkowski et al., 1992). Diese Tendenzen konnten im Ratten-Modell von Blommaert et al. (1996) bestätigt werden.

Die bisher dokumentierten Reparaturkinetiken für G-Pt-G Interstrang-Läsionen führten zu ganz unterschiedlichen Schlußfolgerungen: Zamble et al. (1996) konnten in humanen Zellextrakten keine Interstrang-Reparaturaktivität nachweisen. Jones et al. (1991) beschreiben die Elimination von G-Pt-G dagegen als weitaus effektiver als die der Intrastrang-Addukte.

1.3.4.2 Interindividuelle Unterschiede in der Prozessierung von Chemotherapie induzierten Pt-DNA Addukten

Die Zelltyp-abhängige Bildung und Persistenz Chemotherapie-induzierter Pt-DNA Addukte ist zusätzlich interindividuellen Schwankungen unterworfen. Bei ihren AAS-Messungen an Leukozyten von *Cis-* oder *Carboplatin* behandelten Patienten konnten Parker et al. (1991), Dabholkar et al. (1992) und Reed et al. (1993) Meßwert-Unterschiede von mehr als zwei Größenordnungen aufzeigen. Eine ähnlich große Schwankungsbreite wurde von Fichtinger-Schepman et al., (1987a, b) für Therapie-induzierte Pt-GG Addukte dokumentiert.

Eine gänzlich andere Kinetik wurde von Bonetti et al. (1996) auf der Basis von ICP-MS Messungen erstellt. Interindividuelle Unterschiede bezüglich der initialen Addukt-Last überstiegen nie den Faktor 2. An Autopsie-, Orchiectomie- und Biopsiematerial konnte eindrucksvoll die Langzeitpersistenz der Pt-DNA Läsionen demonstriert werden. So fanden Poirier et al. (1992 & 1993b) und Meijer et al. (1997) mit Hilfe von ELISA- bzw. Immunhistochemie-Messungen an Organ- bzw. Tumorproben selbst 15 Monate nach Abschluß einer *Cisplatin*-Therapie noch Restläsionen in der DNA.

1.3.4.3 Bedeutung einzelner Komponenten der NER-Reparatur für die Platin-Sensitivität von Zellen und Geweben

Für einzelne Komponenten des DNA-Reparatursystems wurde ein direkter Zusammenhang zwischen ihrem Expressions-Status und der Pt-Empfindlichkeit der Zielzellen postuliert.

Erkennung und Bindung *Cis-* bzw. *Carboplatin* induzierter DNA-Addukte durch das XPA-Protein sind wahrscheinlich zentrale Ereignisse in der Prozessierung dieser Läsionen im Rahmen der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (Asahina et al., 1994).

Cisplatin-unempfindliche Tumore weisen häufig eine erhöhte Expression von XPA auf, wie Dabholkar et al. (1994) und States & Reed (1996) durch mRNA-Bestimmungen an humanen Ovarialkarzinomen zeigen konnten. Umgekehrt könnte die niedrige XPA-Expression bei Hodentumorzellen für einen verlangsamten Ablauf der Nukleotid-Exzisions-Reparatur und damit für die extrem *Cisplatin*-Sensitivität dieser Zellen verantwortlich sein.

Einen Geschwindigkeits-bestimmenden Platz nimmt im Rahmen der Nukleotid-Exzisions-Reparatur möglicherweise auch die ERCC1-XPF Exzinuklease ein (Reed, 1998), so daß eine Überexpression Platin-Resistenz vermitteln kann (Kelland, 1994; Li et al., 2000; Yu et al., 2000). Ein entsprechender Zusammenhang wurde auch für die DNA-Ligase I Aktivität postuliert (Ali-Osman, 1994).

Bei Kopf und Halstumoren konnte ein hohes Expressionsniveau der für die DNA-Neusynthese notwendigen Thymidylat Synthase als ein prognostischer Indikator für Therapieversagen nachgewiesen werden (Shiga et al., 1999).

1.3.4.4 Maskierung von Pt-DNA Addukten durch „Damage Recognition“-Proteine

Die individuelle Stereochemie der einzelnen Addukte bedingt Affinitätsunterschiede zu einer Klasse von Addukt-maskierenden, sogenannten „Damage Recognition“ Proteinen, die als gemeinsames Strukturelement die „high mobility group (HMG) box“ Domäne aufweisen. Unabhängig von ihrer eigentlichen Funktion als Transkriptions-assoziierte Faktoren (McA'Nulty & Lippard, 1995) binden sie offenbar auch an Pt-GG und Pt-AG haltige DNA-Sequenzen, nicht dagegen an solche mit Pt GYG (Huang et al., 1994; Ohndorf et al., 1999; Zamble et al., 1996;). Die Anlagerung von HMG 1 an das G-Pt-G Interstrang-Addukt wurde in den Studien von Kasparkova & Brabec (1995) nachgewiesen. Die Addukt-Bindung ist Glutathion-abhängig, da nur reduzierte HMG – Proteine mit Pt-haltigen DNA-Sequenzen interagieren (Billings et al., 1992).

Auffallend ist die Gleichsinnigkeit der Persistenz der einzelnen Addukte mit der Bindung von „damage recognition“ Proteinen. Diese wird im Rahmen des „shielding“-Modells als konkurrierend mit dem Zugriff von DNA-Reparaturproteinen verstanden (Crul et al., 1997).

Das Konzept des Addukt-„shielding“ postuliert für HMG-defiziente Zellen eine erleichterte Reparatur. Entsprechend führt die Ausschaltung des HMG-analogen Ixr1-Proteins bei Hefen zu einer größeren *Cisplatin*-Toleranz (McA'Nulty & Lippard, 1996). Hoffmann et al. (1997) und Chaney & Vaisman (1999) konnten zudem nachweisen, daß das Fehlen der HMG Proteine die „bypass“-Replikation begünstigt.

Kontrovers dazu entwickelten McLaughlin et al. (1993) und Treiber et al. (1994) in Untersuchungen an HMG-überexprimierenden, therapieresistenten Ovarialkarzinomzellen das Titrationsmodell. Dem Entzug der für die Transkription von rRNA essentiellen HMG-Proteine durch Bindung an Pt-DNA Addukte wird eine eigene zytotoxische Bedeutung zugewiesen. Gemäß dieser Vorstellung kann das Defizit durch eine HMG-Überexpression kompensiert werden.

1.3.4.5 Gen-spezifische Reparatur von Pt-DNA Addukten

Bis jetzt ist ungeklärt, ob einer präferentiellen Gen-spezifischen Reparatur in Transkriptionsaktiven DNA-Abschnitten eine Resistenz-vermittelnde Bedeutung zukommt (Bohr, 1995; Jones et al., 1991; Köberle et al., 1997; May et al. 1993; O'Neill et al., 1999; Zhen et al., 1992).

1.3.5 "Replicative Bypass" von Pt-DNA Addukten

Für die meisten Zellen hat ein *Cisplatin*-induzierter DNA-Schaden eine G₂-Arretierung mit nachfolgender Reparatur oder Apoptose zur Folge (Anthony et al., 1996; Sorenson & Eastman, 1988). Folglich muß ein „replicative bypass“ an Pt-DNA Addukten während der S-Phase angenommen werden. Chaney & Vaisman (1999) zeigten, daß diese „translesion synthesis“ durch die DNA-Polymerasen ζ und γ katalysiert werden kann, vermutlich aber auch durch die Polymerase β , welche arretierte Replikationsprodukte über Pt-GG hinaus verlängert (Hoffmann et al., 1995; Vaisman & Chaney, 2000).

Mamenta et al., (1994) und Ali-Osman et al. (1994) konnten in Ovarialkarzinomzellen und malignen Gliomen einen dementsprechenden Zusammenhang zwischen Polymerase β -Aktivität und erworbener Resistenz aufzeigen. Die Polymerase β scheint aber keine essentielle Komponente des zellulären „bypass“-Apparates zu sein: Ochs et al. (1999) zeigten, daß „knockout“-Fibroblasten nicht *Cisplatin*-empfindlicher sind als die entsprechenden Wildtyp-Zellen.

Das Überlesen der Intrastrang Addukte führt *in vitro* zu signifikant höherer Mutationsrate durch „frameshift deletions“ (Hoffmann et al., 1996) und durch Transversionen auf der 5'-Seite des Adduktes (Bradley et al., 1993). Solche Mutationen könnten unter anderem zur Inaktivierung des Mismatch Reparaturapparates (1.3.6.1) und / oder von p53 führen. Eine Konsequenz eines solchen Mismatch-Reparaturdefizites ist der nunmehr beschleunigte „replicative bypass“: Vermutlich blockieren Komplexe von hMSH 6 bzw. hMLH1 und den Intrastrang-Addukten die DNA-Polymerasen ähnlich stark wie dies für HMG-Protein Addukt-Komplexe bekannt ist (Chaney & Vaisman, 1999; Hoffmann et al., 1997).

1.3.6 Addukt-Toleranz und Apoptose

Abhängig vom Ausmaß der Adduktbildung, -elimination und -toleranz hat eine *Cis*- bzw. *Carboplatin*-Exposition bei eukaryontischen Zellen temporäre Wachstumsverlangsamung, Apoptose oder nach sehr hohen Dosen auch Nekrose zur Folge. Als gemeinsames Primärphänomen beobachtet man im Vorfeld dieser Ereignisse eine Zellzyklus-Arretierung (Ormerod et al., 1994; Sekiguchi et al., 1996).

Die therapeutische Ansprechbarkeit von Tumorzellen hängt davon ab, ob sie sich im Rahmen klinisch realisierbarer Pt-Dosen in den programmierten Zelltod zwingen lassen (Sorenson et al., 1990). Teilungsaktive Zellen scheinen gegenüber Platinverbindungen wesentlich empfindlicher zu sein, als solche in G_1/G_0 , wie an Fraktionen von proliferierenden bzw. nicht proliferierenden primären Thymozyten gezeigt werden konnte (Evans & Dive, 1993; Evans et al., 1994; Boulikas, 1996). Im Gegensatz hierzu steht jedoch die Beobachtung, daß von der Platin-Toxizität *in vivo* vor allem nicht-proliferative Zell- und Gewebetypen betroffen sind: Dazu gehören beispielsweise periphere Neuronen und Schwann-Zellen der sensiblen Ganglien, das Nierengewebe und die Haarzellen des Innenohrs.

1.3.6.1 Die Rolle der „Mismatch“-Reparatur-Proteine als Apoptose - Induktoren

Bei proliferativen Zellen findet sich nach *Cis-* bzw. *Carboplatin*-Exposition typischerweise ein G_2 - Arrest, der dosisabhängig länger als 96 h andauern kann (Sorenson & Eastman, 1988). Danach entscheidet sich, ob die „reparierte“ Zelle in die Mitose eintritt oder durch Apoptose eliminiert wird.

Häufig beobachtet man nach einer *Cisplatin*-Therapie einen teilweisen Verlust von aktiven „mismatch“-Reparatur (MMR)-Proteinen (Samimi et al., 2000). Dieses Phänomen wird als die direkte Konsequenz des mutagenen Potentials von *Cisplatin* gedeutet und markiert häufig den Beginn eines Therapieversagens (Aebi et al., 1996; Anthony & Brown, 1995): In Zellen, welche die „mismatch“-Reparaturproteine hMSH2 oder hMLH1 nicht oder in mutierter Form exprimieren, verkürzt sich die G_2 -Arretierung oder entfällt ganz (Brown et al., 1997; Fink et al., 1996 & 1997). Gleichzeitig unterbleibt auch die apoptotische Antwort, so daß die Zellen *Cisplatin*-resistent werden. (Aebi et al., 1996; Branch et al., 2000; Lage et al., 1999; Lage & Dietel, 1999). Schließlich beobachtet man einen beschleunigten „replicative bypass“ (1.1.5), der zu einer erhöhten Teilungsrate führen kann (Chaney & Vaisman, 1999).

Selbst NER-inkompetente XPA-„knockout“ Fibroblasten, welche bei intaktem „mismatch“-Apparat extrem *Cisplatin*-sensitiv sind (1.3.4.4), können durch einen zusätzlichen MMR-Verlust weitgehend unempfindlich werden (Ichikawa et al., 2000).

Eine Überexpression von hMSH2 in Ovarial- und Hodentumorzellen geht dagegen mit einer ausgeprägten *Cisplatin*-Empfindlichkeit einher (Mello et al., 1996).

Die Bedeutung des „mismatch“-Reparatur Apparates wurde zuerst auf die postreplikative Korrektur von „Kopierfehlern“ der DNA-Polymerasen reduziert. Duckett et al. (1996) wiesen nach, daß hMSH2 mit hoher Affinität Pt-GG und Pt-AG Intrastrang-Addukte bindet, nicht aber Pt-GXG Komplexe.

Der MMR-Apparat kann die gebundenen Pt-Läsionen offenbar nicht eliminieren, sondern blockiert im Plasmid-Reaktivierungs-Test sogar deren Reparatur (Cenni et al., 1999). Mello et al. (1996) entwickelten aus diesen Beobachtungen das „shielding“-Modell, gemäß dem der MMR-Apparat ähnlich den „damage recognition“-Proteinen (1.3.4.5) mit den Komponenten der Nukleotid Exzisionsreparatur kompetitiv konkurriert.

Statt effizienter Reparatur des beschädigten Stranges kommt es nach *Cisplatin*-Exposition zu MMR-abhängiger Exzision am neuen, durch die „bypass“-Replikation entstandenen Strang. Die wiederholte und sinnlose Abfolge von Nuklease- und Polymeraseaktivität führt schließlich zu Basen-Deletionen, Strangbrüchen und zum Zelltod. Fink et al. (1996) faßten diese Vorstellung in einem „Selbstmordreparatur“-Modell zusammen.

Schließlich aktivieren Komplexe von Intrastrang-Addukten und „Mismatch“-Reparatur Proteinen direkt Komponenten der p53- oder der p73-Apoptose Kaskade (1.3.6.2) und provozieren somit die Induktion des programmierten Zelltodes (D’Atri et al., 1998; Hawn et al., 1995; Li et al., 1999).

Da ein geschädigter MMR-Apparat seine Reparaturfunktion für fehlgepaarte Basen nicht mehr erfüllt, kommt es gehäuft zu Mutationen in Chemotherapie-relevanten Genen wie p53. Dadurch wird die *Cisplatin*-Empfindlichkeit der Zielzellen weiter vermindert (Anthony et al., 1996), außerdem erhöht sich die Wahrscheinlichkeit von Kreuzresistenzen gegenüber anders wirkenden Chemotherapeutika wie Topotecan, Gemcitabin und Paclitaxel (Lin et al., 1999; Lin & Howell, 1999).

Das „mismatch“-Reparatursystem erfüllt im Rahmen der Transkriptions-gekoppelten, Gen-spezifischen Reparatur eine weitere wichtige Aufgabe als Stabilisator des Komplexes von DNA und „transcription repair coupling factor“ (Mellon et al., 1996). MMR-defiziente Zellen können diesen Anteil des NER-Weges nicht mehr verwirklichen. Obwohl dieses Phänomen eine Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber *Cisplatin* zur Folge haben sollte, resultiert in der Regel eine Resistenz, da der Verlust der Apoptosefähigkeit das entscheidendere Ereignis für das Schicksal der Zelle ist. (Fink et al., 1996; Hawn et al., 1995).

1.4 Prognostische Aussagekraft von Pt - DNA Addukt - Messungen

1.4.1 Zusammenhang von Chemotherapie-induziertem Adduktgehalt und Therapieerfolg

Grundlage einer individualisierten Chemotherapie ist die Verfügbarkeit von prognostischen Indikatoren, die, Therapie-begleitend aufgenommen, Vorhersagen des Behandlungserfolges erlauben. Entsprechende Daten können die Grundlage für das Erkennen und Klassifizieren von Resistenzen bilden und damit eine zielgerichtete therapeutische Intervention ermöglichen (1.5).

Für die Platin-Chemotherapie wurden eine ganze Reihe von Parametern daraufhin überprüft. Weder der über den Therapiezeitraum integrierte Plasmagehalt an freiem Platin (Schellens et al., 1996), noch die Expression von p53, bcl2 oder ki 67 im Tumorgewebe (van de Vaart et al., 2000) konnten sich als eindeutige Determinanten für eine *Cis*- oder *Carboplatin* Empfindlichkeit qualifizieren.

Inhärente oder erworbene Platin-Resistenzen gehen häufig mit einer verminderten Addukt-Bildung, verkürzter Addukt-Persistenz und / oder erhöhter Toleranz einher (Kelland 1994). Folgerichtig wurde auch der Pt-DNA Adduktgehalt als mögliches Kriterium zur Beurteilung der zellulären Empfindlichkeit gegenüber *Cis*- bzw. *Carboplatin* vorgeschlagen.

Addukt-Messungen wurden bisher entweder direkt an chirurgisch entferntem Ovarial- (Poirier et al., 1992 & 1993) bzw. Hodentumorgewebe (Fichtinger-Schepman et al., 1990) behandelter Patienten durchgeführt, zumeist aber an peripheren Leukozyten bzw. an Mundschleimhautzellen.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Pt-DNA Addukt Gehalt in Surrogatzellen und Therapieerfolg wurde belegt: Durch Therapie-begleitende AAS-Messungen an Leukozyten-DNA konnte die Hypothese bestätigt werden, wonach ein hoher Adduktgehalt mit einer therapeutischen Ansprechbarkeit des Tumors einhergeht (Dabhokar et al., 1992; Parker et al., 1991; Reed et al., 1993).

Zur gleichen Schlußfolgerung kommen einige ELISA-gestützte Studien, bei denen entweder die Gesamtheit der Pt-DNA Addukte (Poirier et al., 1985 & 1993a, b; Reed et al., 1986; 1987; 1990 & 1993) oder aber der Pt-GG Gehalt (Boffetta et al., 1998; Fichtinger-Schepman et al., 1987a, b & 1990) quantifiziert wurde.

Immunhistochemisch wurde diese Aussage vor allem durch Messungen an Mundschleimhaut unterstützt (Bartelink et al., 1999; Terheggen et al. 1987, 1988 & 1991a, b; van de Vaart et al., 2000).

Einige wenige Studien bestreiten einen signifikanten Zusammenhang zwischen Pt-DNA Addukt Gehalt und therapeutischem Ansprechen. So konnten Bonetti et al. (1996) mit ihren ICP-MS Messungen keine Korrelation zwischen Leukozyten-Adduktgehalt und dem „clinical outcome“ aufzeigen.

Auch Blommaert et al. (1993) gelang es nicht, den immunhistochemisch ermittelten Addukt-Gehalt in Wangenschleimhautzellen mit dem klinischen Geschehen zur Deckung zu bringen. Poirier et al. (1993) konnten zwar einen Zusammenhang von Therapieerfolg und immunologisch gemessenen Pt-Addukten aufzeigen, nicht aber zu dem mit Hilfe der AAS bestimmten Gesamtgehalt an DNA-gebundenem Platin.

1.4.2 Prädiktive Korrelation des Pt-DNA Addukt Gehalts nach *Cisplatin*-Chemotherapie und nach *ex vivo*-Exposition

Wünschenswert wäre eine Analytik, die bereits im Vorfeld einer Chemotherapie aus *ex vivo* Untersuchungen Aussagen über den zu erwartenden Behandlungserfolg zuläßt.

Fichtinger-Schepman et al. (1987a) zeigten, daß die Messung der DNA-Platinierung von Leukozyten nach *ex vivo Cisplatin*-Exposition tendenzielle Aussagen über das Ausmaß der späteren *in vivo* Pt-DNA Adduktbildung und -elimination in Surrogat- und Tumorzellen erlauben. Ein prädiktiver Wert wurde auch von Welters et al. (1999b) für die Daten aus *ex vivo* exponierten Biopsien von Kopf- und Halstumoren postuliert.

Kontrovers dazu stehen die ICP-MS bzw. immunhistochemischen Untersuchungen von Bonetti et al. (1996) und Terheggen et al. (1988). Sie folgerten, daß ein Rückschluß von *ex vivo* Platinierung auf die *in vivo* Addukt-Bildung nicht möglich ist.

1.5 Chemoprotektion und Resensitivierung

Resistenz (1.1.3) und unerwünschte Nebenwirkungen (1.1.2) sind die Haupthindernisse für eine wirkungsvolle und gleichzeitig die Lebensqualität des Patienten erhaltende Platin-Chemotherapie. Auf der Grundlage einer Therapie-begleitenden, individuellen Effizienzkontrolle hofft man, frühzeitig Auskunft über Resistenzentwicklung und das Ausmaß der Kolateralschäden zu erhalten. In Zukunft könnten diese Informationen eine zielgerichtete therapeutische Intervention wie Chemoprotektion von Normalgewebe oder aber Resensitivierung von Tumorgewebe erlauben.

1.5.1 Chemoprotektoren

Chemoprotektoren sind Substanzen, die im Vorfeld oder Therapie-begleitend appliziert die Platin-induzierten Nebenwirkungen vermindern ohne die antineoplastische Wirkung negativ zu beeinflussen. Die Wirkungsweise ist den intrazellulären Detoxifikationsmechanismen analog (1.3.2): Nukleophile Zentren der entsprechenden Moleküle konkurrieren mit der DNA um die Komplexbildung am Pt^{2+} , so daß die Pt-DNA Adduktbildung vermindert wird. Aufgrund pharmakokinetischer Einflüsse ist diese Interaktion Organ-spezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt. Um die Leistungsfähigkeit einer Substanz als Chemoprotektor zu belegen ist eine möglichst Addukt-spezifische Pt-DNA Analytik zwingend notwendig. Derzeit sind eine ganze Reihe von Substanzen wie z. B. Amifostine (Korst et al., 1998), Methimazole (Osman et al., 2000), Glutathion bzw. Glutathionester (Babu et al., 1999; Hartmann et al., 1999; Links & Lewis, 1999) und Verapamil (Hanada et al., 1999) als potentielle Nephro-, Neuro und Hämatoprotektoren in der Diskussion.

1.5.2 Modulation von Pt-DNA Adduktbildung, -elimination und -toleranz

Pt-DNA Adduktbildung, -elimination und -toleranz entscheiden über die Empfindlichkeit des Tumors gegenüber einer Platin-Chemotherapie (1.3). Unter Modulatoren versteht man Substanzen, die gezielt in diese zellulären Mechanismen eingreifen und dadurch zu einer Verstärkung der antineoplastischen Wirkung führen, so daß man hofft, zukünftig sogar Resistenzen rückgängig machen zu können.

Um Resistenzen vorweg zu charakterisieren und die zytotoxischen Konsequenzen einer pharmakologischen Gegenstrategie bewerten zu können ist auch hierfür eine verlässliche und sensitive Pt-DNA Adduktanalytik unabdingbar.

1.5.3 Neue Platinkomplexe

Die Interaktion von Molekülen des Replikationsapparates, der Nukleotid Exzisions Reparatur und der Apoptose-induzierenden „mismatch“-Reparaturproteine mit Pt-DNA Addukten hängt von deren stereochemischen Architektur ab. Diese wird wiederum beim *Cis*- und *Carboplatin* ganz wesentlich von den beiden Ammin-Liganden bestimmt, die nach der Bildung der bivalenten GG bzw. AG Addukte am Platin verbleiben (Abb. 1; 1.3.3.3).

Kane & Lippard (1996) haben daher die Notwendigkeit neuer Platinkomplexe betont, deren Addukte aufgrund anderer Ligandenstruktur eine alternative Prozessierung erfahren. Dies kann im günstigsten Fall die therapeutische Wiederansprechbarkeit eines *Cisplatin*-resistenten Tumors bewirken (Kasparkova et al., 2000).

Im Vorfeld der rationalen Substitution von *Cisplatin* ist die Aufklärung eines Therapieversagens unabdingbar und bedarf einer verlässlichen Addukt-Analytik. Ebenso wäre parallel zur Wirkstoffneuentwicklung die Etablierung entsprechender Nachweisverfahren einzufordern.

1.5.4 Intervention mit Antisense-Konstrukten und Gen-therapeutische Ansätze zur Revertierung einer *Cisplatin*-Resistenz

Antisense-Konstrukte können die Expression von Genen vermindern, deren Produkte eine Platin-Resistenz begünstigen. In Zellkultur wurde mit diesem Ansatz beispielsweise die cMOAT-Aktivität erniedrigt und damit die *Cisplatin*-Empfindlichkeit gesteigert (Klein et al., 1999; König et al., 1999)

Resistenzen, die durch erhöhte zelluläre Toleranz verursacht werden, können dagegen einer Gen-therapeutischen Beeinflussung zugänglich sein: Fujiwara et al. (1994) gelang es *p53*-mutierte *Cisplatin*-resistente Lungentumorzellen durch Transfektion mit Wildtyp *p53* zu resensibilisieren.

Interventionen dieser Art verlangen die Kenntnis der zugrunde liegenden individuellen Resistenzmechanismen und sind damit von einer Addukt-Analytik abhängig.

1.6 Ziel der Arbeit

Aus dem Vorstehenden ergibt sich sehr klar, daß wir derzeit trotz des enormen Forschungsaufwandes der vergangenen dreißig Jahre weit davon entfernt sind, die antineoplastischen Wirkungsmechanismen, die molekularen Ursachen der zellulären und klinischen Resistenz sowie die Risikofaktoren der toxischen Nebenwirkungen einer Platin-Therapie wirklich zu verstehen. Entscheidende Fortschritte auf jedem dieser Teilgebiete lassen sich nur erzielen, wenn geeignete, hinreichend sensitive und spezifische Meßmethoden zur Verfügung stehen, um die zentralen Parameter der Platin-Wirkung, die DNA-Reaktionsprodukte, im klinisch relevanten Dosisbereich quantitativ zu bestimmen. Deshalb war das Hauptziel dieser Arbeit, entsprechende Werkzeuge in der Form monoklonaler Antikörper und immunanalytischer Verfahren zu entwickeln und diese dann gezielt für experimentelle und klinikorientierte Fragestellungen einzusetzen.

2 ERGEBNISSE & KOMMENTARE

2.1 Generierung von Monoklonalen Antikörpern gegen *Cis*- bzw. *Carboplatin*-induzierte Pt-DNA-Addukte

2.1.1 *in vitro*-Platinierung von DNA

Für die Generierung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen *Cis*- bzw. *Carboplatin*-induzierte Pt-DNA-Addukte wurden nach den Protokollen von Fichtinger-Schepman et al. (1982; 1985a & b) und Berges et al. (1990) unterschiedlich dotierte Pt-DNA-Präparationen hergestellt (Tabelle 1).

Zur Bestimmung des Platingehaltes wurde zunächst zusammen mit dem Institut für Chemo- und Biosensorik (Münster) ein Verfahren zur atomabsorptions-spektroskopischen Quantifizierung etabliert. Die Detektionsgrenze der Methode liegt bei 100 pg Platin, entsprechend 500 fmol Pt-DNA Addukt.

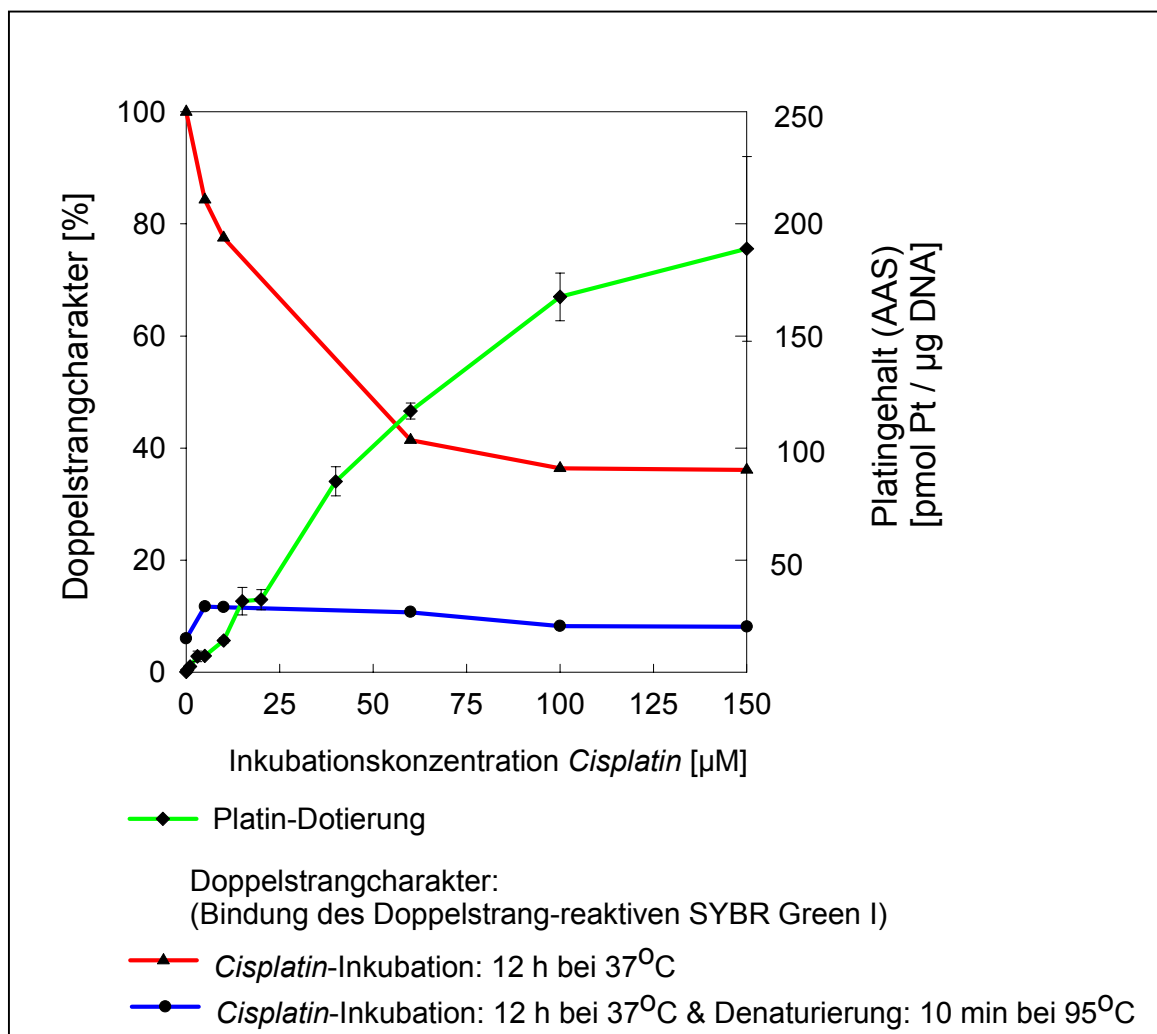


Abb. 4 Denaturierender Effekt *Cisplatin* induzierter Pt-DNA Addukte

Mit zunehmender Addukt-Dichte induzieren Pt-DNA Läsionen denaturierte Bereiche in benachbarten DNA-Sequenzen (Fichtinger-Schepman et al., 1985b; Fichtinger-Schepman et al., 1989). Die Messung dieses Phänomens wurde fluorimetrisch über die Bindung des Doppelstrang-reaktiven Farbstoffes „SYBR Green I“ durchgeführt (Abb. 4).

Ansatz	Bezeichnung	Verwendung	Inkubationskonz. [μ M]	Pt-Gehalt: [pmol Pt / μ g DNA]
1	Pt 0	Nichtkompetitiver ELISA Kompetitiver ELISA Immunomagnetische Zellseparation Postlabelling	--	--
2	--	analytisch	0,05	0,12
3	Pt 1	Postlabelling	0,15	0,52
4	Pt 2	Postlabelling	0,3	1,01
5	--	analytisch	1	2,60
6	Pt 3	Immunomagnetische Zellseparation Postlabelling	2,5	5,02
7	Pt 4	Nichtkompetitiver ELISA Kompetitiver ELISA	3	7,11
8	--	analytisch	5	7,25
9	--	analytisch	10	14,13
10	--	analytisch	15	31,74
11	--	analytisch	20	32,38
12	--	analytisch	40	85,13
13	--	analytisch	60	116,50
14	--	analytisch	100	167,43
15	Pt 5	Antigensynthese Nichtkompetitiver ELISA Kompetitiver ELISA	150	188,00

Tabelle 1 Inkubationskonzentration und molarer Pt-Adduktgehalt von Kalbsthymus-DNA nach *in vitro* Exposition mit *Cisplatin* (4.7.1 – 4.7.5)

2.1.2 Entwicklung eines Enzym-Immunoassays (ELISA) zur Messung des Antikörpertiters im Serum und der immunologischen Aktivität von Hybridomüberständen

Zur Überprüfung des Antikörper-Titers im Serum immunisierter Tiere und zur Erkennung anti-(Pt-DNA) positiver Hybridomklone wurde als Nachweisverfahren ein nichtkompetitiver Enzym-Immunoassay (ELISA) etabliert. Als immobilisierte Antigene wurden die Pt-DNA Präparationen „Pt 4“ und „Pt 5“ eingesetzt, als Negativkontrolle unplatinierte DNA.

Es wurden verschiedene Methoden zur Festphasen-Immobilisierung der unmodifizierten und der platinieren DNA auf Polystyrol-Mikrotiterplatten ausgetestet. Eine Kombination der Protokolle von Poirier et al. (1982) und Tilby et al. (1991) gewährleistet eine hohe und gut reproduzierbare Bindungseffizienz. Die mit DEAE-Dextran vorbeschichtete Platte wird dabei mit der jeweiligen DNA-Präparation beschickt und abschließend einer fixierenden UV-Strahlung unterzogen. Pro Well wurden 22 ng der eingebrachten 250 ng DNA bzw. Pt-DNA gebunden, entsprechend 160 fmol Pt-DNA Addukt für die Präparation „Pt 4“ bzw. 4.300 fmol für „Pt 5“ (Tab. 1).

Die Immunreaktivität gegenüber der schwach bzw. hoch platinieren DNA ist der kleinste gemeinsame Nenner aller anti-(Pt-DNA) Antikörper. MAK, die eine meßbare Kreuzreaktivität mit undotierter DNA aufwiesen, wurden nicht weiter verwendet.

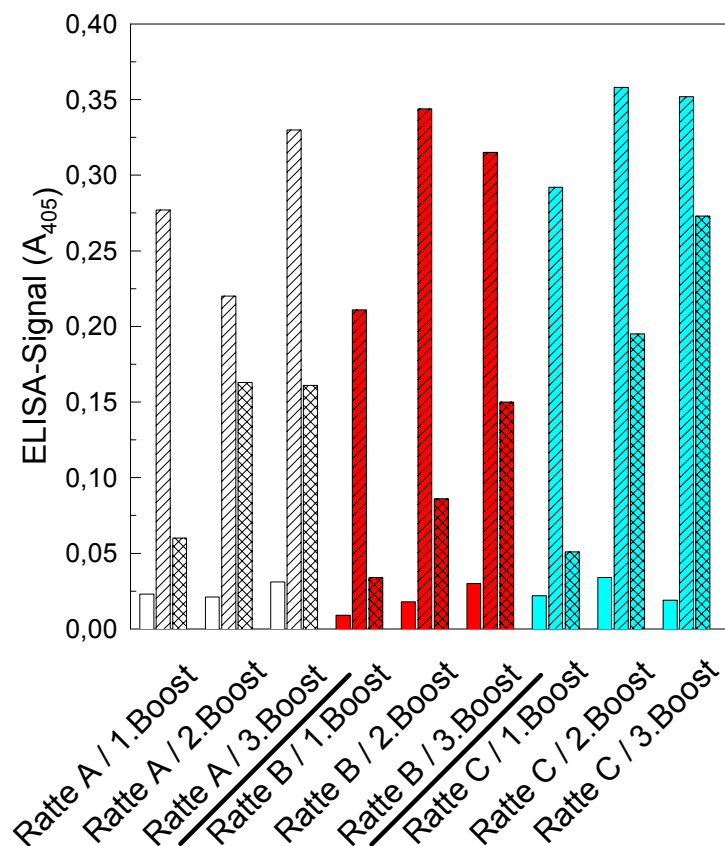
Der Nachweis der Antikörper-Antigenbindung erfolgt über einen alkalische Phosphatasegekoppelten anti-(Ratte IgG/IgM) Antikörper (4.1.3).

2.1.3 Immunisierung mit Konjugaten aus *Cisplatin*-exponierter Kalbsthymus-DNA und methyliertem BSA

Die Generierung der Hybridome bzw. der resultierenden monoklonalen Antikörper gegen *Cis*- bzw. *Carboplatin*- induzierte DNA Addukte gelang durch Verimpfung elektrostatisch gekoppelter Komplexe aus methyliertem Serumalbumin und *in vitro* platinierter DNA (Meijer et al., 1997; Terheggen et al., 1987; Tilby et al., 1991).

Platinierte DNA enthält die Gesamtheit aller möglichen koordinativen Strukturen (Fichtinger-Schepman et al., 1982 & 1985b) d. h. vornehmlich Pt-GG und Pt-AG Intrastrang-Addukte sowie G-Pt-G Interstrangaddukte. Diese Läsionen sind aufgrund der ungleichmäßigen, Platin-induzierten DNA-Denaturierung in verschiedenste stereochemische Nahordnungen integriert, so daß eine breite Palette an Epitopen verimpft wird. Die Heterogenität des Antigens führt zu einer Immunantwort, die aus Antikörpern unterschiedlichster Spezifität besteht.

Drei BD IX- Ratten („A“, „B“, „C“) wurden mit einem „Pt 5“-mBSA Konjugat geimpft, das jeweils 50 nmol an Pt-DNA Addukten enthielt. Die Immunisierung wurde monatlich über ein halbes Jahr lang wiederholt. Blutproben wurden mit dem ELISA auf Antikörperaktivität gegen das Trägerprotein, gegen undotierte DNA und gegen die niedrig platinieren Präparation „Pt 4“ bzw. die hoch platinieren „Pt 5“- DNA untersucht.



Immobilisiertes Antigen:

- Pt 4: 1 Addukt auf 430 Nukleotide; 22,5 ng DNA/Well
- Pt 5: 1 Addukt pro 16 Nukleotide; 22,5 ng DNA/Well
- mBSA; 100 ng/Well

Abb. 5 Anti-(Pt-DNA) bzw. anti-(mBSA) Titer im Serum von BD IX – Ratten nach Immunisierung mit (*Cisplatin*-DNA)-mBSA Komplexen (ELISA nach 2 – 4 Immunisierungen; 4.3.1)

Schon 10 Tage nach der zweiten Antigengabe (Erstimmunisierung und erste „Boost“-Immunisierung) konnte bei allen Tieren ein deutlichen Anstieg des Titers gegen mBSA, „Pt 4“ und „Pt 5“ nachgewiesen werden (Abb. 5). Sechs Monate nach der Erstimmunisierung wurden die Tiere geopfert und die Milzen für die Zellfusion präpariert.

2.1.4 Durchsuchen von Fusionsansätzen nach anti-(Pt-DNA) MAK-produzierenden Klonen: "Klassische" und Affinitäts-forcierte Methode

Die nach Fusion und HAT-Selektion in Kultur verbliebenen Hybridomzellen repräsentieren die gesamte Immunantwort des Tieres und müssen nach anti-(Pt-DNA) MAK-produzierenden Klonen durchsucht werden. Üblicherweise geschieht dies durch Vereinzeln der Zellen auf 96 Well Mikrotiterplatten (Coller & Coller, 1983; Eberle, 1988) und ELISA-Testung der resultierenden Überstände. Die Milz des Tieres „B“ wurde dementsprechend aufgearbeitet (Tabelle 2). Der Fusionsansatz aus 3×10^8 Milzzellen wurde auf insgesamt 6.000 Wells ausplattiert, die mikroskopisch auf Klonwachstum kontrolliert werden mußten. Die 218 resultierenden Klone wurden dem ELISA Test unterzogen, und davon 15 als anti-(Pt-DNA) positiv identifiziert.

Dieser erhebliche Arbeitsaufwand limitiert die Zahl der möglichen Fusionen und damit die Wahrscheinlichkeit, hochaffine und spezifische MAK zu finden.

Alternativ zu dieser Vorgehensweise wurden die Fusionsansätze der Tiere „A“ und „C“ mit dem von Ossendorp et al. (1989) und Horton et al. (1989) entwickelten Verfahren zur immunomagnetischen Separation von Hybridomzellen nach (Pt-DNA)-spezifischen Klonen durchsucht (Abb. 6). Die Methode wurde mit den herkömmlich isolierten Klonen „R-B 8“, „R-B 9“ und „R-B15“ etabliert und ausgetestet (Abb 6 B).

Die immunomagnetische Aufreinigung beschleunigt nicht nur das Auffinden von spezifischen Hybridomen, sondern selektioniert auf Klone, deren membranständige Antikörper eine besonders hohe Affinität zum Antigen haben und daher eine für die Isolierung ausreichende Bindung an die Magnetobeads zeigen (Egeland et al., 1988; Hebell & Götze, 1989). Nach den Vorschriften von Peters & Baumgarten (1992) wurde die Expression dieser membranständigen Antikörper mit Cy3-markiertem anti-(Ratte-Immunglobulin) Serum exemplarisch am Zellklon „R-B 8“ nachgewiesen (Abb. 6 A).

Die im Vergleich zur Immunisierungs-DNA „Pt 5“ nur sehr schwach Pt-dotierte Präparation führt zur präferentiellen Isolierung solcher Klone, welche ihr Antigen auch bei niedrigerem DNA-Adduktgehalt erkennen.

Um die Effektivität der Methode abzuschätzen, wurden drei anti-(Pt-DNA) positive Hybridomklone mit der jeweils 50fachen Zellzahl an anti-(Pt-DNA) negativen Zellen gemischt und der Magnet-Separation unterworfen (Abb. 6 C). Bead-positive und Bead-negative Zellen wurden vereinzelt und die Zellkulturüberstände mit Hilfe des ELISA auf Antikörper getestet. Der Anreicherungsfaktor für anti-(Pt-DNA) sezernierende MAK errechnet sich aus dem Quotienten der positiven Kulturüberstände der Bead-separierten Hybridome und der positiven Fraktionen im unseparierten Kontrollansatz. Für die Vitalitätsuntersuchung wurden jeweils 10.000 Bead-gebundene Hybridomzellen und 10.000 ungebundene Hybridomzellen eingesät und nach drei Tagen mit Hilfe des MTT-Tests untersucht.

Dabei wurden Anreicherungsfaktoren zwischen sechs und elf gefunden, wobei die Vitalität der Hybridomzellen durch das immunomagnetische Prozedere nur unwesentlich beeinträchtigt wurde.

Die immunomagnetische Selektion der Fusionsansätze „A“ und „C“ führte zur Isolierung von 8 bzw. 44 anti-(Pt-DNA)positiven Klonen (Tabelle 2). Die Ausbeute an Antigen-spezifischen-Klonen konnte, bei nur geringem Vitalitätsverlust durch den Anreicherungsschritt von unter 7% auf 72% bzw. 97% gesteigert werden.

	Ratte „A“:	Ratte „B“:	Ratte „C“:
Antigengabe	6x „Pt 5“- mBSA in MPL / TDM-Adjuvans 1x „Pt 5“- mBSA in PBS		
Immunisierungszeitraum	6 Monate		
Milzzell-Ausbeute	0,7x10 ⁸	3x10 ⁸	1,2x10 ⁸
Screening	Immunomagnetische Separation von anti-(Pt-DNA) Hybridomen & Vereinzlung auf Mikrotiterplatten; ELISA	Konservativ: Vereinzlung auf Mikrotiterplatten; ELISA	Immunomagnetische Separation von anti-(Pt-DNA) Hybridomen & Vereinzlung auf Mikrotiterplatten; ELISA
Gesamtzahl der Klone	11	218	45
anti-(Pt-DNA) Klone davon:	8	15	44
IgM	5	12	24
IgG 1	--	1	2
IgG 2a	3	2	17
IgG 2b	--	--	1

Tabelle 2 Immunisierung, Ausbeute an Hybridomklonen und Isotypisierung der MAK aus den Fusionen

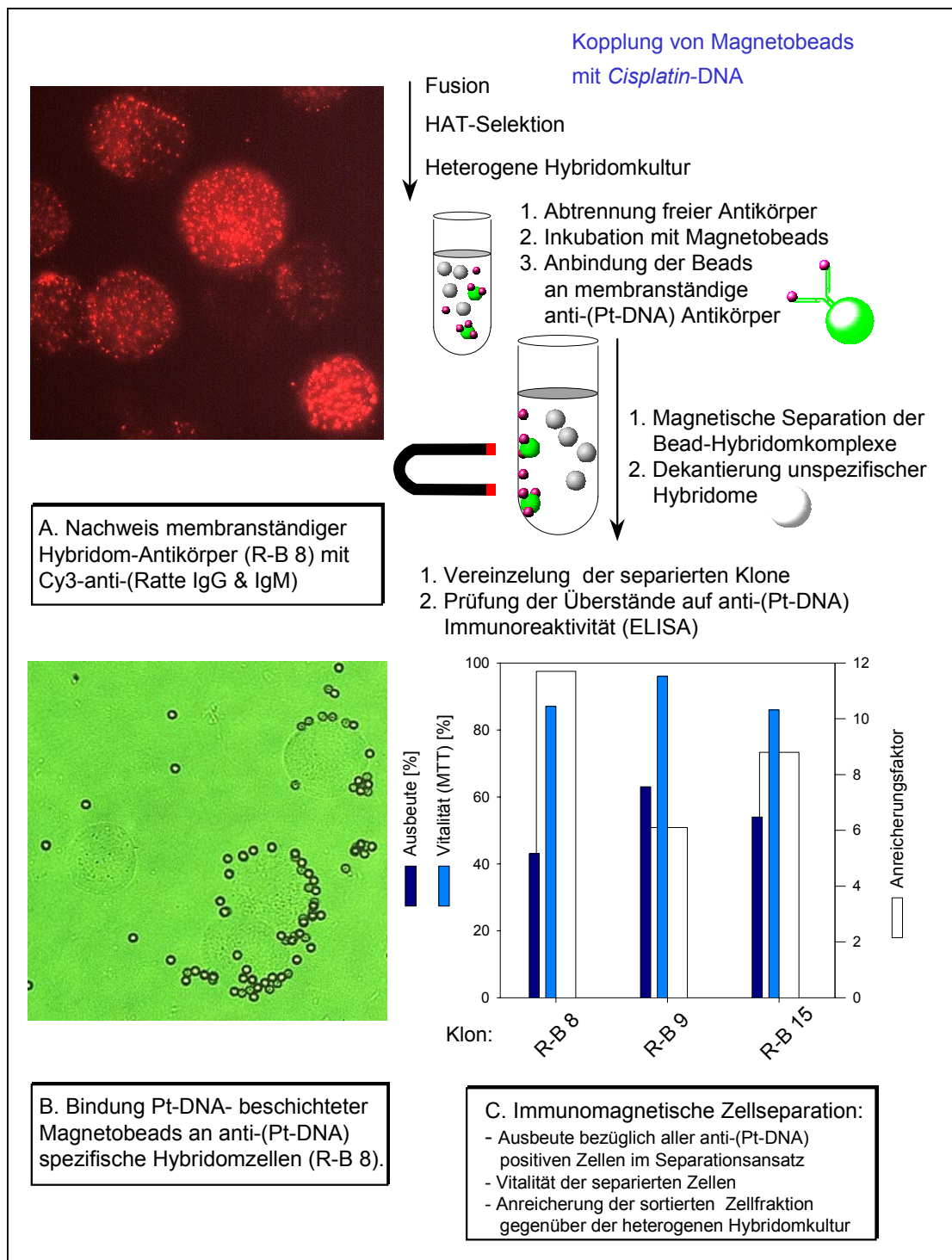


Abb. 6 Immunomagnetische Separation anti-(Pt-DNA) sezernierender Hybridom-Klone

2.1.5 Reinigung monoklonaler Antikörper

Sowohl für die Charakterisierung, als auch für viele immunanalytische Anwendungen müssen Antikörper aus den Kulturüberständen von Hybridomzellen gereinigt oder vollständig isoliert werden. Für die weiteren Schritte wurden die MAK aus 20% FKS-haltigem „RPMI 1640“ Medium oder alternativ aus Serum-freiem „SFM“ Medium isoliert.

Fötale Kälberserum enthält bis zu bis 60 mg / ml Protein, davon entfallen bis zu 400 µg / ml auf bovine Antikörper. Diese sind nur schwer von den gesuchten murinen Antikörpern zu trennen und können insbesondere bei immunhistochemischen Anwendungen zu unerwünschten Klebeeffekten führen (Peters & Baumgarten, 1992).

„SFM“ Medium enthält nur 20 µg/ml Protein und keine Immunglobuline. Drei Tage nachdem initial 10^7 Hybridomzellen in 20 ml Medium eingesät worden waren, konnte sowohl im Serum-freien als auch im Serum-haltigen Medium unterschiedslos Antikörperkonzentrationen von 10 – 20 µg/ml gemessen werden. Standardmäßig wurde die Antikörpergewinnung daher in „SFM“ Medium durchgeführt

Die Reinigung wurde durch eine serielle Kombination aus thiophiler Interaktionschromatographie an „T-Gel“ Adsorbent und Affinitätschromatographie an „HiTrap Protein G“ durchgeführt (Abb. 7 und 8). Die Reinheit der Antikörper aus „SFM“ Medium war in der Regel schon nach der „T-Gel“-Chromatographie ausreichend (Abb. 9).

Da die thiophile Chromatographie aus einer hohen K_2SO_4 -Konzentration durchgeführt wird, muß das zu reinigende Medium vorher nicht dialysiert werden (Hutchens & Porath, 1986; Oscarsson & Porath, 1989). Durch die strukturelle Nachbarschaft der Sulfongruppe zum Thioether bindet „T-Gel“ insbesondere Immunglobuline und α_2 -Makroglobuline (Belew et al., 1987; Lihme & Heegaard 1991; Nopper et al., 1989).

Die MAK-Ausbeute der „T-Gel“-Chromatographie betrug über 80%, die Aktivität der Antikörper blieb dabei vollständig erhalten. Das Eluat konnte ohne Dialyse direkt auf die Protein G-Säule aufgetragen werden.

Das vom Hersteller chemisch modifizierte „HiTrap Protein G“ (Pharmacia) eignet sich zur Isolierung von Ratten-Antikörpern des Isotyps IgG 2a, nicht aber zu der anderer Isotyp-Klassen. Die Ausbeute der Protein G-Chromatographie betrug über 65%, die Antikörperaktivität blieb auch hier vollständig erhalten.

Die gereinigten Eluate wurden abschließend über „Ultrafree 15 / Biomax 100“ auf 10 mg/ml konzentriert und bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert. Über sechs Monate konnte in den Konzentraten kein meßbarer Verlust an Immun-Reaktivität festgestellt werden.

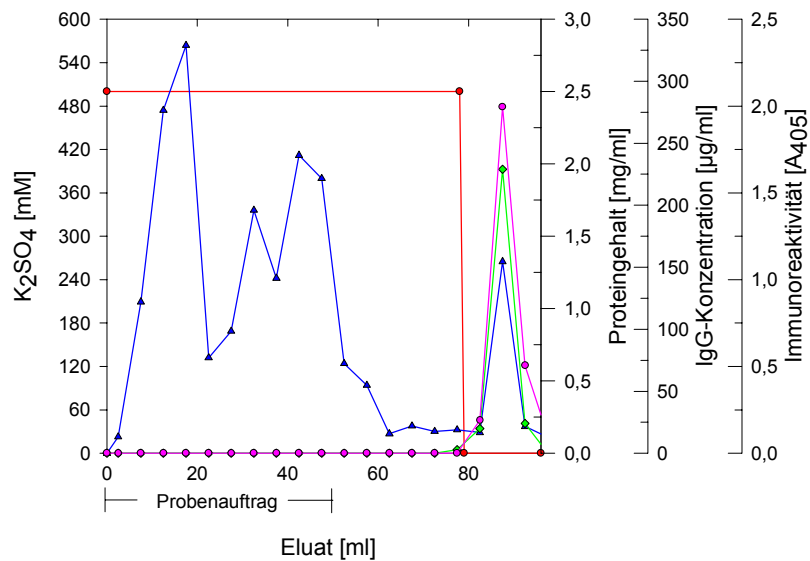
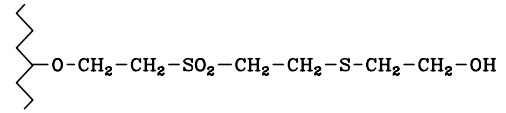
Während des Reinigungsverfahrens wurden regelmäßig Proben der Bestimmung des Proteingehaltes, der Immunglobulinkonzentration und der Immun-Reaktivität unterworfen. Der Reinigungserfolg wurde mit einer denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese dokumentiert (Abb. 9).

Mit diesen beiden chromatographischen Verfahren stehen also relativ einfache und effiziente Reinigungsmethoden zur Verfügung, die eine direkte Verwendung der MAK in den nachfolgenden Schritten erlauben.

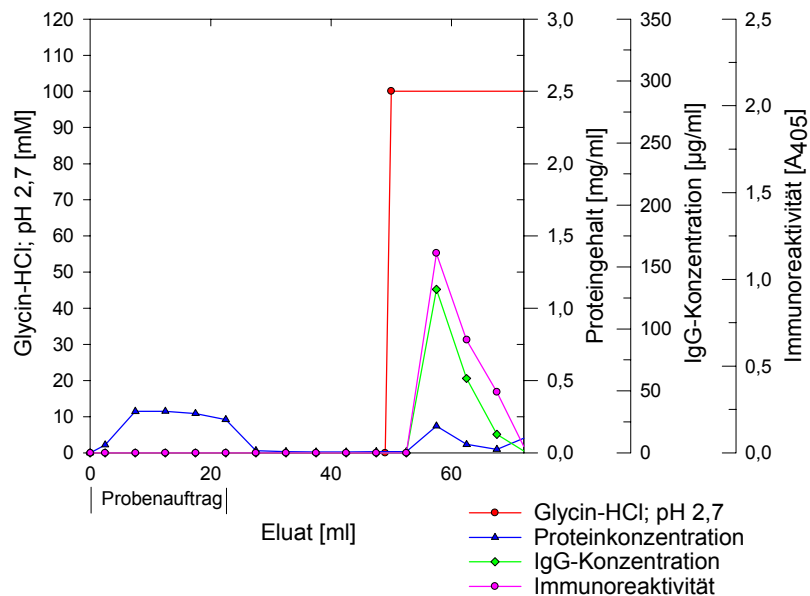
- Einstellung von 50 ml des 20%igen RPMI 1640 Hybridomkultur-Überstandes „R-B 8“ (22 µg IgG 2a / ml) auf 500 mM K₂SO₄

- Sterilfiltration

- Thiophile Chromatographie über T-Gel



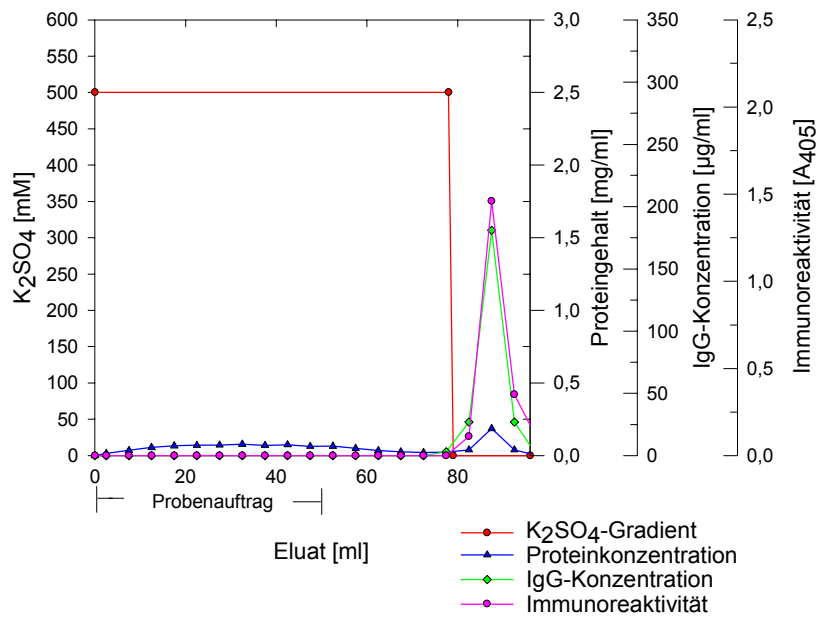
- Protein G-Chromatographie der aktiven Fraktionen über HiTrap Protein G



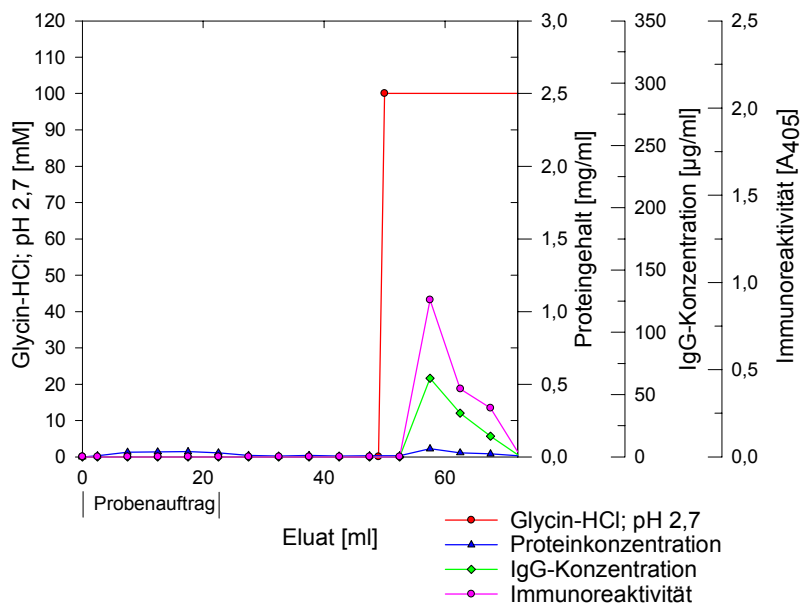
- Konzentration über Ultrafree15 Biomax 100

Abb. 7 Isolierung von MAK „R-B 8“ aus 20%igem „RPMI 1640“ Medium

- Einstellung von 50 ml des Serum-freien SFM Hybridomkultur-Überstandes „R-B 8“ (17 µg IgG 2a / ml) auf 500 mM K_2SO_4
- Sterilfiltration
- Thiophile Chromatographie über T-Gel

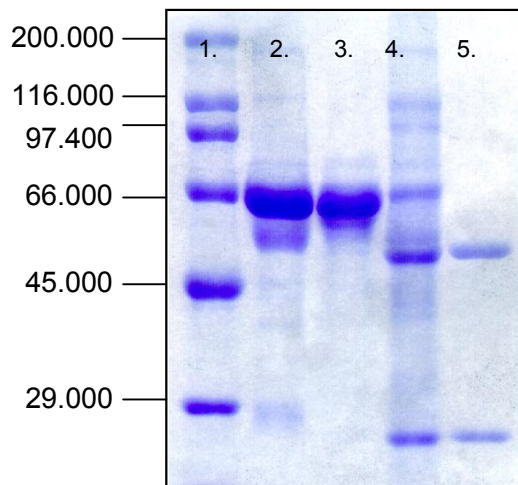


- Protein G-Chromatographie der aktiven Fraktionen über HiTrap Protein G



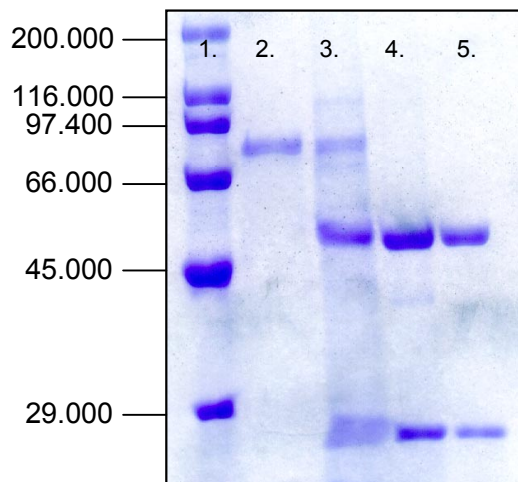
- Konzentration über Ultrafree15 Biomax 100

Abb. 8 Isolierung von MAK „R-B 8“ aus Serum-freiem „SFM“ Medium



SDS 10%-PAGE; 5 µg Protein / Spur; 100 mg/ml DTT:

1. MW-Marker
2. RPMI 1640, 20%FCS
3. „R-B 8“ in RPMI 1640, 20% FCS
4. „R-B 8“ Aktive Fraktionen T-Chromatographie
5. „R-B 8“ Aktive Fraktionen G-Chromatographie



SDS 10%-PAGE; 5 µg Protein / Spur; 100 mg/ml DTT:

1. MW-Marker
2. SFM-Medium
3. „R-B 8“ in SFM
4. „R-B 8“ Aktive Fraktionen T-Chromatographie
5. „R-B 8“ Aktive Fraktionen G-Chromatographie

Abb. 9 Effizienz einer seriellen „T-Gel“ / „HiTrap Protein G“ -Reinigung von 20%igen „RPMI 1640“- bzw. „SFM“- Hybridomüberständen

2.2 Adduktspezifität von MAK gegen Pt-DNA Addukte

2.2.1 Entwicklung und Durchführung eines kompetitiven Enzym-Immunoassays

Die als Antigen verimpfte platinierter DNA enthält die Gesamtheit aller möglichen koordinativen Addukt-Strukturen. Diese Heterogenität führt zu einer Palette von Hybridomklonen mit unterschiedlichsten Spezifitäten (2.1.3). Die Addukte unterscheiden sich nicht nur strukturell voneinander, gleichartige Läsionen können auch in unterschiedlichem stereochemischen Kontext einer DNA-Sequenz eingebunden sein und damit als eigenständige antigene Determinanten fungieren (2.1.1).

Eine Möglichkeit, die Spezifität eines MAK zu charakterisieren besteht in der Anwendung des kompetitiven ELISA. Dabei werden dem Antikörper zunächst potentielle, synthetisch hergestellte Epitope als „Inhibitoren“ zur Bindung angeboten. Besteht eine hohe spezifische Affinität, so wird dies zur Antigen-Antikörperbindung führen und damit zur Absättigung der variablen Region des MAK. Dieser Verlust von Immunreaktivität zeigt sich in einem nachfolgenden ELISA als Signalabschwächung.

Es wurde zunächst versucht die Adduktspezifität der anti-(Pt-DNA) MAK im kompetitiven ELISA mit Hilfe von Pt-Addukt-tragenden Desoxynukleotiden als Inhibitoren aufzuklären.

2.2.1.1 Pt-DNA als Inhibitor

Zuvor wurden die Reaktionsbedingungen der Competition mit den einzel- und doppelsträngig als Inhibitoren eingesetzten Präparationen „Pt 4“ und „Pt 5“ optimiert (Abb. 10). Die Versuche mit der Pt-DNA ließen Schlußfolgerungen zu, inwieweit der jeweils untersuchte Antikörper in seiner Addukt-Erkennungsfähigkeit von der Denaturierung der DNA abhängig ist. Dies ist aus zwei Gründen von Bedeutung: Für immunhistochemische Anwendungen ist ein Antikörper umso besser geeignet, je effektiver er sein Antigen auch im Kontext nativer DNA erkennt. Außerdem führt die Platinerung als solche zu einer Denaturierung der DNA-Struktur (2.1.1). Dies führt bei einem Antikörper, der sein Epitop präferentiell im denaturierten Zustand bindet, unter Umständen zu einer tendenziellen Überbestimmung hochdotierter DNA (Fichtinger-Schepman et al., 1989).

Exemplarisch ist eine solche Competition mit DNA-Inhibitoren für den MAK „R-B 8“ gezeigt (Abb. 10). Undotierte DNA zeigte bei diesem MAK weder im nativen noch im denaturierten Zustand eine inhibitorische Aktivität. Auch Pt-DNA Addukte in der schwach platinierter Fraktion „Pt 4“ waren in nativer DNA nahezu unerkennbar.

Die thermische Denaturierung der DNA hatte eine beträchtliche Steigerung der Immun-Reaktivität gegenüber „Pt 4“ zur Folge. Die hoch dotierte DNA „Pt 5“ zeigte aufgrund der Addukt-induzierten DNA-Aufweitung auch im nativen Zustand eine beträchtliche kompetitive Aktivität, die sich durch Hitze-Denaturierung zwar noch steigern ließ, nicht aber im selben Ausmaß, wie bei der niedrig platinierter „Pt 4“ DNA. Dies Phänomen wird wahrscheinlich von den einer kompletten Denaturierung entgegenwirkenden Pt-DNA Interstrang Addukten hervorgerufen.

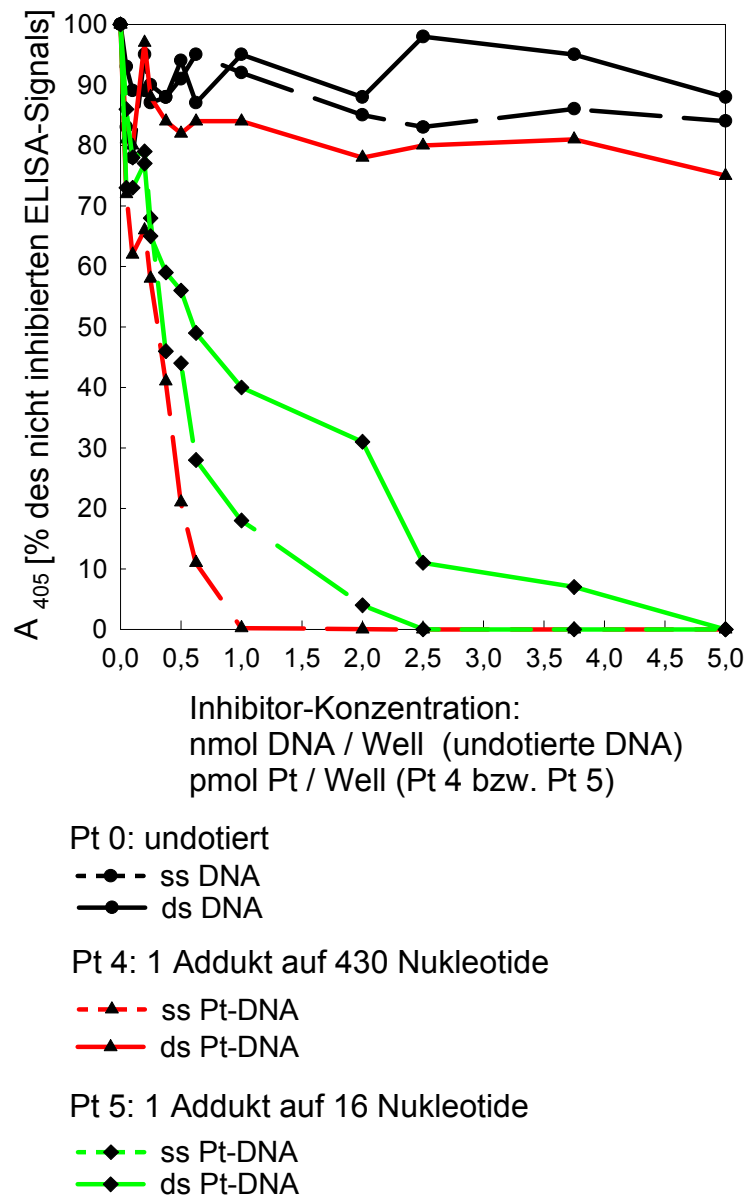


Abb. 10 Immun-Reaktivität des MAK „R-B 8“ gegenüber DNA- und Pt-DNA Inhibitoren im kompetitiven ELISA

2.2.1.2 Pt-Desoxynukleotide als Inhibitoren

Die Klärung der Addukt-Spezifität durch einen kompetitiven ELISA setzt die Synthese von Inhibitoren voraus, die nicht nur strukturell potentiellen Bindungs-Epitopen entsprechen, sondern auch deren dreidimensionale Einbindung in eine Nahordnung nachahmen.

Nach den Vorschriften von Murchie & Lilley (1993) und Kasparkova & Brabec (1995) wurden dazu Oligonukleotide hergestellt, die Pt-GG und Pt-AG enthielten (Abb. 11 A).

Man macht sich dabei zunutze, daß bei einzelsträngigen, *Cisplatin*-exponierten Desoxynukleotiden die koordinative Verknüpfung von benachbartem GG bzw. AG ausschließlich über die beiden N7 Positionen der Basen erfolgt (Abb. 1; Dijt et al., 1988; Naser et al., 1988). Die resultierenden Komplexe entsprechen somit den Strukturen, die Fichtinger-Schepman et al. (1985) in *Cisplatin*-exponierter DNA identifizieren konnten.

Da die Phosphodiesterbindung der Intrastrang-Addukte für eine Spaltung durch das Nuklease P1/DNAse -System unzugänglich ist (Fichtinger-Schepman et al., 1982, 1985a), können die resultierenden Pt-Dinukleotide chromatographisch von den ungebundenen Mononukleotiden getrennt und nachgewiesen werden (Eastman, 1983; Comess et al., 1992). Eine solche Analyse wurde sowohl für die Pt-DNA Präparation „Pt 5“ als auch für die platinieren und unplatinieren Oligonukleotide durchgeführt (Abb. 11 B, C, D). Für jeden Peak wurde mit Hilfe des Photodiodenarray-Detektors ein Spektrum im Wellenlängenbereich von 230 – 300 nm aufgenommen.

Deutlich erkennt man im Pt-DNA Chromatogramm (Abb. 11 B) die Positionen der Intrastrang-Addukt Peaks. Im Hydrolysat des „Pt-Nr. 3“ Oligonukleotids (Abb. 11 C) findet sich der entsprechende Pt-GG Peak wieder. Im Vergleich zum unplatinieren Oligonukleotid „Nr. 3“ (Abb. 11 D) hat der relative Gehalt an freiem Guanylat erwartungsgemäß abgenommen.

Die Konstrukte wurden einzel – und doppelsträngig zehn verschiedenen anti-(Pt-DNA) positiven MAK zur Bindung angeboten. Trotz der Strukturechtheit der induzierten Intrastrang-Addukte konnte für keines der Oligonukleotide eine Affinität und damit inhibitorische Potenz nachgewiesen werden. Es ist daher zu vermuten, daß das stereochemische Motiv, das die Antikörper als Epitop erkennen, unter Umständen deutlich über den Nahbereich der Addukte hinausreicht und von den verwendeten Oligonukleotid-Strukturen nicht ausreichend repräsentiert wird.

Die Schwierigkeit, DNA-Modifikationen zu synthetisieren, die in einem weiträumig umgebenden, dreidimensionalen Kontext eingebettet sind, begrenzt die Möglichkeit des kompetitiven Ansatzes bei der Charakterisierung entsprechend bindender Proteine ganz allgemein.

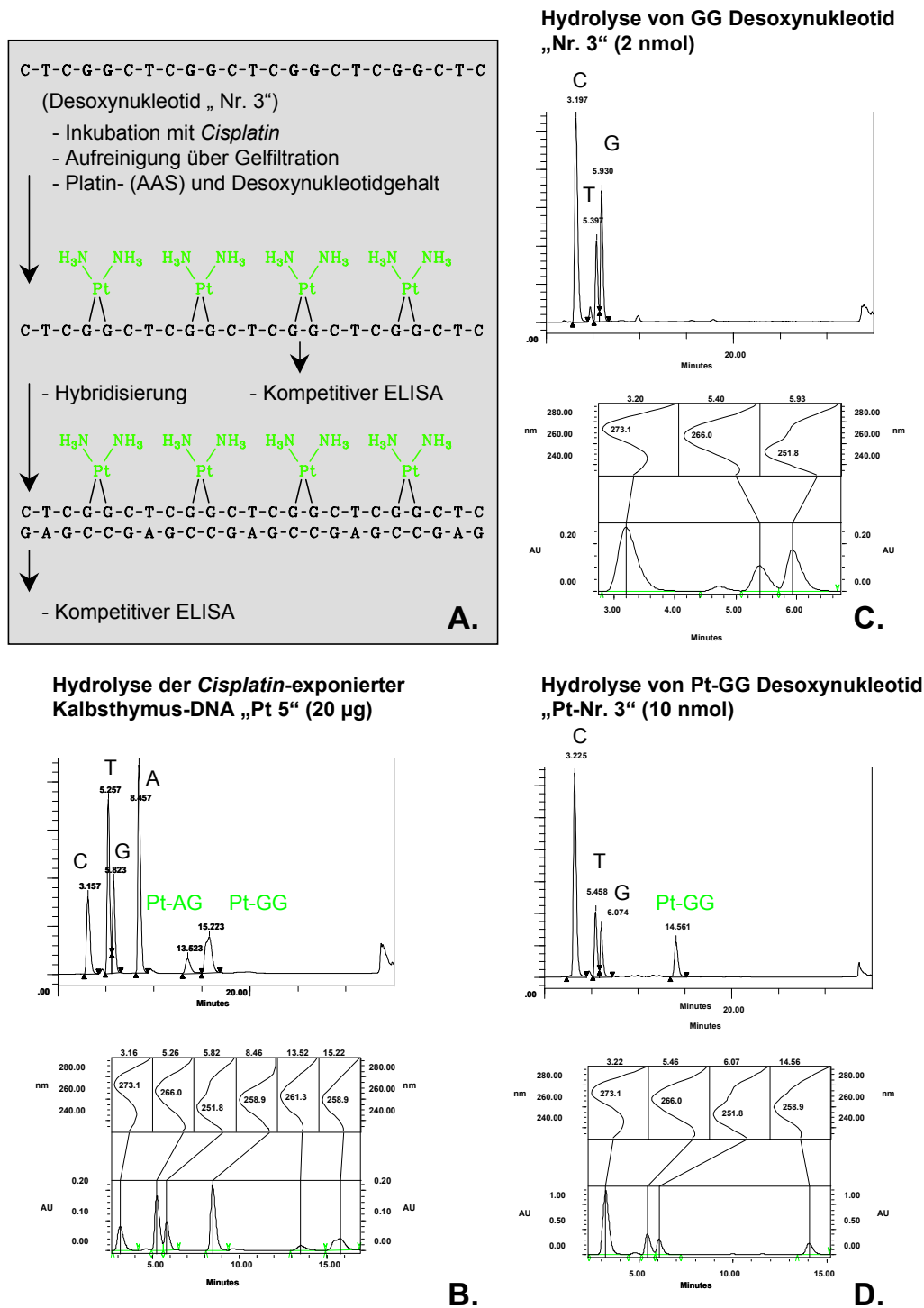


Abb. 11 Generierung und Charakterisierung von einzel- und doppelsträngigen Desoxynukleotiden mit Pt-GG Addukten
 Synthetische Oligonukleotide wurden platinert (4.7.2), enzymatisch verdaut und die resultierenden Mono- und Pt-Dinukleotide chromatographisch aufgetrennt (4.7.7.4)

2.2.2 “Retrospektive” Charakterisierung der MAK-Spezifität mit dem Postlabelling-Verfahren

Alternativ zum kompetitiven ELISA wurde hier erstmalig ein Verfahren entworfen und etabliert, das es ermöglicht, die Bindungs-Spezifität von Antikörpern, die gegen DNA-Modifikationen gerichtet sind, „retrospektiv“ zu charakterisieren.

Dazu wird dem Antikörper die gesamte Palette möglicher Adduktstrukturen zur Bindung angeboten. Die Läsionen befinden sich vereinzelt auf DNA-Fragmenten im nativen Kontext. Im zweiten Schritt werden über ein Festphasen-Adsorptionsverfahren diejenigen DNA-Moleküle angereichert und isoliert, die eine vom Antikörper erkannte und gebundene Struktur enthalten. Dieses Isolat wird dann im dritten Schritt mit Hilfe des „Postlabelling“-Verfahrens auf die Adduktidentität und damit auf die Spezifität der Antikörper untersucht.

2.2.2.1 Generierung der Pt-DNA Fragmente

Um das „DNA-Substrat“ für diese MAK-Charakterisierung bereitzustellen wurden durch Ultraschall-Behandlung der Pt-DNA Präparationen „Pt 1“, „Pt 2“ und „Pt 3“, Fragmente von durchschnittlich 500 bp Länge erzeugt, die statistisch jeweils 0,16, 0,3 bzw. 1,6 Pt-Addukte trugen (Abb. 12). Nach der Poisson-Verteilung ist die Wahrscheinlichkeit, daß bei dieser Vorgehensweise Fragmente mit nur einem Addukt entstanden 92, 86 bzw. 41 Prozent.

2.2.2.2 Filterbindung von MAK-(Pt-Addukt)- Komplexen

Diese Fragmente wurden mit dem zu charakterisierenden MAK inkubiert und das Gemisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen, die Proteine und Protein-DNA-Komplexe, nicht aber native DNA-Moleküle bindet. Nicht-MAK komplexierte DNA passierte die Membran unabhängig vom Adduktgehalt. Anschließend wurde durch Veränderung der Elutionsbedingungen die Antikörper-(Pt-Addukt)-Bindung aufgehoben. Während das Protein auf der Membran verblieb, konnte die DNA-Fraktion, die das durch den MAK spezifisch erkannte Epitop enthielt, im Eluat abgetrennt werden (Abb. 13).

2.2.2.3 Identifizierung von Pt-DNA Addukten mit dem “Postlabelling“-Verfahren

Mit dem Radiochromatographie-gekoppelten ^{32}P -Postlabelling-Verfahren lassen sich Absolutmengen von $> 5 \times 10^9$ Pt-DNA Addukten (8 fmol) nicht nur quantifizieren, sondern auch strukturell identifizieren (Blommaert & Saris 1995; Pluim et al., 1999; Welters et al., 1997).

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schellens, Antoni van Leeuwenhoek Hospital (The Netherlands Cancer Institute), Amsterdam wurde mit Hilfe dieser Methode die Zusammensetzung der aus der Filterbindung stammenden Pt-DNA Addukt-Extrakte untersucht (Abb. 14). Bisher wurden fünf der insgesamt 47 Hybridomklone mit dieser Methode charakterisiert (Tab. 2). Bei der Auswahl wurden solche Antikörper bevorzugt, die ihre Eignung für die immunhistochemische Analyse bereits bewiesen hatten.

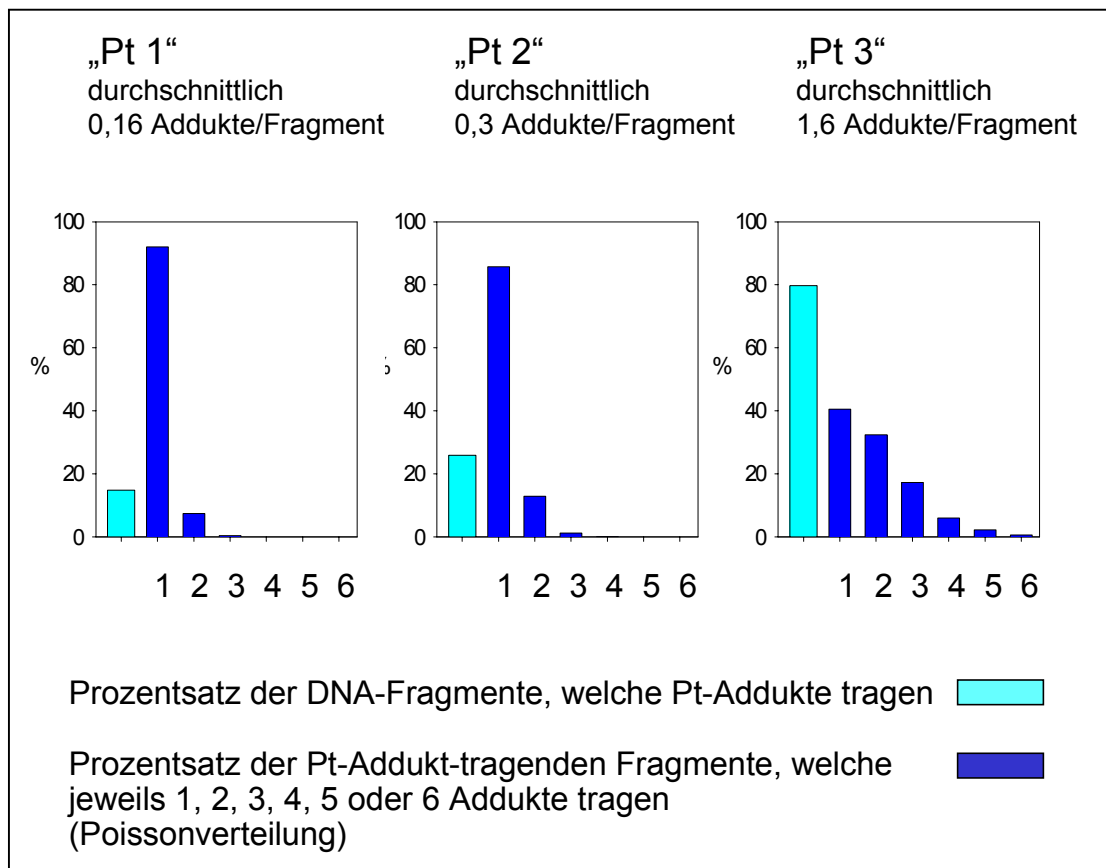


Abb. 12 Häufigkeitsverteilung von Pt-Addukten auf DNA-Fragmenten mit unterschiedlichem Pt-Dotierungsgrad

Die Postlabelling-Analyse der drei unfraktionierten Pt-DNA Präparationen „Pt 1“, „Pt 2“ und „Pt 3“ ergab einen von der Dotierung unabhängigen Pt-AG Anteil zwischen 12,6% und 13,9% (Abb. 15).

Der MAK „R-B 3“ zeigt eine hohe Pt-AG Bindungspräferenz. Aus dem Substrat „Pt 1“, das den geringste Anteil mehrfach adduktierter Fragmente aufwies, wurde Pt-AG von 13% auf 48,4% angereichert. Bei den höher platinieren Fraktionen „Pt 2“ und „Pt 3“ war dieser Anreicherungseffekt weniger deutlich ausgeprägt, da der Prozentsatz an spezifisch gebundenen Addukten von 86,5% („Pt 1“) auf 52,1% („Pt 3“) abnahm und der Einfluß der co-isolierten, überwiegend aus Pt-GG bestehender Addukte überwog. Ein ähnliches Verhalten zeigten die MAK „R-B 8“ und „R-C 22“.

Der MAK „R-C 7“ differenziert offensichtlich nicht zwischen der Pt-GG und der Pt-AG Intrastrang-Läsion. Der relative Pt-AG Anteil entsprach dem des Ausgangs-Substrates, ohne daß der Einfluß der Mehrfachadduktierung zum Ausdruck kam. Dieser Antikörper ist demnach zum gleichzeitigen Nachweis der beiden Hauptaddukte geeignet.

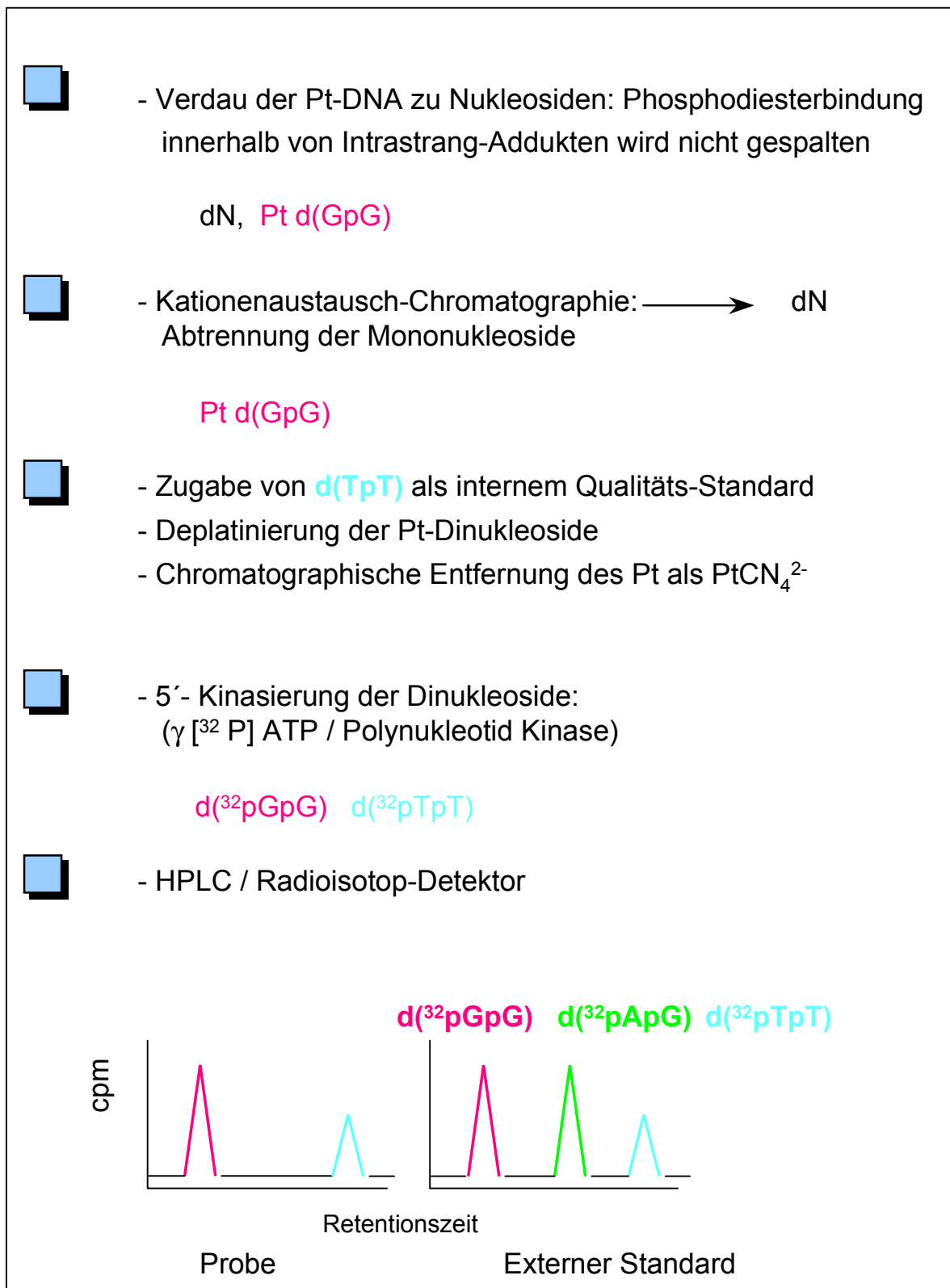
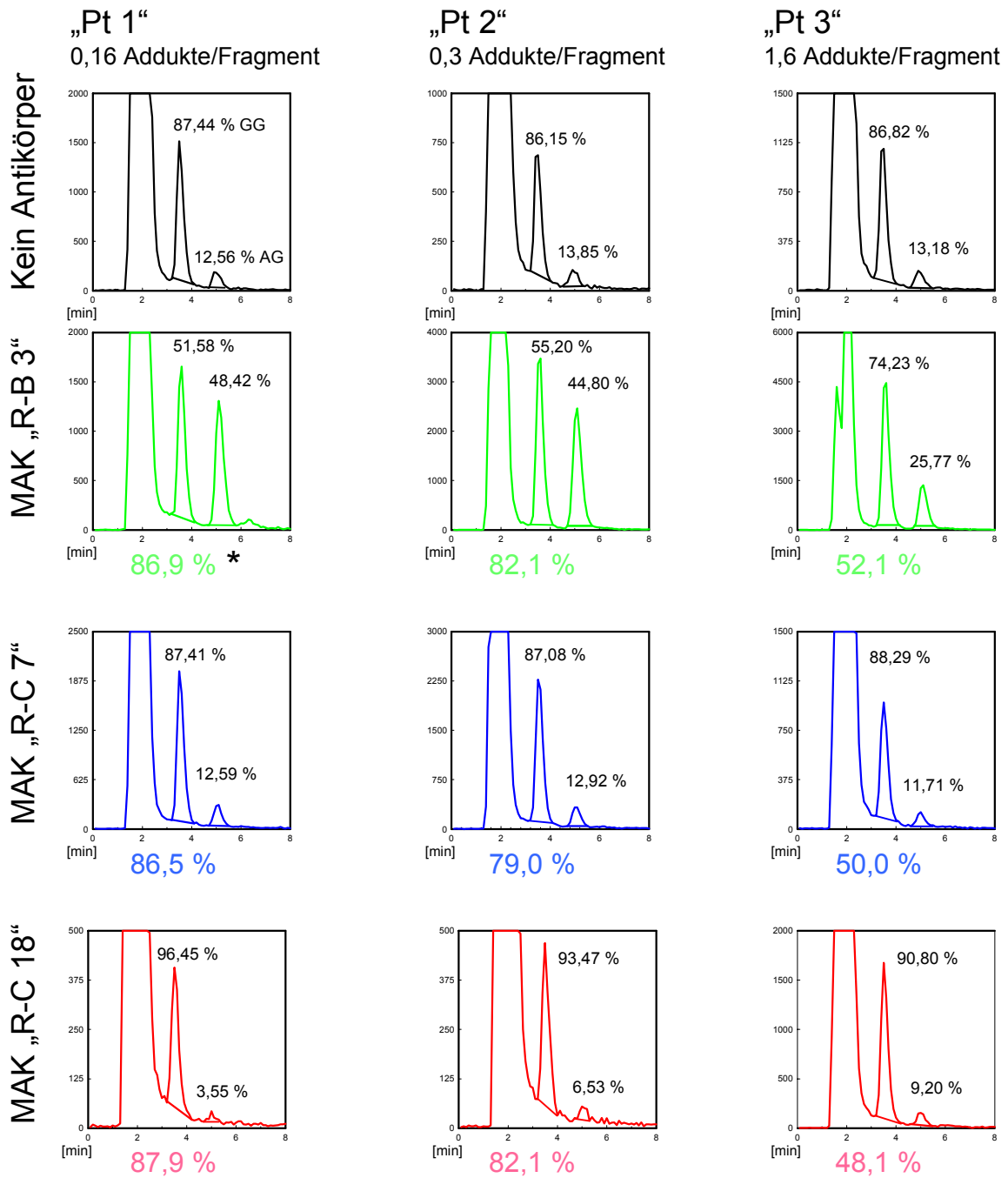


Abb. 14 „ P^{32} -Postlabelling“ und Radiochromatographischer Nachweis von Pt-DNA Addukten (4.2.2.2)



* Prozentsatz der spezifisch gebundenen Addukte

Abb. 15 Radiochromatographische Charakterisierung der Spezifität von anti-(Pt-DNA) MAK (4.7.7.5)

Damit stehen derzeit drei MAK für die Immunanalytik zur Verfügung, von denen einer für das GG-Addukt, einer für das AG-Addukt und einer als Pan-Antikörper für beide Läsionen gleichzeitig eingesetzt werden kann.

2.3 Etablierung und Optimierung des Immuncytologischen Assays (ICA) zum Nachweis *Cis-* bzw. *Carboplatin* induzierter Pt-DNA-Addukte auf Einzelzellebene

Auf der Basis des von Seiler et al. (1993) und Thomale et al. (1994) an unserem Institut etablierten „Immuncytologischen Assay (ICA)“ wurde ein Immunfluoreszenzverfahren entwickelt, um *Cis-* bzw. *Carboplatin*-induzierte DNA-Addukte mit Hilfe der neu etablierten Antikörper Addukt-spezifisch auf Einzelzellebene nachzuweisen und mit Hilfe einer digitalen Bildverarbeitung zu quantifizieren.

Die Methode wurde sowohl für Platin-behandelte Zellkulturen, als auch für Chemotherapie-begleitende Messungen an Biopsiematerial optimiert (Abb. 16).

2.3.1 Immobilisierung von Zellen und Gewebeschnitten

Aufgrund der zu Vermeidung von Hintergrundsignal notwendigen intensiven Proteolyse, müssen Zellen und Gewebe vor der ICA-Färbung auf dem Objektträger immobilisiert werden. Als adäquate Lösung dieses Problems erwies sich die Methode nach Stöcker et al. (1985), bei der Carboxygruppen auf der Zelloberfläche mit Hilfe von 3-Aminopropyl-triethoxysilan als Säureamide gebunden werden und dadurch die Adhäsion auf dem Trägerglas gewährleisten (Abb. 17).

2.3.2 Denaturierung

Um eine ausreichende Zugänglichkeit der Antikörper zu ihren intranukleären Epitopen zu sichern, wurden verschiedene Aufschluß- und Denaturierungsverfahren ausgetestet. Die Alkalibehandlung erwies sich dabei gegenüber einer Formamid-Fixierung und der von Frankfurt et al. (1996a & b) vorgeschlagenen Mikrowellen-Behandlung als überlegen. Durch die Inkubation mit methanolischer NaOH kommt es zu alkalischer Esterhydrolyse der Membranlipide und zusätzlich zu einer partiellen Denaturierung der DNA.

2.3.3 Proteolyse

Die Proteolyse mit Proteinase K und Pepsin begünstigt einerseits die Akzessibilität der antigenen Determinaten, reduziert andererseits unerwünschte, unspezifische Antikörperbindung an zytosolische Proteine und Membranbausteine. Die morphologische Integrität der Zellkerne bleibt dabei weitgehend erhalten.

Die Proteolyse erwies sich insbesondere bei Messungen an Geweben als außerordentlich wichtig, um störende Hintergrundfluoreszenz zu unterbinden (Abb. 18). Für jeden Gewebetyp mußten die optimalen Verdaubedingungen im Einzelnen ausgetestet werden.

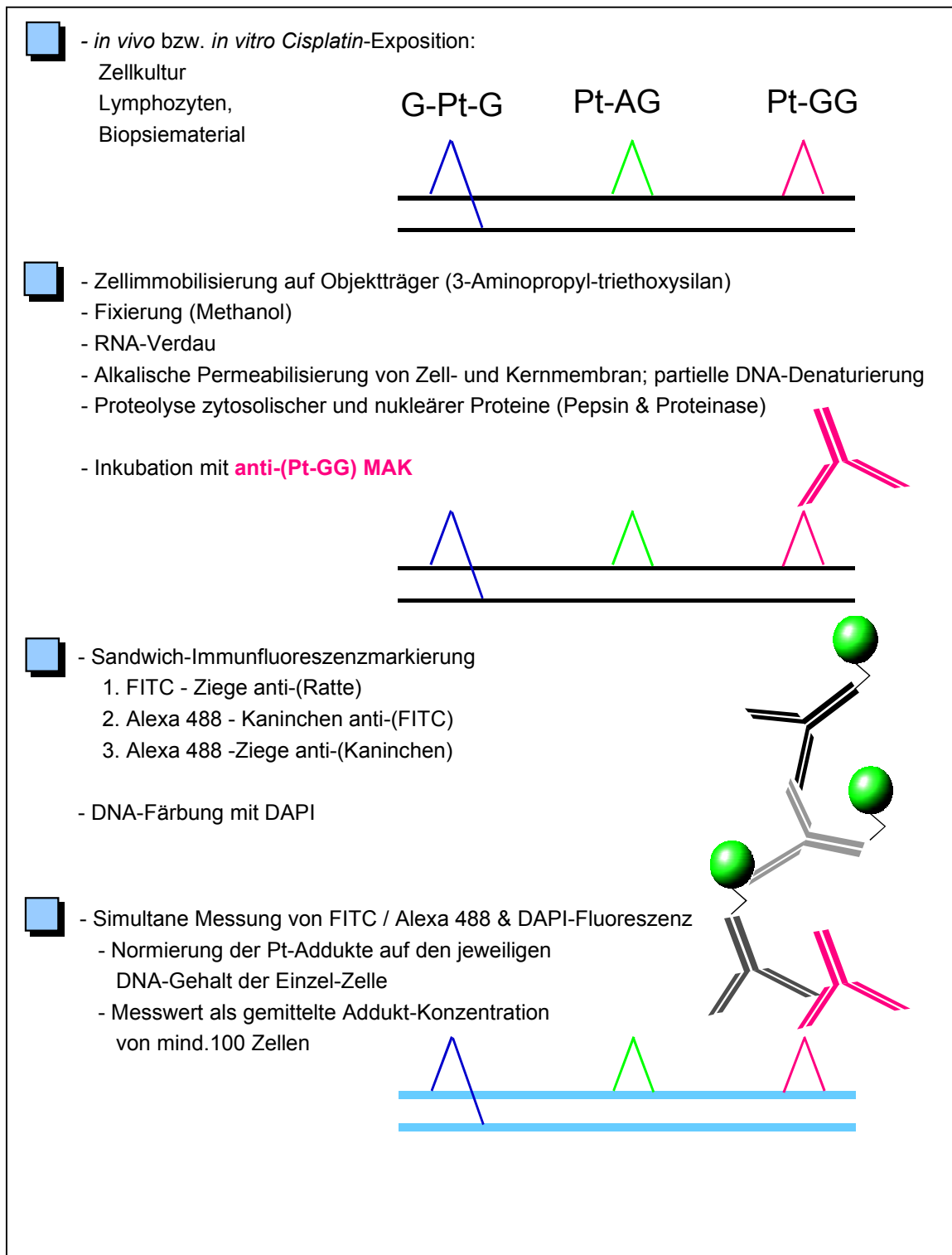


Abb. 16 Schematische Darstellung des „Immuncytologischen Assay“ (ICA) zur Analyse *Cisplatin*-induzierter DNA Addukte in individuellen Zellkernen

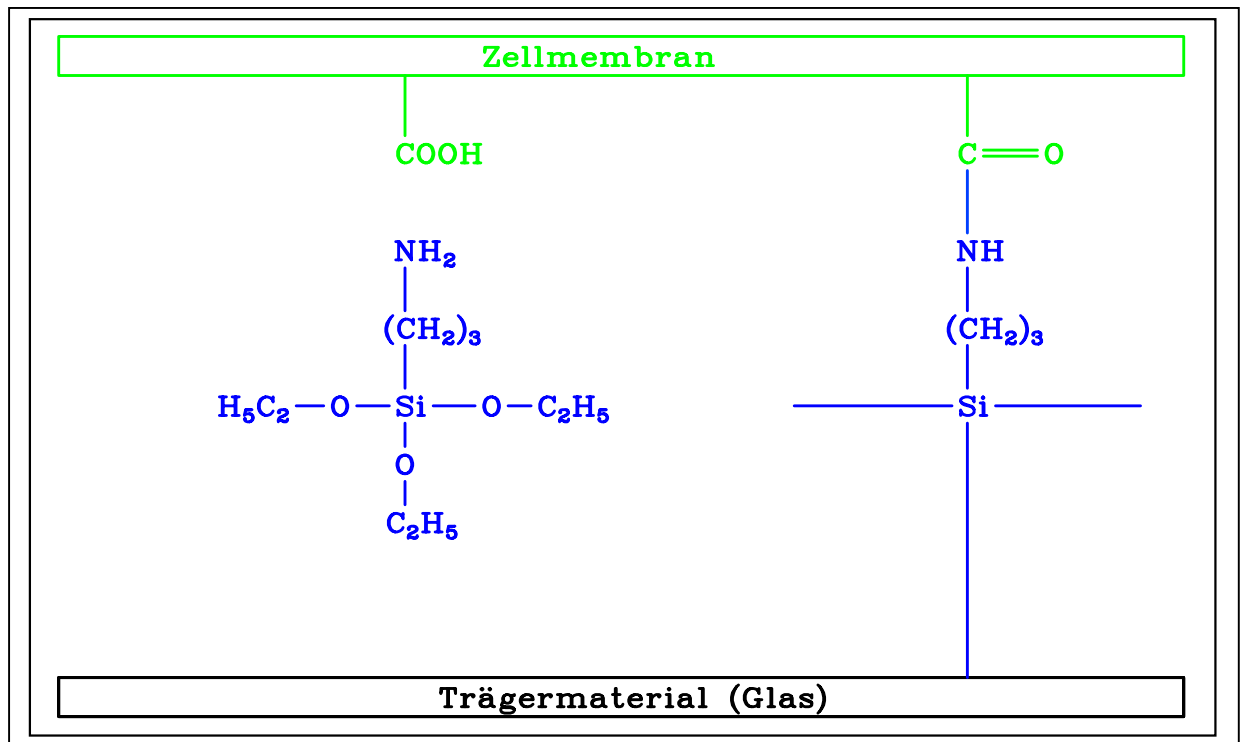


Abb. 17 Fixierung von Zellen und Geweben auf Objektträgern mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan

2.3.4 Signalkaskade

Die Nachweisempfindlichkeit des ICA-Verfahrens wurde durch die Einführung einer Mehr-Stufen-Färbung mit FITC- bzw. ALEXA488- markierten Sekundärantikörpern gesteigert (Abb. 16). Die Signalkaskade verstärkt die Fluoreszenzausbeute und erlaubt die zuverlässige Quantifizierung auch von sehr niedrigen Pt-DNA Adduktgehalten.

2.3.5 Penetration der signalgebenden Komponenten des ICA

Die Tiefenpenetration der Primär- und Sekundärantikörper, sowie des DNA-reaktiven Fluoreszenzfarbstoffes DAPI wurde an Kryoschnitten der Mausleber durch Schichtaufnahmen mit Hilfe eines Laser-Scan Mikroskopes dokumentiert (Abb. 18).

2.3.6 Messung

Die Messung und quantitative Auswertung erfolgte mit einer Fluoreszenzmikroskop-assoziierten CCD Kamera und mit Hilfe des Imageanalyse-Systems „ACAS“. Die Intensität des Immunfluoreszenzsignals wurde auf die parallel aufgenommene DNA-DAPI-Fluoreszenz normiert, um den Einfluß möglicher DNA – Verluste zu korrigieren (Abb. 20).

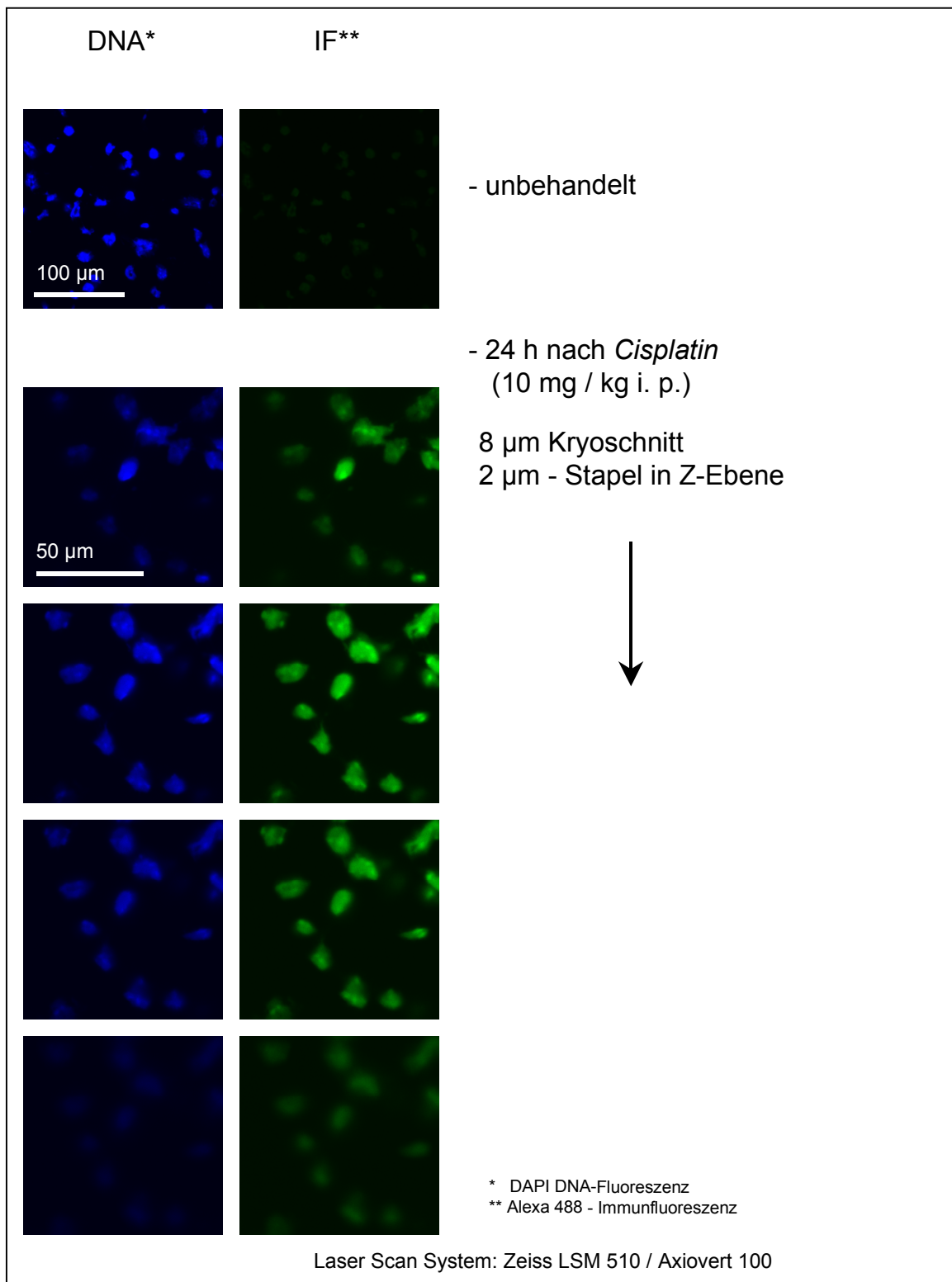


Abb. 18 Vermeidung von Hintergrundfluoreszenz und Penetration von Primär- und Sekundärantikörpern in Kryoschnitten der Mausleber

2.3.7 Linearität und Empfindlichkeit

Die ICA-Methode wurde an der humanen T-Zell Leukämie-Linie „Jurkat“ etabliert und optimiert, da diese in ihrer Morphologie primären Lymphozyten sehr nahe kommt. Seiler et al. (1993) konnten zeigen, daß die Verwendbarkeit eines MAK für die intranukleäre Immunhistochemie häufig durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen Matrix und Antikörper eingeschränkt wird. Solche „Klebe-Effekte“ sind bei verschiedenen Antikörpern sehr unterschiedlich ausgeprägt. Es war daher notwendig, die etablierten MAK einzeln im „Jurkat“-Modell auf ihre ICA-Tauglichkeit zu überprüfen. Der MAK „R-C 18“ konnte sich dabei für Pt-GG Messungen, der MAK „R-B 3“ für Pt-AG Bestimmungen qualifizieren. Ein annähernd linearer Zusammenhang konnte zwischen *Cisplatin*-Expositions-konzentration und Kernfluoreszenz gezeigt werden (Abb. 19). Durch parallel durchgeführte AAS-Messungen zur Absolut-Bestimmung der DNA-Platinierung wurde in diesem Zellsystem eine Detektionsgrenze von rund 40.000 Pt-Addukten pro Zellkern ermittelt.

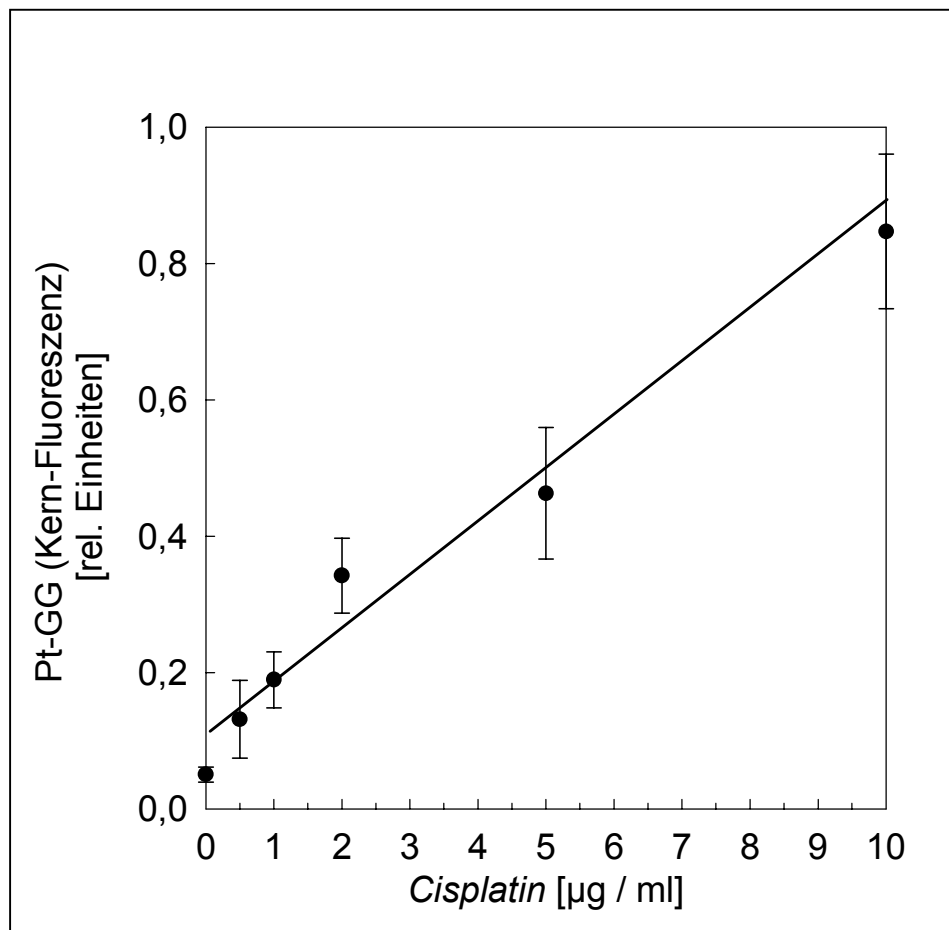


Abb. 19 Pt- GG Kerfluoreszenz als Funktion der *Cisplatin*-Exposition im „Jurkat“-Modell (4.4.4)

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen des Mittelwertes für Messung von jeweils 100 Zellen

Lokalisation der Zellkerne über die DAPI-DNA-Fluoreszenz und Messung der DNA-Menge

ex.	em.
01	01
02	02
03	03
04	04
05	05

**Messung der FITC / Alexa 488 Immunfluoreszenz
Manuelle Markierung verschiedener Zelltypen**

ex.	em.
01	01
02	02
03	03
04	04
05	05

Auf den DNA-Gehalt normierte Immunfluoreszenz als Messwert

Abb. 20 ICA-Messung mit dem „ACAS“-System

2.4 Zellkultur - Modelle für *Cisplatin*-Resistenz

Die klinische *Cisplatin*-Resistenz beruht auf einer Reihe unterschiedlicher, oft synergistisch wirkender, systemischer und zellulärer Mechanismen. Zentrum des Geschehens sind die Pt-DNA – Addukte (Abb. 3). Durch Aufnahme von Addukt-Kinetiken kann beurteilt werden, ob eine Resistenz durch verminderte Adduktbildung, beschleunigte Adduktreparatur oder aber vergrößerte Addukttoleranz verursacht wird. Die Aufklärung dieser Zusammenhänge ist Grundlage jeder re-sensitivierenden pharmakologischen oder gentherapeutischen Intervention. Die Leistungsfähigkeit und Aussagekraft einer solchen „funktionellen“ Pt-Addukt Analytik läßt sich in Zellkultur-Modellen eindrucksvoll belegen.

2.4.1 Humane Melanomzellen mit hoher oder niedriger *Cisplatin*-Empfindlichkeit

In Zusammenarbeit mit Dr. H. Lage, Charité, Berlin wurde ein *Cisplatin*-empfindliches bzw. resistentes Paar von humanen Melanomzellen („MeWo“ und „MeWo Cis 1“) als Modellsystem untersucht. Im MTT-Toxizitätstest erwies sich „MeWo“ etwa viermal *Cisplatin*-empfindlicher als „MeWo Cis 1“. In der Arbeitsgruppe von H. Lage, Berlin, konnte durch Western und Northern Blot-Analyse, sowie über Real Time PCR nachgewiesen werden, daß das Membranprotein cMOAT aus der Gruppe der ABC Transporter in der resistenten Linie deutlich überexprimiert wurde (H. Lage, persönliche Mitteilung; Abb. 21). cMOAT (MRP 2) ist eine Membranpumpe, welche ATP-abhängig Platinkomplexe vom Zytosol in den Extrazellulärraum exportiert (Kawabe et al., 1999; Minamino et al., 1999; Ueda et al., 1999). Die Zellen wurden für zwei Stunden einer Exposition von 5 bzw. 20 µg *Cisplatin* / ml ausgesetzt und danach in Pt-freiem Medium kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde im ICA eine Pt-GG Bestimmung mit dem Antikörper „R-C 18“ durchgeführt. Paralell dazu erfolgte eine FACS-Zellzyklusanalyse (Abb. 22).

Das Adduktmaximum wurde für beide Zell-Linien erst 8 h nach Ende der *Cisplatin*-Exposition festgestellt. Die Bildung von bivalenten Intrastrang Addukten ist ein relativ langsamer Prozeß, der über intermediär gebildete monovalente Addukte verläuft, welche innerhalb von Stunden konvergieren (Berges & Holler, 1991; Blommaert et al., 1998; Knox et al., 1986). Außerdem findet auch im Pt-freien Medium solange Adduktneubildung statt, bis sämtliche von der Zelle aufgenommene Pt²⁺ Hydroxo-Komplexe mit nukleophilen Zentren reagiert haben.

Die quantitative Auswertung ergab, daß sich in der resistenten Zelle „MeWo Cis 1“ bei gleicher *Cisplatin*-Gabe (5 µg / ml) nur etwa 65% der Pt-GG Addukte ausbildeten, die unter diesen Bedingungen in der sensitiven „MeWo“ -Zelle nachweisbar waren. Dies muß als direkte Konsequenz der Überexpression von cMOAT interpretiert werden, welche zu verstärktem Platinexport führt. Nach einer rund 36stündigen Phase fortschreitender Reparatur stagnierte die weitere Adduktprozessierung in beiden Zell-Linien.

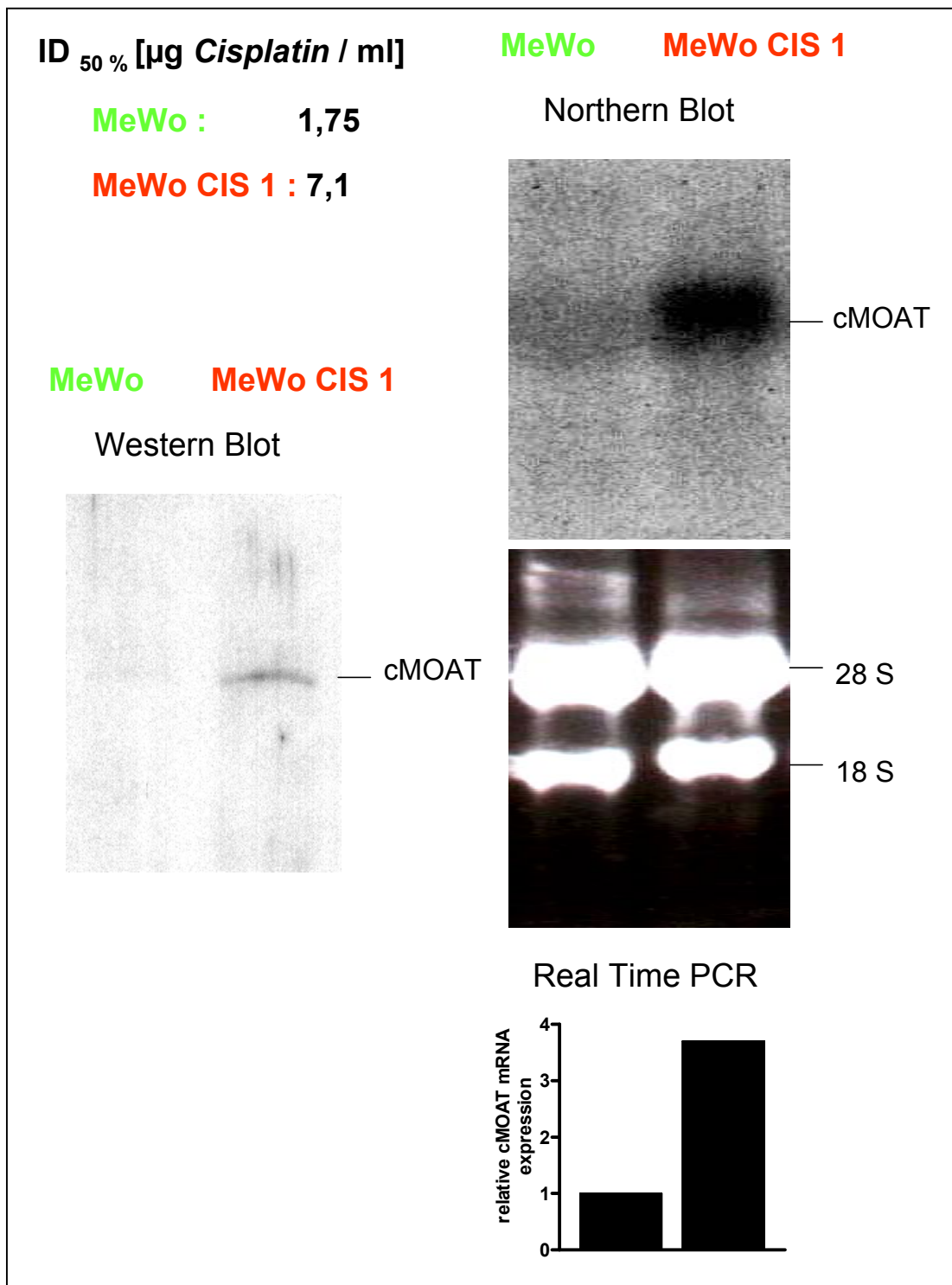


Abb. 21 *Cisplatin*-Empfindlichkeit und cMOAT-Expression der humanen Melanomzellen „MeWo“ und „MeWo Cis 1“
(Expressionsmessungen von Dr. H. Lage, Charite´, Berlin)

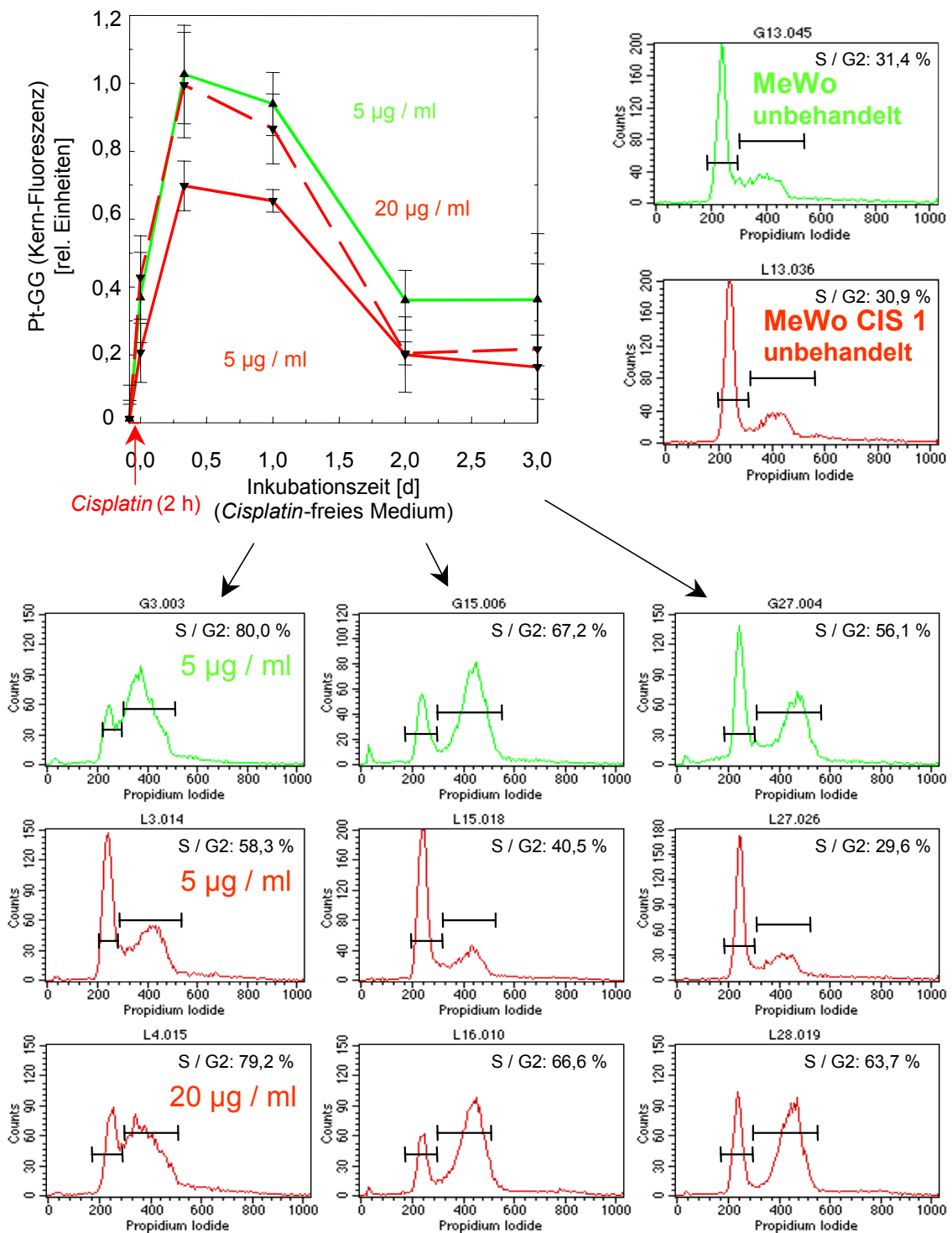


Abb. 22 Zellzyklusveränderungen als Konsequenz der *Cisplatin*-induzierten Pt-GG Addukte in „MeWo“- und „MeWo Cis 1“- Zellen

Es bildete sich ein Plateau aus, das nach dem niedrigen *Cisplatin*-Puls (5 µg/ml) für „MeWo“ etwa 40% des Adduktmaximums repräsentierte, für „MeWo Cis 1“ etwa 21%. Nach dem hohen *Cisplatin*-Puls (20 µg / ml) stabilisierten sich die Restläsionen in „MeWo Cis 1“ auf einem Niveau, das etwa 15% der initial gesetzten Addukte entsprach.

Cisplatin - Dosen, die zu etwa gleichen Adduktspiegeln in beiden Zell- Linien führten (MeWo: 5 µg / ml; MeWo Cis 1: 20 µg / ml) bewirkten umgekehrt auch vergleichbare Toxizität. Die *Cisplatin*-Behandlung führte zu typischen Zellzyklus-Veränderungen, insbesondere zur Ausbildung eines G2-Arrestes. Dieser kann Ausgangspunkt für weitere Proliferation sein, bei irreversibler Zellschädigung aber auch in die Apoptose übergehen (Crul et al., 1997; Sorenson et al., 1990). Im „MeWo“ / „MeWo Cis 1“ Modell zeigte sich, daß das Ausmaß dieser Zellzyklusveränderung, definiert als Anteil der in S und G2 befindlichen Zellen direkt vom genomischen Pt-GG Gehalt bestimmt wird.

Damit ist der DNA-Adduktgehalt in diesem Modell eindeutig als entscheidender, durch zelluläre Mechanismen wie cMOAT beeinflussbarer Parameter für die Zytotoxizität belegt.

2.4.2 *Cisplatin*-empfindliche bzw. resistente Ovarialkarzinomzellen

Ebenfalls in Zusammenarbeit mit Dr. H. Lage, Charité´, Berlin wurde ein Paar von *Cisplatin*-empfindlichen bzw. resistenten humanen Ovarialkarzinomzellen („A 2780 P“ und „A 2780 R“) untersucht, die sich wie „MeWo“ und „MeWo Cis 1“ in der Expression von cMOAT unterscheiden (H. Lage, persönliche Mitteilung).

Cisplatin - Exposition: 15 µg / ml

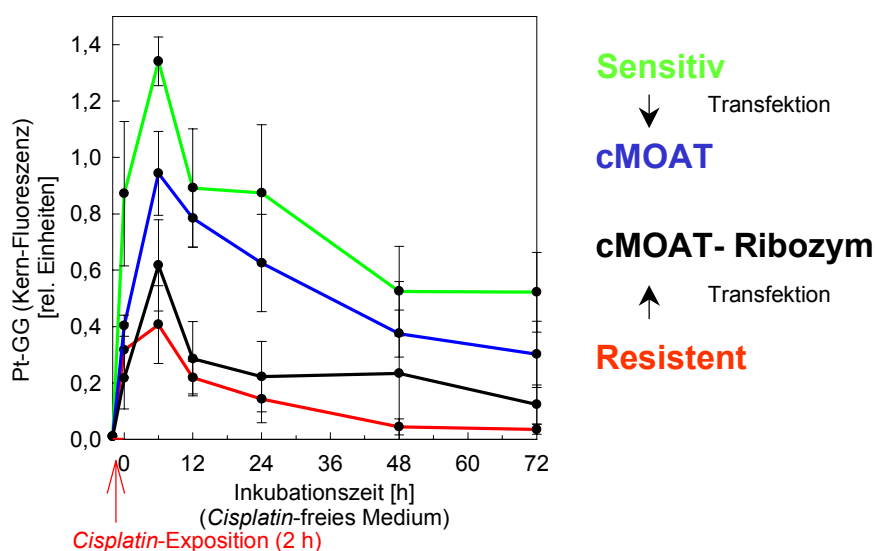


Abb. 23 *Cisplatin*-induzierte Pt-GG Addukte in sensitiven und resistenten Ovarialkarzinomzellen und daraus hervorgegangenen transfizierten Klonen.

(Zell-Linien von Dr. H. Lage, Charité´, Berlin)

„A 2780 P“ erwies sich im MTT-Test als 4,3 mal empfindlicher als „A 2780 R“. Zusätzlich standen die Klone „cMOAT 3“ und „Ribozym 1.12“ für ICA-Untersuchungen zur Verfügung. „cMOAT 3“ ist eine transfizierte Zell-Linie aus „A 2780 P“, welche den ABC-Transporter cMOAT überexprimiert. „Ribozym 1.12“ ist eine transfizierte Zell-Linie aus „A 2780 R“, welche ein Ribozym gegen cMOAT-mRNA exprimiert.

Die unterschiedliche inhärente bzw. modifizierte *Cisplatin*-Exportleistung der Zellen findet sich in den Profilen der Pt-GG Adduktmessungen wieder und begründet die Empfindlichkeitsunterschiede (Abb. 23). Das Modell verdeutlicht die Möglichkeiten der Adduktanalytik im Zusammenhang mit der Entwicklung von Chemoprotektiva für Normalgewebe bzw. von resensitivierenden Agentien für Tumorgewebe.

2.5 Prozessierung von Pt-DNA Addukten in murinen Reparatur-Knockout-Modellen

Über einen Zeitraum von zwei Wochen wurde die Zelltyp-spezifische Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten im Mausmodell untersucht. Neben dem Wildtyp standen XPA- und XPC-Knockout-Tiere für die Versuche zur Verfügung.

2.5.1 Zelltyp-spezifische Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten in der NER-kompetenten „C57 Bl / 6“ Maus

Zur Etablierung eines murinen Modellsystems wurden zunächst C57 Bl/6 Mäuse mit jeweils 10 mg *Cisplatin* / g Körpergewicht intraperitoneal behandelt und nach 6 h, 12 h, 1 d, 2 d, 5 d, 10 d bzw. 15 d geopfert. Die Tiere zeigten im Versuchszeitraum keine Einschränkung der Vitalität. Leber, Niere und immunomagnetisch separierte T-Lymphozyten wurden entnommen und für die ICA-Analyse präpariert.

Die Notwendigkeit der Einzelzellmessung zeigte sich insbesondere bei den Pt-GG Bestimmungen in der Nierenrinde (Abb. 24; Abb. 25). Die Zellen der Tubuli recti proximali wiesen zu allen Zeitpunkten deutlich höhere Adduktgehalte auf als die umgebenden Cortezellen. Noch geringer und dabei sehr homogen belastet zeigte sich das Lebergewebe (Abb. 18). Erstaunlicherweise war die Adduktbildung in den Lymphozyten am geringsten ausgeprägt, obwohl nach intraperitonealer Applikation eine rasche Wirkstoffanflutung im Plasma zu erwarten ist (Abb. 26).

Die Adduktmaxima wurden erst 6 bis 12 h nach *Cisplatin*-Applikation erreicht. Neben der Langsamkeit, mit der die monovalenten zu bivalenten Addukten konvergieren, erklärt sich dieser Befund aus der schrittweisen Mobilisierung von Plasmaeiweiß-gebundenem *Cisplatin* (Cornelison & Reed, 1993). Die Pt-GG Eliminationsprofile der untersuchten Gewebe ähnelten den in Zellkultur aufgenommenen Verläufen. Nach einer intensiven Reparaturphase, die bei Niere und Leber 6 Tage nach der Applikation, bei Lymphozyten schon nach 2 Tagen abgeschlossen war, stabilisiert sich ein Plateau, das etwa 50 % des induzierten Adduktmaximums ausmachte und bis zum letzten Meßzeitpunkt 15 Tage nach Applikation persistierte (Abb. 25; Abb. 26).

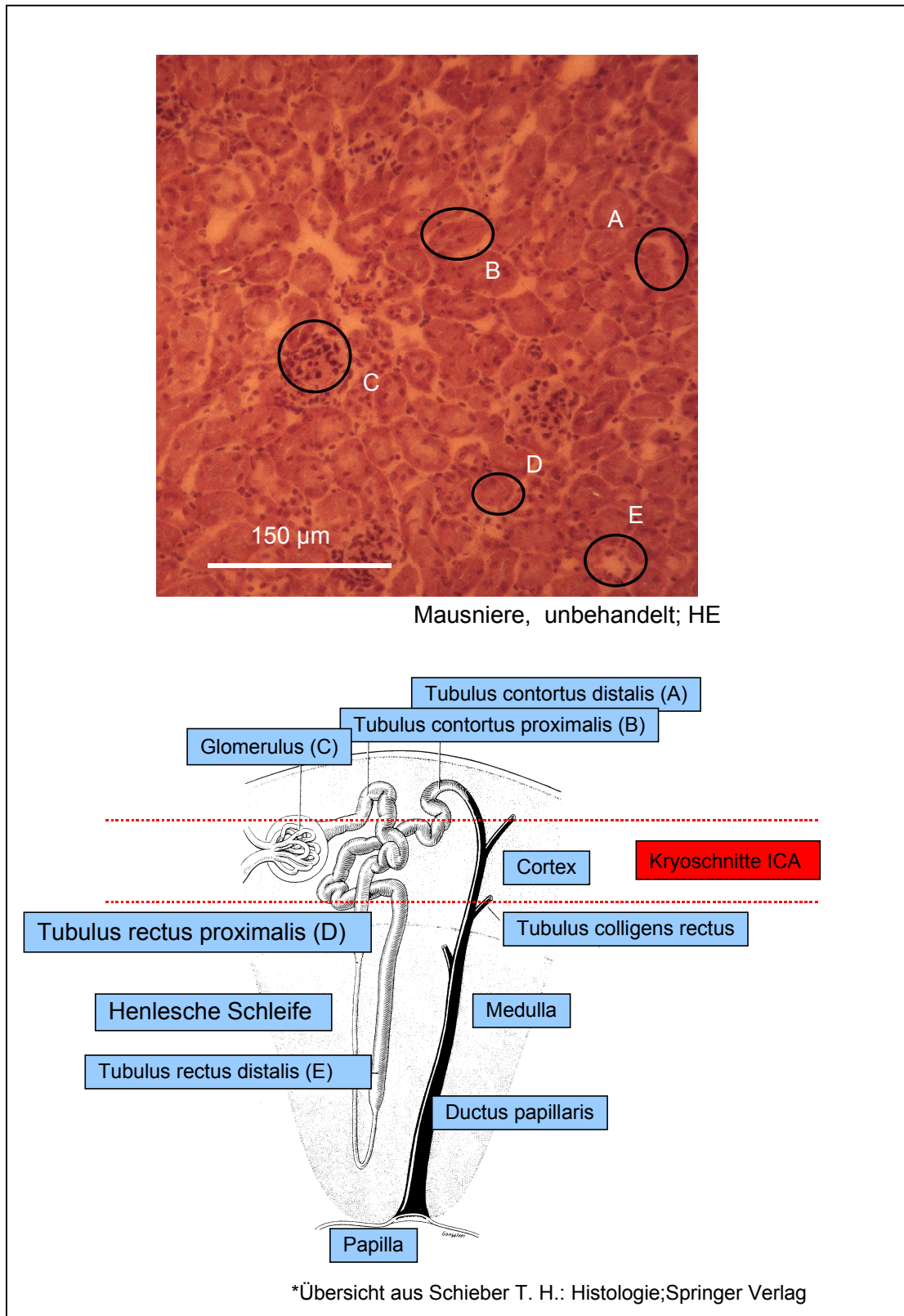


Abb. 24 Schnittführung zur Gewinnung von 8 µm Kryopräparaten aus der Nierenrinde der Maus

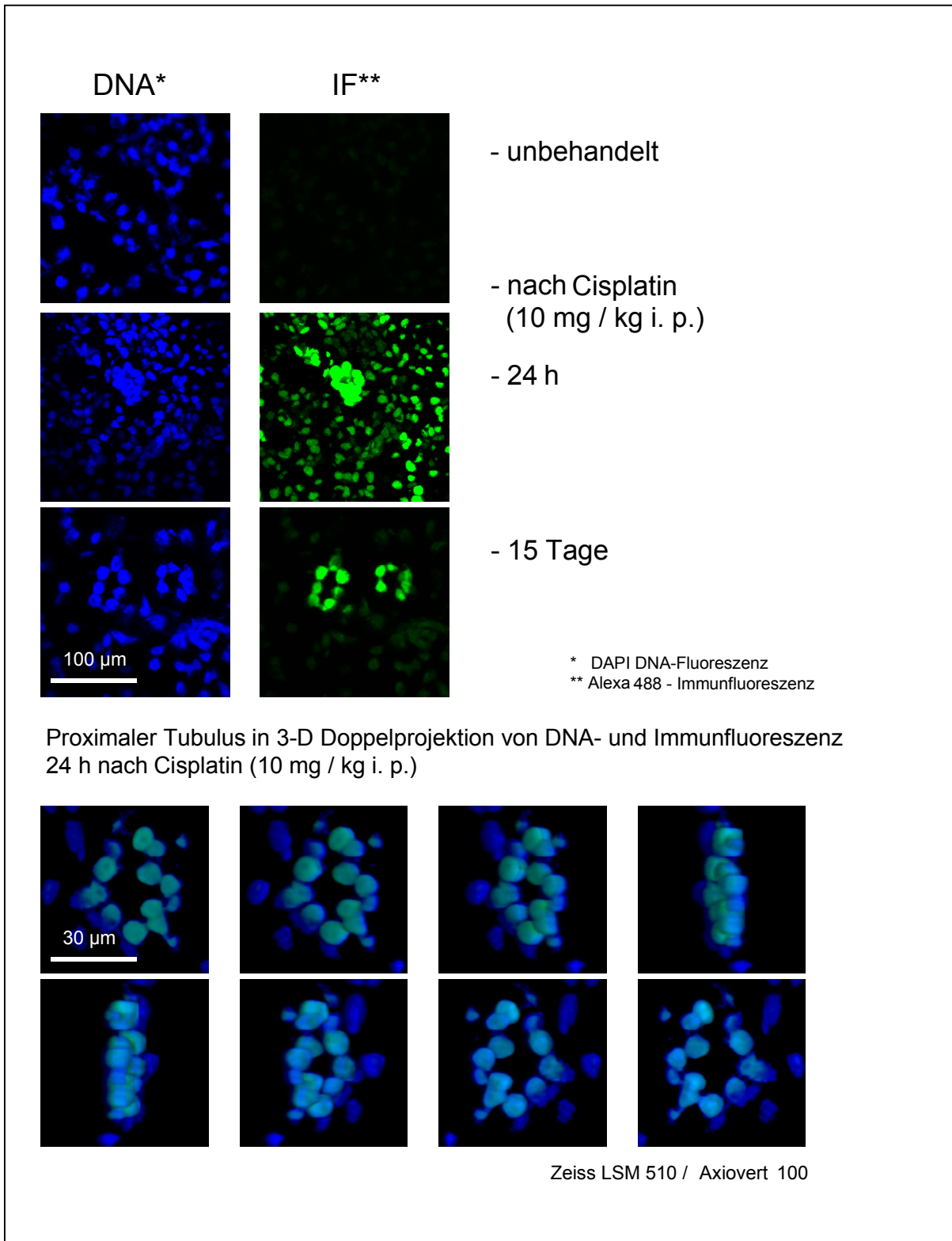


Abb. 25 ICA-Nachweis von Pt-GG Addukten in Zellen der murinen Nierenrinde

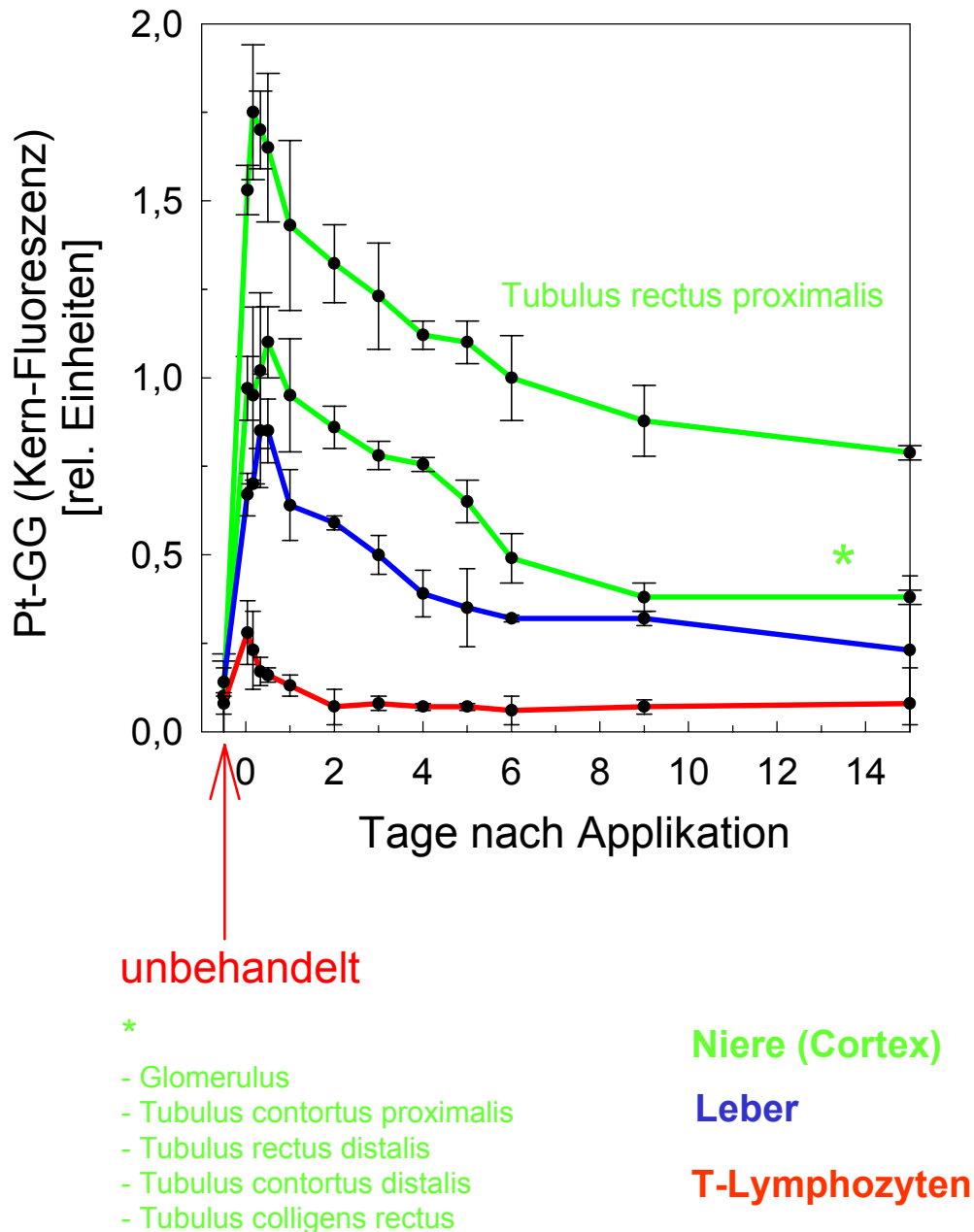
Einmalige Applikation von *Cisplatin* (10 mg / kg i. p)

Abb. 26 Bildung und Elimination von Pt-GG Addukten nach *Cisplatin* - Applikation in verschiedenen Zelltypen der NER-kompetenten „C 57 Bl / 6“ Maus

2.5.2 Akuttoxizität von *Cisplatin* im XPA- und XPC- Knockout Mausmodell

In einer Dosisfindungsstudie wurde die akute Toxizität von *Cisplatin* bei XPA-Knockout-Tieren im Vergleich zu XPA-heterozygoten und zu Wildtyp-Mäusen bestimmt (Abb. 27). Die homozygot XPA-defizienten Tiere erwiesen sich als sehr empfindlich. Nach einer Dosis von 7 mg *Cisplatin* / kg Körpergewicht, welche der halben LD₅₀ einer Wildtypmaus entspricht (Connors et al., 1972), verstarben 90 % der Tiere bereits nach zwei Tagen. XPA-heterozygote und Wildtyp-Mäuse überlebten die Injektion erwartungsgemäß ohne Vitalitätseinschränkung. Selbst eine Gabe von 2 mg/kg, die größenordnungsgemäß einer klinischen Dosis entspricht, führte in den XPA^{-/-} - Tieren nach 5 Tagen zu massiver Nierenschädigung mit zystischer Aufweitung des Tubulus-Lumens und Einblutungen (Abb. 28). Nach 10 Tagen war der Allgemeinzustand der Tiere sehr stark beeinträchtigt. Die XPC-Knockout Mäuse zeigten bei einer gleichartigen Exposition weder Vitalitätseinbuße noch Verlust von morphologischer Integrität in der Nierenrinde.

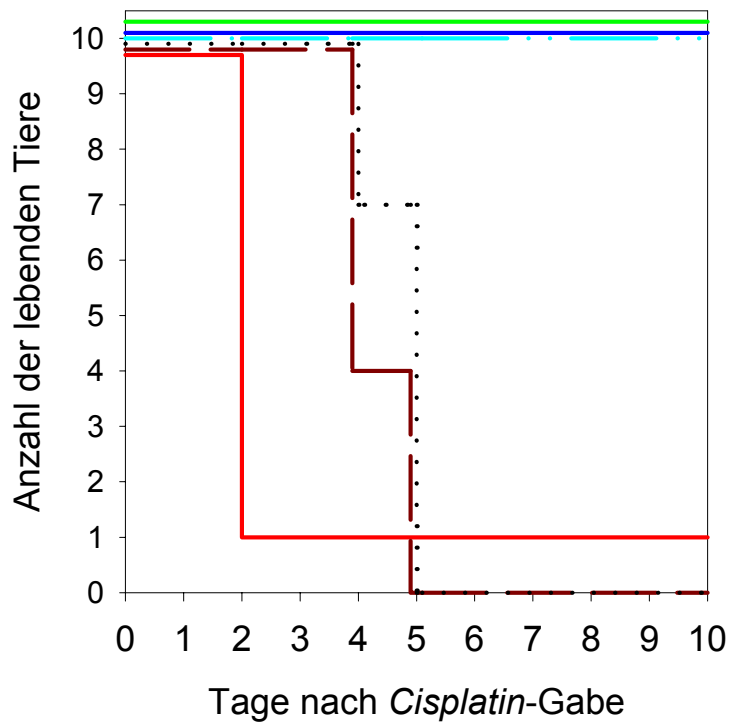
2.5.3 Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten nach subtoxischer Applikation von *Cisplatin* im XPA- und XPC- Knockout Mausmodell

Nach Applikation von 2 mg *Cisplatin* / kg Körpergewicht wurden Wildtyp-, XPA^{-/-} - und XPC^{-/-} - Mäuse nach 6 h, 12 h, 1 d, 2 d, 5 d bzw. 10 d geopfert, die Organe entnommen und für die ICA-Analyse präpariert.

Die Messungen an Wildtyp-Geweben und –Lymphozyten ergaben keinen qualitativen Unterschied zu den Untersuchungen im Hochdosisbereich (Abb. 26; Abb. 29). Die Adduktkonzentrationen waren proportional zur niedrigeren *Cisplatin*-Exposition verringert. Die Eliminationskinetik verlief biphasig, der Zeitraum intensiver Reparatur verkürzte sich aber auf etwa 24 h. Danach bildete sich ein stabiles Addukt-Plateau aus, das etwa 50% der initial gesetzten Addukte repräsentierte. Die nach 10 mg / kg prominenten Unterschiede in der Adduktbelastung von Tubuli recti proximali und den übrigen Cortezellen (Abb. 25) konnten nicht aufgezeigt werden.

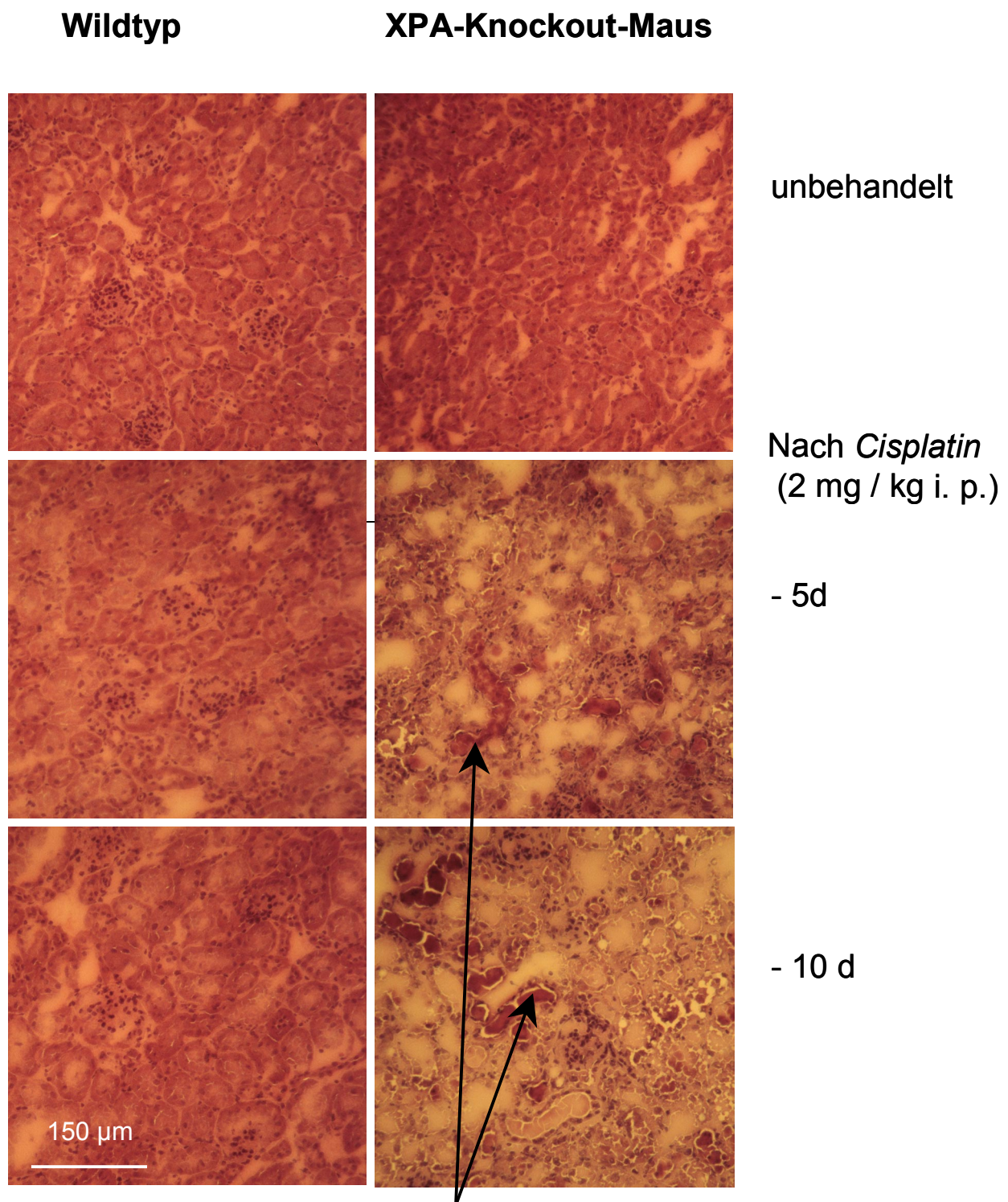
In den XPA-Knockout – Tieren kam es in allen Geweben zu einer etwa doppelt so starken Ausbildung von Pt-GG Intrastrang Addukten wie in den entsprechenden Zellen von Wildtyp-Tieren. Dies legt die Vermutung nahe, daß ein großer Teil der Pt-DNA-Reaktionsprodukte in XPA^{+/+} -Zellen bereits als intermediär entstehende Monoaddukte erkannt, repariert und der Konversion zu bivalenten Läsionen entzogen werden. Die Maximalbelastung der XPA^{-/-} - Mäuse wurde in den Nieren lokalisiert, wobei sich die Tubuli recti proximali durch ihren Adduktgehalt deutlich von den übrigen Cortezellen abhoben. Nach 2 Tagen war die Integrität des Nierengewebes derartig geschädigt, daß diese Zellen während der Immunfärbung verloren gingen.

Trotz der Abwesenheit von aktivem XPA fand in allen Zelltypen eine biphasige Elimination von Intrastrang Addukten statt. Dies widerlegt die bisherige Vorstellung, daß die bivalenten Pt-Läsionen ausschließlich über eine XPA-abhängige Nukleotid-Exzisions- Reparatur beseitigt werden können.



- XPA^{+/+}: 7 mg CisPt / kg
- XPA^{-/-}: 1 mg CisPt / kg
- · · · XPA^{-/-}: 3 mg CisPt / kg
- XPA^{+/-}: 7 mg CisPt / kg
- XPA^{-/-}: 5 mg CisPt / kg
- XPA^{-/-}: 7 mg CisPt / kg

Abb. 27 Akuttoxizität in XPA-kompetenten und -defizienten Mäusen nach i. p. Applikation von *Cisplatin*

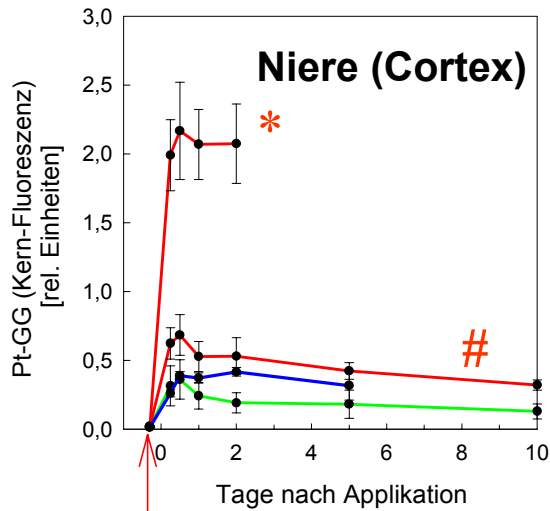


Akute Schädigung proximaler bzw. distaler Tubulus-Zellen mit zystische Aufweitung des Tubulus-Lumens und Einblutungen

Abb. 28 Nephrotoxizität von Cisplatin bei Wildtyp- und XPA-Knockout Mäusen

Wildtyp - **XPA^{-/-}** - **XPC^{-/-}**

Einmalige Applikation von *Cisplatin* (2 mg / kg i. p.)



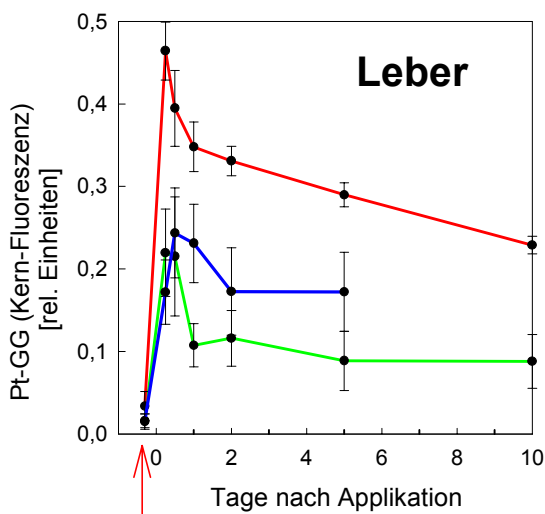
*

- Tubulus rectus proximalis

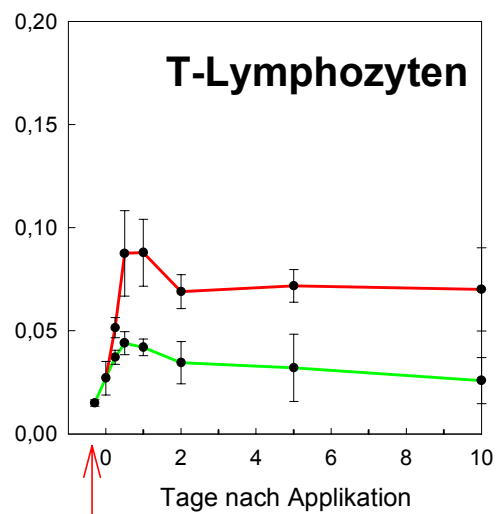
#

- Glomerulus
- Tubulus contortus proximalis
- Tubulus rectus distalis
- Tubulus contortus distalis
- Tubulus colligens rectus

unbehandelt



unbehandelt



unbehandelt

Abb. 29 Pt-GG Adduktkinetiken im XPA- und XPC- Knockout Mausmodell

Wildtyp-Lymphozyten zeigten sowohl nach Hoch- wie auch nach Niedrigdosis eine relativ geringe Adduktbelastung. Hypothetisch könnte diese durch eine außerordentlich effiziente Elimination von frühen monovalenten Addukten erklärt werden. Konsequenterweise müßte dies im Reparatur-inkompetenten XPA-Modell zu einer exzessiven Adduktakkumulation führen. Tatsächlich aber war die relative Adduktkonzentration in XPA-Knockout-Lymphozyten im Vergleich zu den entsprechenden Leber- und Nierenzellen ebenso gering wie in der Wildtyp-Maus. Der geringe Adduktspiegel in Lymphozyten muß demnach durch einen Reparatur-unabhängigen, zumindest XPA-unabhängigen Mechanismus begründet sein.

In Zellen von XPC-Knockout Tieren unterschied sich die initiale Adduktbildung nicht von der bei Wildtyp-Mäusen. Die Elimination der bivalenten Intrastrang Addukte schien dagegen erheblich verlangsamt (Leber) oder vollständig inhibiert zu sein (Niere). Dies erlaubt die Schlußfolgerung, daß XPC, nicht aber XPA eine maßgebliche Schlüsselrolle in der Erkennung und Prozessierung bivalenter Pt-GG Intrastrang Addukte zukommt.

2.6 Immunfärbung von Pt-DNA Addukten in Lymphozyten und in Biopsiematerial von Patienten unter *Cisplatin*-Therapie

An Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Magenkarzinom wurden erste klinische Begleituntersuchungen zur *Cisplatin*-DNA Adduktbildung unter zytostatischer Chemotherapie durchgeführt. Vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der *Cisplatin*-Infusion wurde bioptisch Normal- und Tumorgewebe gewonnen und auf den Gehalt an spezifischen Pt-Addukten untersucht.

Die Akkumulation und Persistenz der Pt-Addukte soll mittelfristig mit den klinischen Daten korreliert werden, um festzustellen, ob diese Parameter frühe diagnostische Hinweise für ein Ansprechen oder ein Versagen der Platintherapie liefern können.

Ein weitere wichtiger Punkt ist der Vergleich zwischen Tumor- und benachbarten Normalgewebe. Es soll untersucht werden, ob die Tumorzellen bei Therapieversagen veränderte Bildungs- oder Reparaturraten für bestimmte Pt-Addukte aufweisen.

Von besonderer Bedeutung ist auch die Analyse von Biopsieproben nach mehreren Therapiezyklen. Es soll festgestellt werden, ob sich das Reparaturverhalten der Tumorzellen durch Adaptation oder Selektion unter einer Platintherapie verändert.

Parallel dazu werden bei allen Patienten in dieser Studie entsprechende Messungen in peripheren mononukleären Zellen durchgeführt. Es soll damit geprüft werden, ob eine Adduktbestimmung in leicht zu gewinnenden Surrogatzellen die Ergebnisse im Biopsiematerial widerspiegelt und damit als früher Indikator für eine inhärente Platinresistenz eingesetzt werden kann. In den kryokonservierten Biopsie- und Surrogatzellproben sollen in Abhängigkeit von den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen auch Gen-Expressionsmessungen mit "real time RT-PCR" beziehungsweise mit "in situ RT-PCR" durchgeführt werden. Von besonderem Interesse sind dabei Gene, die für Transport- oder DNA-Reparaturfunktionen kodieren.

2.6.1 Pilotstudien zur Optimierung von Probennahme und Aufarbeitung

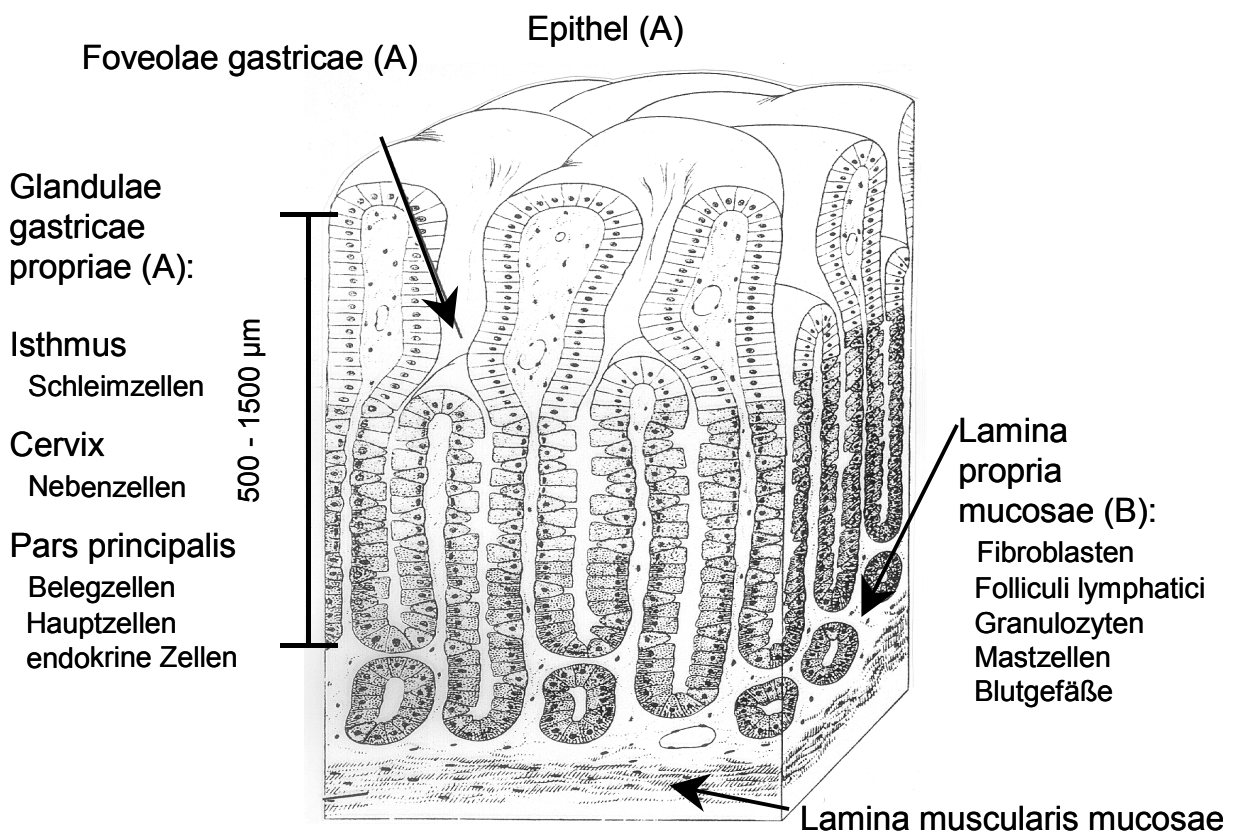
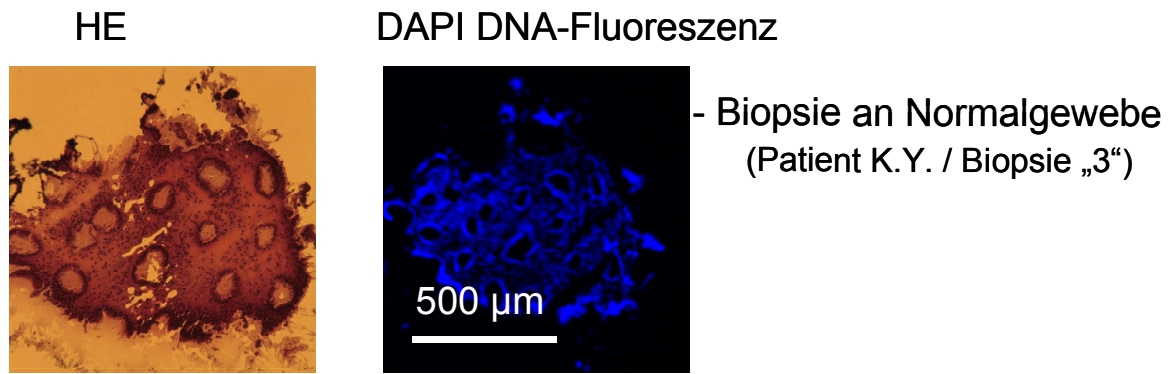
Es wurden erste Pilotstudien zur Optimierung von Probennahme und Aufarbeitung durchgeführt. Bei zwei Patienten (K. Y; A. T.) mit Magen-Adeno-Karzinom wurden Pt-GG Addukte im Normal und Tumorgewebe (Abb. 31) und in T-Lymphozyten (Abb. 32) immungefärbt und quantifiziert.

Die bei den Biopsieproben zu beobachtende ausgeprägte interzelluläre Heterogenität im Platin-Adduktgehalt (Abb. 31) erklärte sich aus der breiten Palette vorhandener Zelltypen (Abb. 30) und macht für die Zukunft eine Standardisierung auf einen „Leitzelltyp“ unverzichtbar.

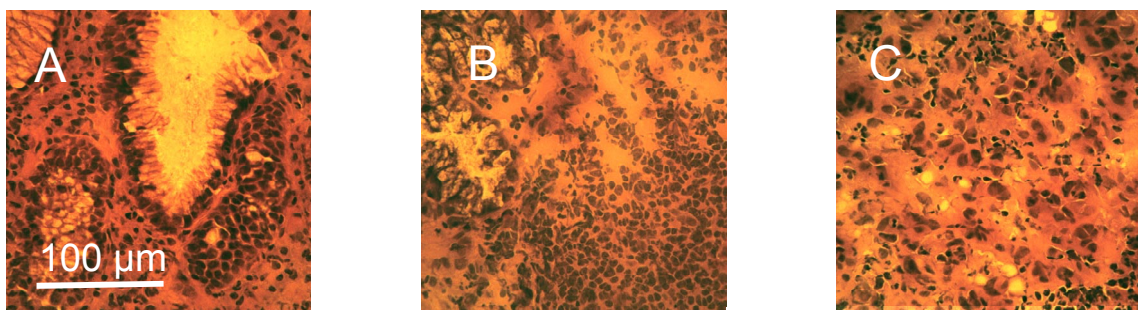
Die Unterschiede zwischen Normal- und Tumorzellen waren in den bisherigen Proben gering. Während bei dem Patienten A. T. die Adduktgehalte nach dem ersten und zweiten Chemotherapie-Zyklus nahezu identisch waren, wurden sowohl im Normal- wie auch im Tumorzellgewebe von Patient K.Y. 48 h nach dem zweiten Zyklus deutlich weniger Pt-Läsionen detektiert als nach dem ersten Zyklus.

Die Bezifferung interindividueller Unterschiede zwischen A.T. und K.Y. war aufgrund der sehr unterschiedlichen histologischen Zusammensetzung der Biopsien bisher nicht möglich.

Der Gehalt an Pt-GG Addukten in peripheren T-Lymphozyten stieg innerhalb von zwei Tage nach der Behandlung kontinuierlich an, zeigte aber für beide Patienten ein deutlich niedrigeres Niveau als in den Zellen des bioptisch gewonnenen Normal- und Tumorgewebes. Das entspricht den Beobachtungen im Mausmodell. Eine Addukt-Persistenz bis zum folgenden Zyklus konnte nicht nachgewiesen werden.



Magenkarzinom (C)



*Übersicht aus Schieber T. H.: Histologie; Springer Verlag

Abb. 30 Zelluläre Heterogenität von Magen-Biopsieproben

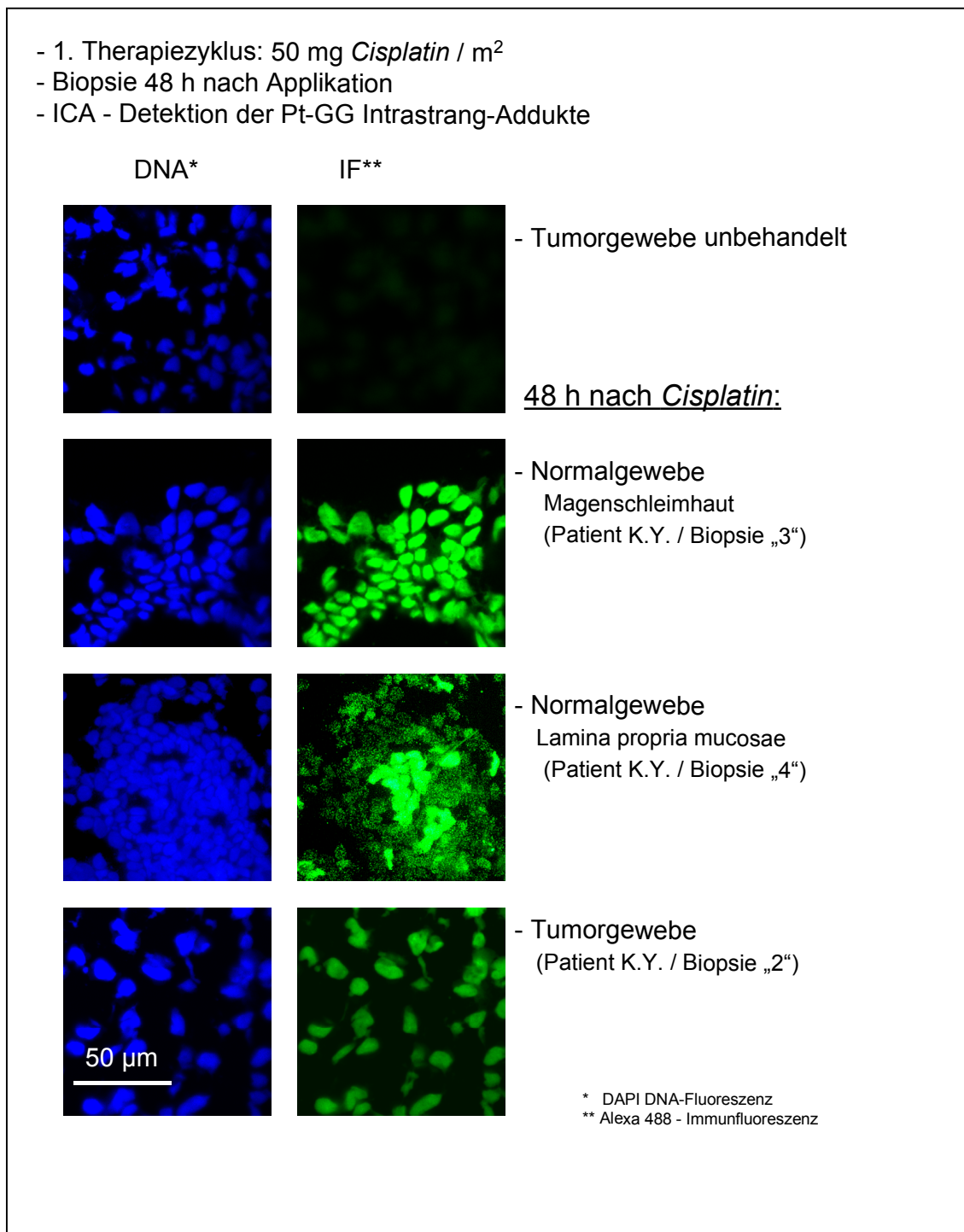


Abb. 31 ICA-Färbung von *Cisplatin*-induzierten Pt-GG Addukten in Normalgewebs- und Tumorbiopsien von Magenkarzinompatienten

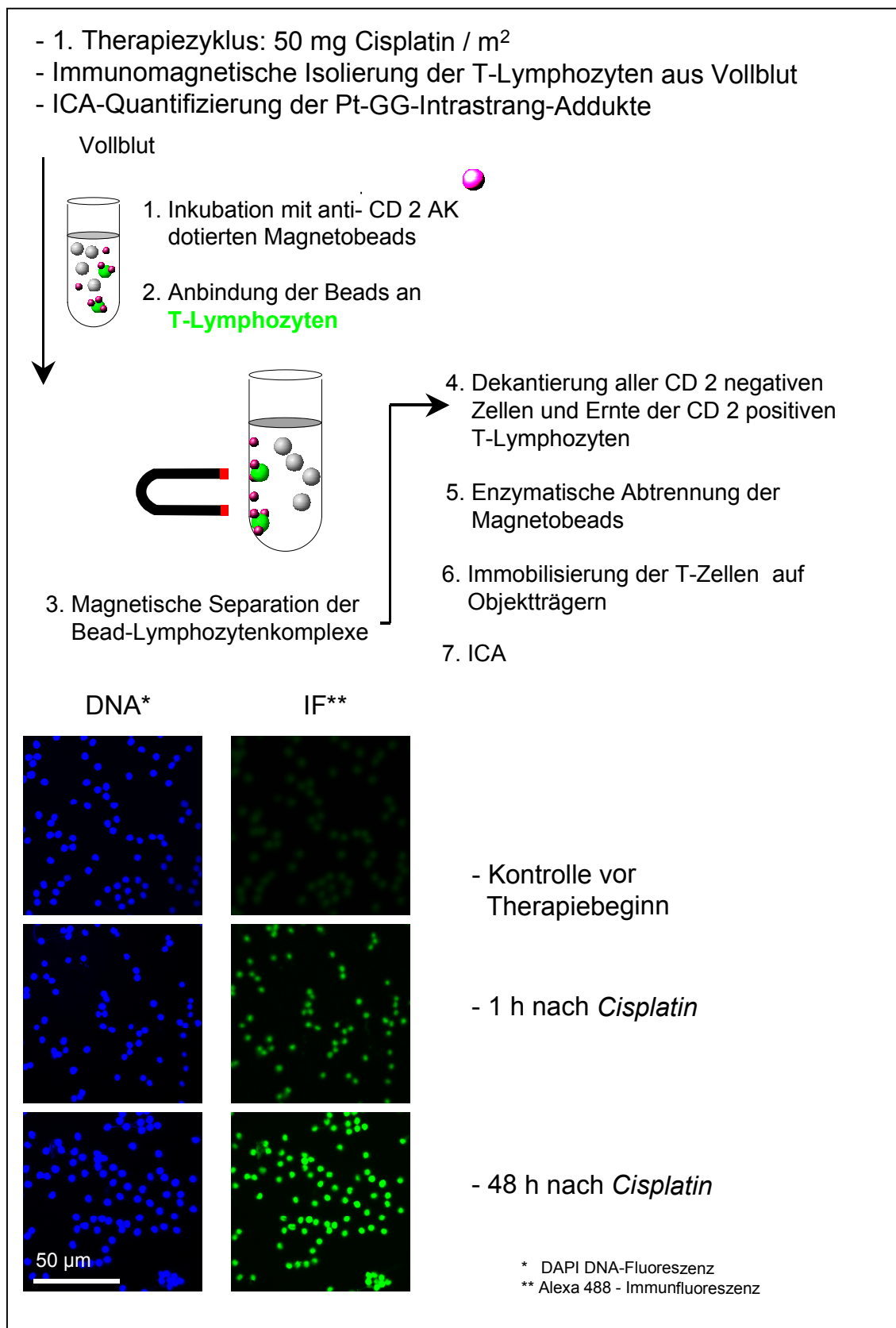


Abb. 32 Reinigungsschema und ICA-Färbung von Therapie-begleitend isolierten T-Lymphozyten

3 DISKUSSION

3.1 Die Einzelzellanalytik von Pt-DNA Addukten ist Voraussetzung für eine individualisierte Platin-Chemotherapie

3.1.1 Klinischer Einsatz von Platin-Komplexen

In der internistischen Onkologie gehören die Verbindungen *Cis-* und *Carboplatin* seit Jahren zu den wirksamsten Zytostatika bei der Behandlung verschiedener solider Tumoren (1.1.1; Petsko, 1995; Havemann & Wolf, 1997; Eberhardt et al., 1998).

Die molekularen Mechanismen der therapeutischen Wirkung dieser Verbindungen sowie die Ursache(n) eines Therapieversagens sind jedoch bisher weitgehend unklar geblieben.

3.1.2 Resistenzen und Nebenwirkungen als pharmakologische Herausforderungen

Die antineoplastische Wirksamkeit von zytotoxischen Platinkomplexen kann durch das Auftreten von Resistenzen aufgehoben werden (1.1.3). *Cisplatin*-unempfindliche Tumore sind dabei in der Regel auch *Carboplatin*-resistent (Lebwohl & Canetta, 1998; Timmer-Bosscha et al., 1992; Trimmer & Essigmann, 1999).

Leukopenie, Thrombozytopenie und Anämie sind häufig schon zu Therapiebeginn unerwünschte Begleiter einer *Cis-* bzw. *Carboplatin*-Therapie (Lokisch & Anderson, 1998). Daneben beeinträchtigen Langzeitnebenwirkungen wie Nephro-, Neuro- und Ototoxizität die Lebensqualität der Patienten oft erheblich (1.1.2; Kollmannsberger et al., 1999).

3.1.3 Zelltyp-spezifische Prozessierung von Pt-DNA Addukten bestimmt die Zytotoxizität im Normal- und Tumorgewebe

Cis- und *Carboplatin*-induzierte bifunktionelle Pt-DNA Intrastrang- und Interstrang-Addukte hemmen Replikation und Transkription und können durch Auslösung des programmierten Zelltodes (Apoptose) zum Absterben der Zielzellen führen (1.3; Blommaert et al., 1995; Fichtinger-Schepman et al., 1995).

Das Ausmaß der DNA-Schädigung und die sich daraus ergebenden zellbiologischen Konsequenzen sind interindividuell und Zelltyp-spezifisch sehr unterschiedlich. Unter anderem kontrollieren die Nierenfunktion, der Wirkstoffimport- und -export über die Zellmembran, sowie zytoplasmatische Detoxifizierungsprozesse das Ausmaß der initialen DNA-Adduktbildung (1.3.1; 1.3.2; 1.3.3). Ebenfalls heterogen ist die Leistungsfähigkeit der zellulären DNA-Reparatursysteme (Kelland, 1994): Platin-DNA Addukte werden über den Nukleotid-Exzisions-Weg (NER) aus der DNA eliminiert (1.3.4; el Mahdy et al., 2000; Sancar, 1996; Smith et al., 2000; Wani et al., 1999).

Im Rahmen klinisch realisierbarer Pt-Dosen ist die Möglichkeit, Zielzellen zur Auslösung des programmierten Zelltods zu provozieren, wahrscheinlich das entscheidende Kriterium für ihre therapeutische Ansprechbarkeit (1.3.6; Sorenson et al., 1990).

Wenn die Addukt-Elimination aus der genomischen DNA nicht effizient greift, wird die Apoptose aus einem Zellzyklus-Arrest heraus über eine p53- bzw. p73-Signalkaskade induziert (Anthony et al., 1996; Gong et al., 1999; Nehme et al., 1999; Vikhanskaya et al., 2000). Dem „Mismatch“-Reparaturapparat kommt dabei sehr wahrscheinlich eine Apoptose-stimulierende Sensor-Funktion für Pt-DNA Addukte zu (1.3.6.1; Yano et al., 1999).

Die zellbiologischen Mechanismen, welche die Weichenstellung in Richtung Addukt-Toleranz und DNA-Reparatur oder aber in Richtung Apoptose steuern sind noch weitgehend unklar (Geske et al., 2000; Li et al., 1998; Seo et al., 1999).

3.1.4 Prognostischer Aussagekraft zellulärer Parameter für die Platin-Chemotherapie

Die pharmakologische Intervention mit Chemoprotektoren kann Nebenwirkungen mildern (1.5.1; Babu et al., 1999; Hartmann et al., 1999; Korst et al., 1998), der Einsatz von Reparatur-Modulatoren, von neuen Platinkomplexen, von Antisense-Konstrukten und Gen-therapeutischer Ansätzen im Falle von Therapieversagen resensitivierend wirken (1.5.2; 1.5.3; 1.5.4; Chen et al., 1999; Kane & Lippard 1996; Klein et al., 1999; König et al., 1999)

Eine rationales, individuell abgestimmte Eingreifen setzt aber das Verständnis der Mechanismen voraus, die für die ungewollte Toxizität bzw. für das Resistenzgeschehen verantwortlich sind. Notwendig ist daher eine Therapie-begleitende Analytik, welche sich auf Parameter mit prognostischer Aussagekraft konzentriert.

Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten sind eindeutige Determinanten der Zytotoxizität und allen anderen meßbaren Parametern wie z. B. dem Plasmagehalt an freien Platin oder der Expression von p53, bcl2 bzw. ki 67 an Informationsgehalt überlegen (1.4; Schellens et al., 1996; van de Vaart et al., 2000).

3.1.5 Ziele

Die Forderung nach einer molekulare Dosimetrie definierter Platin-DNA-Läsionen auf dem Niveau individueller Zellen ist nur durch ein immunhistochemisches Verfahren auf der Basis monoklonaler Antikörper zu erfüllen (1.2; Abb. 2).

Mit Hilfe einer solchen Analytik ist die Messung von Reparaturkinetiken für unterschiedliche Pt-DNA-Addukte auch im begrenzt verfügbaren klinischen Material möglich, wobei zusätzlich die interzelluläre Heterogenität von Adduktbildung und -elimination erfaßt wird.

Die Korrelation von Addukt-Gehalt und Vitalstatus der Zelle kann Aufschlüsse zur zytotoxischen Bedeutung der unterschiedlichen Pt-DNA-Läsionen geben und zur Klassifizierung von inhärenten bzw. erworbenen Resistenzen beitragen.

3.2 Generierung von Monoklonalen Antikörpern gegen *Cisplatin*-induzierte Pt-DNA-Addukte

3.2.1 Immunisierungsstrategien

Eine Immunantwort gegen *Cis*- bzw. *Carboplatin*-induzierte Pt-DNA-Addukte kann durch das Verimpfen von platinierter, Protein-gekoppelter DNA provoziert werden (Chao et al., 1994; Meijer et al., 1997; Poirier et al., 1982; Sundquist et al., 1987; Terheggen et al., 1987; Tilby et al., 1991). Alternativ dazu wurden auch Konjugate aus Addukt-analogen Pt-Dinukleotiden erfolgreich als Immunogene eingesetzt (Fichtinger-Schepman et al., 1985a).

Die hier beschriebenen monoklonalen Antikörper sind nach der ersten Strategie generiert worden, indem elektrostatisch gekoppelte Komplexe aus methyliertem Serumalbumin (mBSA) und *in vitro* platinierter DNA verimpft wurden (2.1.3).

Terheggen et al. (1987) und Meijer et al. (1997) hatten gezeigt, daß eine befriedigende Immunantwort nur durch Immunisierung mit *in vitro* platinierter DNA zu erzielen war, deren Dotierungsgrad weitaus höher war, als er nach Chemotherapie in zellulärer DNA zu erwarten ist.

Der für eine Immunisierung als optimal angegebene Platin-Gehalt der DNA schwankt zwischen 1 Addukt auf 5 Nukleotiden (Chao et al., 1994; Maus) und 1 Addukt auf 125 Nukleotiden (Tilby et al., 1991; Ratte). In dieser Arbeit wurden Pt-DNA Präparationen mit einer Konzentration von 1 Addukt pro 16 Nukleotiden erfolgreich zur Erzielung einer anti-(Pt-DNA) Reaktion bei der Ratte eingesetzt (2.1.1).

Die klonale Expansion und Antikörpersekretion entsprechender B-Zellklone artikuliert sich schon 6 Wochen nach Beginn der Prozedur als Serumtiter (Abb. 5). In ihren Untersuchungen konnte Eberle (1988) zeigen, daß die Affinität monoklonaler Immunglobuline in der Regel mit der Länge des Immunisierungszeitraumes zunimmt. Daher wurde die Immunisierung über 6 Monaten fortgesetzt, wobei eine kumulative Dosis von 350 nmol Pt-Addukt pro Tier verimpft wurden (2.1.3).

Platinierte DNA enthält die Gesamtheit aller möglichen koordinativen Strukturen (Abb. 1), d. h. vornehmlich Pt-(G-G) und Pt-(A-G) Intrastrangaddukte sowie G-Pt-G Interstrangaddukte, die zusammen mehr als 95% der induzierten Läsionen repräsentieren. Die Heterogenität des Antigens führt zu einer ganzen Palette von Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifitäten.

Abhängig vom Pt-Belegungsgrad verändern Pt-DNA Addukte die dreidimensionale Struktur der benachbarten DNA-Sequenzen im Sinne einer Denaturierung (1.3.3.3; Abb. 4) und einer Abwinklung der Helix (Gelasco & Lippard, 1998). Da die antigene Determinante aus der Gesamtheit des Adduktes und des umgebenden stereochemischen Kontext besteht, führt die Immunisierung mit hochplatinierter DNA zu einer ganzen Reihe von Antigenen, die sich nicht in der eigentlichen Pt-DNA Läsion unterscheiden, sondern nur in der einbettenden Nahordnung.

Abgesehen von der fehlenden Adduktspezifität bergen derart hergestellte polyklonale Seren daher einen entscheidenden, von Fichtinger-Schepman et al. (1989) im Detail untersuchten Nachteil: Ein Großteil der Immunantwort richtet sich gegen artifizielle, *in vivo* nicht vorkommende dreidimensionale Motive. Zudem erkennt ein weiterer Teil der Antikörper nur jenen Bruchteil der Läsionen, der aufgrund einer Sequenz-abhängigen lokalen Häufung von Addukten sterisch exponiert vorliegt.

Dies führt im ELISA und in der Immunhistochemie zu einer tendenziellen Unterbestimmung von niedrigen Platin-Adduktgehalten und verfälscht damit die Messungen klinisch relevanter Platingehalte.

Wie wichtig der Addukt-flankierende, dreidimensionale Kontext für die Antikörpergenerierung zu bewerten ist, wird auch durch das Ergebnis einer alternativen von Fichtinger-Schepman et al. (1985a) vorgeschlagenen Immunisierungsstrategie deutlich. Hierbei wurden platierte Dinukleotide als Addukt-imitierende Haptene eingesetzt. Es resultierten Addukt-spezifische Seren, die Pt-Addukte allerdings nur dann erkennen, wenn diese durch enzymatischen Verdau aus dem stereochemischen Umfeld der DNA herausgelöst sind und chromatographisch aufgetrennt vorliegen. Eine immunhistochemische Quantifizierung der Addukte ist daher mit diesen Antikörpern nicht möglich. Umgekehrt sind solche DNA - Hydrolysate gegenüber anti-(Pt-DNA) Antikörpern inert, obwohl die einzelnen Addukte strukturell unbeschadet vorliegen (Tilby et al., 1991).

Die Strategie dieser Studie bestand darin, aus der vielfältigen polyklonalen Immunantwort gegen Pt-DNA, solche Klone zu identifizieren, zu isolieren und zu charakterisieren, welche Addukt-spezifisch ihr Epitop auch in schwach dotierter und nativer DNA erkennen und sich für die immunhistochemische Anwendung qualifizieren.

Einzelne monoklonale Antikörper können durchaus solchen Ansprüche genügen, wie Tilby et al. (1991) belegten, indem sie einen MAK etablierten, dessen Addukt-Erkennungsfähigkeit über einen weiten Konzentrationsbereich hinweg vom Dotierungsgrad der DNA unabhängig war.

3.2.2 Identifizierung und immuno-magnetische Selektion von anti-(Pt-DNA)-Hybridomklonen

Zur Überprüfung des Antikörper-Titers im Serum immunisierter Tiere und zur Erkennung anti-(Pt-DNA) positiver Hybridomklone wurde ein nichtkompetitiver Enzym-Immunoassay (ELISA) mit Pt-DNA-beschichteten Polystyrol-Mikrotiterplatten als Festphase etabliert (2.1.2). Die Immunreaktivität gegenüber der immobilisierten schwach bzw. hoch platinierter DNA ist dabei der kleinste gemeinsame Nenner aller anti-(Pt-DNA) Antikörper. Gleichzeitig dient der ELISA zur Erkennung und Ausgrenzung aller Antikörper, die nennenswerte Kreuzreaktivitäten mit undotierter DNA aufweisen.

Das nach der Zellfusion übliche, „klassische“ Sortieren der resultierenden Klone in Antigen-negative und Antigen-positive Fraktionen verlangt das Austesten aller vitalen Zellpopulationen mit dem ELISA. Dieser erhebliche Arbeitsaufwand limitiert die Zahl der möglichen Fusionen und damit die Wahrscheinlichkeit, hochaffine, spezifische und immunhistochemisch taugliche MAK zu finden.

Deshalb wurde alternativ dazu ein immuno-magnetisches Verfahren zur Anreicherung anti-(Pt-DNA) positiver Hybridomzellen etabliert (2.1.4; Abb. 6). Im Methodenvergleich mit der „klassischen“ Selektion wurde dabei durchschnittlich eine zehnfache Anreicherung der Zielzellen aus dem Fusionsansatz erzielt (Abb. 6 C).

Egeland et al. (1988) und Hebell & Götze (1989) konnten zudem zeigen, daß die immuno-magnetische Aufreinigung von Antigen-positiven Hybridomen solche Klone begünstigt, deren Antikörper eine besonders hohe Affinität haben. Eine zusätzliche Selektion wurde erzielt über den Pt-Dotierungsgrad der DNA auf den Magnetobeads, die den membranständigen Antikörpern als Bindungspartner angeboten wurden. Dieser war etwa 40 mal geringer als jener der ursprünglich verimpften DNA. Präferentiell wurden daher solche Klone isoliert, die Pt-DNA Addukte auch im stereochemischen Kontext schwach belasteter DNA erkennen können. Der hohe Vitalitätserhalt der Bead-gebundenen Hybridomzellen ist ein weiterer Vorteil dieser Methode und entsprach den Erfahrungen von Horton et al. (1989) und Bennick & Brosstad (1993). Damit steht ein sehr effizientes und zeitsparendes Verfahren zur gezielten Etablierung hochaffiner monoklonale Antikörper zur Verfügung.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit die Milzzellen von drei Ratten fusioniert, wobei einmal nach Vereinzeln der Zellen „klassisch“ mit dem ELISA nach anti-(Pt-DNA) Klonen gesucht wurde (Ratte „B“), zweimal die immunomagnetische Selektion vorgeschaltet war (Ratte „A“ & „C“; Tabelle 2). In der konservativ durchsuchten Fusion waren 7% der vitalen Klone anti-(Pt-DNA) positiv, in den Bead-fraktionierten Ansätzen 73% (Tier „A“) bzw 98% (Tier „C“). Ob der hohe Anteil von IgG 2a-Antikörpern im immunomagnetisch sortierten Ansatz „C“ (39% vs. 13% im Ansatz „B“) Ausdruck einer allgemein gültigen Tendenz ist, wurde noch nicht untersucht. Als besonders geeignet für die Immunhistochemie zeigten sich bisher zwei Antikörper aus Tier „B“ (R-B 3; R-B 8) und drei MAK aus Tier „C“ (R-C 7; R-C 18; R-C 22).

3.3 Charakterisierung von anti-(Pt-DNA) MAK

3.3.1 Bedeutung der Addukt-spezifischen Toxizität

Bisher ist ungeklärt, welchen Anteil die strukturell verschiedenen Pt-DNA Addukte an der Zytotoxizität der Platinkomplexe haben. Es ist daher auch umstritten, welche Konsequenz aus der für *Cis*- und *Carboplatin* unterschiedlichen Häufigkeitsverteilung der einzelnen DNA-Läsionen resultiert und ob präferentielle Reparatur einzelner Addukt-Anteile das Auftreten einer Resistenz weit eindeutiger kennzeichnet als die allgemeine Deplatinierung der DNA (1.3.4.1; Hill et al. 1994a, b; Fichtinger-Schepman et al. 1995). So erklärten Hill et al. (1994a, b) die Empfindlichkeit von Hodentumorzellen vor dem Hintergrund ihrer inhärent niedrigen Reparaturleistung für das Pt-GG Intrastrang-Addukt. Eine gesteigerte Reparatur dieser DNA-Läsion hat oft eine erhöhte Platin-Resistenz zur Folge. Umgekehrt legt diese Beobachtung nahe, daß dem unreparierten Pt-GG Addukt eine beträchtliche zytotoxische Qualität zukommt. Diese wird, zumindest teilweise, über Transkriptions-Inhibition vermittelt: Pt-GG verringert die DNA-Bindung der eukaryontischen RNA Polymerase II etwa fünfmal stärker als Pt-AG (Corda et al., 1992).

Bedford et al. (1988) postulierten dagegen eine effektivere G-Pt-G Interstrang-Prozessierung als eindeutigstes Kriterium für die Ausprägung eines resistenten Phänotyps.

Da bei äquitoxischen Dosen von *Cis-* und *Carboplatin* nur Pt-AG mit vergleichbarem Anteil induziert wird, vermuteten Fichtinger-Schepman et al. (1995) aufgrund ihrer ELISA-Untersuchungen, daß diesem Addukt ein ausschlaggebendes Apoptose-induzierendes Potential zukommt. Dieser Zusammenhang konnte von Welters et al. (1999a) in Zellkultur und Xenograftumoren mit dem Postlabelling-Verfahren bestätigt werden. Ein Zusammenhang von Pt-GG Gehalt und *Cisplatin*-Empfindlichkeit ließ sich dagegen nicht aufzeigen.

Der unbefriedigende Erkenntnisstand macht deutlich, daß ohne eine Addukt-spezifische Analytik die antineoplastische Wirkung der Platin-Zytostatika nicht zu verstehen ist. In dieser Arbeit wurden daher Methoden zur eindeutigen Charakterisierung der MAK-Spezifität entwickelt (2.2).

3.3.2 Charakterisierung von Antikörpern mit dem kompetitiven ELISA

Die Addukt-Spezifität der anti-(Pt-DNA) Antikörper kann theoretisch mit einem kompetitiven ELISA untersucht werden. Dabei wird zunächst ein potentielles Bindungsepitop synthetisiert und dem MAK als „Inhibitor“ angeboten. Kommt es zu einer Antikörper-Antigenbindung und damit zu einer Absättigung der variablen Region, so führt dies im nachfolgenden ELISA zu einer reduzierten Reaktivität des Antikörpers gegenüber dem eigentlichen Bindungspartner, der immobilisierter Pt-DNA.

Der kompetitive ELISA wurde mit den niedrig oder hoch dotierten Pt-DNA Präparationen „Pt 4“ und „Pt 5“ als Inhibitoren etabliert (2.2.1; 2.2.1.1).

Die Denaturierung von „Pt 4“ hatte eine erhebliche Steigerung der Immunreaktivität der „R-B 8“-Antikörper zur Folge, was durch eine Verbesserung der sterischen Zugänglichkeit bei einzelsträngiger DNA begründet ist und die Notwendigkeit einer „Helix-aufweitenden“ Behandlung in der Immunhistochemie deutlich macht (Abb. 10). Entsprechende Beobachtungen wurden auch von Terheggen et al. (1991) gemacht. Die hoch dotierte DNA „Pt 5“ hatte auch im nativen Status eine beträchtliche inhibitorische Aktivität, da die Platinierung selbst zu einer für die Antikörperzugänglichkeit günstigen Aufweitung der Doppelhelix führt (Poirier et al., 1982; Terheggen et al., 1991). Durch Hitze-Denaturierung ließ sich dieser Effekt steigern, wurde aber durch den DNA-stabilisierenden Einfluß der Interstrang Addukte weit mehr als in „Pt 4“ kontakariert.

Der kompetitive ELISA zeigte sich als ein geeignetes Werkzeug, um die sterischen Ansprüche eines MAK auszuloten.

Ein weiteres Ziel war die adäquate Nachahmung potentieller Epitope im Rahmen verschiedener Pt-GG und Pt-AG -tragender Oligonukleotide. Diese sollten im kompetitiven ELISA als Inhibitoren eingesetzt, Aufschluß über die Addukt-Spezifität geben. Nach den Vorschriften von Murchie & Lilley (1993) und Kasparkova & Brabec (1995) wurden entsprechende Strukturen hergestellt, auf das Vorhandensein der Addukte überprüft und verschiedenen MAK zur Bindung angeboten (2.2.1.2; Abb. 11).

Hierbei konnte keinerlei Affinität zwischen diesen Pt-Desoxynukleotiden und den Pt-DNA reaktiven MAK nachgewiesen werden.

Ähnliche Beobachtungen machten Tilby et al. (1991) bei dem Versuch, ihren gegen *Cisplatin*-DNA generierten MAK „ICR4“ mit platinieren Pt-Dinukleotiden zu charakterisieren. Übereinstimmend berichteten Terheggen et al. (1991a), daß bei der Untersuchung ihres gegen *Cisplatin*-DNA gerichteten Serums „NKI A59“ doppel- und auch einzelsträngige Pt-DNA-Präparationen von > 150 Basen im kompetitiven ELISA inhibitorisch wirkten, diese Qualität aber für Pt-Oligonukleotide < 42 Basen verloren ging. Reed et al. (1990) zeigten, daß hochmolekulare platinierter poly(dG) poly(dC) bzw. poly d(AG) poly d(TC) – Inhibitoren trotz ihrer artifiziellen Sequenz von anti-(Pt-DNA) Seren erkannt werden können, während entsprechende, Pt-GG bzw. Pt-AG enthaltende Hydrolysate nicht gebunden werden.

Man muß daraus folgern, daß sich ein Großteil der Immunantwort gegen Pt-DNA nicht allein gegen den Platin-Dinukleotidkomplex richtet, sondern vielmehr gegen ein dreidimensionales Motiv, welches im Umfeld der Addukte induziert wird (3.2.1). Dieser Nahbereich wird von Pt-Oligonukleotiden, wie sie hier Verwendung fanden, nicht ausreichend repräsentiert. Unterstützt wird die These zur Bedeutung der Nahordnung durch die Beobachtung von Tilby et al. (1991), die eine Verminderung der anti-(Pt-DNA) Aktivität ihrer Antikörper nach Ultraschall-Fragmentierung der Pt-DNA feststellten.

Die Schwierigkeit, auch andere DNA-Modifikationen zu synthetisieren, welche in einem weiträumig umgebenden, dreidimensionalen Kontext eingebunden sind, begrenzt die Möglichkeit des kompetitiven Ansatzes bei der Charakterisierung entsprechend bindender Antikörper und Proteine ganz allgemein.

3.3.3 Charakterisierung der MAK-Spezifität mit dem “retrospektiven” Postlabelling-Verfahren

Alternativ zum kompetitiven ELISA wurde in dieser Arbeit ein völlig neues Verfahren zur "retrospektiven" Charakterisierung der Bindungs-Spezifität von Antikörpern und Proteinen entwickelt, welche an strukturell modifizierte DNA binden (2.2.2).

Das Prozedere besteht darin, mit dem zu charakterisierenden MAK aus einer großen Zahl von langkettigen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten diejenigen DNA-Moleküle zu isolieren, die das Bindungsmotiv des jeweiligen Antikörpers enthalten (s. Abb. 13). Voraussetzung der Methode ist eine hinreichend niedrige Adduktdichte auf den DNA-Molekülen, sodaß im Schnitt jedes Molekül höchstens eine Modifikation trägt. Nach der Isolierung werden die molekularen Strukturen der Addukte in dieser DNA-Fraktion mit einem Radiochromatographie-assoziierten ³²P-Postlabelling-Verfahren identifiziert (s. Abb. 14).

Zur Gewinnung der entsprechenden DNA-Moleküle wurde zunächst niedrig platinierter DNA, die aber die Gesamtheit aller möglichen Pt-Addukte im nativen stereochemischen Kontext enthielt, durch Ultraschall-Behandlung in Fragmente von durchschnittlich 500 bp Länge zerlegt. Diese trugen, je nach Platinierungsgrad der Ausgangs-DNA, im statistischen Mittel nur jeweils 0,16 bis 1,6 Pt-Addukte (2.2.2.1; Abb. 12).

Aus diesem Fragment-Gemisch konnte dann über ein Festphasen-Adsorptionsverfahren genau die Subpopulation von DNA-Molekülen isoliert werden, an die der zu prüfende Antikörper bindet (2.2.2.2; Abb. 13).

Die strukturelle Identität der MAK-gebundenen Platin-Addukte wurde anschließend aus dem Isolat heraus nach ^{32}P -Markierung radiochromatographisch aufgeklärt (2.2.2.3; Abb. 14 & Abb. 15). Der qualitative und quantitative Nachweis von Pt-GG und Pt-AG mit ^{32}P -Postlabelling wurde ursprünglich von Blommaert & Saris (1995) entwickelt und von Farah et al. (2000), Pluim et al. (1999) und Welters et al. (1997 & 1999a, b) optimiert. Obwohl das Verfahren experimentell extrem aufwendig ist und sich damit für die klinische Analytik von Pt-DNA Addukten wenig eignet, bewährte es sich im Kontext unserer „retrospektiven“ Antikörpercharakterisierung durch seine hohe Empfindlichkeit und Adduktspezifität. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit fünf der 67 etablierten Klone (s. Tabelle 2) mit diesem Verfahren untersucht, wobei sich drei als Pt-AG-spezifisch qualifizierten, einer Pt-GG erkannte und einer zwar hochaffin für Pt-DNA war, aber nicht zwischen beiden Läsionen differenzierte. Dieser Antikörper erkennt offenbar ein Strukturmotiv in platinierter DNA, das beiden Addukten gemeinsam ist. Die bisher charakterisierten Pt-AG-spezifischen MAK wiesen alle eine gewisse Kreuzreaktivität gegenüber Pt-GG auf.

3.4 Der Immunzytologischen Assay (ICA) zum Nachweis von Pt-DNA-Addukten auf Einzelzellebene

Mit Hilfe der in dieser Arbeit generierten MAK wurde ein immunhistochemisches Nachweisverfahren zum Addukt-spezifischen Nachweis *Cis*- bzw. *Carboplatin* induzierter Pt-DNA-Addukte auf Einzelzellebene entwickelt (2.3; Abb. 16). Die Methode ermöglicht sowohl die Messung in Zellkultursystemen als auch in Gewebeproben, die nach *in vivo* Exposition oder nach einer Platin-Chemotherapie gewonnen wurden (2.4; 2.5; 2.6; Abb. 18 & Abb. 19). Für eine Messung reichen schon wenige hundert Einzelzellen aus, so daß zum Beispiel Untersuchungen an Biopsiematerial oder an Wangenschleimhautzellen möglich sind (3.7) und der Vollblutbedarf für eine Lymphozytenanalyse nur 250 μl beträgt. Die Nachweisempfindlichkeit ist mit rund 40.000 Pt-Addukten pro Zellkern so hoch, daß *Cisplatin*-induzierte DNA-Läsionen auch 2 Wochen nach Applikation noch sicher quantitativ erfaßt werden können (2.5.3; Abb. 29).

3.4.1 Vergleichende Bewertung alternativer analytischer Verfahren zur Messung von Pt-DNA Addukten

Die Qualität einer Meßmethode für Platin-induzierte DNA Addukte ergibt sich aus der Sensitivität, der Adduktspezifität und der Möglichkeit zur Einzelzellanalytik (1.2; Abb. 2).

Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) und „inductively coupled plasma mass spectroscopy“ (ICP-MS; 1.2.3) sind weder Addukt-spezifisch noch zur Einzelzellmessung geeignet.

Das Detektionslimit der AAS hängt nur von der verfügbaren Absolutmenge an Pt-DNA Addukten ab, nicht jedoch vom Dotierungsgrad der DNA.

Für eine Einzelmessung sind mindestens 80 pg Platin oder umgerechnet $2,5 \times 10^{11}$ Addukte notwendig (Reed et al., 1993). Etwa zehnmal empfindlicher ist die ICP-MS, so daß die Messung von einem Addukt pro 6×10^6 Nukleotiden (100 µg Analyt-DNA) möglich ist (Bonetti et al., 1996).

Mit dem Postlabelling-Verfahren (1.2.3; 2.2.2.3) lassen sich Absolutmengen von 5×10^9 Addukten nicht nur quantifizieren, sondern auch strukturell identifizieren, nicht allerdings auf Einzelzellniveau (Pluim et al., 1999).

ELISA-gestützte Verfahren zum Nachweis *Cisplatin*-induzierter DNA Addukte sind noch wesentlich empfindlicher, mit guten Antiserum lassen sich Absolutmengen von nur 5×10^8 Addukten nachweisen (Poirier et al., 1992). Die zu messende Probe fungiert dabei als Inhibitor im kompetitiven ELISA, das System wird mit einer externen Standard Pt-DNA geeicht. Dieses niedrige Detektionslimit kann allerdings nur für Untersuchungen an hochdotierter Pt-DNA belegt werden, in schwach dotierten Proben ist die Antikörperzugänglichkeit und damit die Empfindlichkeit des Verfahrens verringert. Da der Dotierungsgrad des Standards in der Regel größer ist als der klinischer Proben, resultierte aus diesem Effekt eine bis zu 1000 fache Pt-Fehlbestimmung. (Fichtinger-Schepman et al., 1989). Der von Fichtinger-Schepman et al., (1985a) konzipierte ELISA kann dieses Problem lösen, indem er chromatographisch aufgetrennte DNA-Hydrolysate als Analyte einsetzt und dadurch sogar Addukt-spezifische Ergebnisse liefert. Trotz des enormen experimentellen Aufwandes lassen sich aber auch mit diesem System keine Einzelzellmessungen durchführen.

Alle bisher vorgestellten Verfahren arbeiten mit Analyt-DNA Mengen von mindestens 10 µg, entsprechend einem mittleren Bedarf von $1,5 \times 10^6$ Zellen und sind damit untauglich für geringe Probenmengen, wie sie zum Beispiel aus Biopsien gewonnen werden.

Zudem wird die geringe Vergleichbarkeit der mit obigen Meßmethoden ermittelten Pt-Addukt Absolutwerte besonders deutlich, wenn man Ergebnisse gegenüberstellt, die von verschiedenen Arbeitsgruppen in identischen Modellen ermittelt wurden. So quantifizierten Poirier et al., (1992) 4 h nach der intravenösen Applikation von 8 mg *Cisplatin* / kg mit ihrem ELISA den Adduktgehalt in der Rattenniere mit 0,14 fmol/µg DNA, Mustonen et al. (1989) ermittelten mit der AAS im gleichen Modell dagegen 211 fmol/µg. In Chemotherapie-begleitenden ELISA-Messungen an Leukozyten fanden Reed et al. (1987) 24 h nach einer Gesamtdosis von 200 mg *Cisplatin* / m² Adduktgehalte von 0,062 – 0,212 fmol/ µg, Bonetti et al. (1996) nach 100 mg *Cisplatin* / m² mit der ICP-MS eine mittlere Belastung von 2,61 fmol/µg und Parker et al. (1991) nach 50 - 75 mg *Cisplatin* / m² mit der AAS Adduktgehalte von bis zu 536 fmol/µg.

Terheggen et al. (1987) führten mit dem polyklonalen Serum „NKI-A59“ erstmals immun-histochemische Untersuchungen auf Einzelzellniveau nach *Cis*- bzw. *Carboplatin*-Exposition durch. Die Messungen an Mundschleimhautzellen von behandelten Patienten belegen die

ausreichende Nachweisempfindlichkeit des Verfahrens, mit dem entsprechende Addukte auch 2 Wochen nach letztmaliger Platin-Infusion noch detektiert werden können (Terheggen et al., 1988). Die Auswertung erfolgt allerdings im Gegensatz zu der in dieser Arbeit beschriebenen Fluoreszenz-Analytik nur semiquantitativ mit einem Peroxidase / Diaminobenzidin-Nachweisverfahren. Eine Normierung des Signals auf den DNA-Gehalt ist dabei nicht möglich. Neben der fehlenden Addukt-Spezifität begrenzt die stark unterschiedliche Qualität der polyklonalen Antikörper-Chargen zusätzlich die Aussagekraft vergleichender Messungen (Johnsson et al., 1994).

3.5 Zellkultur - Modelle für *Cisplatin*-Resistenz

Eine *Cisplatin*-Unempfindlichkeit von Tumoren ist sehr wahrscheinlich multifaktoriell und kann mannigfaltige zellbiologische Ursachen haben (1.3; Abb. 3). Die Addukt-spezifische Quantifizierung der Pt-DNA Läsionen kann zur Klassifizierung solcher Resistenzen beitragen, weil durch die Messungen differenziert wird, ob die veränderte Sensitivität auf verminderter Adduktbildung, verstärkter Elimination oder erhöhter Toleranz beruht. Zellkulturmodelle mit Paaren von sensitiven und resistenten Zellen sind geeignet, um isoliert aus der Komplexität eines Organismus einzelne solcher Mechanismen zu analysieren.

In diesem Sinne wurde in Zusammenarbeit mit Dr. H. Lage, Charité, Berlin ein Paar *Cisplatin*-empfindlicher bzw. -unempfindlicher humaner Melanomzellen, „MeWo“ und „MeWo Cis 1“, als Modellsystem untersucht (2.4.1). Nachdem die Zellen unterschiedlichen *Cisplatin*-Konzentrationen ausgesetzt worden waren, wurden zeitlich gestaffelte Messungen des Pt-GG Addukt Gehaltes vorgenommen. Parallel dazu wurden auch Veränderungen des Zellzyklus dokumentiert.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß die relative Resistenz von „MeWo Cis 1“ nicht auf einer außerordentlichen Addukt-Toleranz beruht. Gleiche Addukt-Gehalte hatten gleichartige Zellzyklusveränderungen und Äquitoxizität zur Folge. In Abhängigkeit vom Ausmaß der DNA-Schädigung wurde ein mehr oder minder deutlicher G2-Arrest festgestellt (Abb. 22): In dieser Phase entscheidet sich, ob die Zelle in der Lage ist, die postreplikative Elimination der Addukte in einem Maße voranzutreiben, welches eine nachfolgende Mitose möglich macht.

Das Adduktmaximum wurde für beide Zell-Linien erst 8 h nach Ende der *Cisplatin*-Exposition erreicht. Nach einem niedrigen *Cisplatin*-Puls (5 µg / ml) wurden in der resistenten Zelle „MeWo Cis 1“ ein um 40% niedrigeres Pt-GG-Adduktniveau gemessen, in der Ausgangslinie. Das gleiche gilt für die integrale Adduktbelastung über die Zeit („adducts under curve“, AUC). Erst durch eine Vervierfachung der Expositionskonzentration konnte in den resistenten Zellen eine äquivalente Adduktbelastung induziert werden.

Eine ähnliche Beobachtung machten Blommaert et al., (1998) bei ihren immun-histochemischen Untersuchungen zur Addukt-Prozessierung in *Cisplatin*-sensitiven und -resistenten L1210 Leukämie-Zellen der Maus nach *in vitro* Platinierung. Das von ihnen eingesetzte polyklonale Serum „NKI-A 59“ ist gegen die Gesamtheit der bivalenten Addukte gerichtet. Das Adduktmaximum wurde hier 6 h nach Ende der *Cisplatin*-Exposition gemessen.

Verglichen mit der parentalen Zelle betrug der Addukt-Spiegel in den Kernen des resistenten Klons zu diesem Zeitpunkt nur etwa 50 %.

In beiden Modellen sind die *Cisplatin*-Resistenzen zumindest anteilig durch ein vermindertes initiales Adduktmaximum begründet. Diese Beobachtungen führen auf die Spur von drei Mechanismen, die theoretisch dafür verantwortlich sein können (Abb. 3). Die Addukt-Bildung wird in Zellkultur durch Wirkstoff-Import und –Export und durch Detoxifizierungsprozesse kontrolliert. Darüberhinaus kann die Konversion zu bivalenten Intrastrang Addukten durch eine sehr frühe Reparatur der initialen monovalenten Addukte verhindert werden.

Für das in dieser Arbeit vorgestellte Modell konnte gezeigt werden, daß der Membrantransporter cMOAT („Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter“; MRP 2) aus der Gruppe der ABC Transporter in der resistenten Linie „MeWo Cis 1“ auf dem Niveau des spezifischen Messengers wie des Proteins deutlich überexprimiert ist (Abb. 21). cMOAT findet sich normalerweise in apikalen Epithel-Membranen von Leber, Niere, Zwölffingerdarm und Dünndarm. Im Rahmen der Biotransformation gewährleistet es den Export von Glutathion-, Glukoronsäure- und Sulfat-Konjugaten endogener Metabolite in Gallenflüssigkeit und Urin. (Borst et al., 1999). *Cisplatin*-Glutathionkomplexe sind Substrat für die Exportaktivität für cMOAT (Kawabe et al., 1999; Minamino et al., 1999; Ueda et al., 1999), eine verstärkte Expression führte in verschiedenen Zellkulturmodellen zu Resistenz (Akiyama et al., 1999; Chen et al., 1998; Minemura et al., 1999).

Sowohl für „MeWo“ als auch für „MeWo Cis 1“ wurde eine biphasische Eliminationskinetik festgestellt (Abb. 21). Etwa 36 h nach dem Adduktmaximum war eine Phase intensiver Reparatur abgeschlossen. In diesem Zeitraum war der G2-Zellzyklusarrest am stärksten ausgeprägt. In beiden Zell-Linien verlief das Eliminationsprofil nach einer Inkubation mit 5 µg *Cisplatin* / ml nahezu deckungsgleich, was zu einem Plateau von Restläsionen führte, der für „MeWo“ in etwa 40% des Adduktmaximums ausmachte, für „MeWo Cis 1“ etwa 21%. Eine hohe initiale Adduktbelastung erhöhte in der resistenten Zelle die Geschwindigkeit der Reparatur, so daß 2 Tage nach einem Puls von 20 µg *Cisplatin* / ml nur noch 15% der Restläsionen vorhanden waren. Die gleiche, äquitoxische Adduktbelastung wurde aus dem Genom von „MeWo“ mit geringerer Effizienz entfernt, so daß letztendlich fast doppelt so viele Restläsionen verblieben. Die Toxizität von *Cisplatin* scheint in diesem Modell also nicht vom Gehalt an unreparierten Restläsionen, sondern vorrangig vom Ausmaß der initialen Adduktbildung abhängig zu sein.

Dieser Resistenz-vermittelnde Unterschied wird zumindest anteilig durch die Überexpression von cMOAT vermittelt.

Die Bedeutung dieses Mechanismus wurde zusätzlich für ein weiteres Zellkultur-Modell bestätigt, die *Cisplatin*-empfindlichen bzw. resistenten, cMOAT-überexprimierenden, Ovarialkarzinomzellen „A 2780 P“ und „A 2780 R“ (2.4.2; Abb. 23). Durch die Transfektion mit einem cMOAT-Konstrukt konnte die initiale Pt-GG Adduktbildung und damit die Platin-Toxizität in der parentalen Linie deutlich vermindert werden. Andererseits führte die Expression eines gegen cMOAT-mRNA gerichteten Ribozyms in „A 2780 R“ zu einer Empfindlichkeitserhöhung, die über vermehrte Adduktbildung vermittelt wurde.

Die Analyse der beiden Zellkultursysteme „MeWo“ und „A 2780“ legt nahe, daß bei der Isolierung von Platin-resistenten Zellvarianten *in vitro* offensichtlich besonders leicht auf eine erhöhte Expression des Transporters cMOAT selektioniert wird. Ob dieser Resistenzmechanismus auch bei genetisch deutlich stabileren Primärzellen *in vivo* eine Rolle spielt, muß an murinen Modellen und in humanen Tumoren verifiziert werden.

3.6 Prozessierung von Pt-DNA Addukten im murinen XPA- und XPC- Knockout-Modell

3.6.1 Zelltyp-spezifische Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten in der NER-kompetenten „C57 Bl / 6“ Maus

Zur Vorbereitung weiterer *in vivo* Studien wurde die Addukt-Bildung und Elimination in „C57 Bl / 6“ Mäusen untersucht, die einem einmaligen Puls von 10 mg Cisplatin / mg Körpergewicht ausgesetzt waren. Über einen Zeitraum von 15 Tagen wurden Messungen in Niere, Leber und T-Lymphozyten durchgeführt (2.5.1; Abb. 26).

Die Niere wurde als das Organ mit der höchsten Adduktbelastung identifiziert (Abb. 24 & 25). Derselbe Befund wurde auch mit anderen Meßverfahren dokumentiert, z. B. mit Hilfe der AAS (Mustonen et al., 1989) oder des kompetitiven ELISA (Poirier et al., 1992). Mit der hier etablierten ICA-Methode konnte gezeigt werden, daß die Addukt-Bildung sich ausgesprochen Zelltyp-spezifisch vollzieht. Belegt wird damit der große Vorteil einer Analytik auf Einzelzellebene.

Die Epithelien der Tubuli recti proximali wiesen im Adduktmaximum im Vergleich zu den umgebenden Cortezellen eine etwa 1,5fache Belastung an Pt-GG auf: Normale Nierenfunktion vorausgesetzt wird etwa 50% des applizierten *Cisplatin*s innerhalb von 24 h über glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion ausgeschieden (Cornelison & Reed, 1993). Durch Wasserrückresorption aus dem Primärharn kommt es lokal, insbesondere in den proximalen Tubuli zu einer erheblichen Konzentrierung des Wirkstoffes, so daß die betroffenen Zellen massiv exponiert werden. Die Prominenz der proximalen Tubuli, insbesondere der gestreckten Anteile wurde auch in den immunhistochemischen Markierungen der Addukte von Blommaert et al. (1996) und Terheggen et al. (1987) beobachtet, in dieser Arbeit aber erstmals quantifiziert.

Die extreme DNA-Schädigung in den Nierenzellen steht in gutem Einklang mit der hohen Nephrotoxizität von *Cisplatin* bei der Maus und auch beim Menschen.

In den Leberzellen der Mäuse fand sich ein Adduktniveau, das ungefähr 80 % der mittleren Nierenbelastung entsprach (Abb. 18). Eine *Cisplatin*-assoziierte Hepatotoxizität ist klinisch ohne Bedeutung, Leberzellen scheinen eine erhöhte Toleranz gegenüber Pt-DNA Läsionen zu besitzen. Ein umgekehrtes Verhältnis zeigte sich in Lymphozyten: Leukopenie ist eine typische Nebenwirkung, die kurz nach Beginn einer Platintherapie beobachtet wird (Lokisch & Anderson, 1998). In den auf Pt-GG Gehalt untersuchten T-Lymphozyten wurde jedoch 6 h nach Applikation ein Adduktmaximum detektiert, daß nur etwa 20% der mittleren Nierenbelastung repräsentierte.

Im Vergleich zur Niere wurde der Pt-GG Spiegel in Ratten-Lymphozyten von Fichtinger-Schepman et al. (1989) mit nur 3% noch niedriger bemessen. Obgleich bezüglich der Wirkstoffanflutung benachteiligt, findet man bei Chemotherapie-begleitenden Messungen selbst in Zellen der Wangenschleimhaut erheblich mehr Addukte als in kernhaltigen Blutzellen (Blommaert et al., 1993; Terheggen et al., 1988; van de Vaart et al., 2000). Auch nach Exponiert *ex vivo* bilden sich in den Schleimhautzellen initial etwa zehnmal mehr Addukte als in Lymphozyten (Meijer et al., 1997). Über die Ursache der geringen Platinbelastung und der hohen Hämatotoxizität kann daher bislang nur spekuliert werden. Es wäre möglich, daß hämatopoetische Zellen, insbesondere die proliferationskompetenten Blasten ähnlich Platin-intolerant sind wie Hodentumorzellen, die ebenfalls in einem Kompartiment sehr niedriger Adduktbelastung eingebunden sind (Johnsson et al. 1995). Denkbar wäre weiterhin die Möglichkeit, daß Stammzell-nahe Populationen in weitaus stärkeren Maße für *Cisplatin*-induzierte DNA-Schädigung zugänglich sind als die ausdifferenzierten Lymphozyten. Nicht auszuschließen ist ferner die Möglichkeit, daß ein Reparaturdefizit Grund der hohen Sensibilität ist. Funktionelle Untersuchungen an humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen scheinen dies zu bestätigen (Buschfort-Papewalis & Thomale, persönliche Mitteilung) Diese Inkompetenz könnte auch die Gen-spezifische Reparatur von Pt-DNA Addukten betreffen oder die Elimination eines seltenen Adduktes, dessen Persistenz bei den bisher möglichen Messungen quantitativ nicht auffallen würde. *Cisplatin*-induzierte Pt-DNA Addukte persistieren *in vivo* erstaunlich lange. Pt-GG wird über eine biphasige Kinetik aus dem Genom eliminiert (Abb. 26; Abb. 29). Nach einer effektiven Initialphase, die in Abhängigkeit von der induzierten Maximalbelastung in 2 bis 6 Tagen abgeschlossen war, bildete sich bei den Primärzellen, ähnlich wie in Zellkulturl, ein stabiles Addukt-Plateau aus, daß in etwa 30 – 40 % der initialen Schädigung repräsentierte und über 15 Tage persistierte. In den unter Hochdosis-Behandlung (10 mg/kg) besonders geschädigten Tubuli recti proximali waren nach 2 Wochen sogar noch 50% der Addukte manifest. Die tatsächliche Adduktreparatur muß sehr wahrscheinlich als noch ineffizienter eingestuft werden, da besonders hoch belastete Zellen durch Apoptose nach und nach aus dem Gewebeverband ausscheiden und somit im Mittel eine Addukt-Elimination vortäuschen.

3.6.2 Akuttoxizität von *Cisplatin* im XPA- und XPC- Knockout Mausmodell

Cisplatin-induzierte Pt-DNA Addukte werden über den Nukleotid-Exzisions-Reparatur Weg entfernt (1.3.4; Abb. 34). Die Erkennung *Cis*- bzw. *Carboplatin* induzierter DNA-Addukten durch das XPA-Protein ist dabei wahrscheinlich ein initiale Ereignisse in der Prozessierung dieser Läsionen (Asahina et al., 1994; Jones & Wood, 1993; Kuraoka et al., 1996).

Die gesamtgenomische NER-Reparatur ist außerdem von dem Schadenserkennungs-Protein XPC abhängig. (Berg et al., 2000; Cheo et al., 2000; Friedberg et al., 1999, 2000).

Um die Angriffspunkte und die Bedeutung dieser beiden Reparaturproteine im Rahmen der Pt-DNA Addukt-Elimination zu identifizieren, wurden *in vivo* Untersuchungen an XPA - und XPC-Knockout Mäusen vorgenommen.

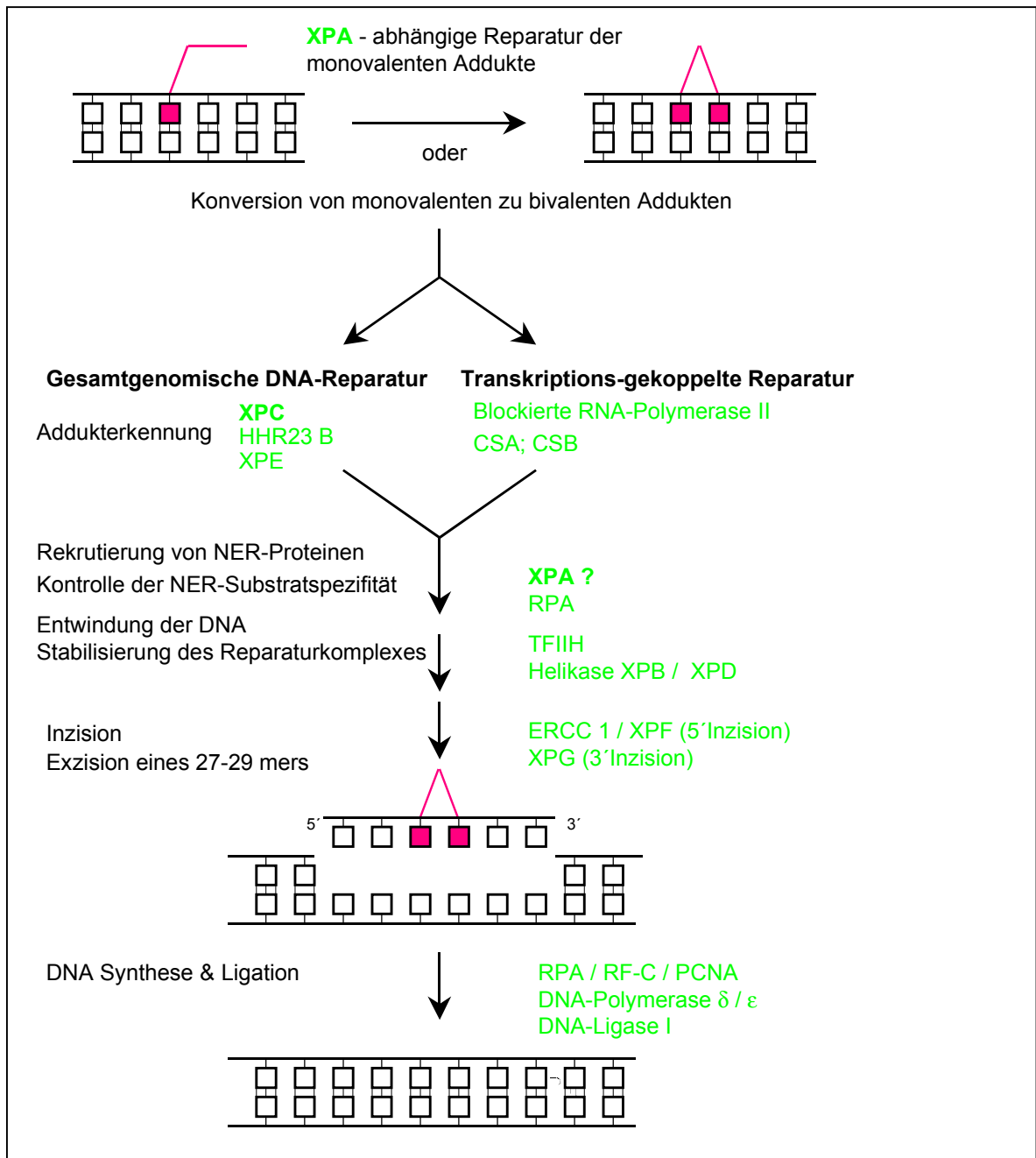


Abb. 33 Interaktion von XPA und XPC mit *Cisplatin*-induzierten DNA Addukten im Rahmen des Nukleotid-Exzisions-Weges (modifiziert nach van Steeg et al., 2000)

In einer Dosisfindungsstudie wurde die akute Toxizität von *Cisplatin* in den NER-defizienten Tieren untersucht (2.5.2). Mäuse mit einem funktionellen XPA-Knockout zeigten sich extrem sensitiv (Abb. 27). Insbesondere die Nierenschäden waren prominent (Abb. 28)

Die Beobachtungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Dijt et al. (1988) und Hansson et al. (1989), die nachwiesen, daß XPA-defiziente Zellen extrem empfindlich auf *Cisplatin* reagieren, während Platin-resistente Zellen häufig XPA überexprimieren (Dabholkar et al., 1994; States & Reed 1996).

Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} verdrängen Zn^{2+} aus dem Zinkfingermotiv des XPA-Proteins und inhibieren es damit funktionell (Asmuss et al., 2000). Ähnlich wie nach einem XPA-Knockout sind Zellen nach einer Behandlung mit diesen Übergangsmetallen gegenüber *Cisplatin* sensitiviert und zeigen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Platin-induzierte Mutationen (Krüger et al., 1999).

Die XPC-Knockout Mäuse zeigten erstaunlicherweise bei der ausgetesteten *Cisplatin*-Dosis keine Vitalitätseinbuße. In der Literatur ist zur *Cisplatin*-Empfindlichkeit von XPC-Knockoutmodellen bislang nichts bekannt.

3.6.3 Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten nach subtoxischer Applikation von *Cisplatin* im XPA- und XPC- Knockout Mausmodell

Nach der gleichen *Cisplatin*-Dosis lag das Maximum der Pt-GG Intrastrang Adduktbelastung in den XPA-Knockout – Tieren in allen Geweben etwa doppelt so hoch wie in den entsprechenden Zellen von Wildtyp-Tieren (Abb. 29). Ein großer Teil der Pt-DNA-Reaktionsprodukte wird in XPA⁺⁺-Zellen offensichtlich bereits als intermediär entstehende Monoaddukte erkannt und repariert, so daß keine bivalenten Läsionen entstehen können.

Auch in Abwesenheit von funktionellem XPA-Protein fand in allen untersuchten Zellen eine biphasige Elimination von Intrastrang Addukten statt. Dies widerlegt die Vorstellungen von Dijt et al. (1988) und Hansson et al. (1989), welche eine Reparatur von bivalenten Pt-Läsionen in XPA-inkompetenten Zellen ausschlossen.

Auch wenn dem XPA-Protein eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Platin-Addukten zukommt, postulierten Zhen et al. (1993) in ihren Studien zur genspezifischen Reparatur einen alternativen Weg zur Entfernung dieser Schäden. An humanen Fibroblasten von XP-Patienten konnten sie zeigen, daß, in Einklang mit unseren Ergebnissen, diese Zellen zur Elimination von Pt-DNA Läsionen auch ohne intaktes XPA-Protein in der Lage sind: Während die XPA-kompetenten Vergleichszellen innerhalb von 24 h nach Exposition 69 % der Intrastrang-Addukte und 84% der Interstrang-Addukte abbauten, wurden in den XPA-defizienten Zellen immerhin noch 22% bzw. 32% dieser Läsionen eliminiert.

Es ist zur Zeit noch nicht auszuschließen, daß die erstaunlich ausgeprägte Toxizität nicht nur durch die initial vermehrt gebildeten Pt-GG-Schäden verursacht wird, sondern zumindest anteilig auch durch ein Reparaturdefizit bezüglich anderer, relativ seltener, aber besonders zytotoxische Pt-Läsion. Mögliche Kandidaten wären das Pt-AG Intrastrang-Addukt und das G-Pt-G Interstrang-Addukt. Von beiden ist bekannt, daß sie in NER-kompetenten Modellen gesamt-

genomisch schneller als Pt-GG repariert werden (Huang et al., 1994; Jones et al., 1991; Jones & Wood, 1993; Kuraoka et al., 1996; Szymkowski et al., 1992;). Entsprechende ICA-Analysen an den Knockout-Mäusen sind in Vorbereitung.

Der schnelle Verlauf der akuten Vergiftung legt die Vermutung nahe, daß nicht ein Replikations- und Proliferationsblock, sondern eine Transkriptionsblockade lebenswichtiger Gene das entscheidende Zelltod-induzierende Ereignis ist.

Die Hauptursache für den drastischen Toleranzunterschied zwischen Wildtyp- und XPA-Knockout-Tieren liegt deshalb möglicherweise hauptsächlich in einer unterschiedlich effizienten Transkriptions-gekoppelten Reparatur von Läsionen in „house keeping“- Genen. Dieser Zustand könnte für die Knockout-Mäuse lethal sein, ohne daß Unterschiede in der gesamtgenomischen Reparatur offenbar werden. Deshalb sind die geplanten Addukt-Messungen in spezifischen Gensequenzen von besonderer Bedeutung.

Ausmaß und Wirkung einer präferentiellen Reparatur von Pt-DNA-Addukten in transkribierten DNA-Sequenzen („Genspezifischen Reparatur“) werden unterschiedlich eingeschätzt. Ungeklärt ist insbesondere die Frage, ob eine Veränderung dieser Subkomponente des Reparatursystems alleine zu einer Überempfindlichkeit oder Resistenz der Zielzellen führen kann (Bohr, 1995; Köberle et al., 1997; May et al., 1993; Petersen et al., 1996; Zhen et al., 1992).

Köberle et al. (1997) konnten an inhärent sensitiven und resistenten Zell-Linien eine im Vergleich zum Gesamtgenom beschleunigte Transkriptions-gekoppelte Reparatur-Aktivität von Pt-DNA Addukten nicht nachweisen, während Jones et al. (1991) und May et al. (1993) sowohl eine bevorzugte Bildung als auch die beschleunigte Elimination von Intrastrang-Addukten aus der DNA transkribierter Gene dokumentierten. Eine verstärkte Gen-spezifische Reparatur von Intrastrang-Addukten wurde sowohl von Ali-Osman (1994) als auch von O'Neill et al. (1999) als ein möglicher Resistenzmechanismus in Glioblastom- bzw. Ovarialkarzinomzellen postuliert.

Die in dieser Arbeit generierten anti-(Pt-DNA) MAK sollen daher in Zukunft auch in einem Meßverfahren zur Gen-spezifischen DNA-Reparatur eingesetzt werden. Damit sollen Addukt-spezifische Reparaturkinetiken in definierten Gensequenzen erfaßt werden, um so die Bedeutung einer möglichen toposelektiven Elimination von Pt-DNA-Addukten bei klinisch relevanten Konzentrationen zu untersuchen. Dieser am IFZ entwickelte Assay basiert auf einer Kombination von Immunaffinitäts-Schritten und quantitativer Polymerasekettenreaktion (PCR). Mit Hilfe entsprechender MAK werden DNA-Fragmente, die spezifische Addukte enthalten, aus der genomischen DNA isoliert. Aus dieser Fraktion werden definierte Gen-Sequenzen durch einen PCR-Schritt amplifiziert und anschließend durch Hybridisierung mit genspezifischen Sonden quantifiziert (Thomale et al., 1994; Engelbergs et al., 1998).

Ein interessanter Befund ergab sich aus dem Vergleich der Adduktspiegel in unterschiedlichen Zelltypen: Sowohl bei den NER-kompetenten wie auch bei den XPA-Knockout-Mäusen lagen die Initialkonzentrationen der Pt-GG-Intrastrangaddukte im Kern von Leber- oder Nierenzellen erheblich höher als bei in peripheren T-Lymphozyten. (Abb. 29)

In Wildtyp-Tieren könnte diese Beobachtung durch eine außerordentlich effiziente Elimination von frühen monovalenten Addukten erklärt werden. Im Reparatur-defizienten Knockoutmodell scheidet diese Erklärung jedoch aus. Es muß also in T-Lymphozyten weitere zelluläre Funktionen geben, die die initiale DNA-Platinierung stark beeinflussen. In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Lage soll daher untersucht werden, inwieweit die Transportaktivität von cMOAT für die verminderte Initialbelastung verantwortlich ist (3.5).

Erstmals wurden in dieser Arbeit Pt-Addukt Messungen im murinen XPC-Knockout Modell durchgeführt. Die initiale Pt-GG Adduktbildung unterscheidet sich dabei nicht von der bei Wildtyp-Mäusen. Die nachfolgende Elimination der bivalenten Intrastrang Addukte ist dagegen erheblich verlangsamt (Leber) oder vollständig inhibiert (Niere). Die Untersuchungen sind erste Hinweise, daß XPC, nicht aber XPA eine maßgebliche Schlüsselrolle bei der Erkennung und Prozessierung der fertig ausgebildeten Pt-GG Addukte zukommt.

3.7 Prognostische Aussagekraft von Pt - DNA Addukt - Messungen in Lymphozyten und in Biopsien von Patienten unter *Cisplatin* Therapie

3.7.1 Immunhistochemische Quantifizierung von Pt-DNA Addukten in Normal und Tumorgewebe nach Biopsien

In Rahmen dieser Arbeit wurden erste klinische Begleituntersuchungen zur DNA-Adduktbildung bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Magenkarzinom unter *Cisplatin*-Chemotherapie durchgeführt. Mit der hier entwickelten Immunanalytik ist es erstmals möglich, solche Messungen an Normal- und Tumorgewebe aus Biopsien durchzuführen. Die ersten Ergebnisse verdeutlichen die Heterogenität der Adduktbelastung in verschiedenen Geweben und damit die Notwendigkeit einer Einzelzellanalytik (2.6.1; Abb. 30 & Abb. 31).

Mittelfristig soll die Akkumulation und Persistenz der Pt-Addukte zu den klinischen Daten korreliert werden, um festzustellen, ob diese Parameter frühe diagnostische Hinweise für ein Ansprechen oder ein Versagen der Platintherapie liefern können. Ein weitere wichtiger Aspekt ist dabei der Vergleich zwischen Tumor- und benachbarten Normalgewebe, der zeigen soll, ob die Tumorzellen bei Nicht-Ansprechen der Therapie veränderte Bildungs- oder Reparaturraten für bestimmte Pt-Addukte aufweisen. Von besonderer Bedeutung ist auch die Analyse von Biopsieproben nach mehreren Therapiezyklen, um festzustellen, ob sich das Reparaturverhalten der Tumorzellen durch Adaptation oder Selektion unter einer Platintherapie verändert.

3.7.2 Aussagekraft des Pt-DNA Adduktgehaltes in Lymphozyten für den Therapieerfolg

Parallel zu den Magen-Biopsien werden bei allen Patienten in dieser Studie entsprechende Messungen in peripheren mononukleären Zellen durchgeführt, um zu prüfen ob eine Adduktbestimmung in leicht zu gewinnenden Surrogatzellen die Ergebnisse im Biopsiematerial widerspiegeln (2.6.1; Abb. 32).

Die Frage, inwieweit sich die interindividuell unterschiedliche Prozessierung von Pt-DNA Addukten im Tumor proportional in Zellen des Normalgewebes widerspiegelt und ob Therapie-induzierte Veränderungen des Addukt-Bildungs-, Eliminations- und Toleranzphänotyps alle Zellen und damit auch die Lymphozyten betreffen wird zur Zeit ergebnisoffen diskutiert (1.4.1). Reed et al. (1993) postulierten, daß der Umgang mit Pt-DNA Addukten vor dem Hintergrund einer allen Organen gemeinsamen genetischen Grundausstattung von Mechanismen abläuft, welche die Integrität der DNA unter genotoxischem Streß gewährleisten sollen. Durch Zelltyp-spezifisch Expression einzelner Komponenten ist dieser Apparat zwar in verschiedenen Organen unterschiedlich effizient, trotzdem kann man aus Messungen an Surrogatzellen die grundsätzliche Befähigung eines Individuums ableiten, mit DNA-reaktiven Noxen umzugehen. Inhärente, d. h. schon zu Beginn einer Platin-Chemotherapie auftretende Resistenzen, wie sie für Lungentumore typisch sind, werden nach diesem Konzept zu einem Sonderfall der erworbenen Resistenz: Reed et al. (1993) vermuten, daß durch die langandauernde Exposition mit genotoxischen Noxen schon im Vorfeld der Cancerogenese zur Induktion zellulärer Resistenzmechanismen kommt, die dann mit Beginn der Chemotherapie offenbar werden.

Das Modell wird durch mehrere Studien unterstützt, die einen Zusammenhang zwischen Therapieerfolg und der Pt-DNA Adduktbelastung von Surrogatzellen, wie Lymphozyten oder Mundschleimhautzellen aufzeigen (Blommaert et al., 1993; Boffetta et al., 1998; Dabhokar et al., 1992; Fichtinger-Schepman et al., 1990; Reed et al., 1993). Die interindividuellen Unterschiede werden allerdings unvereinbar unterschiedlich bemessen. Während z. B. Dabhokar et al. (1992) Varianzen von bis zu zwei Größenordnungen angeben, unterscheiden sich die Gesamtaddukt-Gehalte der DNA bei Blommaert et al. (1993) und Terheggen et al. (1988) interindividuell maximal um den Faktor 3 - 15.

Die Extrapolation des Surrogatzell-Adduktgehaltes muß dann versagen, wenn es zu selektiven Mutationen im Tumorgewebe kommt, die zu einer veränderten Adduktbildung oder -prozessierung führen. Der Therapedruck kann dann zur Begünstigung dieser Zellklone führen.

In Fortführung dieser Arbeit und in Zusammenarbeit mit den hiesigen Kliniken für Neurologie und für Urologie soll zusätzlich untersucht werden, ob die Surrogatzell-Messungen Aufschluß über das Ausmaß der *Cisplatin*-induzierten Nebenwirkungen, insbesondere der Polyneuropathien geben können.

3.8 Ausblick: Zukünftige Bedeutung der Pt-DNA Adduktanalytik für die individualisierte Chemotherapie

Der Schutz von Normalgeweben durch Chemoprotektoren (1.5.1) und die Resensitivierung von Tumoren durch Modulatoren (1.5.2), durch Antisense-Konstrukte, Gen-therapeutische Ansätze (1.5.4) oder den Einsatz von neuen Platinkomplexen (1.5.3) wird die bisherige *Cis-* bzw. *Carboplatin*-Therapie effizienter und schonender machen (Abb. 34).

Mittlerweile sind einige dieser Strategien in klinische Studien umgesetzt oder bereits zugelassen.

Beruhet eine Resistenz z. B. auf einer verminderten Adduktbildung, so kann das *Cisplatin*-Exportprotein cMOAT das Ziel einer Intervention sein. Es ist bekannt, daß Cyclosporin A und Strukturverwandte wie PSC 833 (Chen et al., 1999) ebenso wie Leukotrien – analoge Verbindungen (Klein et al., 1999; König et al., 1999) den MRD 2 Transporter selektiv inaktivieren können.

Auch intrazelluläre Detoxifikationsmechanismen können manipuliert werden. Buthionin-sulfoximin inhibiert beispielsweise die γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase und erwies sich in den Zellkulturexperimenten von Sharp et al. (1998) als *Cisplatin*-sensitivierende Substanz.

Hemmstoffe der Topoisomerase I besitzen neben ihrer eigenen zytotoxischen Qualität zusätzliche Eigenschaften als Modulatoren der Adduktbildung. Ma et al. (1998) erklärten die über einen einfachen Synergismus hinausgehende Potenzierung der *Cisplatin*-Wirkung in Gegenwart von Topotecan durch die begünstigte Bildung von G-Pt-G Interstrang Addukten.

Klinische Resistenzen aufgrund hoher DNA-Reparatureffizienz der Zielzellen lassen sich mit Hilfe geeigneter Modulatoren für einzelne Schlüsselkomponenten ebenfalls kompensieren.

So hemmt das Purin-Analogue Fludarabinphosphat die Nukleotid Exzisions Reparatur von Pt-DNA Addukten auf der Ebene der Inzision und Ligation, vor allem aber der DNA Neusynthese (Li et al. 1997a, b; Li & Yang, 1999).

Wechselwirkungen mit dem NER-Apparat werden auch für Gemcitabin (van Moorsel et al., 1999; Yang et al., 2000) und 5-Fluorouracil angenommen (Fujishima et al., 1997; Sasaki et al., 2000; Tsushima & Sakata, 1998).

Tumore, welche p185^{erbB-2} überexprimieren, zeigen eine ras-abhängige Stimulation der Pt-DNA Addukt-reparatur. Mit Hilfe des Antikörpers TAb-250, der gegen die extrazelluläre Domäne des Wachstumsfaktor-Rezeptors gerichtet ist und diesen blockiert, konnte eine Resensitivierung von *Cisplatin*-resistenten Zellen erzielt werden (Yen et al., 1997).

Die Aktivität der Proteinkinase C wirkt der *Cisplatin*-induzierten Apoptose entgegen und kann Zellen damit auf der Ebene der Addukt-Toleranz resistent machen (Ikeda et al., 1999; Spitaler et al., 1999) Inhibitoren der Proteinkinase C wie 7-Hydroxyl-Staurosporin werden bereits klinisch genutzt.

Alle Interventionen dieser Art verlangen die Kenntnis der zugrunde liegenden individuellen Resistenzmechanismen und sind damit von einer Addukt-Analytik abhängig, so daß die Einsatzmöglichkeiten der in dieser Arbeit entwickelten Methodik in Zukunft weiter zunehmen werden.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

4.1 Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen *Cis-* bzw. *Carboplatin*-induzierte Pt-DNA-Addukte

4.1.1 Antigen synthese: Konjugate aus *Cisplatin*-exponierter Kalbsthymus-DNA und mBSA

Durch die Verimpfung elektrostatisch gekoppelter Komplexe aus methyliertem Serumalbumin und *in vitro* platinierter DNA wurde eine Immunreaktion gegen *Cis-* bzw. *Carboplatin*-induzierte DNA Addukte provoziert. Die Antigen synthese wurde nach einem modifizierten Protokoll von Tilby et al. (1991) durchgeführt. Ein ml der DNA-Präparation Pt 5 in PBS (4.7.1; 2.100 µg/ml, 188 pmol Pt/µg) wurde mit 1 ml einer mBSA-Lösung (2.100 µg/ml in PBS) vereinigt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung verimpft.

4.1.2 Immunisierung

Für jede Impfung wurden 250 µl des Pt-DNA-mBSA-Konjugates (4.1.1), entsprechend 50 nmol Addukt in 250 µl MPL / TDM-Adjuvans aufgenommen (Monophosphoryl Lipid A / Trehalose Dicorynomycolat in PBS; Sigma). Insgesamt drei BD IX- Ratten wurde diese Antigenlösungen intraperitoneal injiziert und die Behandlung innerhalb eines halben Jahres monatlich wiederholt. 10 Tage nach jeder Antigenapplikation wurde unter CO₂-Narkose eine Blutprobe aus dem Plexus Retrobulbaris entnommen und im ELISA (4.1.3) auf den Antikörpertiter untersucht. Drei Tage vor der Zellfusion wurde jedem Tier eine abschließende Injektion von 250 µl des Pt-DNA-mBSA-Konjugates ohne Adjuvans verabreicht.

4.1.3 Entwicklung eines Enzym-Immunoassays (ELISA) zur Messung des Antikörpertiters im Serum und der immunologischen Aktivität von Hybridomüberständen

Der Test basiert auf einem modifizierten Protokoll von Sundquist et al. (1987). Jedes Well einer 96 Well- Polystyrol-Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc) wurde mit 200 µl einer 100 µg/ml DEAE-Dextran-Lösung (1 M Na₂CO₃, 5 mM EDTA, pH 9,6) für 5 h bei 37°C vorbehandelt und anschließend viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl PBS, 0,05 % Tween 20 gewaschen. Jede Spalte der Platte wurde alternierend mit einer der folgenden DNA-Präparationen (4.7.1) beschichtet.

Bezeichnung der DNA-Präparation	Pt-Gehalt: [pmol Pt / µg DNA]
Pt 0	--
Pt 4	7,11
Pt 5	188,00

Jedes Well wurde dazu mit 50 µl der jeweiligen DNA-Verdünnung (5µg/ml PBS) beschickt und die Platte anschließend 16 h bei 37°C getrocknet. Durch eine UV Bestrahlung (0,12 J, UV Stratalinker 2400, Stratagene) wurde die DNA auf dem Polystyrol immobilisiert. Die Platte wurde viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl PBS, 0,05 % Tween 20 gewaschen. Unspezifische Protein-Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation bei 37°C mit 200 µl PBS, 1% Casein abgeblockt. Die Platte wurde viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl PBS, 0,05 % Tween 20 gewaschen. Bei 37°C folgte die einstündige Inkubation mit 50 µl der auf Antikörper-Aktivität zu prüfenden Probe (Verdünnungen in PBS, 1% Casein; Titerbestimmung: 1: 10.000 & 1:100.000; Hybridomüberstände: 1: 1.000 & 1:10.000; Konzentrate aus T- und G-Chromatographie: 1: 1000.000 & 1:10.000.000). Die Platte wurde viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl PBS gewaschen. Zur Detektion der gebundenen anti-(Pt-DNA) Antikörper wurde jedes Well mit 50 µl eines Alkalische Phosphatase - konjugierten Ziege anti-(Ratte- [IgG + IgM (H + L)]) Serums in PBS, 1% Casein beschickt (2,4 µg/ml; Dianova) und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl 10 mM Diethanolamin, 1 mM MgCl₂, pH 9,8 gewaschen. 100 µl einer p-Nitrophenyl-Phosphat-Lösung (1 mg/ml in 10 mM Diethanolamin, 1 mM MgCl₂, pH 9,8; PNP, Sigma) wurden als Phosphatase-Substrat in jedes Well eingetragen. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 37°C erfolgte die Messung der Absorption bei 405 nm (Mikroplatten-Reader: EL_x 800, Steuerungs- und Meßprogramm: MikroWin 2.39, Bio-Tek Instruments).

4.1.4 Zell-Fusion

Die Fusionen wurden in Zusammenarbeit mit der Monoclonal Unit des IFZ durchgeführt. Die Ratten-Myelom-Linie Y3. Ag 1.2.3 (Galfre et al. 1979; ATCC CRL-1631) wurde in Standardmedium (RPMI 1640, 20 % FKS, 2 mM Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 100 µg Penicillin / ml, 100 U Streptomycin / ml) kultiviert. Vor der Fusion wurden 1x10⁸ Zellen bei 139xg für 5 min abzentrifugiert und in 10 ml Serum-freiem Medium aufgenommen. Die Ratten wurden durch Genickbruch getötet, die Milz steril präpariert, in 10 ml Standardmedium aufgenommen und durch ein Milzsieb gedrückt. Für jede Fusion wurde ein Aliquot von 1x10⁸ Zellen entnommen, bei 139xg für 5 min abzentrifugiert und in 10 ml Serum-freiem RPMI 1640 Medium aufgenommen. Myelom- und Milzzellen wurden im 1:1 Verhältnis gemischt, bei 139xg für 5 min pelletiert und für 1 h auf Eis gestellt. Standardmedium und eine 0,7 g/ml PEG-Lösung (Polyethylen Glykol, Sigma) in RPMI 1640, 2 mM Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 100 µg Penicillin / ml, 100 U Streptomycin / ml, 15 % DMSO wurden auf 37°C temperiert.

Der gekühlte Fusionsansatz wurde dekantiert, sodann wurde 1 ml PEG-Lösung innerhalb von 45 s tropfenweise unter Schütteln dazugegeben. Nachfolgend wurden über einen Zeitraum von 7 Minuten 5 ml des vorgewärmten Standardmediums eingetragen, schließlich über 8 Minuten weitere 45 ml. Der Ansatz wurde bei 139xg für 10 min abzentrifugiert und in 200 ml HAT-Medium (RPMI 1640, 20 % FKS, 2 mM Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 100 µg Penicillin / ml, 100 U Streptomycin / ml; 10 % BM-Condimed H 1, Roche; Hypoxanthin / Aminopterin / Thymidin-Zusatz, GIBCO BRL, Life Technologies) aufgenommen. Die Suspension wurde auf 96 Well Mikrotiterplatten (Nunclon, Nunc) ausplattiert. Pro Well wurden 100 µl, entsprechend 5×10^4 Milzzellen eingetragen. Alternativ dazu, in Vorbereitung auf die immunomagnetische Zellseparation (4.1.8) wurde der in HAT-Medium aufgenommene Fusionsansatz direkt in 75 cm² Zellkulturflaschen (20 ml entsprechend 1×10^7 Milzzellen) kultiviert. Die Hybridome wurden zunächst drei Wochen mit HAT-Medium und anschließend mindestens zwei Wochen mit HT-Medium (RPMI 1640, 20 % FKS, 2 mM Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 100 µg Penicillin / ml, 100 U Streptomycin / ml; 10 % BM-Condimed H 1, Roche; Hypoxanthin / Thymidin-Zusatz, GIBCO BRL, Life Technologies) gehalten. Alle drei Tage wurde das Medium zur Hälfte erneuert. Drei Wochen nach der Fusion wurden die Überstände der 96 Well Mikrotiterplatten mit Hilfe des ELISA (4.1.3) auf Antikörperaktivität getestet. Anti-(Pt-DNA) positive Klone wurden in Zellkulturflaschen überführt (4.1.5).

4.1.5 Haltungsbedingungen für Hybridome

Die Hybridom-Zellen wurden in Standardmedium (RPMI 1640, 20% FKS, 2 mM Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 100 µg Penicillin / ml, 100 U Streptomycin / ml) bei 5 % CO₂ und 37°C kultiviert. Alternativ wurden die Zellen in Serum-freiem Medium (20 µg / ml Protein; Hybridoma-SFM, GIBCO BRL, Life Technologies), 2 mM Glutamin, 100 µg Penicillin / ml, 100 U Streptomycin / ml bei 5 % CO₂ und 37°C gehalten.

4.1.6 Reklonierung der Hybridome

Zur Gewährleistung der Monoklonalität wurden anti-(Pt-DNA) positive Klone in Standardmedium, 10 % BM-Condimed H 1 (Roche) aufgenommen und gemäß dem Protokoll von Coller & Coller (1983) auf 96 Well Mikrotiterplatten vereinzelt. Drei Wochen nach der Reklonierung wurden die Überstände der 96 Well Mikrotiterplatten mit Hilfe des ELISA (4.1.3) auf Antikörperaktivität getestet. Das Prozedere wurde für jeden Klon dreimal durchgeführt.

4.1.7 Reinigung monoklonaler Antikörper

Die Isolierung der monoklonalen Antikörper aus Hybridomkulturüberständen erfolgte durch Chromatographie über T-Gel (4.7.7.2) und Protein G (4.7.7.3). Die aufgereinigten Fraktionen wurden auf Proteinkonzentration (4.7.6), Antikörpergehalt (4.1.7.1) und -aktivität (4.1.3) untersucht. Der Reinigungserfolg wurde auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (4.7.8.1.2) demonstriert. Der Isotyp der MAK wurde mit Hilfe eines ELISA (4.1.7.2) bestimmt.

4.1.7.1 Quantifizierung von Immunglobulinen

Die Quantifizierung von Immunglobulinen erfolgte mit einem „Capture-ELISA“ nach Fleming & Pen (1988). Jedes Well einer 96 Well- Polystyrol-Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc) wurde mit 50 µl einer 20 µg/ml Ziege anti-(Ratte-[IgG+IgM (H + L)])-Verdünnung in PBS für 12 h bei 4°C vorbehandelt und anschließend viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl PBS, 0,05 % Tween 20 gewaschen. Unspezifische Protein-Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation bei 37°C mit 200 µl PBS, 1% Casein abgeblockt. Die Platte wurde viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl PBS, 0,05 % Tween 20 gewaschen. Bei 37°C folgte die einstündige Inkubation mit 50 µl der auf Antikörper-Gehalt zu prüfenden Proben (Verdünnungen in PBS, 1% Casein; Hybridomüberstände: 1: 100 & 1:1.000; Konzentrate aus T- und G-Chromatographie: 1: 100.000 & 1:1.000.000). Auf jeder Platte wurden zusätzlich acht IgG bzw. IgM- Standards im Konzentrationsbereich zwischen 0,05 - 0,5 µg/ml aufgetragen. Die Platte wurde viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl PBS gewaschen. Zur Detektion der gebundenen anti-(Pt-DNA) Antikörper wurde jedes Well mit 50 µl eines Alkalische Phosphatase - konjugierten Ziege anti-(Ratte-[IgG + IgM (H + L)]) Serums in PBS, 1% Casein beschickt (2,4 µg/ml; Dianova) und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl 10 mM Diethanolamin, 1 mM MgCl₂, pH 9,8 gewaschen. 100 µl einer p-Nitrophenyl-Phosphat-Lösung (1 mg/ml in 10 mM Diethanolamin, 1 mM MgCl₂, pH 9,8; PNP, Sigma) wurden als Phosphatase-Substrat in jedes Well eingetragen. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 37°C erfolgte die Messung der Absorption bei 405 nm (4.1.3). Die MAK-Konzentration wurde durch Abgleich des Probensignals mit der Standardreihe ermittelt.

4.1.7.2 Typisierung von Immunglobulinen

Die Typisierung von Immunglobulinen erfolgte mit einem „Capture-ELISA“ nach Coulter et al. (1989). Die Wells jeder Spalte einer 96 Well-Polystyrol-Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc) wurden alternierend mit einem Isotyp-spezifischen Maus anti-(Ratte-[F_c])-Antikörper beschichtet. Hierzu standen anti-[IgG 1]-, anti-[IgG 2A]-, anti-[IgG 2B]-, anti-[IgG 2C]- und anti-[IgM]-MAK (Sigma) zur Verfügung. Jedes Well wurde mit 50 µl einer 20 µg/ml MAK-Verdünnung in PBS für 12 h bei 4°C vorbehandelt und anschließend viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl PBS, 0,05 % Tween 20 gewaschen. Unspezifische Protein-Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation bei 37°C mit 200 µl PBS, 1% Casein abgeblockt. Die Platte wurde viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl PBS, 0,05 % Tween 20 gewaschen. Bei 37°C folgte die einstündige Inkubation mit 50 µl der auf Antikörper-Isotyp zu prüfenden Proben (Verdünnungen der Hybridomüberstände in PBS, 1% Casein: 1: 10 & 1:100). Jede Fraktion wurde gegen alle immobilisierten anti-(Ratte-[F_c])-Antikörper ausgetestet Die Platte wurde viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl PBS gewaschen. Zur Absättigung unerwünschter Kreuzreaktivität der anti-(Ratte-[F_c])-MAK gegenüber dem aus Ziege stammenden anti-(Ratte)- Sekundärantikörper wurde jedes Well mit 50 µl einer 15 µg/ml Ziege anti-(Maus-[IgG + IgM (H + L)])-Lösung in PBS; 1% Casein für 1 h bei 37°C inkubiert.

Zur Detektion der gebundenen anti-(Pt-DNA) Antikörper wurde jedes Well mit 50 µl eines Alkalische Phosphatase - konjugierten Ziege anti-(Ratte-[IgG + IgM (H + L)]) Serums in PBS, 1% Casein beschickt (2,4 µg/ml; Dianova) und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde viermal mit H₂O und einmal mit 200 µl 10 mM Diethanolamin, 1 mM MgCl₂, pH 9,8 gewaschen. 100 µl einer p-Nitrophenyl-Phosphat-Lösung (1 mg/ml in 10 mM Diethanolamin, 1 mM MgCl₂, pH 9,8; PNP, Sigma) wurden als Phosphatase-Substrat in jedes Well eingetragen. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 37°C erfolgte die Messung der Absorption bei 405 nm (4.1.3). Der gesuchte Antikörper-Isotyp zeigte sich durch ein positives ELISA-Signal.

4.1.8 Immunomagnetisches Screening von Hybridomkulturen

Das Ergebnis der Zell-Fusion (4.1.4) ist ein polyklonales Hybridom-Gemisch, das die Gesamtheit der immunologischen Aktivität des zugrunde liegenden Tieres repräsentiert. Zur Anreicherung anti-(Pt-DNA) positiver Klone wurde ein immunomagnetisches Separationsverfahren etabliert.

4.1.8.1 Immunfluoreszenz-Nachweis Zellmembran-ständiger Antikörper

Voraussetzung für die immunomagnetische Isolierung von Hybridomzellen ist die Expression membranständiger Antikörper. Der entsprechende Nachweis wurde gemäß einem Protokoll von Peters & Baumgarten (1992) geführt. Ein Aliquot des Hybridom-Gemisches (ca. 1×10^5 Zellen) wurde bei 139xg für 5 min zentrifugiert und das Zellkulturmedium abgesaugt. Zur Entfernung löslicher Antikörper wurde einmal mit 1 ml Serum-freiem Standardmedium gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 µl einer Cy3 - konjugierten Ziege anti-(Ratte-[IgG + IgM (H + L)]) Verdünnung in Serum-freiem Standardmedium (6,5 µg/ml; Dianova) für 2 h bei 4°C. Die Zellen wurden bei 139xg für 5 min zentrifugiert, das Zellkulturmedium abgesaugt. Zur Entfernen der nicht gebundenen anti-(Ratte) Antikörper wurde das Pellet einmal mit 1 ml Serum-freiem Standardmedium gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 50 µl PBS aufgenommen. Ein Aliquot wurde auf einen Objektträger gegeben und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. (Fluoreszenzmikroskop Axioplan mit Objektiv Plan-Neofluar 40fach / 0,75, Zeiss; Quecksilberlampe HBO 100 W; Cy3-Filter: Anregung 510 – 560 nm; Emission 590 nm).

4.1.8.2 Beschichtung von Magnetobeads mit Pt-DNA

Die Beschichtung von Magnetobeads mit Pt-DNA wurde gemäß einem modifizierten Protokoll von Barcellini et al. (1992) durchgeführt. Ein Eppendorf-Gefäß mit 1 ml Dynabeads M 450 – Lösung (29 mg/ml = 4×10^8 Beads/ml; Dynal) wurde in einem Dynal MPC-Magneten plziert. Nach 60 s wurde der Überstand dekantiert, der Magnet entfernt und die Beads in 1 ml PBS aufgenommen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt.

Anschließend wurde das Bead-Pellet in 1 ml Poly-L-Lysin-Lösung (50 µg/ml in PBS) aufgenommen und für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Beads wurden im Magneten viermal mit PBS gewaschen. Die Beschichtung der Beads erfolgte mit den DNA-Präparationen Pt 0 (Negativ-Kontrolle) bzw. Pt 3.

Bezeichnung der DNA-Präparation	Pt-Gehalt: [pmol Pt / µg DNA]
Pt 0	--
Pt 3	5,02

4×10^8 der gewaschenen Beads wurden in 1ml DNA-Lösung (1.000 µg/ml in PBS) aufgenommen und auf dem Roller für 4 h bei 37°C und anschließend für 12 h bei 4°C inkubiert. Die Beads wurden zweimal mit PBS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Protein-Bindungsstellen für 1 h bei 37°C in 1 ml RPMI 1640, 20% FKS suspendiert. Abschließend erfolgte eine letzte Waschung mit PBS.

4.1.8.3 Zellseparation

Die Isolierung von Hybridomzellen mit Magnetobeads erfolgte gemäß den modifizierten Vorschriften von Ossendorp et al. (1989). Nach Fusion und anschließender HAT-Selektion (4.1.4) wurde die resultierende polyklonale Hybridom-Kultur bei 139xg für 5 min zentrifugiert und das HAT-Medium abgesaugt. Zur Entfernung löslicher anti-(Pt-DNA)-Antikörper wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml kaltem Standardmedium gewaschen, das Medium verworfen. Anschließend wurden die Hybridome in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen / ml in Standardmedium aufgenommen. Je Milliliter Zellsuspension wurden 1×10^7 der DNA-beschichteten Beads (25 µl) eingetragen und auf dem Roller bei 25°C für 15 min und anschließend bei 4°C für 2 h inkubiert. Die Bead-assoziierten Zellen wurden über den Dynal MPC-Magneten isoliert und durch zweimalige Waschung mit kaltem Standardmedium von Bead-freien Zellen getrennt. Bead-positive und Bead-negative Hybridome wurden in der Neubauer-Kammer gezählt und auf 96 Well-Zellkulturplatten (Nunc, Nunc) in HT-Medium vereinzelt. Die Überstände der resultierenden Klone wurden nach 14 Tagen auf ihrer anti-(Pt-DNA)-Aktivität überprüft (4.1.3).

4.2 Adduktspezifität von MAK gegen *Cis* -bzw. *Carboplatin*-induzierte DNA-Addukte

4.2.1 Entwicklung eines kompetitiven Enzym-Immunoassays zur Charakterisierung von anti-(Pt-DNA) MAK

Es wurde versucht, die Adduktspezifität der anti-(Pt-DNA) MAK im kompetitiven ELISA mit Hilfe von potentiell inhibitorischen Pt-Desoxynukleotiden (4.7.2) aufzuklären. Die Reaktionsbedingungen für eine optimale Konkurrenz wurden mit Pt-DNA (4.7.1) als Inhibitor etabliert.

4.2.1.1 Pt-DNA Präparationen als Inhibitoren

Folgende Pt-DNA Präparationen (4.7.1) wurden im nativen und denaturierten Zustand als Inhibitoren eingesetzt:

Bezeichnung der DNA-Präparation	Pt-Gehalt: [pmol Pt / µg DNA]
Pt 0	--
Pt 4	7,1
Pt 5	188,0

Den zu testenden MAK wurden folgenden Kompetitor-Konzentrationen angeboten:

Pt 0 [fmol Pt/Well]	Pt 0 [ng DNA/Well]	Pt 4 [fmol Pt/Well]	Pt 4 [ng DNA/Well]	Pt 5 [fmol Pt/Well]	Pt 5 [ng DNA/Well]
--	16	50	7	50	0,3
--	32	100	14	100	0,5
--	64	200	28	200	1
--	80	250	35	250	1,3
--	120	375	53	375	2,0
--	160	500	70	500	2,7
--	200	625	88	625	3,3
--	320	1.000	141	1.000	5,3
--	640	2.000	281	2.000	10,6
--	800	2.500	352	2.500	13,3
--	1.200	3.750	527	3.750	19,9
--	1.600	5.000	703	5.000	26,5

4.2.1.2 Pt-Desoxynukleotide als Inhibitoren

Die Pt-Oligonukleotide Nr. 1 – 4 (4.7.2) wurden einzelsträngig und doppelsträngig als potentielle Inhibitoren ausgetestet.

Den zu testenden MAK wurden folgenden Kompetitor-Konzentrationen angeboten:

Pt-Desoxynukleotide [fmol Pt/Well]
100
1.000
5.000
10.000
25.000
250.000
2.500.000
25.000.000

4.2.1.3 Durchführung des kompetitiven Enzym-Immunoassays

Für die Kompetition wurde jedes Well einer 96 Well Mikrotiterplatte mit 200 µl PBS, 1% Casein für 60 min bei 37°C behandelt, um alle unspezifischen Protein- und Nukleinsäure-Bindungsstellen zu versiegeln. In jedem Well wurden 75 µl einer 0,15 µg/ml MAK Verdünnung (PBS, 1% Casein) mit 75 µl des potentiellen Inhibitors vereinigt und für 1 h auf 37°C temperiert. 50 µl des MAK-Inhibitor-Gemisches wurden als zu testende Probe in den Enzym-Immunoassay (4.1.3) eingetragen und auf verbliebene Antikörper-Aktivität untersucht. Die Reduktion des Meßsignals bei 405 nm demonstriert die Affinität des MAK zu der als Inhibitor fungierenden Struktur.

4.2.2 “Retrospektive” Charakterisierung der MAK-Spezifität mit dem Postlabelling-Verfahren

Die Charakterisierung der MAK-Spezifität mit dem Postlabelling-Verfahren wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Schellens am Antoni van Leeuwenhoek Hospital (The Netherlands Cancer Institute), Amsterdam durchgeführt.

4.2.2.1 Filterbindung

Die Generierung von Pt-Addukt-tragenden DNA-Fragmenten mit einer Länge von < 500 bp gelang durch Beschallung folgender DNA-Faktionen (4.7.1; 1.000 µg/ml in STE) für 5x1 min auf Eis (Sonifier B 12, Branson Sonic Power Company). Die Vollständigkeit der Fragmentierung wurde mit einem 1,5%igen Agarose-Gel (4.7.8.2) überprüft.

Bezeichnung der DNA-Fraktion	Pt-Gehalt: [pmol Pt / µg DNA]
Pt 0	--
Pt 1	0,52
Pt 2	1,01
Pt 3	5,02

60 µl einer DNA-Fragment-Lösung (833 µg DNA/ml STE, 500 µg/ml BSA) wurden mit 40 µl MAK-Lösung (2,5 mg/ml STE) vereinigt und bei 37°C für 2 h inkubiert. Ein 2,5 cm² Nitrozellulose-Filter (Protran BA 85, Schleicher & Schüll) wurde für 1 h bei 25°C in STE konditioniert. Der Filter wurde über eine Absaug-Apparatur einmal mit 1 ml STE gewaschen. Nachfolgend wurde der Reaktionsansatz (100 µl) aufgetragen und durch die Nitrozellulose gesaugt. Anschließend wurde dreimal mit je 1 ml STE gewaschen. Der noch feuchte Filter wurde in ein silikonisiertes 1,5 ml Gefäß verbracht, die gebundenen Pt-Addukt-MAK-Komplexe mit 1 ml einer wässrigen 5 mM KCl-Lösung, 5% Butanol 48 h lang bei 25°C auf dem Roller eluiert. Das Eluat wurde im Speed Vac-Konzentrator (Savant) bis zur Trockne eingengt, der Rückstand in 100 µl 50 mM Ammoniumacetat, pH 5, aufgenommen. Zur Entfernung des KCl wurde die DNA-Lösung einer Gelchromatographie über Biospin P6 (4.7.7.1) unterworfen, der DNA-Gehalt des Durchlaufs mit dem SYBR Green Test ermittelt (4.7.3).

4.2.2.2 Postlabelling von Pt-DNA Intrastrang-Addukten

Zu 50 µl der Pt-DNA Fragment-Lösung (50 mM NH₄CH₃COO, pH 5) wurden 12 µl einer Stammlösung Nuklease P1 (0,5 U/µl), entsprechend 6 U pipetiert, anschließend wurde der Ansatz bei 55°C für 2 h inkubiert. Nach Konditionierung mit 10 µl 1 M Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, pH 8,2 wurde 10 µl DNase-Stammlösung (10 U/µl), entsprechend 100 U hinzugefügt, der Ansatz bei 37°C für 2 h inkubiert. Durch Eintrag von 20 µl Alkalischer Phosphatase (1 U/µl), entsprechend 20 U und zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden die Nukleoside freigesetzt. Nachfolgend wurde der Ansatz mit 300 µl Tris-HCl, pH 8 aufgefüllt und für 5 min auf 100°C erhitzt. Zur Extraktion der Enzym-Proteine wurde 400 µl einer Lösung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (50 : 48 : 2 Vol%) zugefügt, das Gemisch für 15 s geschüttelt und für 5 min bei 10.000xg zentrifugiert.

Die wässrige, Nucleosid-haltige Phase wurde dekantiert und zur Entfernung von Phenolresten mit 400 µl Chloroform vereinigt, 15 s gemischt und für 5 min bei 10.000xg zentrifugiert. Die Protein-freie obere Phase wurde zur Isolierung der Pt-Dinucleoside einer Kationenaustauschchromatographie über LiChrolut SCX (Merck) unterworfen. Die Säule wurde durch Spülungen mit 2x1 ml H₂O, 2x1 ml Methanol, 2x1 ml H₂O und 2x1 ml 50 mM Tris-HCl, pH 3 konditioniert. Die Nucleosid-Lösung wurde durch Zugabe von 90 µl 50 mM HCl auf pH 3 eingestellt und auf die Säule aufgetragen. Die unplatinierten Mononucleoside wurden durch achtmaliges Waschen mit je 1 ml 5 mM NH₄CHOO, pH 6 unter Vakuum (-0,1 bar) eluiert. Anschließend erfolgte die Elution der Pt-Dinucleoside mit 2x500 µl 250 mM NH₄OH-Lösung. Der Ansatz wurde mit einem internen Standard von 60 µl 5 nM dTpdT (300 fmol_{absolut}) in 20 mM NaCN versetzt und nachfolgend in der SpeedVac bis zur Trockne eingengt. Zum Zweck der Deplatiniierung wurde der Rückstand in 12 µl 100 mM NaCN (Endkonz. 200 mM) aufgenommen und bei 65°C für 2 h inkubiert. Parallel zu den zu charakterisierenden Proben wurden dApdG (100 fmol_{absolut}) und dGpdG(100 fmol_{absolut}) enthaltende, externe Standards vorbereitet. Durch Zugabe von 7 µl 3 M NaCH₃COO-Lösung, pH 5 wurde jeder Ansatz auf pH 8 eingestellt. Die 5' - Kinasierung der Dinucleoside erfolgte durch Eintrag von 2,5 µl T 4 Polynucleotidkinase (1 U/µl); entsprechend 2,5 U und 0,5 µl 5' γ - ³²P - ATP (3.000 Ci/mmol; 10 mCi/ml), entsprechend 1,65 pmol. Die Inkubation wurde bei 37°C für 40 min durchgeführt, anschließend wurde der Ansatz mit H₂O auf ein Volumen von 150 µl aufgefüllt. Die Auftrennung und Identifikation der kinsierten Dinucleoside erfolgte mit der Radiochromatographie (4.7.7.5).

4.3 Etablierung und Optimierung des Immuncytologischen Assays (ICA) zum Nachweis *Cis*- bzw. *Carboplatin* induzierter Pt-DNA-Addukte auf Einzelzellebene

4.3.1 Zell-Immobilisierung

Durch die Vorbehandlung der Objektträger soll die Anhaftung von Zellen und Geweben während des ICA-Prozederes gewährleistet werden. Zu diesem Zweck wurden die Objektträger für 2 min bei 25°C mit einer 2%igen Lösung von 3-Aminopropyl-triethoxysilan in Aceton behandelt.

Anschließend erfolgte eine Waschung im Acetonbad und die einstündige Trocknung bei 42°C. Suspensions-Zellen wurden aus einer 25%igen Stärkelösung in PBS ([6%]-Poly (O-2-hydroxyethyl) Stärke, 154 mM NaCl; HAES-steril, Fresenius) 24 h lang bei 25°C auf die Aminosilan-beschichteten Objektträger aufgetrocknet. Kryoschnitte wurden direkt aufgelegt und für 24 h bei 25°C dehydriert. Bis zum ICA wurden die Proben bei -80°C gelagert.

4.3.2 Immuncytologischer Assays (ICA)

Die auf einem Objektträger-immobilisierte Probe wurden für 12 h bei -20°C in Methanol fixiert und anschließend für 10 min im PBS-Bad bei 25°C rehydriert.

Bei 37°C folgte ein einstündiger RNA-Verdau mit 100 µl RNase-Lösung (200 µg/ml RNase A & 50 U/ml RNase T1 in PBS) in einer Feuchtkammer. Der Objektträger wurde im PBS-Bad bei 25°C gewaschen. Durch die Behandlung im Alkali-Bad (60% 70 mM NaOH / 140 mM NaCl, 40% Methanol) für 5 min bei 0°C wurden die Lipide der Zell- und Kernmembranen hydrolysiert und die DNA partiell denaturiert. Der Objektträger wurde im PBS-Bad bei 25°C gewaschen. Es folgte eine Proteolyse mit 100 µl vorgewärmter Pepsin-Lösung (Zellen, Niere, Leber: 200 µg/ml in 20 mM HCl; Magen: 1.000 µg/ml in 20 mM HCl) für 5 min (Zellen) bzw. 10 min (Gewebe) bei 37°C. Der Objektträger wurde im PBS-Bad bei 25°C gewaschen. Anschließend wurde die Probe für 5 min (Zellen) bzw. für 10 min (Gewebe) bei 37°C einem Verdau in 100 µl vorgewärmter Proteinase K-Lösung (Zellen: 2 µg/ml in 20 mM Tris/HCl, 2 mM CaCl₂ pH 7,5; Gewebe: 100 µg/ml Proteinase K in 20 mM Tris/HCl, 2 mM CaCl₂ pH 7,5) unterworfen. Der Objektträger wurde in einer 0,2 %igen Glycin / PBS-Lösung für 10 min bei 25°C gewaschen, anschließend erfolgte die Absättigung unspezifischer Protein-Bindungsstellen durch ein Bad in 1%iger Casein / PBS-Lösung für 30 min bei 25°C. Im nächsten Schritt wurde die Probe mit 100 µl anti-(Pt-DNA) MAK (0,1 µg/ml in PBS, 1% Casein, 200 µg beschallte CT-DNA/ml) für 2 h bei 37°C in der Feuchtkammer inkubiert. Der Objektträger wurde für 5 min bei 25°C in einer 0,05%igen Tween 20 / PBS-Lösung und anschließend kurz im PBS-Bad gewaschen. Es folgte eine Feuchtkammer-Inkubation mit 100 µl FITC-Ziege IgG F(ab')₂ anti-(Ratte [IgG + IgM (H+L)]) (6,5 µg/ml in PBS, 1% Casein, Dianova) für 1 h bei 37°C. Der Objektträger wurde für 5 min bei 25°C in einer 0,05%igen Tween 20 / PBS-Lösung und anschließend kurz im PBS-Bad gewaschen. Zur Verstärkung des FITC-Signals wurde die Probe in der Feuchtkammer für 1 h bei 37°C mit 100 µl „ALEXA FLUOR 488“-Kaninchen IgG anti-(FITC) (5 µg/ml in PBS, 1% Casein, Molecular Probes) behandelt. Der Objektträger wurde für 5 min bei 25°C in einer 0,05%igen Tween 20 / PBS-Lösung und anschließend kurz im PBS-Bad gewaschen. Der abschließende Baustein der Signalkaskade wurde durch eine einstündige 37°C-Inkubation mit 100 µl „ALEXA FLUOR 488“-Ziege anti-(Kaninchen IgG (H+L)) (5 µg/ml in PBS, 1% Casein, Molecular Probes) eingefügt. Der Objektträger wurde für 5 min bei 25°C in einer 0,05%igen Tween 20 / PBS-Lösung und anschließend kurz im PBS-Bad gewaschen. Die DNA-Färbung erfolgte mit 1 µg/ml DAPI in PBS für 30 min bei 25°C. Der Objektträger wurde im PBS-Bad bei 25°C gewaschen. Abschließend wurde die Probe in dem Eindeckmittel „VECTASHIELD“ eingebettet. Die Quantifizierung der Immun- und der DNA-Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Mikroskop-gekoppelten digitalen Bildauswertesystems durchgeführt (Fluoreszenzmikroskop Axioplan mit Objektiv Plan-Neofluar 40fach / 0,75, Zeiss; Quecksilberlampe HBO 100 W; DAPI-Filter: Anregung 365 nm, Emission 397 nm; FITC / ALEXA 488-Filter: Anregung 450 – 490 nm; Emission 515 – 565 nm; CCD Kamera C4880, Hamamatsu; ACAS 6.0 Cytometry Analysis System, Ahrens Electronics). Die Untersuchungen zur Penetrationstiefe der anti-(Pt-DNA) MAK in Gewebeschnitten erfolgten mit einem Laser-Scan Mikroskop (Axiovert 100 mit Steuer- und Auswertesystem LSM 510, Zeiss).

4.4 Zellkultur - Modelle für erworbene *Cisplatin*-Resistenz

4.4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

4.4.1.1 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden in PBS gewaschen, 5 min bei 37°C in Trypsin-Lösung inkubiert und durch mehrfaches Pipettieren vereinzelt. Anschließend wurden sie 5 min bei 139xg sedimentiert und schließlich in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen / ml in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium bestand aus dem jeweiligen Kulturmedium mit 20% FKS und 10% DMSO. Jedes Kryogefäß wurde mit 1 ml Zellsuspension beschickt, zunächst für einen Tag bei -80°C gelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

4.4.1.2 Mediumwechsel:

Die Kulturmedien wurden alle 3 Tage gewechselt.

4.4.1.3 Mykoplasmentest

Mykoplasmen können bei Säugerzellen chromosomale Aberrationen hervorrufen. Alle Zellkulturen wurden deshalb mit Hilfe des „Mycoplasma Detection Kits“ regelmäßig auf Mykoplasmen-Infektion überprüft. Die Reinigung infizierter Zelllinien erfolgte mit Hilfe des „BM-Cyclin-Kits“ nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim).

4.4.1.4 Passagieren von Monolayer-Kulturen

Adhärente Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine auf 37°C vorgewärmte Trypsin-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS) zugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von Serum-haltigem Medium inhibiert, die Zellen durch auf- und abpipettieren vereinzelt und durch Zentrifugation bei 139xg sedimentiert. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen und ausgesiedelt.

4.4.2 Haltungsbedingungen für „Jurkat“, „MeWo“ und „MeWo Cis 1“- Zellen

„Jurkat“ ist eine nichtadhärente, humane T-Zell Leukämie-Linie (TIB-152, ATCC). „MeWo“ und „MeWo Cis 1“ sind adhärent wachsende, *Cisplatin*-empfindliche bzw. resistente humane Melanomzellen (Kern et al., 1997). Die Zellen wurden in RPMI 1640, 10% FKS, 2 mM Glutamin, 100 µg Penicillin / ml, 100 U Streptomycin / ml bei 5 % CO₂ und 37°C kultiviert. Dem Medium von „Mewo Cis 1“ wurde 1 µg *Cisplatin* / ml zugesetzt. Zwei Wochen vor einem Experiment wurde auf Pt-freies-Medium umgestellt.

4.4.3 Haltungsbedingungen für Ovarialkarzinomzellen

„A 2780 P“ und „A 2780 R“ sind adhärente, *Cisplatin*-empfindliche bzw. resistente humane Ovarialkarzinomzellen. „cMOAT 3“ ist eine transfizierte Zell-Linie aus „A 2780 P“, welche den ABC-Transporter MRP 2 (cMOAT) überexprimiert.

„Ribozym 1.12“ ist eine transfizierte Zell-Linie aus „A 2780 R“, welche ein Ribozym gegen cMOAT-mRNA exprimiert (Hermann Lage, Charite Berlin, pers. Mitteilung). Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g Glukose, 10% FKS, 4 mM Glutamin, 2 mM Pyruvat, 100 µg Penicillin / ml, 100 U Streptomycin / ml bei 5 % CO₂ und 37°C kultiviert. Dem Medium von „A 2780 R“ wurde 1 µg *Cisplatin* / ml zugesetzt. Dem Medium der transfizierten Zellen wurde 200 µg/ml Geneticin (G 418) zugegeben. Zwei Wochen vor einem Experiment wurde auf Pt- bzw. G 418-freies-Medium umgestellt.

4.4.4 Platinbehandlung von Zellen

Verschiedene Zelltypen wurden in *in vitro* bzw. *ex vivo* einer Platinbehandlung unterzogen, in deren Anschluß Pt-Adduktgehalt (ICA, 4.3.2), Proliferation (SYBR-Green Test, 4.4.5), Vitalität (MTT, 4.4.6) und Zellzyklusveränderung (FACS, 4.4.7) bestimmt wurden. Die Zellen wurden dabei für 2 h bei 37°C folgenden *Cisplatin*-Konzentrationen ausgesetzt:

[µg/ml]	0,5	1	2	3	5	6	10	15	20
[µM]	1,7	3,3	6,6	10,0	16,7	20	33,3	50	66,6

Nach der Exposition wurden die Zellen bis zur Messung in Pt-freiem Medium für 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h postinkubiert.

Die Platinbehandlung von Zellen für den ICA wurde auf 8-Kammer Objektträgern (1 cm² / Well, Lab-Tek Chamber Slides 115 45 34, Nunc) durchgeführt. Pro Kammer wurden 200.000 Zellen in 400 µl des jeweiligen Kulturmediums eingetragen. Adhärenz Zellen wurden vor der Exposition 24 h lang kultiviert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht-adhärenz Zellen zu entfernen. Die *Cisplatin*-Behandlung erfolgte durch Zugabe von 100 µl einer jeweils fünffach konzentrierten Platinlösung (Stammlösung: 500µg/ml, Platinex, Bristol Arzneimittel GmbH) in Zellkulturmedium für 2 h bei 37⁰ C. Nach 2 h wurden die Objektträger bei 179xg für 5 min zentrifugiert, das Pt-Medium durch 400 µl Pt-freies Medium ersetzt. Nach der Postinkubation wurde die Objektträger bei 179xg für 5 min zentrifugiert und abgesaugt. Die Zellen wurden in einer 25%igen Stärkelösung in PBS ([6%]-Poly (O-2-hydroxyethyl) Stärke, 154 mM NaCl; HAES-steril, Fresenius) gewaschen, über 12 h bei 25°C getrocknet und anschließend bis zur ICA-Analyse bei –80°C eingefroren.

Die Platinbehandlung von Zellen für den „SYBR Green I“ bzw. „MTT“-Test wurde in 96 Well-Platten (Nunclon, Nunc) durchgeführt. Pro Well wurden 1.000 (SYBR Green I) bzw. 10.000 (MTT) Zellen in 200 µl des jeweiligen Kulturmediums eingetragen. Adhärenz Zellen wurden vor der Exposition 24 h lang kultiviert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht-adhärenz Zellen zu entfernen. Die *Cisplatin*-Behandlung erfolgte wie oben, jedoch mit 50 µl der jeweiligen Platinlösung.

Nach 2 h wurden die Zellkulturplatten bei 247xg für 5 min zentrifugiert, das Pt-Medium durch 200 µl Pt-freies Medium ersetzt. Nach der Postinkubation wurde der „SYBR Green I“ bzw. „MTT“-Test durchgeführt.

Die Platinbehandlung von Zellen für die „FACS“-Zellzyklusanalyse wurde in 12 Well-Platten (3 cm² / Well, TPP) durchgeführt. Pro Well wurden 600.000 Zellen in 1.200 µl des jeweiligen Kulturmediums eingetragen. Platin-Exposition und Nachinkubation erfolgten sinngemäß wie oben beschrieben. Nach der Postinkubation wurde die „FACS“-Zellzyklusanalyse durchgeführt.

4.4.5 SYBR Green I- Proliferationstest

In proliferierenden Zellen ist die allmähliche Verminderung der Pt-DNA Addukte nach Abschluß einer Platinexposition nicht allein durch DNA-Reparaturvorgänge zu erklären. Additiv sorgt die DNA-Synthese im Rahmen der Mitose für eine Adduktverdünnung. Zur Quantifizierung dieses Effektes und damit zur Normierung der im ICA bestimmten Reparaturraten wurden die zeitlichen Veränderungen im DNA-Gehalt von *Cisplatin*-exponierten Zellen gemessen. Die Zellen wurden unterschiedlichen *Cisplatin*-Konzentrationen ausgesetzt (4.4.4). Nach der Postinkubation wurden die Zellkulturplatten bei 247xg für 5 min zentrifugiert, das Medium durch 100 µl Proteinase K - Lösung (200 µg/ml Proteinase K in 10 mM Tris; pH 7,5; 1 mM EDTA) ersetzt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurden 100 µl einer 1:5.000 TE-Verdünnung des DNA-reaktiven Fluoreszenzfarbstoffes „SYBR Green I“ eingetragen und für 15 min bei 37⁰ C temperiert. Die Messung erfolgte mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm, die Emission der DNA-Fluoreszenz wurde bei 530 nm aufgenommen (Fluoreszenz-Reader: FL 500, PC-Programm: FL 500 1.D.1, Bio-Tek Instruments).

4.4.6 MTT- Zellvitalitäts-Test

Die Vitalität von *Cisplatin*-exponierten Zellen wurde über die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen mit dem „MTT“-Test bestimmt. Als Meßparameter dient die Reduktion von gelbem 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) zu dunkelblauem Formazan. Die Zellen wurden unterschiedlichen *Cisplatin*-Konzentrationen ausgesetzt (4.4.4). Nach der Postinkubation wurden 25 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) zugegeben und für 2 h bei 37⁰ C inkubiert. Die Zellkulturplatten wurden anschließend bei 247xg für 5 min zentrifugiert, die MTT-Lösung abgesaugt und durch 100 µl DMSO, 0,6 % Essigsäure, 100 mg SDS/ml ersetzt.

Nach 30 min Inkubation bei 37°C erfolgte die Absorptionmessung bei 550 nm (4.1.3).

4.4.7 FACS-Zellzyklusanalyse

Zellzyklusveränderungen nach *Cisplatin*-Exposition wurden mit Hilfe der Durchfluß-Zytometrie untersucht. Die Zellen wurden unterschiedlichen *Cisplatin*-Konzentrationen ausgesetzt (4.4.4). Nach der Postinkubation wurden die Zellkulturplatten bei 247xg für 5 min zentrifugiert und das Medium durch 200 µl Trypsin-Lösung ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37°C wurde die Zellsuspension zur Inaktivierung des Trypsins in 1 ml des jeweiligen FKS-haltigen Kulturmediums überführt. Die Zellen wurden bei 247xg für 5 min sedimentiert und in 250 µl PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 750 µl Ethanol wurde für 3 h bei -20°C fixiert. Anschließend folgte die Färbung mit Propidiumjodid (20 µg/ml in PBS, 200 µg/ml RNase A / 50 U/ml RNase T1) für 30 min bei 25°C. Die Proben wurden bis zur Analyse auf Eis gelagert. Propidiumjodid-DNA-Komplexe erfahren eine optimale Anregung bei 535 nm, die maximale Emission wird bei 617 nm abgestrahlt (FACS: Calibur750, Steuerungs- und Meßprogramm: CellQuest, Becton Dickinson).

4.5 Tiermodelle zur Prozessierung von Pt-DNA Addukten

Die Zelltyp-spezifische Bildung und Elimination von Pt-DNA Addukten wurde im Mausmodell untersucht. Dabei standen NER-defiziente XPA- und XPC-Knockout-Tiere zur Verfügung. Die in den Versuchen eingesetzten XPC⁻ - Mäuse (Cheo et al., 1997) stammten aus der Arbeitsgruppe von Prof. L. Mullenders, Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis-MGC, Leiden University Medical Center, The Netherlands und wurden genotypisiert angeliefert. Die XPA⁻ - Mäuse (Nakane et al., 1995) stammten ursprünglich aus der Arbeitsgruppe von Prof. K. Tanaka, Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University, Osaka, Japan. Zucht (4.5.10) und Genotypisierung (4.5.2) für die beschriebenen Versuche erfolgten aber am Institut für Zellbiologie, Essen.

4.5.1 Isolierung von DNA

Die Isolierung von hochmolekularer DNA aus Zellen und Gewebe erfolgte mit dem „DNeasy Kit“ (Qiagen) gemäß der Vorschrift des Herstellers.

Die Reinheit der präparierten Nukleinsäuren wurde nach Sambrook et al. 1989 photometrisch bei 260 nm und 280 nm bestimmt (Spektralphotometer: Modell 150-20, Hitachi). Für eine saubere DNA-Präparation war ein E_{260} / E_{280} Quotient von 1,8 - 2,0 gefordert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem „SYBR Green I“ Test (4.7.3) quantifiziert, die Integrität mit einem 0,9%igen Agarose-Gel (4.7.8.2) überprüft.

4.5.2 Genotypisierung der XPA – Knockout Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde den Tieren im Alter von 3 – 4 Wochen unter lokaler Betäubung ein 0,4 – 1,2 cm langes Stück der Schwanzspitze entnommen. Die DNA wurde mit dem „Qiagen DNeasy Kit“ (4.5.1) isoliert und mit dem „SYBR Green I“ Test (4.7.3) quantifiziert. Die PCR wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Nakane et al. (1995) als 50 µl Ansatz durchgeführt.

Folgende Primer wurden eingesetzt:

Primer A (Oberer Primer: Wild-Typ)

5' GTG GGT GCT GGG CTG TCT AA 3'

M_r : 6.300; 5,30 nmol/ A_{260}

Primer B (Unterer Primer: Wild-Typ / Knockout)

5' ATG GCG TGG GTT CTT CTT C 3'

M_r : 6.210; 5,44 nmol/ A_{260}

Primer C (Oberer Primer: Knockout):

5' ATG GCC GCT TTT CTG GAT TC 3'

M_r : 6.170; 5,62 nmol/ A_{260}

Das PCR-Reaktionsgemisch (40 μ l) wurde gemäß folgendem Schema unter Kontaminationskontrolle vorbereitet und bis zur Zugabe der DNA auf Eis gelagert.

Komponente	Konzentration der Stamm-Lösung	Eintrag [μ l]	Konzentration im Ansatz
H ₂ O	--	34	--
Primer A	400 μ M	0,03	250 nM
Primer B	400 μ M	0,03	250 nM
Primer C	400 μ M	0,03	250 nM
d NTP (Amersham Pharmacia)	25 mM	0,4	200 μ M
AccuTherm – Puffer	10 fach	5	einfach
AccuTherm-Polymerase (GeneCraft)	5 U / μ l	0,3	0,03 U / μ l

Es wurden 10 µl der isolierten DNA (20 µg/ml in H₂O) eingetragen. Die PCR wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt (PCR-Gerät: MJ Research PTC 200, Biozym):

Zeit	Temperatur	Zyklen
1 min	94 ° C	1
25 s	94 ° C	34
30 s	55 ° C	34
60 s	72 ° C	34
4 min	72 ° C	1

Die PCR-Produkte wurden über ein 3% iges Agarose – Gel (4.7.8.2) aufgetrennt.

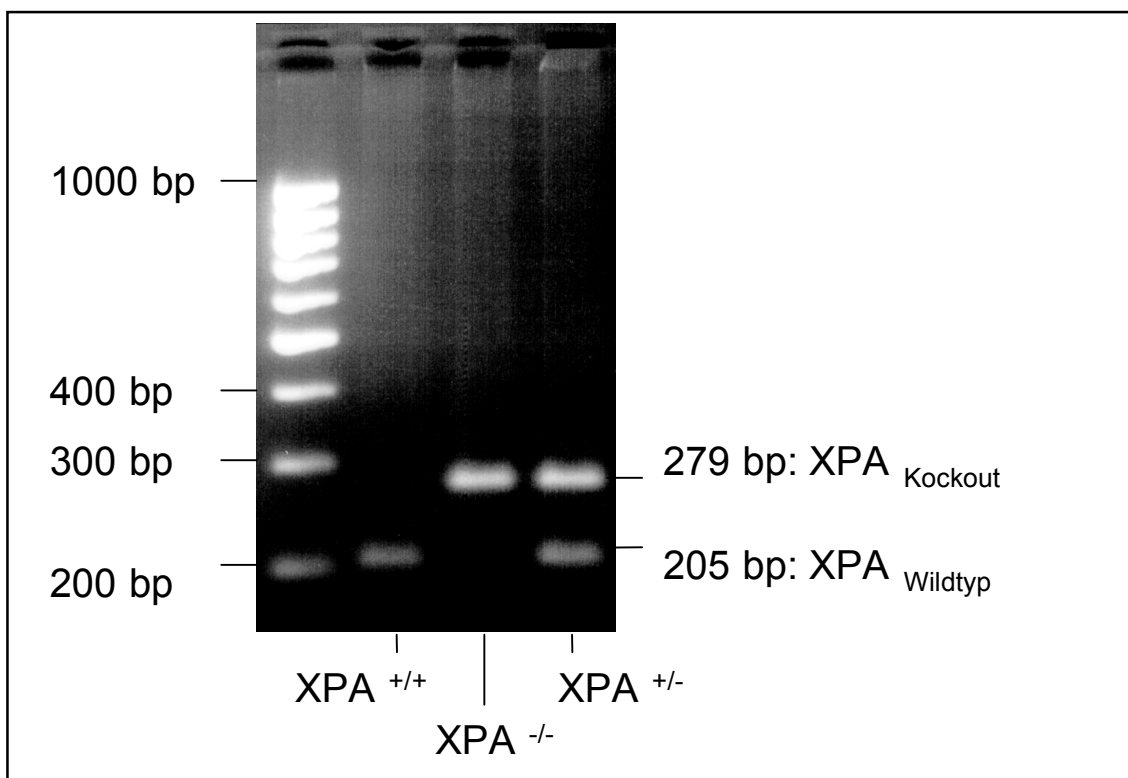


Abb. x Genotypisierung von hetero und homozygoten XPA-Knockout-Mäusen
(3% iges Agarose – Gel)

4.5.3 Behandlung der Tiere

Die Platinbehandlung der Tiere wurde in Konzentrationen von 2mg/kg und 10 mg/kg Körpergewicht durchgeführt (Platinex Bristol Arzneimittel GmbH, München). Die Injektionen erfolgten peritoneal. Die Tiere wurden 6 h, 12 h, 1 d, 2 d, 5 d, 10 d bzw. 15 d nach Applikation durch CO₂-Begasung getötet.

4.5.4 Isolierung von T-Lymphozyten aus Blutproben mit Magneto-Beads

Durch einen Aortaschnitt wurden pro Tier zwischen 250 – 500 µl Vollblut gewonnen und mit 0,075 Einheiten Na-Heparinat / µl (Novo Nordisk) heparinisiert.

Für die immunomagnetische Isolierung der T-Lymphozyten wurden "Mouse pan T (Thy 1.2)"-Beads (Dynal) eingesetzt, die mit einem Antikörper gegen das Maus-T-Lymphozytenantigen Thy 1.2 beschichtet sind. Ein Eppendorf-Gefäß mit 1 ml Dynabeads M 450 – Lösung (29 mg/ml entsprechend 4×10^8 Beads/ml) wurde in einem Dynal MPC-Magneten plaziert. Nach 1 min wurde der Überstand dekantiert, der Magnet entfernt und die Beads in 1 ml PBS, 1% FKS aufgenommen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt.

250 µl heparinisiertes Vollblut wurden mit 250 µl kaltem PBS verdünnt und mit 6,25 µl Beadsuspension, entsprechend $2,5 \times 10^6$ Beads gemischt. Der Ansatz wurde auf einem langsamen Roller für 30 min bei 25°C inkubiert.

Die Bead-assoziierten T-Lymphozyten wurden über den Dynal „MPC“-Magneten isoliert. Das Zell-Pellet wurde in PBS resuspendiert, erneut für 2 min im Magneten plaziert und schließlich dekantiert, um Bead-freie Zellen abzutrennen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Zum Ablösen der Beads wurden die Zellen für 15 min bei 37° mit 250 µl Trypsin behandelt. Danach wurde das Trypsins durch Zugabe von 750 µl RPMI 1640, 20% FKS inaktiviert. Zum Entfernen der Beads wurde die Zell-Suspension erneut im „MPC“-Magneten plaziert, der Zell-haltige Überstand abgenommen und bei 350xg für 10 min zentrifugiert. Die isolierten T-Zellen wurden in 20 µl einer 25%igen Stärkelösung in PBS ([6%]-Poly (O-2-hydroxyethyl) Stärke, 154 mM NaCl; HAES-steril, Fresenius) überführt und auf einen Aminosilan-beschichteten Objektträger (4.3.1) gegeben. Die Trocknung erfolgte für 12 h bei 25°C.

4.5.5 Organentnahme

Den Tieren wurde unmittelbar nach der Tötung Leber, Niere, Hirn, den Männchen zusätzlich Hoden entnommen, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei –80°C gelagert.

4.5.6 Kryoschnitte

Von den Geweben wurden 8 µm-Schnitte angefertigt (Mikrotom: 2800 Frigocut, Reichert-Jung) und auf Objektträgern immobilisiert.

4.6 Immunfärbung von Pt-DNA Addukten in humanen Lymphozyten und Biopsiematerial

Die klinischen Untersuchungen wurden am Zentrum für Tumorforschung und Tumorthherapie, Essen unter der Leitung von Dr. U. Vanhoeve, Innere Klinik (Tumorforschung) durchgeführt.

4.6.1 Isolierung der T-Lymphozyten

Für eine Messung wurden 1 - 2 ml Vollblut entnommen und mit 75 Einheiten Na-Heparinat / ml (Novo Nordisk) heparinisiert.

Für die immunomagnetische Isolierung der T-Lymphozyten wurden "DynaL CD 2 Collection Kit"-Beads (DynaL) eingesetzt, die mit einem Antikörper gegen das humane T-Lymphozytenantigen CD 2 beschichtet sind. Ein Eppendorf-Gefäß mit 1 ml Dynabeads M 450 – Lösung ($6,6 \times 10^8$ Beads / ml) wurde in einem Dynal MPC-Magneten plaziert. Nach 1 min wurde der Überstand dekantiert, der Magnet entfernt und die Beads in 1 ml PBS, 0,1% BSA aufgenommen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. 500 µl heparinisiertes Vollblut wurden mit 500 µl kaltem PBS verdünnt und mit 37,5 µl Beadsuspension, entsprechend $2,5 \times 10^7$ Beads gemischt. Der Ansatz wurde auf einem langsamen Roller für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Bead-assoziierten T-Lymphozyten wurden über den Dynal „MPC“-Magneten isoliert. Das Zell-Pellet wurde in PBS resuspendiert, erneut für 2 min im Magneten plaziert und schließlich dekantiert, um Bead-freie Zellen abzutrennen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Zum Ablösen der Beads wurden die Zellen in RPMI 1640, 1% FKS aufgenommen für 30 min bei 37°C mit 10 µl DNase-Lösung behandelt. Zum Entfernen der Beads wurde die Zell-Suspension erneut im „MPC“-Magneten plaziert, der Zell-haltige Überstand abgenommen und bei 350xg für 10 min zentrifugiert. Die isolierten T-Zellen wurden in 20 µl einer 25%igen Stärkelösung in PBS ([6%]-Poly (O-2-hydroxyethyl) Stärke, 154 mM NaCl; HAES-steril, Fresenius) überführt und auf einen Aminosilan-beschichteten Objektträger (4.3.1) gegeben. Die Trocknung erfolgte für 12 h bei 25°C.

4.6.2 Biopsieproben

Die Biopsien wurden Therapie- begleitend von Herrn Dr. med. W. Eberhardt, Innere Klinik und Poliklinik (Tumorforschung), Zentrum für Tumorforschung und Tumorthherapie, Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

4.7 Allgemeine Methoden

4.7.1 *in vitro*-Platinierung von Kalbsthymus-DNA

Die *in vitro* Platinierung erfolgte nach den Vorschriften von Fichtinger-Schepman et al., 1982. Hochmolekulare Kalbsthymus-DNA (Roche) wurde durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 Vol. EtOH (96 %) aus der wässrigen Stammlösung gefällt. Nach 10 minütiger Inkubation bei -20°C wurde die ausgefällte DNA bei 4°C abzentrifugiert (12.000xg, 20 min). Das resultierende DNA-Pellet wurde mit EtOH (70 %) gewaschen und dann in H₂O (bidest./ autoklaviert) aufgenommen.

Ansatz	Bezeichnung	Verwendung	Inkubationskonz. [μM]
1	Pt 0	Nichtkompetitiver ELISA (4.1.3) Kompetitiver ELISA (4.2.1.2) Immunomagnetische Zellseparation (4.1.9) Postlabelling (4.2.2)	--
2	--	analytisch	0,05
3	Pt 1	Postlabelling (4.2.2)	0,15
4	Pt 2	Postlabelling (4.2.2)	0,3
5	--	analytisch	1
6	Pt 3	Immunomagnetische Zellseparation (4.1.9) Postlabelling (4.2.2)	2,5
7	Pt 4	Nichtkompetitiver ELISA (4.1.3) Kompetitiver ELISA (4.2.1.2)	3
8	--	analytisch	5
9	--	analytisch	10
10	--	analytisch	15
11	--	analytisch	20
12	--	analytisch	40
13	--	analytisch	60
14	--	analytisch	100
15	Pt 5	Antigensynthese (4.1.1) Nichtkompetitiver ELISA (4.1.3) Kompetitiver ELISA (4.2.1.2)	150

Die Integrität der DNA wurde mit Hilfe eines 0,9-prozentigen Agarose-Gels überprüft (4.7.8.2). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem „SYBR Green“ Test (siehe 4.7.3). Die Platinierung wurde in analytischem (100 µg DNA) oder präparativem (10 mg DNA) Maßstab in einer Lösung von 300 µg DNA /ml 10 mM Na-Phosphat, pH 7 durchgeführt. Mit einer *Cisplatin*-Stammlösung (1,6 mM; Platinex, Bristol Arzneimittel GmbH) wurden unterschiedliche Platin-Inkubationskonzentrationen eingestellt.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 12 h. Zur Entfernung des nicht abreagierten *Cisplatin*s und zur Überführung in die für nachfolgende Verwendung nötigen Puffer wurde die Pt-DNA einer Gelchromatographie (4.7.7.1) über „Biospin P6“ (analytische Ansätze) bzw. „HiPrep 26/10“ (präparative Ansätze) unterworfen. Die Konzentrierung der analytischen Fraktionen erfolgte bei 5.000xg über „Centricon 30“ (Amicon), die der präparativen Ansätze über „Ultrafree 15 / Biomax 30“ (Millipore) bei 2.000xg.

Der Platingehalt der analytischen Ansätze bzw. der analytischen Aliquots präparativer Ansätze wurde mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie (4.7.5) bestimmt.

Denaturierte Pt-DNA wurde durch zehnmütiges Erhitzen auf 95°C und anschließendes Abkühlen auf Eis erhalten.

4.7.2 Synthese von Desoxynukleotiden mit definierten Pt-DNA Addukten

Zur Antikörpercharakterisierung wurden verschiedene Pt-GG bzw. Pt-AG -tragende Oligonukleotide dargestellt und im kompetitiven ELISA (4.2.1) als Inhibitoren eingesetzt. Folgende Oligonukleotide (MWG Biotech) wurden einer Platinierung unterworfen (potentielle Platin-Bindungsstellen **fett**).

Nr. 1 5' TCC CTC CTT CCT TCC **GG** CCC TCC TTC CCC TTC 3'

M_r : 9.517; 4,07 nmol / A_{260}

Nr. 2 5' TCC CTC CTT CCT TCC **AG** CCC TCC TTC CCC TTC 3'

M_r : 9.501; 4,02 nmol/ A_{260}

Nr. 3 5' CTC **GGC** TCG **GCT** **CGG** CTC **GGC** TC 3'

M_r : 7.065; 5,25 nmol/ A_{260}

Nr. 4 5' CTC **AGC** TCA **GCT** **CAG** CTC **AGC** TC 3'

M_r : 7.001; 4,96 nmol/ A_{260}

Die Platinierung erfolgte nach den Vorschriften von Murchie & Lilley (1993) und Kasparikova & Brabec (1995) in einer Lösung von 0,8 mM Oligonukleotid in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5. Mit *Cisplatin*-Stammlösung (16 mM; 10fach konzentriertes Platinex, Bristol Arzneimittel GmbH) wurde eine Platin-Inkubationskonzentration von 1,2 mM (Oligo Nr. 1 & Nr. 2) bzw. 4,8 mM (Oligo Nr. 3 & Nr. 4) eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 24 h. Zur Entfernung des nicht abreagierten *Cisplatin*s wurden die Ansätze einer Gelchromatographie (4.7.7.1) über Biospin P6 unterworfen und mit H₂O eluiert. Die Konzentrationsbestimmung der unplatinieren und platinieren Desoxynukleotide erfolgte UV-photometrisch (4.7.4). Der Platingehalt wurde mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie (4.7.5) bestimmt.

Für die Hybridisierung wurden die Pt-Oligonukleotide im Speed Vac-Konzentrator (Savant) bis zur Trockne eingengt und in einer Konzentration von 0,8 mM in 10 mM Tris / HCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, pH 7,5 aufgenommen. Nach Zugabe einer äquimolaren Menge des komplementären Oligonukleotids in 10 mM Tris / HCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, pH 7,5 wurde der Ansatz auf 65°C erhitzt und über 16 h auf 10°C abgekühlt. Der Hybridisierungserfolg wurde mit Hilfe eines 20-prozentigen nativen Polyacrylamidgels (4.7.8.1.1) kontrolliert. Der Nachweis der Pt-GG bzw. Pt-AG Addukte erfolgte durch enzymatische Hydrolyse der Pt-Desoxynukleotide und anschließender HPLC-Auftrennung der resultierenden Nukleotidgemische (4.7.7.4).

4.7.3 DNA – Quantifizierung

Die DNA-Quantifizierung erfolgte mit dem „SYBR Green I“ Test (Molecular Probes).

Die erforderlichen Standard-Präparationen im Konzentrationsbereich von 0,1 - 1 µg/ml wurden aus hochmolekularer DNA (Roche) in TE angesetzt und UV-photometrisch (Spektralphotometer Modell 150-20, Hitachi) bei 260 nm eingestellt (50 µg Doppelstrang-DNA / ml entspricht 1 A₂₆₀).

Auf einer 96-Well-Platte (Maxisorp, Nunc) wurde jedes Well entweder mit 50 µl DNA-Standard bzw. Analyt beschickt. Jeder Standard und jede Probe wurde doppelt aufgetragen. In jedes Well wurden 50 µl einer 1:10.000 TE-Verdünnung des DNA-reaktiven Fluoreszenzfarbstoffes „SYBR Green I“ eingebracht, die Testplatte wurde sodann 15 min lichtgeschützt bei 25°C inkubiert. Die Messung erfolgte mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm, die Emission der DNA-Fluoreszenz wurde bei 530 nm aufgenommen (4.4.5). Die Nachweisgrenze (doppeltes Leersignal) wurde mit 0,001 µg DNA/ml (50 pg DNA/Well) ermittelt.

4.7.4 Quantifizierung von Desoxynukleotiden

Die Quantifizierung einzel- und doppelsträngiger Oligonukleotide erfolgte UV-photometrisch (Spektralphotometer Modell 150-20, Hitachi) bei 260 nm. Die entsprechenden Absorptionskoeffizienten wurden mit dem PC-Programm „Oligo 4.1“ (National Biosciences) ermittelt.

4.7.5 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Die atomabsorptionsspektroskopische Bestimmung des Platin-Gehaltes in DNA bzw. Desoxynukleotiden erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Cammann am Institut für Chemo- und Biosensorik e.V., Münster.

Die Messungen wurden mit einem Atomabsorptionsspektrometer vom Typ „Perkin-Elmer 4100 ZL“ gemäß dem modifizierten Protokoll von Reed et al., 1988 durchgeführt.

Das in H₂O gelöste Probenmaterial wurde ohne vorhergehende Oxidation direkt injiziert.

Die Injektionstemperatur betrug 20°C, das Probenvolumen jeweils 50 µl, wobei Fraktionen mit geringem Platingehalt vor der Messung durch Mehrfachauftrag konzentriert wurden.

Die Atomisierung des Probengutes erfolgte im Graphitrohrfen.

Folgendes Temperaturprogramm wurde durchgeführt:

Abfolge	Temperatur [°C]	Rampe [s]	Haltezeit [s]	Gasfluß [ml/min]	Gasart
1	110	1	20	250	Argon
2	130	5	40	250	Argon
3	150	5	30	250	Argon
4	550	10	30	250	Argon
5	800	15	20	250	Argon
6	1100	15	30	250	Argon
7	2500	0	5	0	--
8	2500	1	2	250	Argon
9	20	1	8	250	Argon
10	2500	1	5	250	Argon
11	20	1	8	250	Argon
12	2500	1	5	250	Argon

Als Meßwert wurde die Abschwächung der von einer Hohlkathodenlampe erzeugten Strahlung bei der für Platin spezifischen Resonanzwellenlänge von 265,9 nm aufgenommen. Die Meßzeit betrug 5 Sekunden. Die Wellenlängenselektion erfolgte über einen Monochromator mit einer Spaltbreite von 0,7 nm. Zur Ausschaltung spektraler Interferenzen wurde über den Zeeman Effekt korrigiert.

Die Kalibrierung des Systems wurde mit einer Platin-Maßlösung (Titrisol, Merck) im Bereich von 0 – 200 ng/ml vorgenommen.

4.7.6 Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit Hilfe des auf den Vorschriften von Bradford, 1976 basierenden „Bio-Rad-Protein-Assays“ (Bio-Rad). Die erforderlichen Standard-Fractionen im Konzentrationsbereich von 2 - 100 µg/ml wurden aus BSA-Maßlösung (Pierce) in TE angesetzt. Auf einer 96-Well-Platte (Maxisorp, Nunc) wurde jedes Well entweder mit 60 µl Protein-Standard bzw. Analyt beschickt. Jeder Standard und jede Probe wurde doppelt aufgetragen. In jedes Well wurden 120 µl einer 25 %igen TE-Verdünnung des „Bio-Rad Reagenzes“ eingebracht, die Testplatte wurde sodann 10 min bei 25°C inkubiert. Die Absorptions-Messung erfolgte bei 595 (4.1.3). Die Nachweisgrenze (doppeltes Leersignal) wurde mit 1 µg Protein/ml ermittelt.

4.7.7 Chromatographische Verfahren

4.7.7.1 Entsalzung über Gelfiltration

Entsalzung und Umpufferung von Proteinen und Nukleinsäuren wurden gelchromatographisch durchgeführt.

Für Probenvolumina < 100 µl wurden zu diesem Zweck „Biospin P6“-Säulen (Bio-Rad), für Probenvolumina > 100 µl die „HiPrep 26/10 Desalting“-Säule (Pharmacia) nach Angaben der Hersteller eingesetzt. Die Chromatographie über „HiPrep 26/10“ erfolgte isokratisch bei 9 ml/min mit einer FPLC-Anlage (Pharmacia). Die Detektion der Zielfractionen erfolgte UV-spektrometrisch bei 260 nm (Nukleinsäuren) bzw. 280 nm (Proteine).

4.7.7.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie über “T- Gel”

Zur Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Serum-haltigen und Serum-freien Hybridomkulturüberständen wurde die hydrophobe Interaktions-Chromatographie nach Hutchens & Porath, 1986 eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde eine Leersäule (HR 10/10, 10*100 mm; Pharmacia) mit 7,85 ml „T-Gel Adsorbent“ (Pierce) gepackt und in eine FPLC-Anlage (4.7.7.1) integriert. 50 ml Hybridomkulturüberstand wurden auf 500 mM K₂SO₄, pH 7,5 eingestellt und über eine 0,2 µm Zellulose-Membran (MicronSep, Osmonics) filtriert. Probenauftrag und Chromatographie wurden gemäß dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Bindungspuffer: 500 mM K₂SO₄, 50 mM Na-Phosphat, pH 7,5

Elutionspuffer: 50 mM Na-Phosphat, pH 7,5

Zeit [min]	Flußrate [ml/min]	Kulturüberstand [%]	Bindungspuffer [%]	Elutionspuffer [%]
0	0,5	100	0	0
100	0,5	100	0	0
100	0,5	0	100	0
160	0,5	0	100	0
160	0,5	0	0	100
200	0,5	0	0	100

Es wurden 2 ml Fraktionen aufgefangen.

Die Detektion der Zielfractionen erfolgte UV-spektrometrisch bei 280 nm. Nachfolgend wurde ihr Protein- (4.7.6) und Immunglobulingehalt (4.1.7.1), sowie ihre Immunoreaktivität(4.1.3) bestimmt. Der Reinigungserfolg wurde mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel (4.7.8.1.2) überprüft.

„T-Gel“-aufgereinigte Fractionen aus Serum-freien Überstände wurden über „Ultrafree 15 / Biomax 100“ (Millipore) bei 2.000xg auf 10 mg MAK/ml konzentriert.

„T-Gel“-aufgereinigte Fractionen aus Serum-haltigen Überstände wurden einer weiteren Aufreinigungstufe über „Protein G“ unterworfen.

4.7.7.3 Chromatographie über “Protein G”

Eine „HiTrap Protein G“-Säule (Pharmacia) wurde in eine FPLC-Anlage (4.7.7.1) integriert. Probenauftrag und Chromatographie wurden gemäß dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Bindungspuffer: 50 mM Na-Phosphat, pH 7,5

Elutionspuffer: 100 mM Glycin-HCl, pH 2,7

Zeit [min]	Flußrate [ml/min]	Aktive “T-Gel”- Fractionen [%]	Bindungspuffer [%]	Elutionspuffer [%]
0	0,5	100	0	0
40	0,5	100	0	0
40	0,5	0	100	0
100	0,5	0	100	0
100	0,5	0	0	100
160	0,5	0	0	100

Es wurden 2 ml Fractionen aufgefangen. Zur Neutralisation des Eluates wurden je Fraction 200 µl 1 M Tris-HCl, pH 9 vorgelegt.

Die Detektion der Zielfractionen, sowie die Bestimmung von Proteinkonzentration, Immunglobulingehalt und Immunoreaktivität erfolgten wie oben, ebenso die Reinheitskontrolle und Konzentration.

4.7.7.4 Chromatographischer Nachweis von Pt-DNA Intrastrang-Addukten

Aliquots der platinieren Desoxynukleotide (4.7.2) wurden einem Nuklease-Verdau unterzogen, das resultierende Hydrolysat chromatographisch aufgetrennt.

Da die Phosphodiesterbindung der Intrastrang-Addukte für eine Spaltung durch das Nuklease P1/DNAse -System unzugänglich ist, können die resultierenden Pt-Dinukleotide von den ungebundenen Mononukleotiden getrennt werden. Als Referenzen dienten Lösungen der Mononukleotide und ein Hydrolysat von platinierter Kalbsthymus-DNA.

Die Hydrolyse erfolgte nach den Vorschriften von Fichtinger-Schepman et al. 1982 & 1985a durch Aufnahme von 20 nmol der Desoxynukleotide bzw. von 40 µg Pt-DNA (Pt 5: 188,0 pmol Pt/µg DNA) in 80 µl 10 mM Tris/HCl, pH 7,5. Durch Zugabe von 2,5 µl 10 mM ZnSO₄ bzw. 160 mM MgCl₂ wurden Endkonzentrationen von 0,25 mM an Zn²⁺ bzw. 4 mM an Mg²⁺ eingestellt. Der Verdau erfolgte durch Eintrag von 5 µl Stammlösung DNAse (40 U/µl) entsprechend 200 U und von 12,5 µl Stammlösung Nuklease P1 (0,34 U/µl) entsprechend 4,25 U. Nach 16 h Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz für 5 min auf 95°C erhitzt um die enzymatische Aktivität zu stoppen. Die Trennung der Nukleotide von den Enzym-Proteinen erfolgte durch 10 minütige Zentrifugation bei 10.000xg über „Ultrafree MC 30.000“ (Millipore). Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 100 µl.

Die chromatographische Auftrennung der Hydrolysate wurde gemäß einer modifizierten Vorschrift von Eastman, 1983 durchgeführt.

Eine 8x100 mm „reversed phase“-Säule (Nova-Pak C18; Waters) wurde in eine HPLC-Anlage (Waters) integriert. Das Probenvolumen betrug 50 µl, pro Lauf wurde das Hydrolysat von 10 nmol Pt-Desoxynukletid bzw. 20 µg Pt-DNA injiziert.

Die Chromatographie wurden gemäß dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Eluent A: 100 mM NH₄CH₃COO, pH 5,5

Eluent B: Methanol

Zeit [min]	Flußrate [ml/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Profil
0	0,8	100	0	
11	0,8	93	7	konvex
11,5	0,8	0	100	linear
35	0,8	0	100	linear
40	0,8	100	0	linear
45	0,8	100	0	linear

Das Chromatogramm wurde bei 260 nm generiert. Zusätzlich wurde für jeden Peak mit einem Photodiodenarray-Detektor ein Spektrum im Wellenlängenbereich von 230 – 300 nm aufgenommen.

4.7.7.5 Radiochromatographie

Die Aufklärung der MAK-Spezifität erfolgte durch Identifizierung der ^{32}P -markierten Dinukleotide (4.2.2) über Radiochromatographie. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Schellens am Antoni van Leeuwenhoek Hospital (The Netherlands Cancer Institute), Amsterdam durchgeführt.

Eine 150x4,6 mm „C₁₈“-Säule (Inertsil ODS-80 A, Phase Separations BV, Waddinxveen;) wurde in eine HPLC-Anlage (Beckman Instruments Inc) integriert. Die Säulentemperatur wurde auf 40°C gehalten. 50 µl des Ansatzes wurden injiziert. Die Chromatographie wurde isokratisch durchgeführt, als Eluent diente ein 100 mM KH₂PO₄ - Puffer, pH 5,5 mit einem Zusatz von 4,5 % Methanol. Die Flußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, die Laufdauer 16 min. Simultan wurde die Absorption bei 260 nm und die ^{32}P – Aktivität (Radiomatik 500TR flow scintillation analyzer, Canberra Packard) aufgenommen.

4.7.8 Elektrophoretische Verfahren

4.7.8.1 Polyacrylamid-Gelsysteme

4.7.8.1.1 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Desoxynukleotide

Die Vollständigkeit der Desoxynukleotid-Hybridisierung (4.7.2) wurde mit nativen Polyacrylamid-Gelelektrophoresen überprüft. Die Auftrennung erfolgte in der „Mini-Protean II“ Elektrophorese Kammer (Bio-Rad), die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

	Trenngel
Acrylamid – Konzentration [%]	20
40 % Acrylamidlösung [ml]	10
10fach TBE-Puffer [ml]	2
H ₂ O [ml]	8
10% Ammoniumperoxo- Disulfat [µl]	100
Temed [µl]	8

Für die 40%ige Acrylamidlösung wurden 38 g Acrylamid und 2 g Bisacrylamid in 100 ml H₂O eingetragen, 30 min gerührt und nachfolgend filtriert. Der 10fach TBE- bestand aus 1 M Tris-HCl; 0,85 M H₃BO₃ , 0,01 M EDTA, pH 8,3. Die Elektrophorese-Gel war nach zweistündiger

Polymerisation gebrauchsfertig. Die Desoxynukleotid-Proben wurden mit 0,2 Vol. Probenpuffer (TBE, 50% Glycerin; 0,05% Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TBE bei 100 V. Die Banden wurden im „Oli-Green“-Bad (1:200 Verdünnung in TE; Molecular Probes) fluoreszenzgefärbt und am UV -Transilluminator (Bachmann) sichtbar gemacht.

4.7.8.1.2 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese für Proteine

Zur analytischen Begleitung der Antikörperreinigung (4.1.7) wurden denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen nach Laemmli (1970). durchgeführt. Bei dieser Elektrophorese ist das Trenngel mit einem Sammelgel von niedrigerem Vernetzungsgrad überschichtet. Die beiden Gele unterscheiden sich im pH-Wert, so daß sich bei Stromfluß ein Spannungsfeld aufbaut, das zur Fokussierung der Proteine an der Grenzlinie zwischen Sammel- und Trenngel führt. Die Auftrennung erfolgte in der „Mini-Protean II“ Elektrophorese Kammer (Bio-Rad), die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid – Konzentration [%]	10	5
30 % Acrylamidlösung [ml]	6,6	2,55
4fach Trenngelpuffer [ml]	5	--
4fach Sammelgelpuffer [ml]	--	3,75
H ₂ O [ml]	8,4	8,7
10% Ammoniumperoxo- Disulfat [µl]	200	150
Temed [µl]	8	15

Für die 30% Acrylamidlösung wurden 29 g Acrylamid; 1g Bisacrylamid und 5g Amberlite MB 1 in 100 ml H₂O eingetragen, 30 min gerührt und nachfolgend filtriert. Der 4fach Trenngelpuffer bestand aus 1,5 M Tris-HCl; 0,4 % SDS; pH 8,7, der 4fach Sammelgelpuffer aus 0,5 M Tris-HCl; 0,4 % SDS; pH 6,8. Die Elektrophorese-Kammer wurde zu 80% mit Trenngel gefüllt und mit 0,1%iger SDS-Lösung überschichtet. Nach zweistündiger Polymerisation wurde die SDS-Lösung dekantiert und das Sammelgel gegossen. Nach einstündiger Polymerisation war das Gel gebrauchsfertig. Die Protein-Proben wurden mit 0,2 Vol. Probenpuffer (375 mM Tris; pH 6,8; 10 % SDS; 50% Glycerin; 0,5% Bromphenolblau) und 0,2 Vol. DTT-Lösung (500 mg / ml in H₂O) vereinigt und für 3 min auf 90°C erhitzt. Die Proteine wurden durch diese denaturierende und reduzierende Behandlung in die konstituierenden Polypeptidketten aufgespalten und in Polyanionen überführt. Die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine hängt unter diesen Bedingungen nur noch von der Molekülgröße bzw. dem

Molekulargewicht ab. Es wurden jeweils 15 µl Probenlösung mit einem Proteingehalt von 0,2 – 20 µg aufgetragen. Als Standard wurde 5 µl „BenchMark Protein Ladder“ (Gibco) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 25 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3 bei 40 V im Sammelgel und bei 150 V im Trenngel bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Gelrand erreicht hatte.

Die Coomassie-Färbung erfolgte nach dem Protokoll von Peters & Baumgarten, 1992. Das Gel wurde zuerst in H₂O gespült, sodann 10 min in 20 %iger TCA und anschließend 10 min in 7,5%iger Essigsäure bei 25°C fixiert. Das Gel wurde 1 h bei 25°C in wässriger Färbelösung (0,5% CuSO₄*5H₂O, 0,15 % Coomassie Brilliant Blue R 250, 10% ml Essigsäure, 45% ml Methanol) inkubiert und nachfolgend einer zweistündigen Entfärbung (1% CuSO₄*5H₂O, 10% Essigsäure, 25% ml Methanol) unterzogen. Abschließend erfolgte eine 12stündige Konservierung in 25% Ethanol, 10 % Glycerin und die Geltrocknung.

4.7.8.2 Agarose-Gel

Die Auftrennung von DNA und Pt-DNA erfolgte in Elektrophorese Agarose-Gelen folgender Konzentration:

Agarose-Konz. [%]	Verwendungszweck	mg Agarose auf 50 ml TAE
0,9	Generierung von Pt-DNA (4.7.1) Isolierung von DNA (4.5.1)	450
1,5	Fragmentierung von DNA (4.2.2)	750
3	PCR-Produkte (4.5.2)	1.500

Die entsprechende Menge „Biozym Agarose“ (0,9%, 1,5 %) bzw. „Biozym Small DNA Agarose“ (3%) wurde in 50 ml TAE-Puffer aufgenommen und 2 min bei 700 W in der Mikrowelle erhitzen. Vor der Aushärtung des Gels wurden 4 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. 12,5 µl der Probe wurden mit 2,5 µl 6xLadepuffer versetzen und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1*TAE bei 50 V für 2 h. Als Standards diente die „GeneRuler 50 bp, 100 bp bzw. 1 kb DNA Ladder“ (MBI). Die Auswertung erfolgte am UV -Transilluminator (Bachmann).

4.7.9 Hämatoxylin - Eosin (HE) - Färbung von Kryoschnitten

Der Kryoschnitt wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 10 min bei 25°C im Acetonbad fixiert. Anschließend erfolgte die Überführung in wässrige Hämatoxylin-Lösung (2 g Hämatoxylin / l, 0,2 g NaIO₃ / l, 17,6 g KAl(SO₄)₂ / l) für 5 min bei 25°C. Nachfolgend wurde der Schnitt für 10 min gewässert und 5 min in 1%iger ethanolischer Eosin-Lösung gefärbt. Nach kurzem Wasserbad wurde die Probe durch jeweils zweimaliges Eintauchen in 70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Ethanol und Xylol entwässert und abschließend eingebettet (Entellan, Merck).

4.7.10 Tierhaltung

Die in der Versuchstier-Anlage des IFZ gehaltenen Mäuse erhielten täglich „Zuchthaltungsfutter Maus-Ratte 10 H 10“ (Eggersmann) und Trinkwasser ad libitum, zusätzlich einmal wöchentlich Haferflocken. Zwischen 18.00 - 6.00 wurde eine definierte Dunkelphase eingehalten. In halbjährlichen Abständen wurden je 2 Tiere jedes Stammes auf pathogene Mikroorganismen untersucht.

5 LITERATUR

- Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R. D., Boland, C. R., Koi, M., Fishel, R. & Howell, S. B. (1996) Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res.* **56**: 3087 – 3090
- Akiyama, S., Chen, ZS., Kitazono, M., Sumizawa, T., Furukawa, T. & Aikou, T. (1999) Mechanisms for resistance to anticancer agents and the reversal of the resistance. *Hum. Cell* **12 (3)**: 95 – 102
- Ali-Osman, F., Berger, M. S., Rairkar, A. & Stein, D. E. (1994) Enhanced repair of a cisplatin-damaged reporter chloramphenicol-O-acetyltransferase gene and activities of DNA polymerases alpha and beta, and DNA ligase in cells of a human malignant glioma following in vivo cisplatin therapy. *J. Cell Biochem.* **54**: 11 – 19
- Anthony, A. & Brown, R. (1995) The detection of genomic instability in drug resistant human tumour cell lines. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* **36**: 323 – 328
- Anthony, D. A., McIlwrath A. J., Gallagher, W. M., Edlin, A. R. M. & Brown, R. (1996) Microsatellite instability, apoptosis and loss of p 53 function in drug -resistant tumor cells. *Cancer Res* **56**: 1374 – 1381
- Asahina, H., Kuraoka, I., Shirakawa, M., Morita, E. H., Miura, N., Miyamoto, I., Ohtsuka, E., Okada, Y. & Tanaka, K. (1994) The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kind of DNA damage. *Mutat. Res. DNA Repair* **315**: 229 – 237
- Asmuss, M., Mullenders, L. H. & Hartwig, A. (2000) Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. *Toxicol. Lett.* **112**: 227 – 231
- Babu, E., Ebrahim, A. S., Chandramohan, N. & Sakthisekaran, D. (1999) Rehabilitating role of glutathione ester on cisplatin induced nephrotoxicity. *Ren. Fail.* **21(2)**: 209 – 217
- Barcellini, W., Borghi, M. O., Fain, C., Del Papa, N., Nicoletti, F. & Meroni, P. L. (1992) Enrichment of IgG Anti-DNA producing lymphoblastoid cell lines by antigen-coated immunomagnetic beads. *Clinical Immunology and Immunopathology* **65 (1)**: 39 – 44
- Bartelink, H., Begg, A., Martin, J. C., van-Dijk, M., van-'t-Veer, L., van-der-Vaart, P. & Verheij, M. (1999) Towards prediction and modulation of treatment response. *Radiother. Oncol.* **50(1)**: 1-11.
- Basu, A. & Lazo, J. S. (1990) A hypothesis regarding the protective role of metallothioneins against the toxicity of DNA interactive anticancer drugs. *Toxicol Lett.* **50(2-3)**: 123 - 135
- Bedford, P., Fichtinger-Schepman, A. M. J., Shellard, S. A., Walker, M. C., Masters, J. R. W. & Hill, B. T. (1988) Differential repair of platinum-DNA adducts in human bladder and testicular tumor continuous cell lines. *Cancer Res* **48**: 3019 – 3024
- Belew, M., Juntti, N., Larsson, A. & Porath, J. (1987) A one-step purification method for monoclonal antibodies based on salt-promoted adsorption chromatography on a 'thiophilic' adsorbent. *J. Immunol. Methods* **102(2)**: 173 - 182

-
- Bellon, S. F., Coleman, J. H. & Lippard, S. J. (1991) DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochemistry* **30**: 8026 – 8035
- Bennick, A. & Brosstad, F. (1993) A rapid method for selecting specific hybridoma clones using paramagnetic dynabeads. *Scand. J. Immunol.* **38**: 212 – 214
- Berg, R. J., Rebel, H., van der Horst, G. T., van Kranen, H. J., Mullenders, L. H., van Vloten, W. A. & de Gruijl, F. R. (2000) Impact of global genome repair versus transcription-coupled repair on ultraviolet carcinogenesis in hairless mice. *Cancer Res.* **60(11)**: 2858 - 2863
- Bergstrom, P., Johnsson, A., Bergenheim, T. & Henriksson, R. (1999) Effects of amifostine on cisplatin induced DNA adduct formation and toxicity in malignant glioma and normal tissues in rat. *J. Neurooncol.* **42(1)**: 13 - 21
- Bernges, F., Dörner, G. & Holler, E. (1990) Escherichia coli DNA polymerase I: inherent exonuclease activities differentiate between monofunctional and bifunctional adducts of DNA and cis- or trans-diamminedichloroplatinum(II). *Eur. J. Biochem.* **191**: 743 - 753
- Bernges, F., & Holler, E. (1991) The reaction of platinum(II) complexes with DNA. Kinetics of intrastrand crosslink formation in vitro. *Nucleic Acids Res.* **19(7)**: 1483 - 1489
- Billings, P. C., Davis, R. J., Engelsberg, B. N., Skov, K. A. & Hughes, E. N. (1992) Characterization of high mobility group protein binding to cisplatin-damaged DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188(3)**: 1286 - 1294
- Bingham, J. P., Hartley, J. A., Souhami, R. L. & Grimaldi, K. A. (1996) Strand-specific measurement of cisplatin-induced DNA damage and repair using quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* **24(5)**: 987 -989
- Blommaert, F. A., Michael, C., Terheggen, P. M. A. M., Muggia, F. M., Kortés, V., Schornagel, J. H., Hart, A. A. M. & den Engelse, L. (1993) Drug-induced DNA modification in buccal cells of cancer patients receiving Carboplatin and Cisplatin combination chemotherapy, as determined by an immunocytochemical method: Interindividual variation and correlation with disease response. *Cancer Res.* **53**: 5669 - 5675
- Blommaert, F. A. & Saris, C. P. (1995a) Detection of platinum-DNA adducts by ³²P-postlabelling. *Nucleic Acids Res.* **23 (8)**: 126 – 132
- Blommaert, F. A., van Dijk-Knijenburg, H. C. M., Dijt, F. J., den Engelse, L., Baan, R. A., Berends, F. & Fichtinger-Schepman, A. M. J. (1995b) Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin. Different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells. *Biochemistry* **34**: 8474 – 8480
- Blommaert, F. A., Froot, B. G. J., van Dijk-Knijenburg, H. C. M., Berends, F., Schornagel, J. H., den Engelse, L. & Fichtinger-Schepman, A. M. J. (1996) The formation and repair of Cisplatin-DNA adducts in wild-type and Cisplatin-resistant L1210 cells: comparison of immunocytochemical determination with detection in isolated DNA Dissertation Universität Amsterdam.
- Blommaert, F. A., Froot, B. G. J., van Dijk-Knijenburg, H. C. M., Baan, R. A., Schornagel, J. H., den Engelse, L. & Fichtinger-Schepman, A. M. J. (1998) The formation and repair of cisplatin-DNA adducts in wild-type and cisplatin-resistant L1210 cells: comparison of immunocytochemical determination with detection in isolated DNA. *Chem. Biol. Interact.* **108(3)**: 209-225.

- Boffetta, P., Fichtinger-Schepman, A. M. J., Weiderpass, E., van Dijk-Knijnenburg, H. C. M., Stoter, G., van Oosterom, A. T., Keizer, H. J., Kaldor, J. & Roy, P. (1998) Cisplatin-DNA adducts and protein-bound platinum in blood of testicular cancer patients. *Anti Cancer Drugs* **9**: 125 – 129
- Bohr, A. (1995) DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogenesis* **16** (12): 2885 – 2892
- Bonetti, A., Apostoli, P., Zaninelli, M., Pavanel, F., Colombatti, M., Cetto, G. L., Franceschi, T., Sperotto, L. & Leone, R. (1996) Inductively coupled plasma mass spectroscopy quantitation of platinum-DNA adducts in peripheral blood leukocytes of patients receiving cisplatin- or carboplatin-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2**(11): 1829 – 1835
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. & Wijnholds, J. (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**: 347 – 357
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248 – 254
- Bradley, L. J., Yarema, K. J., Lippard, S. J. & Essigmann, J. M. (1993) Mutagenicity and genotoxicity of the major DNA adduct of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* **32**(3): 982 - 988
- Branch, P., Masson, M., Aquilina, G., Bignami, M. & Karran, P. (2000) Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells. *Oncogene* **19**(28): 3138 – 3145
- Brown, R., Hirst, G. L., Gallagher, W. M., McIlwrath, A. J., Margison, G. P., van der Zee, A. G. J. & Anthony, D. A. (1997) h MLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene* **15**: 45 – 52
- Buschfort, C., Müller, M. R., Seeber, S., Rajewsky, M. F. & Thomale, J. (1997) DNA Excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. *Cancer Res.* **57**: 651 – 658
- Cano, J. R., Catalan, B. & Jara, C. (1998) Neuronopathy due to cisplatin *Rev. Neurol.* **27**(158): 606 – 610
- Cenni, B., Kim, H. K., Buble, G. J., Aebi, S., Fink, D., Teicher, B. A., Howell, S. B. & Christen, R. D. (1999) Loss of DNA mismatch repair facilitates reactivation of a reporter plasmid damaged by cisplatin. *Br. J. Cancer* **80**(5-6): 699 – 704
- Chaney, S. G. & Vaisman, A. (1999) Specificity of platinum-DNA adduct repair. *J. Inorg. Biochem.* **77**(1-2): 71 – 81
- Chao, C. C., Shieh, T.-C. & Huang, H. (1994) Use of a monoclonal antibody to detect DNA damage caused by the anticancer drug cis-diamminedichloroplatinum (II) in vivo and in vitro. *FEBS Lett.* **354**: 103 – 109
- Chao, C. C. (1996) Cross-resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) of a multidrug-resistant lymphoma cell line associated with decreased drug accumulation and enhanced DNA repair. *Eur. J. Pharmacol.* **305**(1-3): 213 – 222
- Chao, C. C. (1996) Molecular basis of cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance: a review. *J. Formos. Med. Assoc.* **95**(12): 893 - 900

-
- Chao, J. C., Wan, X. S., Engelsberg, B. N., Rothblum, L. I. & Billings, P. C. (1996) Intracellular distribution of HMG1, HMG2 and UBF change following treatment with cisplatin. *Biochim. Biophys. Acta* **1307(2)**: 213 – 219
- Chen, Z. S., Mutoh, M., Sumizawa, T., Furukawa, T., Haraguchi, M., Tani, A., Saijo, N., Kondo, T. & Akiyama, S. (1998) An active efflux system for heavy metals in cisplatin-resistant human KB carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **240(2)**: 312 – 320
- Chen, Z. S., Kawabe, T., Ono, M., Aoki, S., Sumizawa, T., Furukawa, T., Uchiumi, T., Wada, M., Kuwano, M. & Akiyama, S. I. (1999) Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Mol. Pharmacol.* **56(6)**: 1219 – 1228
- Cheo, D. L., Ruven, H. J., Meira, L. B., Hammer, R. E., Burns, D. K., Tappe, N. J., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H. & Friedberg, E. C. (1997) Characterization of defective nucleotide excision repair in XPC mutant mice. *Mutat.-Res.* **374(1)**: 1 – 9
- Cheo, D. L., Burns, D. K., Meira, L. B., Houle, J. F. & Friedberg, E. C. (1999) Mutational inactivation of the xeroderma pigmentosum group C gene confers predisposition to 2-acetylaminofluorene-induced liver and lung cancer and to spontaneous testicular cancer in Trp53^{-/-} mice. *Cancer Res.* ; **59(4)**: 771 – 775
- Cheo, D. L., Meira, L. B., Burns, D. K., Reis, A. M., Issac, T. & Friedberg, E. C. (2000) Ultraviolet B radiation-induced skin cancer in mice defective in the Xpc, Trp53, and Apex (HAP1) genes: genotype-specific effects on cancer predisposition and pathology of tumors. *Cancer Res.* **60(6)**: 1580 – 1584
- Coller, H. A. & Coller, B. S. (1983) Statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique with a view toward ensuring hybridoma monoclonality. *Hybridoma* **2(1)**: 91 – 96
- Comess, K. M., Burstyn, J. N., Essigmann, J. M. & Lippard, S. J. (1992) Replication inhibition and translesion synthesis on templates containing site-specifically placed cis-diamminedichloroplatinum(II) DNA adducts. *Biochemistry* **31 (16)**: 3975-3990
- Corde, Y., Anin, M.-F., Leng, M. & Job, D. (1992) RNA polymerases react differently at d(ApG) and d(GpG) adducts in DNA modified by cis-Diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* **31**: 1904-1908
- Cornelison, T. L. & Reed, E. (1993) Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin, and ormaplatin. *Gynecol. Oncol.* **50(2)**: 147 - 158
- Coulter, A. R., Cox, J. C., Harris, R. D. & Healey, K. (1989) An enzyme immunoassay for isotyping mouse monoclonal antibodies. *Med. Lab. Sci.* **46(1)**: 54 – 58
- Crul, M., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H. & Maliepaard, M. (1997) Cisplatin resistance and DNA repair. *Cancer Treatment Reviews* **23**: 341 – 366
- Dabholkar, M., Bradshaw, L., Parker, R. J., Gill, I., Bostick-Bruton, F., Muggia, F. M. & Reed, E. (1992) Cisplatin-DNA damage and repair in peripheral blood leukocytes in vivo and in vitro. *Environ. Health. Perspect.* **98**: 53 – 59
- Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J. J. & Reed, E. (1994) Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum chemotherapy. *J. Clin. Invest.* **94**: 703 – 708

-
- D'Atri, S., Tentori, L., Lacial, P. M., Graziani, G., Pagani, E., Benincasa, E., Zambruno, G., Bonmassar, E. & Jiricny, J. (1998) Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. *Mol. Pharmacol.* **54(2)**: 334 – 341
- Davol, P. A., Goulette, F. A., Frackelton, A. R. Jr. & Darnowski, J. W. (1996) Modulation of p53 expression by human recombinant interferon $\alpha 2a$ correlates with abrogation of cisplatin resistance in a human melanoma cell line. *Cancer Res.* **56**: 2522 – 2526
- de Graeff, A., Slebos, R. J. & Rodenhuis, S. (1988) Resistance to cisplatin and analogues: mechanisms and potential clinical implications. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **22(4)**: 325 - 332
- Delb, W., Feilen, S., Koch, A. & Federspil, P. (1993) Comparative studies of the ototoxicity of cisplatin and carboplatin. *Laryngorhinotologie* **72(1)**: 24 – 27
- Demeule, M., Brossard, M. & Beliveau, R. (1999) Cisplatin induces renal expression of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter. *Am. J. Physiol.* **277(6 Pt 2)**: F832 – 840
- Dijt, F. J., Fichtinger-Schepman, A. M. J., Berends, F. & Reedijk, J. (1988) Formation and repair of Cisplatin-induced adducts to DNA in cultured normal and repair-deficient human fibroblasts. *Cancer Res.* **48**: 6058-6062
- Dijt, F. J., Chottard, J. C., Girault, J. P. & Reedijk, J. (1989) Formation and structure of reaction products of cis-PtCl₂(NH₃)₂ with d(ApG) and/or d(GpA) in di-, tri- and penta-nucleotides. Preference for GpA chelation over ApG chelation. *Eur. J. Biochem.* **179(2)**: 335 – 344
- Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M. J. & Modrich, P. (1996) Human MutS recognizes damaged DNA base pairs containing O⁶-methylguanine, O⁴-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 6443 – 6447
- Eastman, A. (1983) Characterization of the adducts produced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum (II) and cis-dichloro(ethylenediamine) platinum (II). *Biochemistry* **22**: 3927 - 3933
- Eberhardt, W., Stamatis, G., Stuschke, M., Wilke, H., Müller, M.R., Stahl, M., Budach, V., Greschuchna, D., Konietzko, N., Sack, H. & Seeber, S. (1998) Aggressive trimodality treatment including chemoradiation induction and surgery in LD-Small-cell lung cancer I-IIIB - Long-term Results *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **17**: 450a (abstr 1735),
- Eberle, G. (1988) Monoklonale Antikörper gegen Kanzerogen-DNS Addukte. Inaugural-Dissertation, Universität-Gesamthochschule Essen.
- Egeland, T., Hovdenes, A. & Lea, T. (1988) Positive selection of antigen-specific B lymphocytes by means of immunomagnetic particles. *Scand. J. Immunol.* **27(4)**: 439 – 444
- Engelbergs, J., Thomale J., Galhoff A. & Rajewsky M R. (1998) Fast repair of O⁶-ethyl-, but not O⁶-methylguanine, in transcribed genes prevents mutation of H-ras in rat mammary tumorigenesis induced by ethyl- in place of methylnitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**: 1635-1640
- Fajac, A., Dasilva, J., Ahomadegbe, J. C. et al., (1996) Cisplatin -induced apoptosis and p53 gene status in a cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell line. *Int. J. Cancer* **68**: 67 – 74

-
- Farah, N., Dresner, H. S., Searles, K. J., Winiarsky, R., Moosikasuwana, M., Cajigas, A., Hahm, S. & Steinberg, J. J. (2000) Cisplatin DNA adduct detection and depurination measured by ³²P DNA radiolabeling and two-dimensional thin-layer chromatography: a time and concentration study. *Cancer Invest.* **18(4)**: 314 – 326
- Fichtinger-Schepman, A. M. J., Lohman, P. H. M. & Reedijk, J. (1982) Detection and quantification of adducts formed upon interaction of diamminedichloroplatinum (II) with DNA, by anion-exchange chromatography after enzymatic degradation. *Nucleic Acids Res.* **10 (17)**: 5345 – 5356
- Fichtinger-Schepman, A. M. J., van der Veer, J. L., den Hartog, J. H. J., Lohman, P. H. M. & Reedijk, J. (1985a) Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) with DNA: Formation, identification and quantification. *Biochemistry* **22**: 707 – 713
- Fichtinger-Schepman, A. M. J., Baan, R. A., Luiten-Schuite, A., van Dijk, M. & Lohman, P. H. M. (1985b) Immunochemical quantitation of adducts induced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum (II) and analysis of adduct-related DNA-unwinding. *Chem. Biol. Interact.* **55**: 275 – 288
- Fichtinger-Schepman, A. M. J., van Oosterom, A. T., Lohman, P. H. M. & Berends, F. (1987a) Interindividual human variation in cisplatin sensitivity, predictable in an *in vitro* assay? *Mutat.-Res.* **190**: 59 – 62
- Fichtinger-Schepman, A. M. J., van Oosterom, A. T., Lohman, P. H. M. & Berends, F. (1987b) Cis-diammine-dichloroplatinum (II)-induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients: Quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.* **47**: 3000 – 3004
- Fichtinger-Schepman, A. M., Baan, R. A. & Berends, F. (1989) Influence of the degree of DNA modification on the immunochemical determination of cisplatin-DNA adduct levels. *Carcinogenesis* **10**: (12): 2367 – 2369
- Fichtinger-Schepman, A. M., van der Velde-Visser, S. D., van Dijk-Knijnenburg, H. C., van Oosterom, A. T., Baan, R. A. & Berends, F. (1990) Kinetics of the formation and removal of cisplatin-DNA adducts in blood cells and tumor tissue of cancer patients receiving chemotherapy: Comparison with *in vitro* adduct formation. *Cancer Res.* **50**: 7887 – 7894
- Fichtinger-Schepman, A. M. J., van Dijk-Knijnenburg, H. C. M., van der Velde-Visser, S. D., Berends, F. & Baan, R. A. (1995) Cisplatin -and carboplatin-DNA adducts: is Pt-AG the cytotoxic lesion? *Carcinogenesis* **16 (10)**: 2447 – 2453
- Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R. D. & Howell, S. B. (1996) The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res.* **56**: 4881 – 4886
- Fink, D., Zheng, H., Nebel, S., Norris, P. S., Aebi, S., Lin, T.-P., Nehme, A., Christen, R. D., Haas, M., MacLeod, C. L. & Howell, S. B. (1997) *In vitro* and *in vivo* resistance to Cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res* **57**: 1841 – 1845
- Fleming, J. O. & Pen, L. B. (1988) Measurement of the concentration of murine IgG monoclonal antibody in hybridoma supernatants and ascites in absolute units by sensitive and reliable enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *J. Immunol. Methods* **110(1)**: 11 – 18

-
- Frankfurt, O. S., Robb, J. A., Sugarbakker, E. V. & Villa, L. (1996a) Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. *Exp. Cell Res.* **226**: 387 – 397
- Frankfurt, O. S., Robb, J. A., Sugarbakker, E. V. & Villa, L. (1996b) Apoptosis in human breast and gastrointestinal carcinomas. detection in histological sections with monoclonal antibody to single-stranded DNA. *Anticancer Res.* **16**: 1979 – 1988
- Friedberg, E. C., Cheo, D. L., Meira, L. B. & Reis, A. M. (1999) Cancer predisposition in mutant mice defective in the XPC DNA repair gene. *Prog. Exp. Tumor Res.* **35**: 37 – 52
- Friedberg, E. C., Bond, J. P., Burns, D. K., Cheo, D. L., Greenblatt, M. S., Meira, L. B., Nahari, D. & Reis, A. M. (2000) Defective nucleotide excision repair in xpc mutant mice and its association with cancer predisposition. *Mutat.-Res.* **459(2)**: 99 – 108
- Fujishima, H., Nakano, S., Masumoto, N., Esaki, T., Tatsumoto, T., Kondo, T. & Niho, Y. Inhibition by 5-fluorouracil of ERCC1 and gamma-glutamylcysteine synthetase messenger RNA expression in a cisplatin-resistant HST-1 human squamous carcinoma cell line. *Oncol Res.* **9(4)**: 167 – 172
- Fujiwara, T., Grimm, E. A., Mukhopadhyay, T., Zhang, W. W., Owen-Schaub, L. B. & Roth, J. A., (1994) Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of wild type p53 gene. *Cancer Res* **5**: 2287 – 2291
- Galfre, G., Milstein, C. & Wright, B. (1979) Rat x rat hybrid myelomas and monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. *Nature* **277**: 131 – 133
- Gelasco, A. & Lippard, S. J. (1998) NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry* **37(26)**: 9230 – 9239
- Geske, F. J., Nelson, A. C., Lieberman, R., Strange, R., Sun, T. & Gerschenson, L. E. (2000) DNA repair is activated in early stages of p53-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **7(4)**: 393 – 401
- Gong, J. G., Costanzo, A., Yang, H. Q., Melino, G., Kaelin, W. G., Levrero, M. & Wang, J. Y. (1999) The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage [see comments] *Nature* **399(6738)**: 806 – 809
- Grimaldi, K. A., McAdam, S. R., Souhami, R. L. & Hartley, J. A. (1994a) DNA damage by anti-cancer agents resolved at the nucleotide level of a single copy gene: Evidence for a novel binding site for Cisplatin in cells. *Nucleic Acids Res.* **22 (12)**: 2311 – 2317
- Halloran, M. J. & Parker, C. W. (1966a) The preparation of nucleotide-protein conjugates: Carbodiimides as coupling agents. *Journal Immunol.* **96**: 373 – 378
- Hanada, K., Odaka, K., Kudo, A. & Ogata, H. (1999) Effects of disopyramide and verapamil on renal disposition and nephrotoxicity of cisplatin in rats. *Pharmacol. Res.* **16(10)**: 1589 – 1595
- Hansson, J. & Wood, R. D. (1989) Repair synthesis by human cell extracts in DNA damaged by cis- and trans- diamminedichloroplatinum (II). *Nucleic Acids Res.* **17 (20)**: 8073 – 8091
- Hartmann, J. T., Kollmannsberger, C., Kanz, L. & Bokemeyer, C. (1999) Platinum organ toxicity and possible prevention in patients with testicular cancer. *Int. J. Cancer* **83(6)**: 866 – 869
- Havemann, K. & Wolf, M. (1997) Lungentumoren. in: Ostendorf, P. C. & Seeber, S. (Hrsg.): Hämatologie. Onkologie. Kapitel XI 53, 606 – 643

-
- Hawn, M. T., Umar, A., Carethers, J. M., Marra, G., Kunkel, T. A., Boland, C. R & Koi (1995) Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res.* **55(17)**: 3721 – 3725
- Hebell, T. & Gotze, O. (1989) The isolation of B lymphocytes from human peripheral blood using antibodies coupled to paramagnetic particles and rosetting techniques. *J. Immunol. Methods* **123(2)**: 283 – 291
- Herod, J. J., Eliopoulos, A. G., Warwick, J., Niedobitek, G., Young, L. S. & Kerr, D. J. (1996) The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **56**: 2178 – 2184
- Higby, D. J., Wallace, H. J. Jr., Albert, D. J. & Holland, J. F. (1974) Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors. *Cancer* **33(5)**: 1219 – 1215
- Hill, B. T., Scanlon, K. J., Hansson, J., Harstrick, A., Pera, M., Fichtinger-Schepman, A M. J. & Shellard, S. A. (1994a) Deficient repair of cisplatin-DNA adducts identified in human testicular teratoma cell lines established from tumors from untreated patients. *Eur. J. Cancer* **30A (6)**: 832 –837
- Hill, B. T., Shellard, S. A., Fichtinger-Schepman, A M. J., Schmoll, H. J. & Harstrick, A. (1994b) Differential formation and enhanced removal of specific cisplatin-DNA adducts in two cisplatin-selected resistant human testicular teratoma sublines. *Anti Cancer Drugs* **5**: 321 – 328
- Hoffmann, J. S., Pillaire, M. J., Maga, G., Podust, V. Hubscher, U. & Villani, G. (1995) DNA polymerase beta bypasses in vitro a single d (GpG)-cisplatin adduct placed on codon 13 of the HRAS gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 5356 – 5360
- Hoffmann, J. S., Pillaire, M. J., Garcia-Estefania, D., Lapalu, S. & Villani, G. (1996) In vitro bypass replication of the cisplatin-d(GpG) lesion by calf thymus DNA polymerase beta and human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase is highly mutagenic. *J. Biol. Chem.* **271(26)**: 15386 – 15392
- Hoffmann, J. S., Locker, D., Villani, G. & Leng, M. (1997) HMG1 protein inhibits the translesion synthesis of the major DNA cisplatin adduct by cell extracts. *J. Mol. Biol.* **270(4)**: 539 – 43
- Horton, J. K., Evans, O. M., Swann, K. & Swinburne, S. (1989) A new and rapid method for the selection and cloning of antigen-specific hybridomas with magnetic microspheres. *J. Immunol. Methods* **124**: 225 – 230
- Huang, J. C., Zamble, D. B., Reardon, J. T., Lippard, S. J. & Sancar, A. (1994) HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 10394 – 10398
- Hutchens, T. W. & Porath, J. (1986) Thiophilic adsorption of immunoglobulins--analysis of conditions optimal for selective immobilization and purification. *Anal. Biochem.* **159(1)**: 217 – 226
- Ichikawa, M., Nakane, H., Marra, G., Corti, C., Jiricny, J., Fitch, M., Ford, J. M., Ikejima, M., Shimada, T., Yoshino, M., Takeuchi, S., Nakatsu, Y. & Tanaka, K. (2000) Decreased UV sensitivity, mismatch repair activity and abnormal cell cycle checkpoints in skin cancer cell lines derived from UVB-irradiated XPA-deficient mice. *Mutat.-Res.* **459(4)**: 285 – 298
- Ikeda, S., Fukuzaki, A., Kaneto, H., Ishidoya, S. & Orikasa, S. (1999) Role of protein kinase C in cisplatin nephrotoxicity. *Int. J. Urol.* **6(5)**: 245 – 250

-
- Ishikawa, T. & Ali-Osman, F. (1993) Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J. Biol. Chem.* **268(27)**: 20116 – 20125
- Johnsson, A., Olsson, C., Anderson, H. & Cavallin-Stahl, E. (1994) Evaluation of a method for quantitative immunohistochemical analysis of cisplatin-DNA adducts in tissues from nude mice. *Cytometry* **17**: 142 – 150
- Johnsson, A., Olsson, C., Nygren, O., Nilsson, M., Seiving, B. & Cavallin-Stahl, E. (1995) Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin in nude mice: platinum levels and cisplatin-DNA adducts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **37(1-2)**: 23 – 31
- Johnsson, A. & Wennerberg, J. (1999) Amifostine as a protector against cisplatin-induced toxicity in nude mice. *Acta Oncol.* **38(2)**: 247 – 53
- Jones, J. C., Zhen, W., Reed, E., Parker, R. J., Sancar, A. & Bohr V. A. (1991) Gene-specific formation and repair of cisplatin intrastrand adducts and interstrand cross-links in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **266 (11)**: 7101 – 7107
- Jones, C. J. & Wood, R. D. (1993) Preferential binding of the Xeroderma Pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA. *Biochemistry* **32**: 12096 – 12104
- Kane, S. A. & Lippard, S. J. (1996) Photoreactivity of platinum(II) in cisplatin-modified DNA affords specific cross-links to HMG domain proteins. *Biochemistry* **35**: 2180 – 2188
- Kasparkova, J. & Brabec, V. (1995) Recognition of DNA Interstrand cross-links of cis-diamminedichloroplatinum (II) and its trans isomer by DNA-binding proteins. *Biochemistry* **34**: 12379 – 12387
- Kasparkova, J., Farrell, N. & Brabec, V. (2000) Sequence specificity, conformation, and recognition by HMG1 protein of major DNA interstrand cross-links of antitumor dinuclear platinum complexes. *J. Biol. Chem.* **275(21)**: 15789 – 15798
- Kath, R., Fiehler, J., Schneider, C. P. & Hoffken, K. (2000) Gastric cancer in very young adults: apropos four patients and a review of the literature. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **126(4)**: 233 – 237
- Kawabe, T., Chen, Z. S., Wada, M., Uchiumi, T., Ono, M., Akiyama, S. & Kuwano, M. (1999) Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett.* **456(2)**: 327 – 331
- Klein, I., Sarkadi, B. & Varadi, A. (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**: 237 – 262
- Knox, R. J., Friedlos, F., Lydall, D. A. & Roberts, J. J. (1986) Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res.* **46(4 Pt 2)**: 1972 - 1979
- Köberle, B., Grimaldi, K. A., Sunter, A., Hartley, J. A., Kelland, L. R. & Masters, J. R. W. (1997) DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int. J. Cancer* **70**: 551 – 555

-
- Köberle, B., Masters, J. R., Hartley, J. A. & Wood, R. D. (1999) Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr. Biol.* **9(5)**: 273 – 276
- Kollmannsberger, C., Kuzczyk, M., Mayer, F., Hartmann, J. T., Kanz, L. & Bokemeyer, C. Late toxicity following curative treatment of testicular cancer. *Semin. Surg. Oncol.* **17(4)**: 275 – 81
- König, J., Nies, A. T., Cui, Y., Leier, I. & Keppler, D. (1999) Conjugate export pumps of multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity and MRP 2-mediated drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**: 377 – 394
- Konishi, T., Teruya, M., Kawahara, M., Itoh, A., Asakura, R., Araki, S., Hojo, K., Nouchi, T. & Takeda, Y. (1998) [Chemotherapy of gastric cancer] *Gan To Kagaku Ryoho* **25(4)**: 504 – 515
- Korst, A. E., van der Sterre, M. L., Gall, H. E., Fichtinger-Schepman, A. M., Vermorken, J. B. & van der Vijgh, W. J. (1998) Influence of amifostine on the pharmacokinetics of cisplatin in cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **4(2)**: 331 – 336
- Krueger, I., Mullenders, L. H. & Hartwig, A. (1999) Nickel(II) increases the sensitivity of V79 Chinese hamster cells towards cisplatin and transplatin by interference with distinct steps of DNA repair. *Carcinogenesis* **20(7)**: 1177 – 1184
- Kuraoka, I., Morita, E. H., Saijo, M., Matsuda, T., Morikawa, K., Shirakawa, M. & Tanaka, K. (1996) Identification of a damaged-DNA binding domain of the XPA protein. *Mutat.-Res.* **362**: 87 – 95
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(259)**: 680 – 5
- Lage, H., Christmann, M., Kern, M. A., Dietel, M., Pick, M., Kaina, B. & Schadendorf, D. (1999) Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance. *Int. J. Cancer.* **80(5)**: 744 – 750
- Lage, H. & Dietel, M. (1999) Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **125(3-4)**: 156 – 165
- Lau, A. H. (1999) Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney Int.* **56(4)**: 1295 – 1298
- Lebwohl, D. & Canetta, R. (1998) Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur. J. Cancer* **34(10)**: 1522 - 1534
- Li, G. & Ho, V. C. (1998) p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br. J. Dermatol.* **139(1)**: 3 - 10
- Li, G. M. (1999) The role of mismatch repair in DNA damage-induced apoptosis. *Oncol Res.* **11(9)**: 393 – 400
- Li, L., Liu, X., Glassman, A. B., Keating, M. J., Stros, M., Plunkett, W. & Yang, L. Y. (1997) Fludarabine triphosphate inhibits nucleotide excision repair of cisplatin-induced DNA adducts in vitro. *Cancer Res.* **57(8)**: 1487 – 1494
- Li, M. J. & Yang, L. Y. (1999) Use of novel plasmid constructs to demonstrate fludarabine triphosphate inhibition of nucleotide excision repair of a site-specific 1,2-d(GpG) intrastrand cisplatin adduct. *Int. J. Oncol.* **15(6)**: 1177 – 1183

-
- Li, Q., Yu, J. J., Mu, C., Yunmbam, M. K., Slavsky, D., Cross, C. L., Bostick-Bruton, F. & Reed, E. (2000) Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* **20(2A)**: 645 – 652
- Lihme, A. & Heegaard, P. M. (1991) Thiophilic adsorption chromatography: the separation of serum proteins. *Anal. Biochem.* **192(1)**: 64 – 69
- Links, M. & Lewis-C. (1999) Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs* **57(3)**: 293 – 308
- Lin, X. & Howell, S. B. (1999) Effect of loss of DNA mismatch repair on development of topotecan-, gemcitabine-, and paclitaxel-resistant variants after exposure to cisplatin. *Mol. Pharmacol.* **56(2)**: 390 – 395
- Lin, X., Kim, H. K. & Howell, S. B. (1998) The role of DNA mismatch repair in cisplatin mutagenicity. *J. Inorg. Biochem.* **77(1-2)**: 89 – 93
- Lokich, J. & Anderson, N. (1998) Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Ann. Oncol.* **9(1)**: 13 – 21
- Luo, F. R., Wyrick, S. D. & Chaney, S. G. (1999) Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, ormaplatin, and their biotransformation products utilizing a rat dorsal root ganglia in vitro explant culture model. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **44(1)**: 29 – 38
- Ma, J., Maliepaard, M., Nooter, K., Boersma, A. W., Verweij, J., Stoter, G. & Schellens, J. H. (1998) Synergistic cytotoxicity of cisplatin and topotecan or SN-38 in a panel of eight solid-tumor cell lines in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **41(4)**: 307 – 316
- Mamenta, E. L., Poma, E. E., Kaufmann, W. K., Delmastro, D. A., Grady, H. L. & Chaney, S. G. (1994) Enhanced replicative bypass of platinum -DNA adducts in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **54**: 3500 – 3505
- Matsunaga, T., Shirasawa, H., Hishiki, T., Enomoto, H., Kouchi, K., Ohtsuka, Y., Iwai, J., Yoshida, H., Tanabe, M., Kobayashi, S., Asano, T., Etoh, T., Nishi, Y. & Ohnuma, N. (1998) Expression of MRP and cMOAT in childhood neuroblastomas and malignant liver tumors and its relevance to clinical behavior. *Jpn. J. Cancer Res.* **89(12)**: 1276 – 1283
- May, A., Nairn, R. S., Okumoto, D. S., Wassermann, K., Stevnsner, T., Jones, J. C. & Bohr, V. A. (1993) Repair of individual DNA strands in the hamster dihydrofolate reductase gene after treatment with ultraviolet light, alkylating agents, and cisplatin. *J. Biol. Chem.* **268**: 1650 – 1657
- McA'Nulty, M. M. & Lippard, S. J. (1995) Consequences of HMG-domain protein binding to cisplatin-modified DNA. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **9**: 264 – 284
- McA'Nulty, M. M. & Lippard, S. J. (1996) The HMG-domain protein Ixr1 blocks excision repair of cis-DNA adducts in yeast. *Mutat. Res. DNA Repair* **362**: 75 – 86
- McLaughlin, K., Coren, G., Masters, J. & Brown, R. (1993) Binding activities of cis-platin-damage - recognition proteins in human tumour cell lines. *Int. J. Cancer* **53**: 662 – 666
- Meijer, C., Mulder, N. H., Timmer-Bosscha, H., Sluiter, W. J., Meersma, G. J. & de Vries, E. G. (1992) Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res.* **52(24)**: 6885 – 6889

-
- Meijer, C., de Vries E. G. E., Dam, W. A., Wilkinson, M. H. F., Hollema, H., Hoekstra, H. J. & Mulder, N. H. (1997) Immunocytochemical analysis of cisplatin-induced platinum-DNA adducts with double-fluorescence video microscopy. *Br. J. Cancer* **76 (3)**: 290 – 298
- Meijer, C., de-Vries, E. G., Marmioli, P., Tredici, G., Frattola, L. & Cavaletti, G. (1999) Cisplatin-induced DNA-platination in experimental dorsal root ganglia neuronopathy. *Neurotoxicology* **20(6)**: 883 – 887
- Meijer, C., Timmer, A., de-Vries, E. G., Groten, J. P., Knol, A., Zwart, N., Dam, W. A., Sleijfer, D. T. & Mulder, N. H. (2000) Role of metallothionein in cisplatin sensitivity of germ-cell tumours. *Int. J. Cancer* **85(6)**: 777 – 781
- Mello, J. A., Lippard, S. J. & Essigmann, J. M. (1995) DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum (II) and its trans isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo. *Biochemistry* **34**: 14783 – 14791
- Mello, J. A., Acharya, S., Fishel, R. & Essigmann, J. M. (1996) The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem. Biol.* **3**: 579 – 589
- Mellon, I., Rajpal, D. K., Koi, M., Boland, C. R. & Champe, G. N. (1996) Transcription-coupled repair deficiency and mutations in human mismatch repair genes. *Science* **272**: 557 – 560
- Minamino, T., Nomura, M., Tamai, M., Moritani, S., Ohshima, T. & Miyamoto, K. (1996) In vivo cisplatin resistance of rat ascites hepatoma AH66. *Cancer Lett.* **108(2)**: 153 – 156
- Minamino, T., Tamai, M., Itoh, Y., Tatsumi, Y., Nomura, M., Yokogawa, K., Suzuki, H., Sugiyama, Y., Ohshima, T. & Miyamoto, K. (1999) In vivo cisplatin resistance depending upon canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT). *Jpn. J. Cancer Res.* **90(10)**: 1171 – 1178
- Minemura, M., Tanimura, H. & Tabor, E. (1999) Overexpression of multidrug resistance genes MDR1 and cMOAT in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines. *Int. J. Oncol.* **15(3)**: 559 – 563
- Moorehead, R. A., Armstrong, S. G., Rainbow, A. J. & Singh, G. (1996) Nucleotide excision repair in the human ovarian carcinoma cell line (2008) and its cisplatin-resistant variant (C13*). *Cancer Chemother. Pharmacol.* **38(3)**: 245 – 253
- Murchie, A. I. H. & Lilley, D. M. J. (1993) T4 endonuclease VII cleaves DNA containing a Cisplatin adduct. *J. Mol. Biol.* **233**: 77 – 85
- Mustonen, R., Takala, M., Leppala, S. & Hemminki, K. (1989) Dose-dependence and stability of cisplatin binding to tissue DNA and blood proteins in rats. *Carcinogenesis.* **10(2)**: 365 – 368
- Nakane, H., Takeuchi, S., Yuba, S., Saijo, M., Nakutsu, Y., Murai, H., Nakatsuru, Y., Ishikawa, T., Hirota, S., Kitamura, Y., Kato, Y., Tsunoda, Y., Miyauchi, H., Horio, T., Tokunaga, T., Matsunaga, T., Nikaido, O., Nishimune, Y., Okada, Y. & Tanaka, K. (1995) High incidence of ultraviolet-B- or chemical-carcinogen-induced skin tumours in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene. *Nature* **377**: 165 – 168
- Naser, L. J., Pinto, A. L., Lippard, S. J., Essigmann, J. M. (1988) Chemical and biological studies of the major DNA adduct of cis-diamminedichloroplatinum(II), cis-[Pt(NH₃)₂(d(GpG))], built into a specific site in a viral genome. *Biochemistry* **27 (12)**: 4357 – 4367

-
- Nehme, A., Baskaran, R., Nebel, S., Fink, D., Howell, S. B., Wang, J. Y. & Christen, R. D. (1999) Induction of JNK and c-Abl signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells. *Br. J. Cancer* **79(7-8)**: 1104 – 1110
- Niimi, S., Nakagawa, K., Yokota, J., Tsunokawa, Y., Nishio, K., Terashima, Y., Shibuya, M., Terada, M. & Saijo, N. (1991) Resistance to anticancer drugs in NIH3T3 cells transfected with c-myc and/or c-H-ras genes. *Br. J. Cancer* **63(2)**: 237 – 241
- Nopper, B., Kohen, F. & Wilchek, M. (1989) A thiophilic adsorbent for the one-step high-performance liquid chromatography purification of monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **180(1)**: 66 – 71
- Ochs, K., Sobol, R. W., Wilson, S. H. & Kaina, B. (1999) Cells deficient in DNA polymerase beta are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage. *Cancer Res.* **59(7)**: 1544 – 1551
- Ohndorf, U. M., Rould, M. A., He, Q., Pabo, C. O. & Lippard, S. J. (1999) Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature.* **399(6737)**: 708 – 712
- O'Neill, C. F., Koberle-B., Masters, J. R. & Kelland, L. R. (1999) Gene-specific repair of Pt/DNA lesions and induction of apoptosis by the oral platinum drug JM216 in three human ovarian carcinoma cell lines sensitive and resistant to cisplatin. *Br. J. Cancer.* **81(8)**: 1294 – 1303
- Ormerod, M. G., Orr, R. M. & Peacock, J. H. (1994) The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometric study. *Br. J. Cancer* **69**: 93 – 100
- Ormerod, M. G., O'Neill, C., Robertson, D., Kelland, L. R. & Harrap, K. R. (1996) cis-diamminedichloroplatinum (II) induced cell death through apoptosis in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **37**: 463 – 471
- Osman, A. M., El-Sayed, E. M., El-Demerdash, E., Al-Hyder, A., El-Didi, M., Attia, A. S. & Hamada, F. M. (2000) Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by methimazole. *Pharmacol. Res.* **41(1)**: 115 – 121
- Oscarsson, S. & Porath J. (1989) Covalent chromatography and salt-promoted thiophilic adsorption. *Anal. Biochem.* **176(2)**: 330 – 337
- Ossendorp, F. A., Bruning, P. F., Van den Brink, J. A. M. & De Boer, M. (1989) Efficient selection of high-affinity B cell hybridomas using antigen-coated magnetic beads. *J. Immunol. Methods* **120**: 191 – 200
- Parker, R. J., Gill, I., Tarone, R., Vionnet, J. A., Grunberg, S., Muggia, F. M. & Reed, E. (1991) Platinum-DNA damage in leukocyte DNA of patients receiving carboplatin and cisplatin chemotherapy, measured by atomic absorption spectrometry. *Carcinogenesis.* **12(7)**: 1253 – 1258
- Pattanaik, A., Bachowski, G., Laib, J., Lemkuil, D., Shaw, C. F. 3rd, Petering, D. H., Hitchcock, A. & Saryan, L. (1992) Properties of the reaction of cis-dichlorodiammineplatinum(II) with metallothionein. *J. Biol. Chem.* **267(23)**: 16121 – 16128
- Perez, R. P. (1988) Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur. J. Cancer* **34(10)**: 1535 - 1542 Review.
- Pestell, K. E., Hobbs, S. M., Kelland, L. R. & Walton, M. I. (2000) Effect of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line. *Mol. Pharmacol.* **57(3)**: 503 – 511

-
- Peters, J. H. & Baumgarten, H., (Eds.) (1992) Monoclonal Antibodies. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Petsko, G. A. (1995) Cancer chemotherapy. Heavy metal revival. *Nature* **377(6550)**: 580 – 581
- Pilch, D. S., Dunham, S. U., Jamieson, E. R., Lippard, S. J. & Breslauer, K. J. (2000) DNA sequence context modulates the impact of a cisplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link on the conformational and thermodynamic properties of duplex DNA. *J. Mol. Biol.* **296(3)**: 803 – 812
- Pluim, D., Maliepaard, M., van-Waardenburg, R. C., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. (1999) 32P-postlabeling assay for the quantification of the major platinum-DNA adducts. *Anal. Biochem.* **275(1)**: 30 – 38
- Poirier, M. C., Lippard, S. J., Zwelling, L. A., Ushay, H. M., Kerrigan, D., Thill, C. C., Santella, R. M., Grunberger, D. & Yuspa, S. H. (1982) Antibodies elicited against cis-diamminedichloroplatinum (II)-modified DNA are specific for cis-diamminedichloroplatinum (II) - DNA adducts formed *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6443 – 6447
- Poirier, M. C., Reed, E., Litterst, C. L., Katz, D. & Gupta-Burt, S. (1992) Persistence of platinum-ammine-DNA adducts in gonads and kidneys of rats and multiple tissues from cancer patients. *Cancer Res.* **52**: 149 – 153
- Poirier, M. C. (1993a) Antisera specific for carcinogen-DNA adducts and carcinogen-modified DNA: Applications for detection of xenobiotics in biological samples. *Mutat.-Research* **288**: 31 – 38
- Poirier, M. C., Reed, E., Shamkhani, H., Tarone, R. E. & Gupta-Burt, S. (1993b) Platinum drug-DNA interactions in human tissues measured by cisplatin-DNA enzyme-linked immunosorbent assay and atomic absorbance spectroscopy. *Environ. Health Perspect.* **99**: 149 – 154
- Raymond, E., Faivre, S., Woynarowski, J. M. & Chaney, S. G. (1998) Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin. Oncol.* **25(2 Suppl 5)**: 4 – 12
- Reed, E., Litterst, C. L., Yuspa, S. H. & Poirier, M. C. (1987) cis-Diamminedichloroplatinum (II)-DNA adduct formation in renal, gonadal, and tumor tissues of male and female rats. *Cancer Res.* **47**: 718 - 722
- Reed, E., Sauerhoff S., & Poirier M. C. (1988) Quantitation of platinum-DNA binding after therapeutic levels of drug exposure a novel use of graphite furnace spectrometry. *Atomic Spectroscopy* **9 (3)**: 93 – 95
- Reed, E., Gupta-Burt, S., Litterst, C. L. & Poirier, M. C. (1990a) Characterization of the DNA damage recognized by an antiserum elicited against cis-diamminedichloroplatinum (II)-modified DNA. *Carcinogenesis* **11 (12)**: 2117 – 2121
- Reed, E., Ostchega, Y., Steinberg, S. M., Yuspa, S. H., Young, R. C., Ozols, R. F. & Poirier M. C. (1990b) Evaluation of platinum-DNA adduct levels relative to known prognostic variables in a cohort of ovarian cancer patients. *Cancer Res.* **50 (8)**: 2256 – 2260
- Reed, E., Parker, R J., Gill, I., Bicher, A., Dabholkar, M., Vionnet, J. A., Bostick-Bruton, F., Tarone, R. & Muggia, F. M. (1993) Platinum-DNA adduct in leukocyte DNA of a cohort of 49 patients with 24 different types of malignancies. *Cancer Res.* **53 (16)**: 3694 – 3699
- Reed, E. (1998) Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* **24(5)**: 331 – 44

-
- Rosenberg, B., van Camp, L. & Krigas, T (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode *Nature* **205**: 698 – 699
- Runger, T. M., Emmert, S., Schadendorf, D., Diem, C., Epe, B. & Hellfritsch, D. (2000) Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide. *J. Invest.-Dermatol.* **114(1)**: 34 – 39
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samimi, G., Fink, D., Varki, N. M., Husain, A., Hoskins, W. J., Alberts, D. S. & Howell, S. H (2000) Analysis of MLH1 and MSH2 expression in ovarian cancer before and after platinum drug-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **6(4)**: 1415 – 1421
- Sancar, A. (1996) DNA excision repair. *Ann. Rev. Biochem.* **65**: 43 – 81
- Sasaki, T., Maeda, Y., Kobayashi, T., Okamoto, R., Omuro, Y. & Takada, N (2000) Standard chemotherapy for gastrointestinal malignancies based on evidence. *Gan To Kagaku Ryoho* **27(2)**: 166 – 176
- Sato, N., Mizumoto, K., Maehara, N., Kusumoto, M., Nishio, S., Urashima, T., Ogawa, T. & Tanaka, M. (2000) Enhancement of drug-induced apoptosis by antisense oligodeoxynucleotides targeted against Mdm2 and p21WAF1/CIP1. *Anticancer Res.* **20(2A)**: 837 – 842
- Schellens, J. H. M., Ma, J., Planting, A. S. Th., van der Burg, M. E. L., van Meerten, E., de Boer-Dennert, M., Schmitz, P. I. M., Stoter, G. & Verweij, J. (1996) Relationship between the exposure to cisplatin, DNA-adduct formation in leucocytes and tumour response in patients with solid tumours. *Br. J. Cancer* **73**: 1569 – 1575
- Schiebler, T., Peiper, U., & Schneider, Fr. (1986) *Histologie 2. Aufl.* Springer Verlag
- Seiler, F., Kirstein, U., Eberle, G., Hochleitner, K., Rajewsky, M. F. (1993) Quantification of specific DNA O-alkylation products in individual cells by monoclonal antibodies and digital imaging of intensified nuclear fluorescence. *Carcinogenesis.* **14 (9)**: 1907 – 1913
- Sekiguchi, I., Suzuki, M., Tamada, T., Shinomiya, N., Tsuru, S. & Murata, M. (1996) Effects of cisplatin on cell cycle kinetics, morphological change, and cleavage pattern of DNA in two human ovarian carcinoma cell lines. *Oncology* **53**: 19 – 26
- Seo, Y. R., Lee, S. H., Han, S. S. & Ryu, J. C. (1999) Effect of p53 tumor suppressor on nucleotide excision repair in human colon carcinoma cells treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **104(2)**: 157 – 164
- Sharp, S. Y., Smith, V., Hobbs, S. & Kelland, L. R. (1998) Lack of a role for MRP1 in platinum drug resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br. J. Cancer.* **78(2)**: 175 – 180
- Shiga, H., Heath, E. I., Rasmussen, A. A., Trock, B., Johnston, P. G., Forastiere, A. A., Langmacher, M., Baylor, A., Lee, M. & Cullen, K. J. (1999) Prognostic value of p53, glutathione S-transferase pi, and thymidylate synthase for neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* **5(12)**: 4097 – 4104
- Siddik, Z. H., Jones, M., Boxall, F. E. & Harrap, K. R. (1988) Comparative distribution and excretion of carboplatin and cisplatin in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **21**: 19 – 24

-
- Siu, L. L., Banerjee, D., Khurana, R. J., Pan, X., Pflueger, R., Tannock, I. F. & Moore, M. J. (1998) The prognostic role of p53, metallothionein, P-glycoprotein, and MIB-1 in muscle-invasive urothelial transitional cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **4(3)**: 559 – 65
- Smith, M. L., Ford, J. M., Hollander, M. C., Bortnick, R. A., Amundson, S. A., Seo, Y. R., Deng, C. X., Hanawalt, P. C. & Fornace, A. J. Jr (2000) p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol. Cell Biol.* **20(10)**: 3705 – 3714
- Smootenburg, G. F., De-Groot, J. C., Hamers, F. P. & Klis, S. F. (1999) Protection and spontaneous recovery from cisplatin-induced hearing loss. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **884**: 192 – 210
- Sorenson, C. M. & Eastman, A. (1988a) Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* **48**: 4484 – 4488
- Sorenson, C. M., Barry, M. A. & Eastman, A. (1990) Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 749 – 755
- Spitaler, M., Wiesenhofer, B., Biedermann, V., Seppi, T., Zimmermann, J., Grunicke, H. & Hofmann, J. (1999) The involvement of protein kinase C isoenzymes alpha, epsilon and zeta in the sensitivity to antitumor treatment and apoptosis induction. *Anticancer Res.* **19(5B)**: 3969 – 3976
- States, J. C. & Reed, E. (1996) Enhanced XPA mRNA levels in cisplatin-resistant human ovarian cancer are associated with XPA mutations or gene amplification. *Cancer Lett.* **108**: 233 – 237
- Stöcker, K., Stöcker, W., Ritter-Frank, Y. & Scriba, P. C. (1985) Chemically activated glass slides for frozen sections and their use in autoantibody diagnosis. *Acta Histochem. Suppl.* **31**: 283 - 294
- Sundquist, W. I., Lippard, S. J. & Stollar, B. D. (1987) Monoclonal antibodies to DNA modified with cis- or trans-diamminedichloroplatinum (II). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 8225 – 8229
- Szymkowski, D. E., Yarema, K., Essigmann, J. M., Lippard, S. J. & Wood, R. D. (1992) An intrastrand d (GpG) platinum crosslink in duplex M13 DNA is refractory to repair by human cell extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 10772 – 10776
- Terheggen, P. M. A. B., Floot, B. G., Scherer, E., Begg, A. C., Fichtinger-Schepman, A. M. J. & den Engelse, L. (1987) Immunocytochemical detection of interaction products of cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) with DNA in rodent tissue sections. *Cancer Res.* **47**: 6719 – 6725
- Terheggen, P. M., Dijkman, R., Begg, A. C., Dubbelman, R., Floot, B. G., Hart, A. A. & den Engelse, L. (1988) Monitoring of interaction products of cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine(1,1-cyclobutane-dicarboxylato)platinum(II) with DNA in cells from platinum-treated cancer patients. *Cancer Res.* **48**: 5597 – 603
- Terheggen, P. M. A. B., Emond, J. Y., Floot, B. G., Dijkman, R., Schrier, P. I., den Engelse, L. & Begg, A. C. (1990) Correlation between cell killing by cis-diamminedichloroplatinum(II) in six mammalian cell lines and binding of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-DNA antiserum. *Cancer Res.* **50**: 3556 – 3561
- Terheggen, P. M., Floot, B. G., Lempers, E. L., van Tellingen, O., Begg, A. C. & den Engelse, L. (1991a) Antibodies against cisplatin-modified DNA and cisplatin-modified (di)nucleotides. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **28**: 185-191

-
- Terheggen, P. M. A. B., Begg, A. C., Emond, J. Y., Dubbelman, R., Froot, B.G. & den Engelse, L. (1991b) Formation of interaction products of carboplatin with DNA in vitro and in cancer patients. *Br. J. Cancer.* **63**: 195 – 200
- Thomale, J., Hochleitner, K. & Rajewsky, M. F. (1994) Differential formation and repair of the mutagenic DNA alkylation product O⁶-Ethylguanine in transcribed and nontranscribed genes of the rat. *J. Biol. Chem.* **269**: 1681 – 1686
- Thomale, J., Seiler, F., Müller, M.R., Buschfort, C., Seeber, S. & Rajewsky, M. F. (1994) Repair of O⁶-alkylguanines in the nuclear DNA of human lymphocytes and leukaemic cells: analysis at the single cell level. *Br. J. Cancer* **69**: 698 - 705
- Tilby, M. J., Johnson, C., Knox, R. J., Cordell, J., Roberts, J. J. & Dean C. J. (1991) Sensitive detection of DNA modifications induced by Cisplatin and Carboplatin in vitro and in vivo using a monoclonal antibody. *Cancer Res.* **51**: 123 – 129
- Timmer-Bosscha, H., Mulder, N. H. & de Vries, E. G. (1992) Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance: a review. *Br. J. Cancer.* **66(2)**: 227 - 238 Review.
- Timmer-Bosscha, H., Timmer, A., Meijer, C., de Vries, E. G., de Jong, B., Oosterhuis, J. W. & Mulder, N. H. (1993) cis-diamminedichloroplatinum(ii) resistance in vitro and in vivo in human embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* **53(23)**: 5707 – 5713
- Treiber, D. K., Zhai, X., Jantzen, H.-M. & Essigmann, J. M. (1994) Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the ribosomal RNA transcription factor hUBF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 5672 – 5676
- Trimmer, E. E. & Essigmann, J. M. (1999) Cisplatin. *Essays Biochem.* **34**: 191 – 211
- Tsushima, K. & Sakata, Y. (1998) Treatment of recurrent gastric cancer *Gan To Kagaku Ryoho* **25(3)**: 321 – 326
- Ueda, K., Suzuki, H., Akiyama, S. & Sugiyama, Y. (1999) Differences in substrate specificity among glutathione conjugates (GS-X) pump family members: comparison between multidrug resistance-associated protein and a novel transporter expressed on a cisplatin-resistant cell line (KCP-4). *Jpn. J. Cancer Res.* **90(4)**: 439 – 47
- Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T. A., Risinger, J. I., Barrett, J. C., Hamilton, T. C. & Chaney, S. G. (1998) The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res.* **58(16)**: 3579 – 3585
- Vaisman, A. & Chaney, S. G. (2000) The efficiency and fidelity of translesion synthesis past cisplatin and oxaliplatin GpG adducts by human DNA polymerase beta. *J. Biol. Chem.* **275(17)**: 13017 – 13025
- Vaisman, A., Masutani, C., Hanaoka, F. & Chaney, S. G. (2000) Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta. *Biochemistry* **39(16)**: 4575 – 4580
- van Vuuren, A. J. (1995) Nucleotide Excision Repair: ERCC1 and TFIIH Complexes. Thesis Erasmus University Rotterdam, The Netherlands.

-
- Van de Vaart, P. J., Belderbos, J., de Jong, D., Sneeuw, K. C., Majoor, D., Bartelink, H. & Begg, A. C. (2000) DNA-adduct levels as a predictor of outcome for NSCLC patients receiving daily cisplatin and radiotherapy. *Int. J. Cancer* **89(2)**: 160 – 166
- Van Moorsel, C. J., Pinedo, H. M., Veerman, G., Bergman, A. M., Kuiper, C. M., Vermorken, J. B., van der Vijgh, W. J. & Peters, G. J. (1999) Mechanisms of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small-cell lung cancer cell lines. *Br. J. Cancer*. **80(7)**: 981 – 990
- Van Steeg, H., Mullenders, L. H. & Vijn, J. (2000) Mutagenesis and carcinogenesis in nucleotide excision repair-deficient XPA knock out mice. *Mutat.-Res.* **450(1-2)**: 167 – 180
- Vikhanskaya, F., D'Incalci, M. & Broggin, M. (2000) p73 competes with p53 and attenuates its response in a human ovarian cancer cell line. *Nucleic Acids Res.* **28(2)**: 513 – 519
- Visse, R. (1994) DNA Repair by Escherichia Coli Uvr ABC Endonuclease. Thesis University of Leiden, The Netherlands
- Wani, M. A., Zhu, Q. Z., El Mahdy, M. & Wani, A. A. (1999) Influence of p53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells. *Carcinogenesis* **20(5)**: 765 – 772
- Welters, M. J. P., Fichtinger-Schepman, A. M. J., Baan, R. A., Hermsen, M. A. J. A., van der Vijgh, W. J. F., Cloos, J. & Braakhuis, B. J. M. (1997) Relationship between the parameters cellular differentiation, doubling time and platinum accumulation and cisplatin sensitivity in a panel of head and neck cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **71**: 410 – 415
- Welters, M. J. P., Maliepaard, M., Jacobs-Bergmans, A. J., Baan, R. A., Schellens, J. H. M., Ma, J., van der Vijgh, W. J. F., Braakhuis, B. J. M. & Fichtinger-Schepman, A. M. J. (1997) Improved ³²P-postlabeling assay for the quantification of the major platinum-DNA adducts. *Carcinogenesis* **18(9)**: 1767 – 1774
- Welters, M. J., Braakhuis, B. J., Jacobs-Bergmans, A. J., Kegel, A., Baan, R. A., van der Vijgh, W. J. & Fichtinger-Schepman, A. M. (1999) The potential of platinum-DNA adduct determination in ex vivo treated tumor fragments for the prediction of sensitivity to cisplatin chemotherapy. *Ann. Oncol.* **10(1)**: 97 – 103
- Welters, M. J., Fichtinger-Schepman, A. M., Baan, R. A., Jacobs-Bergmans, A. J., Kegel, A., van der Vijgh, W. J. & Braakhuis, B. J. (1999) Pharmacodynamics of cisplatin in human head and neck cancer: correlation between platinum content, DNA adduct levels and drug sensitivity in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* **79(1)**: 82 – 88
- Yang, L. Y., Li, L., Jiang, H., Shen, Y. & Plunkett, W. (2000) Expression of ERCC1 antisense RNA abrogates gemcitabine-mediated cytotoxic synergism with cisplatin in human colon tumor cells defective in mismatch repair but proficient in nucleotide excision repair. *Clin. Cancer Res.* **6(3)**: 773 – 781
- Yano, M., Asahara, T., Dohi, K., Mizuno, T., Iwamoto, K. S. & Seyama, T. (1999) Close correlation between a p53 or hMSH2 gene mutation in the tumor and survival of hepatocellular carcinoma patients. *Int. J. Oncol.* **14(3)**: 447 – 451
- Yarema, K. J., Wilson, J. M., Lippard, S. J. & Essigmann, J. M. (1994) Effects of DNA adduct structure and distribution on the mutagenicity and genotoxicity of two platinum anticancer drugs. *J. Mol. Biol.* **236**: 1034 – 1048

-
- Yarema, K. J., Lippard, S. J. & Essigmann, J. M. (1995) Mutagenic and genotoxic effects of DNA adducts formed by the anticancer drug cis-diamminedichloroplatinum (II) *Nucleic Acids Res.* **23**: 20
- Yasumasu, T., Ueda, T., Uozumi, J., Mihara, Y., Koikawa Y. & Kumazawa J (1992) Ultrastructural alterations and DNA synthesis of renal cell nuclei following cisplatin or carboplatin injection in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **44 (11)**: 885 – 887
- Yen, L., Nie, Z. R., You, X. L., Richard, S., Langton-Webster, B. C. & Alaoui-Jamali, M. A. (1997) Regulation of cellular response to cisplatin-induced DNA damage and DNA repair in cells overexpressing p185(erbB-2) is dependent on the ras signaling pathway. *Oncogene.* **14(15)**: 1827 – 1835
- Yu, J. J., Lee, K. B., Mu, C., Li, Q., Abernathy, T. V., Bostick-Bruton, F. & Reed, E. (2000) Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int. J. Oncol.* **16(3)**: 555 – 560
- Zamble, D. B., Mu, D., Reardon, J. T., Sancar, A. & Lippard, S. J. (1996) Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry* **35**: 10004 – 10013
- Zeng-Rong, N., Paterson, J., Alpert, L., Tsao, M.-S., Viallet, J. & Alaoui-Jamali, M. A. (1995) Elevated DNA Repair Capacity is associated with intrinsic resistance of lung cancer to chemotherapy. *Cancer Res.* **55**: 4760 – 4764
- Zhen, W., Link, C. J. Jr., O'Connor, P. M., Reed, E., Parker, R., Howell, S. B. & Bohr, V. A. (1992) Increased gene-specific repair of cisplatin interstrand cross-links in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *Mol. Cell Biol.* **12**: 3689 – 3698
- Zhen, W., Evans, M. K., Haggerty, C. M. & Bohr, V. A. (1993) Deficient gene specific repair of Cisplatin-induced lesions in Xeroderma pigmentosum and Fanconi's anemia cell lines. *Carcinogenesis* **14 (5)**: 919 – 924

6 ANHANG

6.1 Geräte

FACS „FACSCalibur 750“	Steuerungsprogramm „CellQuest“ (Becton Dickinson)
Fluoreszenzmikroskop	„Axioplan“ (Zeiss) Objektiv „Plan-Neofluar“ 40fach / 0,75, (Zeiss) Quecksilberlampe „HBO 100 W“ (Zeiss) CCD Kamera „C4880“ (Hamamatsu)
Fluoreszenz-Reader	„ACAS 6.0“ Cytometry Analysis System (Ahrens Electronics) „FL 500“ (Bio-Tek Instruments) Steuerungsprogramm „FL 500 1.D.1“ (Bio-Tek Instruments)
Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer	„Liquid Scintillation Counter Wallac 1410“ (Pharmacia)
FPLC-Anlage (Pharmacia):	Kontrolleinheit „Liquid Chromatography Controller LCC 500“ Pumpen „Pump P 500“ UV-Durchflußphotometer „Single Path Monitor UV-1“, Flachbettschreiber „REC-1“, Fraktionssammler „Frac-100“ Injektionsventil „MV-7“, Peristaltikpumpe „P-1“ Schreiber „REC-481“
Gelkammer	„Mini-Protean II Gel-Kammer“ (Bio-Rad)
Heizblöcke:	„Thermomixer 5436“ (Eppendorf)
HPLC 1 (Waters)	Controller „600 S“ Gradientenpumpe „W 626“ 6-Wege Injektionsventil „Rheodyne 9125-080“ Photodiodenarray-Detektor „W 996“ Steuerungsprogramm „Millenium 2.1“
HPLC 2	„Solvent Module 126“ (Beckman Instruments Inc.) „Autosampler System Gold 507e“ (Beckman Instruments Inc.) Säulenofen „Waters Temperature Control Module“ (Waters) Detektor „Radiomatik 500TR“ (Canberra Packard) Steuerungsprogramm „FLO-ONE Analysis Vers. 3.55“ (Packard Instrument Co. Inc.)
Laser-Scan Mikroskop	„Axiovert 100“ (Zeiss) Steuer- und Auswertesystem „LSM 510“ (Zeiss)
Magnet	„MPC“ (Dynal)
Magnet-Heizrührer:	„IKA-COMBIMAG RCT“ (IKA Labortechnik) „IKAMAG® REO“ (IKA Labortechnik) „RCT basic“ (IKA Labortechnik)
Mikroplatten-Reader	„EL _x 800“ (Bio-Tek Instruments) Steuerungsprogramm „MikroWin 2.39“ (Bio-Tek Instruments)
Mikrotom	„2800 Frigocut“ (Reichert-Jung);
Multipette	„Proline 250“ (Biohit)
PCR-Gerät	„MJ Research PTC 200“ (Biozym)
Power Supplies:	„Bio-50 W“ (Genofit) „Electrophoresis Powersupply“ (Renner GmbH) „Gene Power Supply GPS 200/400“ (Pharmacia)
Speed Vac-Konzentrator	„Speed vac-Konzentrator“ (Savant) Kühlfalle „Refrigerated Condensation Trap RT 100“ (Savant) Vakuum Pumpe „High Vacuum Pump Model Serial“ (Edwards) Vorfilter „Model VPOF-100“ (Savant)
Spektralphotometer	„Modell 150-20“ (Hitachi);
Überkopfschüttler	„Rotator Drive STR4“ (Stuart Scientific)
Ultraschall-Desintegrator	„Sonifier B 12“ (Branson)
UV-Bestrahler	„Stratalinker 2400“ (Stratagenen)
UV –Transilluminator	(Bachmann)

Vortexer	„VF2“ (IKA Labortechnik)
Waagen:	Digitalwaage „AE 100“ (Mettler) Digitalwaage „440-45“ (Kern)
Wasserbäder:	„20 B“ (Julabo)
Zentrifugen:	„202 MK“ (Sigma) „Biofuge B“ (Heraeus Christ) „J-21B Centrifuge“ (Beckman) „Megafuge 1.0“ (Heraeus) „Minifuge T“ (Heraeus Sepatech) „Tisch-Zentrifuge 5412“ (Eppendorf)

6.2 Technisches Zubehör

Filter	0,2 µm Zellulose-Membran „MicronSep“ (Osmonics)
FPLC-Säulen	„HR 10/10“ (Pharmacia) mit „T-Gel Adsorbent“ (Pierce) „HiTrap Protein G“-Säule (Pharmacia)
Gelchromatographie-Säulen	„Bio-Spin 6“ (Bio-Rad) „HiPrep 26/10 Desalting“ (Pharmacia)
HPLC-Säulen	C ₁₈ -Säule „Inertsil ODS-80 A“ (Phase Separations BV) C ₁₈ -Säule „Nova-Pak C18“ (Waters) MaDynabeads M 450 – Lsg. (29 mg/ml = 4*10 ⁸ Beads/ml; Dynal)
Mikrotiterplatte	„Maxisorp“ (Nunc) „Nunclon“ (Nunc)
Kationenaustauscher	„LiChrolut SCX“ (Merck)
Konzentratoren	„Centricon-100“ (Amicon) „Ultrafree 15“ (Millipore) „Ultrafree MC 30.000“ (Millipore)
Nitrozellulose-Membran	„BA 85“ (Schleicher & Schuell)
Objektträger	„Lab-Tek Chamber Slides 115 45 34“ (Nunc)
Sterilfilter-Tips (Biozym)	
Zellkulturflaschen (Nunc)	

6.3 PC-Programme

„C-Design“ (FoBasoft)
 „Oligo 4.1“ (National Biosciences)
 „Power Point“ (Microsoft)
 „Sigma Plot 4.0“ (Jandel Scientific)
 Steuerungsprogramme siehe Geräte
 „Word 97“ (Microsoft).

6.4 Chemikalien

Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen, mit Ausnahme von:
 Adjuvans „MPL / TDM“ (Sigma)
 Agarose (Biozym)
 Aminopropyl-triethoxysilan (Sigma)
 Blockprotein „Rad-Free“ (Schleicher & Schuell)
 BSA-Maßlösung (Pierce)
 Chloroform (Baker)
 Cisplatin „Platinex“ (Bristol Arzneimittel GmbH)
 dApdG (Sigma)
 dATP, dCTP, dGTP, dTTP-Gemisch für PCR (Amersham Pharmacia Biotech)
 dGpdG (Sigma)
 DEAE-Dextran (Amersham Pharmacia Biotech)
 Diethanolamin (Sigma)
 Eindeckmittel „Entellan“ (Merck)
 Ethidiumbromid (Serva)
 Geneticin „G418“ (Sigma)

Glutardialdehyd (Sigma)
 Heparin (Novo Nordisk)
 Kalbsthymus-DNA (Roche)
 MTT (Sigma)
 Nitrophenyl-Phosphat „PNP“ (Sigma)
 Polyethylen Glykol (Sigma)
 Cisplatin-Maßlösung „Titrisol“ (Merck)
 Propidiumjodid (Sigma)
 Scintillations-Flüssigkeit „Ready-Safe“ (Beckman)
 Stärkelösung „HAES-steril“ (Fresenius)
 TEMED (Bio-Rad)
 Tween 20 (Sigma)
 Eindeckmittel „Vectashield“ (Vector)

6.5 Radiochemikalien

5' γ - ^{32}P – ATP (Amersham Pharmacia Biotech)

6.6 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung von Puffern und Lösungen ist im Experimentellen Teil beschrieben

6.7 Kits

DNA-Isolierung	„DNeasy Kit“ (Qiagen)
DNA-Quantifizierung	„SYBR Green I“ (Molecular Probes).
Lymphozytenisolierung	„Mouse pan T (Thy 1.2)“ (Dyna)
Lymphozytenisolierung	„CD 2 Cellaction Kit“ (Dyna)
„Mycoplasma Detection Kits“ (Roche)	
Olinukleotidquantifizierung	„Oli-Green“ (Molecular Probes)
Proteinquantifizierung	„Bio-Rad-Protein-Assays“ (Bio-Rad)

6.8 Molekulargewichtsstandards

DNA Größen-Standards	„GeneRuler 50 bp, 100 bp bzw. 1 kb DNA Ladder“ (MBI)
Proteinmolekulargewichts-Standards	„BenchMark Protein Ladder“ (Gibco)

6.9 Enzyme

AccuTherm-Polymerase (GeneCraft)
 Alkalischer Phosphatase (Roche)
 DNA-Polymerase I (Roche)
 Nuklease P1 (Roche)
 Pepsin (Roche)
 Proteinase K (Merck)
 RNase A (Roche)
 RNase T1 (Roche)
 T 4 Polynukleotidkinase (Rochel)

6.10 Antikörper

„ALEXA FLUOR 488“-Kaninchen IgG anti-(FITC) (Molecular Probes)
 „ALEXA FLUOR 488“-Ziege anti-(Kaninchen IgG (H+L)) (Molecular Probes)
 Alkalische Phosphatase - Ziege anti-(Ratte- [IgG + IgM (H + L)]) (Dianova)
 Cy3 - Ziege anti-(Ratte-[IgG + IgM (H + L)]) (Dianova)
 FITC-Ziege IgG F(ab')₂ anti-(Ratte [IgG + IgM (H+L)]) (Dianova)
 Isotyp-spezifische Maus anti-(Ratte-[F_c]) anti-[IgG 1]-, anti-[IgG 2A]-, anti-[IgG 2B]-, anti-[IgG 2C]- und anti-[IgM]-MAK (Sigma)
 Ziege anti-(Maus-[IgG + IgM (H + L)]) (Dianova)

6.11 Nukleinsäuren

MWG Biotech:

Nr. 1 5' TCC CTC CTT CCT TCC **GG** CCC TCC TTC CCC TTC 3'

Nr. 2 5' TCC CTC CTT CCT TCC **AG** CCC TCC TTC CCC TTC 3'

Nr. 3 5' CTC **GGC** TCG **GCT CCG** CTC **GGC** TC 3'

Nr. 4 5' CTC **AGC** TCA **GCT CAG** CTC **AGC** TC 3'

6.12 PCR-Primer

MWG Biotech:

Primer A (Oberer Primer: Wild-Typ)

5' GTG GGT GCT GGG CTG TCT AA 3'

Primer B (Unterer Primer: Wild-Typ / Knockout)

5' ATG GCG TGG GTT CTT CTT C 3'

Primer C (Oberer Primer: Knockout):

5' ATG GCC GCT TTT CTG GAT TC 3'

6.13 Zell-Linien & Nährmedien

Zell-Linien und Nährmedien sind im Experimentellen Teil beschrieben

6.14 Versuchstierstämme

Versuchstierstämme sind im Experimentellen Teil beschrieben

6.15 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ci	Curie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	Doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
h	Stunde(n)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
kb	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton(s)
KT	Kalbsthymus
MAK	Monoklonaler Antikörper
mRNA	Boten-RNA
MW	Molekulargewicht
NC	Nitrozellulose
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
nm	Wellenlänge in Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
s	Sekunde(n)
ss	Einzelsträngig
SSC	Standard Salz-Lösung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T	Thymin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Relative Enzym-Einheit
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
XP	Xeroderma pigmentosum

Danksagung

Herrn PD. Dr. Jürgen Thomale (IFZ) danke ich für seine wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung, insbesondere aber für das Vertrauen, daß er in das Projekt und in mich gesetzt hat.

Herrn Prof.Dr. Siegfried Seeber (Innere Klinik, Tumorforschung) danke ich für sein fortwährendes Interesse am Fortschritt dieser Studie und für die großzügige Förderung, die er dieser Arbeit zukommen ließ.

Herrn Prof. Dr. Joachim Boos (Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde -Pädiatrische Hämatologie / Onkologie- Universität Münster) danke ich für die völlig uneigennützigte Hilfe, die er dem Projekt zukommen ließ, selbst als klar war, daß es auswandern und in Essen beheimatet sein würde.

Ich danke allen Kollegen der Forschergruppe „Tumorselektive Therapie und Therapie-resistenz: Grundlagen und Klinik“ für ihr Interesse und ihre Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt meiner technischen Mitarbeiterin Frau Beate Karow (IFZ). Ohne ihre methodische Erfahrung, ihren unermüdlichen Eifer und ihren ordnenden Überblick wäre manches Experiment gescheitert.

Ich danke den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen I und V des IFZ für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke der Bibliothekarin Christa Wartchow (Innere Klinik, Tumorforschung), deren Sachkenntnis, vor allem aber deren Hilfsbereitschaft mich immer wieder beschämt hat.

Ich danke Inge Spratte (IFZ) für ihre Unterstützung in der Zellkultur und Kerstin Heise (IFZ) für die Anfertigung der Kryoschnitte.

Dank an Dr. Susanne Koeppen und Dr. Volker Limmroth (Klinik und Poliklinik für Neurologie) für die Zusammenarbeit im Rahmen unserer Studie zur *Cisplatin*-induzierten Polyneuropathie.

Dank an Dr. Udo Vanhoeve und seine Gruppe (Innere Klinik, Tumorforschung) für die Zusammenarbeit im Rahmen unserer Magenkarzinomstudie.

Dr. Hermann Lage (Institut für Pathologie, Charite, Berlin) danke ich für die Überlassung der MeWo und Ovariakarzinomzellen.

Dr. Marc Maliepaard und Dick Pluim (Departments of Experimental Therapy, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) danke ich für die angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen des Postlabelling Assays.

Prof. K. Tanaka (Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University, Osaka, Japan) danke ich für die Überlassung der XPA-Knockout-Mäuse.

Prof. L. Mullenders (Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis-MGC, Leiden University Medical Center, The Netherlands) danke ich für die Überlassung der XPC-Knockout-Mäuse.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Molekulare Dosimetrie Platin-induzierter DNA-Läsionen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Liedert befürworte.

Essen, den

PD. Dr. J. Thomale

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

Bernd Liedert

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den

Bernd Liedert

Bernd Liedert
Walter Homann Str. 9
45 128 Essen

Lebenslauf

Geburt: 6. März 1961 in Gelsenkirchen
Eltern: Jürgen Liedert, Tiefbauingenieur, geb. am 24.4.1931 in Königsberg
Ruth Liedert geb. Hawlitzky, Sekretärin, geb. am 15.3.1933 in Berlin

Schulbesuch:

1967 bis 1971 Pfefferackerschule, Gelsenkirchen-Buer
1971 bis 1975 Max-Planck-Gymnasium, Gelsenkirchen-Buer
1975 bis 1981 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Marl
Allgemeine Hochschulreife am 10.6.1981

Studium:

1985 bis 1992 Studium der Biologie und Chemie an der WWU Münster
25.11.1987 Abschluß des Biologiestudiums mit dem Vordiplom
28.7.1992 Abschluß des Chemiestudiums mit der Diplom-Hauptprüfung
1994 Beginn der Promotion mit dem Thema "Tumorbiologische
Prognosefaktoren bei Bronchialkarzinomen: Molekulare Dosimetrie
Chemotherapie-induzierter Platin-DNA Addukte" am Institut für
Zellbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen