

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

der Medizinischen Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. med. B. Wollenberg

Bedeutung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur

für die Cisplatin-induzierte Chemoresistenz

von Plattenepithelkarzinomen

im Kopf-Hals-Bereich

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Claudia Ditz

aus Waldbröl

Lübeck 2007

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Ingo Kausch-Blecken von Schmeling

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2007

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.12.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Die selbstständige Anfertigung versichere ich an Eides statt.

Lübeck, den _____
(Datum)

(Claudia Ditz)

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	VI
2	Einleitung	1
2.1	Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC)	1
2.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Prognose	1
2.1.2	Klinische und histopathologische Einteilung	2
2.1.3	Limitation derzeitiger Therapien	3
2.2	Chemotherapeutische Erfolge bei metastasierenden Testistumoren	4
2.3	Cisplatin	6
2.3.1	Intrazelluläre Aktivierung und Wirkmechanismus	6
2.3.2	Mechanismen der Cisplatin-Chemoresistenz	8
2.3.2.1	Veränderungen des intra- und extrazellulären Transports	10
2.3.2.2	Intrazelluläre Entgiftung durch Glutathion und Metallothionein	11
2.3.2.3	Verminderte Platin-DNA-Adduktbildung	12
2.3.2.4	Veränderungen in der Reparaturkapazität der Zellen	12
2.3.2.5	Defekte in proapoptotischen Signalwegen	14
2.4	Molekulare Faktoren für die Cisplatinsensitivität von Testistumoren	15
2.5	Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)	19
2.6	RNA-Interferenz (RNAi)	22
2.6.1	Mechanismus der Genregulation mittels RNAi	22
2.6.2	Intrazelluläre Prozessierung von dsRNA	23
2.7	Stand der Forschung	25
2.8	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	27
3	Materialien.....	29
3.1	Verwendete Laborgeräte	29
3.2	Verbrauchsmaterialien	30
3.3	Chemikalien und Farbstoffe	31
3.4	Puffer und Lösungen	33
3.5	Zellkulturmedien und Zusätze	34
3.6	Verwendete Zelllinien	34

3.7	Tumorproben	36
3.8	Primer und QuantiProbe-Sonden	38
3.9	Komplette Kits	39
3.10	DNA-Längenmarker	39
3.11	Antikörper	39
3.11.1	Primäre Antikörper	39
3.11.2	Sekundäre Antikörper	40
3.12	siRNAs und Transfektionsreagenzien	40
3.13	Computer und Software	41
4	Methoden	42
4.1	Zellkulturarbeiten	42
4.1.1	Anzucht der Zellen	42
4.1.1.1	Mediumwechsel	43
4.1.1.2	Subkultivierung der Zellen	43
4.1.2	Bestimmung der Zellzahl	44
4.1.3	Einfrieren von Zellen	44
4.1.4	Auftauen von eingefrorenen Zellen	45
4.2	Archivieren von Tumorgewebeproben	45
4.3	MTT-Zytotoxizitäts-Assay	45
4.4	RNA-Isolierung	47
4.4.1	RNA-Isolierung aus Zellkulturen	48
4.4.2	RNA-Isolierung aus Gewebeproben	49
4.4.3	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	49
4.4.4	Agarosegelelektrophorese	50
4.5	Genexpressionanalyse auf mRNA-Ebene mittels One-Step „real-time“ RT-PCR	52
4.5.1	Allgemeines Prinzip der quantitativen „real-time“ PCR	52
4.5.1.1	Verwendete Detektionsmethode	53
4.5.1.2	Funktionsweise der One Step “real-time” RT-PCR	55
4.5.2	Primerdesign	57
4.5.3	DNA-Amplifikation mit dem LightCycler™-System	58
4.5.3.1	Programmierung des LightCyclers™	58
4.5.3.2	Vorbereitung des PCR-Ansatzes und Quantifizierungs-PCR auf	

	dem LightCycler™	60
4.5.4	Gelelektrophorese der PCR-Produkte	62
4.5.5	Auswertung der PCR-Ergebnisse mittels relativer Quantifizierung	63
4.5.5.1	Normalisierung der Expressionsergebnisse anhand eines Referenz- gens	64
4.5.5.2	Erstellung der Standardkurven	65
4.6	Western Blot-Analyse	67
4.6.1	Proteinisolierung	67
4.6.1.1	Proteinisolierung aus Zellen	67
4.6.1.2	Proteinisolierung aus Gewebe	67
4.6.1.3	Photometrische Messungen der Proteinkonzentration	68
4.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	69
4.6.3	Protein-Transfer mit dem Semi-Dry-Verfahren	70
4.6.4	Spezifischer Nachweis von Proteinen durch monoklonale Antikörper ...	71
4.7	„Gene Silencing“ durch siRNA	72
4.7.1	Transfektion von humanen Zelllinien	72
4.7.2	Optimierung der Transfektionseffizienz	73
4.7.3	Auswertung der Transfektionsergebnisse	74
4.7.4	Chemosensibilisierungsversuche durch „Gene-Silencing“ mittels siRNA	74
4.8	Fluoreszenzmikroskopie	75
4.9	Durchflusszytometerische Messungen	75
4.9.1	Aufbau und Prinzip des Durchflusszytometers	76
4.9.2	Vorbereitung und Messung der Proben	77
4.9.3	Auswertung der Proben	78
4.10	Fehlerbetrachtung der Versuchsergebnisse	80
5	Ergebnisse	81
5.1	Charakterisierung der untersuchten Zelllinien	81
5.1.1	Wachstumsverhalten der Zelllinien unter Cisplatinbehandlung	81
5.1.1.1	Bestimmung der IC ₅₀ , IC ₉₀ und des Resistenzgrades (RT)	81
5.1.1.2	Vergleich der Cisplatinresistenz von Testistumor- und HNSCC- Zelllinien	87
5.1.2	Analyse der XPF- und ERCC1-mRNA-Expression der Zelllinien	88

5.1.3	Analyse der XPA- und XPF- und ERCC1-Protein-Expression der Zelllinien	91
5.1.4	Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Expression der Zelllinien	96
5.1.5	Korrelation zwischen NER-Expression und Cisplatinresistenz (IC ₉₀) der Zelllinien	96
5.2	Charakterisierung der Tumorproben	98
5.2.1	Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten	98
5.2.2	Tumorstadien und histopathologische Einteilung	100
5.3	Differentielle Expression von NER-Genen in HNSCC- und Testistumorgewebeproben	102
5.3.1	Analyse der ERCC1- und XPF- mRNA-Expression	102
5.3.2	Analyse der XPA-, XPF- und ERCC1-Protein-Expression	105
5.3.3	Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Expression der Tumorgewebeproben	109
5.4	Transfektion von humanen Zelllinien mit siRNA	110
5.4.1	Bestimmung der Transfektionseffizienz	110
5.4.2	Nachweis des spezifischen „Knock-downs“ der NER-Gen-Expression im Western Blot	114
5.4.3	Chemosensibilisierung von cisplatinresistenten SKOV-3 Zellen durch RNAi	116
6	Diskussion.....	118
6.1	Erhöhte in vitro Cisplatinresistenz von HNSCC-Zelllinien	118
6.2	Expression von NER-Genen in HNSCC- und Testistumorzelllinien und -Gewebeproben	122
6.2.1	Erhöhte XPF-Protein-Expression in HNSCC-Zelllinien	122
6.2.2	NER-Expression in Testistumorzelllinien	123
6.2.3	Die XPF-Protein-Expression korreliert mit der Cisplatinresistenz bzw. -sensibilität der Zelllinien	124
6.2.4	Fehlende Korrelation zwischen der mRNA- und Protein-Expression von NER-Genen	125
6.2.5	NER-Expressionsunterschiede zwischen TGCT- und HNSCC-	

	Primärtumorgewebeproben	128
6.2.6	Erhöhte NER-Expression in HNSCC-Metastasengewebe	129
6.2.7	Mehrbandige Migration von XPA und XPF im Western Blot	130
6.2.8	Schlussfolgerungen der NER-Expressionsanalysen	132
6.3	Steigerung der in vitro-Cisplatinempfindlichkeit durch gezielte Hemmung der NER mittels siRNA	134
6.4	Ausblick	136
7	Zusammenfassung	138
8	Literaturverzeichnis	139
9	Danksagung	152
10	Lebenslauf	153

1 Abkürzungsverzeichnis

Die geläufigen Maßeinheiten und Abkürzungen werden als bekannt vorausgesetzt. Die Abkürzungen der verwendeten Chemikalien und Versuchsreagenzien sind in Kapitel 3 erklärt.

Abb.	Abbildung
ABC	engl.: ATP binding cassette
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Entionisiertes Wasser
ATCC	engl.: American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP7A, ATP7B	ATP-abhängige Kupferexportproteine
β-HCG	Humanes Choriongonadotropin Beta
Bax, Bcl-2, Bcl-xL	apoptosesteuernde Proteine
BEP-Schema	Polychemotherapie mit den Zytostatika Bleomycin, Etoposid und Cisplatin
BLAST	engl.: Basic local alignment search tool
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CP	engl.: Crossing point
C _T	engl.: Cycle treshold
Ctr1p	engl.: High-affinity copper transporter 1
DIC	engl.: Differential interference contrast microscopy
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
E. coli	lat.: Escherichia coli
ERCC1	engl.: Homo sapiens excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
et al.	lat.: et alii (und andere)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FACS	engl.: Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	engl.: Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gravitationsbeschleunigung
G	Guanin
GFP	engl.: Green fluorescent protein
gi	engl.: GenInfo Identifier
hMSH2, hMutSα, hMutSβ	Proteine des MMR-Systems

HNSCC	engl.: Head and neck squamous cell carcinoma
HPRT-1	Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase 1
HPV	Humane Papillomviren
hVHF	Humane Vorhautfibroblasten
IC ₅₀	halbmaximale wachstumsinhibierende Konzentration
IC ₉₀	90 %ige wachstumsinhibierende Konzentration
IgG _{xy}	Immunglobulin (Typ _{xy})
INF	Interferon
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
MDR	engl.: Multidrug resistance
MMR	engl.: Mismatch repair
mRNA	engl.: messenger-RNA
MRP2	engl.: Multidrug resistance related protein 2
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche, Stichprobenmenge
n. b.	nicht bestimmt
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
n. s.	nicht signifikant
NSGCT	engl.: Non-seminomatous germ cell tumors
OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p53	apoptoseförderndes Protein 53
p73	apoptoseförderndes Protein 73
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pat. Nr.	Patientennummer
PCR	engl.: Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
pH	lat.: Pondus hydrogenii
PI	Propidiumjodid
Pt	Platin
PT	Primärtumor
PTGS	engl.: Posttranscriptional gene silencing
r	Korrelationskoeffizient
Rez.	Rezidiv
RF	Resistenzfaktor
RISC	engl.: RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SD	Standardabweichung
siRNA	engl.: Small interfering RNA
SSC	engl.: Sideward scatter (Seitwärtsstreulicht)
Taq	lat.: Thermus aquaticus
TGCT	engl.: Testicular germ cell tumors
Tm	engl.: Melting temperature
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
UICC	franz.: Union International Contre Cancer

UV	Ultraviolett
WHO	engl.: World Health Organisation
XPA	engl.: Homo sapiens xeroderma pigmentosum, complementation group A
XPF	engl.: Homo sapiens xeroderma pigmentosum, complementation group F

Weitere Abkürzungen sind an gegebender Stelle im Text erklärt.

2 Einleitung

2.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC)

2.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognose

Maligne Tumoren im Kopf-Hals-Bereich liegen weltweit an sechster Stelle unter den am häufigsten auftretenden Neoplasien. Mehr als 90 % dieser Tumoren sind verhornende oder nicht-verhornende Plattenepithelkarzinome (HNSCC) (Parkin et al., 1999b). Die Prävalenz von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches nimmt weltweit zu (Mashberg, 1993). In den westlichen Industrienationen werden jährlich 80.000 HNSCC-Neuerkrankungen diagnostiziert (Parker et al., 1996), bei einer weltweiten Inzidenz von über 500.000 Fällen (Vokes et al., 1993). Das Manifestationsalter beträgt im Durchschnitt 60 +/- 15 Jahre, wobei Männer derzeit noch dreimal so häufig betroffen sind wie Frauen (Parkin et al., 1999a; Sankaranarayanan et al., 1998). Ätiologisch gelten neben genetischen Faktoren (Copper et al., 1995; Foulkes et al., 1996) vor allem chronischer Tabak- und Alkoholkonsum als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von HNSCC (Decker and Goldstein, 1982; Lewin et al., 1998). Als ebenfalls beteiligte Faktoren werden Stäube sowie Noxen aus dem beruflichen Bereich, Viren und Ernährungsfaktoren diskutiert. Für oropharyngeale Plattenepithelkarzinome konnte eine ätiologische Beziehung zu Hochrisiko-Typen von HPV 16 und 18 nachgewiesen werden (Gillison et al., 2000; Mellin et al., 2000; Paz et al., 1997). Die 5-Jahres-Überlebensrate von HNSCC-Patienten liegt in Abhängigkeit von Tumorlokalisation und -stadium (Vokes et al., 1993) zwischen 10 und 60 % und hat sich in den vergangenen 30 Jahren, trotz Einführung sensitiverer diagnostischer Methoden, verbesserter chirurgischer Techniken und der Verfügbarkeit neuartiger Chemotherapeutika sowie radiologischer Methoden, nicht signifikant verbessert (Greenlee et al., 2001). Zu den prognoselimitierenden Faktoren gehören die hohe lymphogene Metastasierungstendenz, die Lokalrezidivneigung (Leemans et al., 1994) und das häufige Auftreten von Zweitkarzinomen. Fernmetastasen treten relativ selten, meist erst bei weit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen auf und betreffen hauptsächlich die Lunge (Jones et al., 1995).

2.1.2 Klinische und histopathologische Einteilung

Bei Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes unterscheidet man nach ihrer Lokalisation Tumoren des Kehlkopfes, des Rachens (Oro-, Hypo- und Nasopharynx), der Mundhöhle und der Nasenhaupt- bzw. -nebenhöhlen. Sie entwickeln sich vorwiegend über eine Reihe klinisch und histopathologisch definierter Stadien, von normalem Epithel zu Dysplasien wie der Leukoplakie über das Carcinoma in situ zum invasiven Karzinom mit der Potenz der Metastaseninduktion (Chin et al., 2004). Die erwähnten exogenen chemischen Noxen begünstigen dabei bei langdauernder Einwirkung Epithelreaktionen im Sinne einer Hyperplasie und Hyperkeratose, die schließlich zu einer Epitheldysplasie führen können. Eine maligne Transformation kann allerdings auch in nicht dysplastischem Epithel stattfinden. Je nach histologischer Differenzierung der Tumorzellen werden Karzinome in verschiedene Grade eingeteilt, die Aufschluss über die Malignität des Tumors geben:

- G1 (gut oder hochgradig differenziert)
- G2 (mäßig oder mittelgradig differenziert)
- G3 (schlecht oder wenig differenziert)
- G4 (un- oder entdifferenziert)

Die Klassifikation der Tumorstadien zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erfolgt nach dem international anerkannten TNM-System der UICC (franz.: „Union International Contre Cancer“) und beschreibt die Größe des Primärtumors (zunehmend von T1 bis T4), das Ausmaß der lymphogenen Metastasierung (zunehmend von N0 bis N3) und das Auftreten von Fernmetastasen (M0 oder M1). In Abhängigkeit dieser Tumorstadien erfolgt die prognostische Einteilung der Karzinome in vier Schweregrade (Tab. 2-1).

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IV A	T4	N0, N1	M0
	jedes T	N2	M0
Stadium IV B	jedes T	N3	M0
Stadium IV C	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 2-1: UICC-Stadieneinteilung bei HNSCC

2.1.3 Limitation derzeitiger Therapien

HNSCC werden aufgrund der relativ spät auftretenden Symptome häufig erst in fortgeschrittenen Tumorstadien (III und IV) diagnostiziert. Standardtherapie für die meisten Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich ist die chirurgische Entfernung des Tumors, die in Abhängigkeit von Tumorstadium und Allgemeinzustand des Patienten mit einer adjuvanten Chemo- bzw. Strahlentherapie kombiniert wird. Die lokalen Behandlungsmöglichkeiten haben mittlerweile ihre Grenzen erreicht und bleiben, selbst in Kombination mit anderen Therapiemodalitäten, suboptimal für Patienten im Stadium III und IV. So sinkt die Wahrscheinlichkeit auf Heilung mit steigender Größe des Primärtumors und bei Metastasierung in die regionalen Lymphknoten (Thekdi and Ferris, 2002; Vikram, 1998). Während HNSCC im Stadium I häufig heilbar sind und die 5-Jahres-Überlebensrate 90 % übersteigt, liegt die Überlebensrate im Stadium III-IV (70 % der Patienten bei der Erstvorstellung) bei ca. 30 %. Radiochemotherapie mit dem Zweck der Organerhaltung wird seit einem Jahrzehnt erfolgreich angewendet. Hierdurch können entstellende Resektionen und Organdysfunktionen, hervorgerufen durch eine chirurgische Behandlung, vermieden werden (Vikram et al., 1984b). Die Einführung dieser Behandlungsmodalitäten hatte jedoch, bedingt durch die hohe Rate an Tumorrezidiven und Zweitkarzinomen, keinen Einfluss auf die Überlebensraten der Patienten (Vikram et al., 1984a). Trotz beeindruckender initialer Reaktionsraten eine auf Cisplatin-Chemotherapie alleine oder in Kombination mit anderen Substanzen wie Carboplatin oder 5-Fluorouracil, sind

dauerhafte Behandlungserfolge durch eine rapide Resistenzentwicklung der Tumorzellen limitiert.

2.2 Chemotherapeutische Erfolge bei metastasierenden Testistumoren

Chemotherapie kann bei metastasierten Tumorleiden den Tod hinauszögern. Eine Heilung solider metastatischer Tumore bei Erwachsenen durch Chemotherapie, selbst in Kombination mit Chirurgie und Strahlentherapie, wird jedoch selten erreicht. Einige Metastasen von häufig vorkommenden Tumoren wie Lungen-, Ovarial-, Brust- und Magenkarzinomen reagieren zwar zunächst auf chemotherapeutische Maßnahmen, der Einfluss der Therapie auf das Überleben der Patienten ist jedoch klein oder nicht bestätigt. Häufig erleiden die Patienten Rezidive, wobei die Tumoren Resistenzen gegen die eingesetzten Chemotherapeutika entwickeln. Daneben finden sich einige wenige Tumorentitäten, bei denen nachhaltige Erfolge durch eine chemotherapeutische Behandlung erzielt werden können. So sind z.B. akute lymphatische Leukämien (ALL) des Kindesalters, bestimmte Lymphome und testikuläre Tumoren potentiell durch Chemotherapie heilbar. Mit der Einführung von Cisplatin Mitte der 70er Jahre bei der Behandlung von testikulären Keimzelltumoren (TGCT, engl.: „Testicular Germ Cell Tumors“) hat sich die Prognose dieser Tumoren dramatisch verbessert (Einhorn and Donohue, 1977). Aufgrund der ausgesprochenen Chemosensitivität können heute über 80 % der Patienten mit metastasierenden TGCT dauerhaft geheilt werden (Einhorn, 2002). Testikuläre Keimzelltumoren gelten daher als Modell einer kurativen Tumorerkrankung. TGCT stellen mit einer Inzidenz von ca. 10/100.000 pro Jahr zwar eine relativ seltene Tumorentität dar, jedoch nehmen sie in ihrer Häufigkeit in den letzten Jahren kontinuierlich zu. Sie betreffen Männer mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr und repräsentieren den häufigsten soliden Tumor in dieser Altersgruppe (Bosl and Motzer, 1997). TGCT leiten sich von den Keimzellen des Hodens ab und bilden mit ca. 85-90 % die Mehrzahl aller Hodentumoren. Sie werden histopathologisch in sog. Seminome und Nichtseminome unterteilt, wobei letztere wiederum mehrere

histologische Untertypen wie Embryonales Karzinom, Chorionkarzinom, Dottersacktumor, Teratom oder Polyembryom umfassen. Seminome zeigen eine Hypersensitivität gegenüber Radiatio und Chemotherapie, wohingegen die Gruppe der Nichtseminome zwar eine hohe Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika aufweist, jedoch wenig empfindlich auf Strahlentherapie reagiert. Seminome und Nichtseminome kommen anteilmäßig in etwa gleich häufig vor. Nichtseminöse TGCT treten häufig als Misch- oder Kombinationstumoren bestehend aus undifferenzierten und differenzierten Anteilen auf. Ca. 10-15 % der TGCT sind sog. kombinierte Tumoren, die aus seminösen und nichtseminösen Anteilen bestehen.

Die Stadieneinteilung der TGCT erfolgt nach der TNM-Klassifikation der UICC oder in Abhängigkeit von der Metastasenausdehnung nach der Lugano-Klassifikation (Cavalli et al., 1980), bei der zwischen den klinischen Stadien I bis III unterschieden wird (Tab. 2-2). Als Therapieoptionen stehen neben der Orchiektomie des befallenen Hodens ggf. auch die Strahlentherapie, Chemotherapie oder Metastasen Chirurgie zur Verfügung. Das Behandlungskonzept und die Wahl bzw. die Kombination der Therapieformen richtet sich nach der Tumorausdehnung, der histologischen Einteilung und weiteren Prognosefaktoren wie beispielsweise der Konzentration der Tumormarker AFP, β -HCG und LDH im Serum oder der Metastasenlokalisation. Die Therapie erfolgt standardisiert nach den Leitlinien wissenschaftlicher Fachgesellschaften (Bamberg et al., 1997; Krege et al., 2001). Neben den optimalen multimodalen Therapieverfahren hat vor allem die cisplatinbasierte Chemotherapie die Heilungsrate der TGCT enorm verbessert (Bohlen et al., 1999; Einhorn, 1981). Vor der Therapieeinführung von Cisplatin lag die Überlebenschance von TGCT-Patienten bei nur ca. 45 %. Das heutige Standard-Chemotherapier regime basiert auf der Applikation von Cisplatin in Kombination mit Etoposid und Bleomycin (sog. BEP-Schema) und führt bei über 90 % der behandelten Patienten zu einer kompletten Tumorremission (de Wit, 1999; Nichols, 2001; Williams et al., 1987). Erkenntnisse über die molekularen Ursachen der Cisplatinempfindlichkeit von metastatischen Testistumoren könnten dazu beitragen, neue therapeutische und diagnostische Ansätze für HNSCC und andere Tumorerkrankungen zu entwickeln, bei denen therapeutische Erfolge durch das Auftreten von chemoresistenten Tumorzuständen limitiert werden.

Stadium I	Tumormarker nach Orchiektomie normal oder mit kinetiktgerechtem Abfall Bildgebende Diagnostik ohne Metastasennachweis Primärtumor auf den Hoden begrenzt
Stadium IIA	Retroperitoneale Metastasen < 2 cm
Stadium IIB	Mindestens eine retroperitoneale Metastase 2-5 cm
Stadium IIC	Retroperitoneale Metastasen > 5 cm
Stadium IIIA	Supraklavikuläre oder mediastinale Lymphknoten-Metastasen
Stadium IIIB	Lungenparenchymmetastasen Minimal: < 5 Metastasen in jeder Lunge < 2 cm Advanced: > 5 Metastasen in jeder Lunge oder 1 Herd > 2 cm
Stadium IIIC	Hämatogene Metastasen außerhalb der Lunge

Tabelle 2-2: Lugano-Klassifikation der testikulären Keimzelltumoren

2.3 Cisplatin

2.3.1 Intrazelluläre Aktivierung und Wirkmechanismus

Die zytostatische Wirkung von Platin wurde erstmals Mitte der sechziger Jahre von *Rosenberg et al.* bei Versuchen mit *E. coli*-Bakterien beschrieben (Rosenberg et al., 1965). Diese Entdeckung bildete die Grundlage für die Entwicklung von Cisplatin (cis-Diamindichloroplatin (II)) sowie weiterer platinhaltiger Zytostatika. Seit 1979 ist Cisplatin als Zytostatikum zugelassen. Heute gehört es zu den meist genutzten Substanzen bei der chemotherapeutischen Therapie einer Vielzahl von Tumoren. Cisplatin wird als Einzelpräparat oder in Kombination mit anderen, synergistisch wirkenden Zytostatika gegen HNSCC, Hoden-, Ovarial-, Blasen- und Lungenkarzinome eingesetzt (Manetta et al., 1998; Oguri et al., 1999; Young et al., 1999). Bei der Behandlung von HNSCC wird Cisplatin meist in Kombination mit 5-Fluorouracil verabreicht. Für diese Zytostatikakombination wurde eine über den additiven Synergismus hinausgehende Wirkungsverstärkung beobachtet (Fujishima et al., 1997). Die Wirkung von Cisplatin beruht hauptsächlich auf der Ausbildung von kovalenten Bindungen mit verschiedenen intrazellulären Molekülen wie RNA, DNA und Proteinen. Dabei geht die apoptoseauslösende Wirkung

von Cisplatin vor allem auf die Bildung von DNA-Addukten zurück, die die Replikation und Transkription behindern (Trimmer and Essigmann, 1999).

Cisplatin wird entweder durch passive Diffusion oder durch erleichterten Transport über eine bisher nicht näher beschriebene Membranpumpe in die Zellen aufgenommen. Neuste Studien haben gezeigt, dass ein durch CTR1 codierter Kupfertransporter an der zellulären Aufnahme von Cisplatin beteiligt sein könnte (Ishida et al., 2002). Intrazellulär wird Cisplatin aufgrund der dort wesentlich geringeren Chlorid-Ionenkonzentration hydrolisiert. Die Chlorid-Ionen werden schrittweise von Wassermolekülen verdrängt, wodurch eine kationische, reaktive Konfiguration entsteht. Durch diese positive Ladung kann Cisplatin mit zahlreichen negativ geladenen Molekülen wie beispielsweise den Nukleinsäuren der DNA reagieren (Zamble and Lippard, 1995). Prinzipiell können dabei verschiedene Typen von Cisplatin-DNA-Komplexen gebildet werden. Am häufigsten finden sich sog. Intrastrang-Quervernetzungen („intrastrand adducts“) mit Verknüpfung zweier Nucleobasen *eines* DNA-Strangs. In 65 % der Fälle werden dabei zwei benachbarte Guanin-Basen verknüpft, Addukte zwischen Guanin und Adenin treten in 25 % der Fälle auf (Fichtinger-Schepman et al., 1985; Pinto and Lippard, 1985). Daneben werden durch Cisplatin auch Quervernetzungen zwischen zwei *unterschiedlichen* DNA-Strängen ("interstrand adducts") verursacht (1 %). Zu einem geringen Prozentsatz können außerdem sog. Monoaddukte entstehen, bei denen nur eine reaktive Gruppe mit der DNA verbunden wird. Die so entstehenden Platin-DNA-Addukte führen zu einer Konfigurationsänderung und Destabilisierung der DNA mit vermehrter Induktion von Strangbrüchen (Sundquist et al., 1986). Folge der veränderten DNA-Struktur ist die Hemmung von Replikation und Transkription, aus der schließlich das Absterben der Zellen resultiert. Die genauen Mechanismen, über die der zytotoxische Effekt vermittelt und der programmierte Zelltod ausgelöst wird, sind noch nicht bekannt.

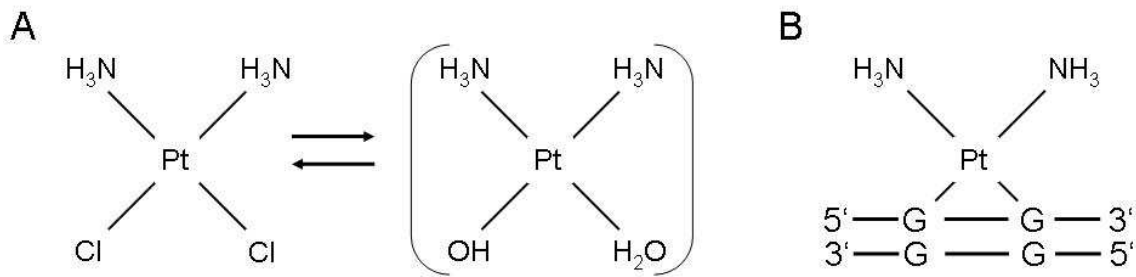


Abbildung 2-1: (A) Strukturformel von Cisplatin und intrazelluläre Hydrolyse, (B) Pt-GG-Addukt, mit ca. 65 % die häufigste Form der Platin-DNA-Addukte

2.3.2 Mechanismen der Cisplatin-Chemoresistenz

Die chemotherapeutische Cisplatinbehandlung maligner Neoplasien kann aufgrund einer Wirkstoffresistenz versagen, an der eine Vielzahl verschiedener molekularer Veränderungen ursächlich beteiligt sein können (Kartalou and Essigmann, 2001). Die resistenten Krebszellen zeichnen sich im Vergleich zu anderen Zellen durch eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber dem verwendeten Zytostatikum aus. Dabei unterscheidet man die primäre oder intrinsische Resistenz von der sekundären Resistenz. Die primäre Resistenz von Tumoren besteht bereits initial und ist unabhängig von einer vorausgegangen Chemotherapie. Die sekundäre Resistenz entwickelt sich dagegen erst im Laufe einer Zytostatikatherapie und resultiert aus dem Selektionsdruck, der unter der medikamentösen Behandlung besteht. In zunächst auf die Behandlung ansprechenden Tumoren entstehen durch Veränderungen auf molekularer Ebene Zellen, die sich der Wirkung der Therapie mit Hilfe neu entstandener Resistenzmechanismen entziehen und sich so im Wachstum durchsetzen können. Typischerweise treten dann Monate oder Jahre nach der initialen Behandlung Tumorrezidive auf, die sich oft als resistent gegenüber dem zuvor verwendeten Chemotherapeutikum erweisen. Im Zusammenhang mit dieser Resistenzentwicklung werden verschiedenste Mechanismen diskutiert (Abb. 2-2) (Gottesman,

2002; Kaufmann and Earnshaw, 2000; Lage and Dietel, 1999). Dazu gehören im Einzelnen:

- Veränderungen des intra- bzw. extrazellulären Transports
- Intrazelluläre Entgiftung durch Glutathion oder Metallothionein
- Verminderte Platin-DNA-Adduktbildung
- Veränderungen in der Reparaturkapazität der Zellen
- Defekte in proapoptotischen Signalwegen

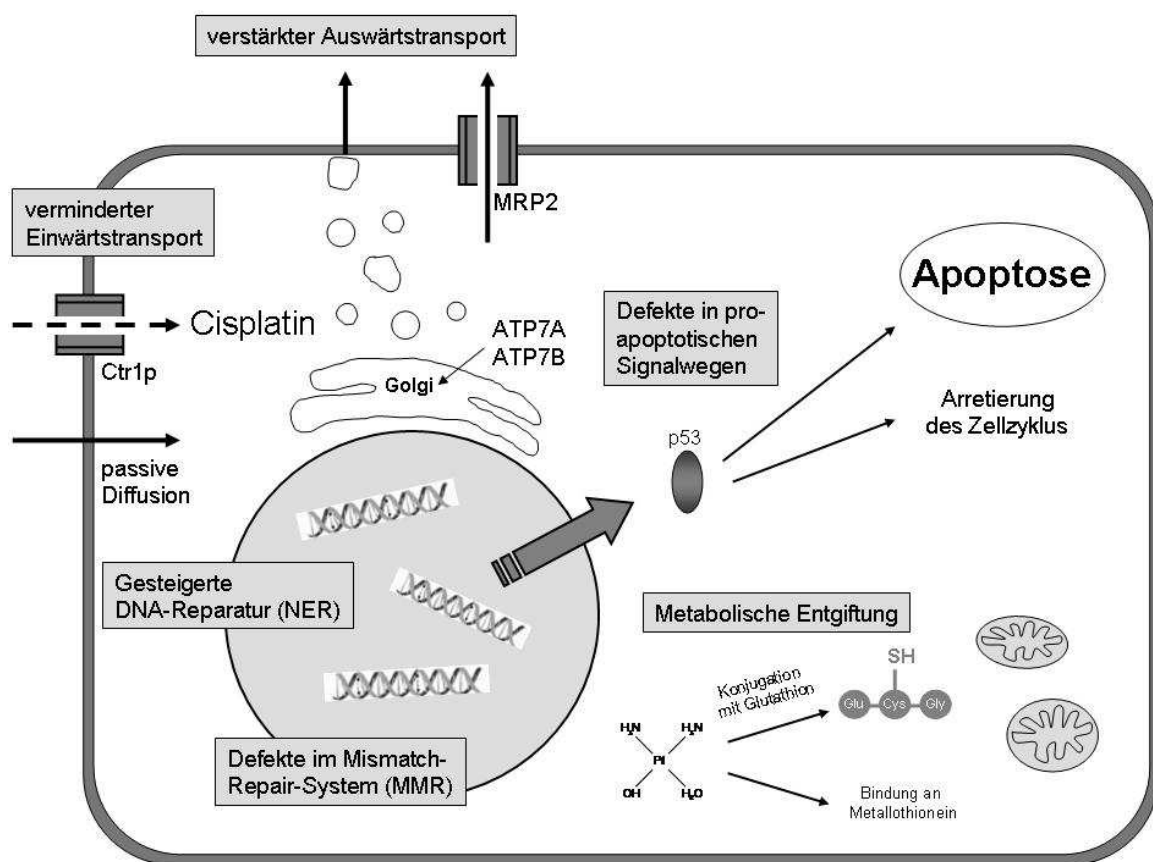


Abbildung 2-2: Cisplatin-Chemoresistenzmechanismen

Dargestellt sind verschiedene molekulare Mechanismen, die an der Entwicklung einer Cisplatin-resistenz von Krebszellen beteiligt sein können (Erläuterungen siehe Text).

2.3.2.1 Veränderungen des intra- bzw. extrazellulären Transports

Veränderungen des transmembranösen Transports können zu einer Verminderung der intrazellulären Cisplatinkonzentration führen (Waud, 1987). Ein möglicher Resistenzmechanismus ist die verminderte Aufnahme des Substrates in die Zelle bzw. ein vermehrter Auswärtstransport des Zytostatikums. Platin-komplexe gelangen entweder durch passive Diffusion oder durch erleichterten Transport über eine Membranpumpe in die Zellen. Über den genauen Aufnahme-mechanismus von Cisplatin war bis vor kurzem wenig bekannt. Neuste Studien haben gezeigt, dass ein durch das Gen CTR1 codiertes Kupfertransportprotein (Ctr1p, engl.: „high-affinity copper transporter 1“) an der zellulären Aufnahme von Cisplatin beteiligt ist (Ishida et al., 2002). Auch an der Ausschleusung von Platinkomplexen sind nach aktuellen Untersuchungen Kupferexportproteine (ATP7A und ATP7B) beteiligt, die normalerweise Kupferionen unter Verbrauch von ATP in den Golgi-Apparat pumpen. Dort werden sie an kupferabhängige Enzyme gebunden und über Vesikel aus der Zelle hinaus befördert (Katano et al., 2002). Eine Resistenzentwicklung gegen Cisplatin kann daher auf Regulations- veränderungen bei den beteiligten Kupfertransportproteinen beruhen (Kruh, 2003). So konnte in experimentellen Studien ein Ausschalten von CTR1 sowie eine Überexpression von ATP7B mit verminderten intrazellulären Cisplatinkonzentra- tionen und einer gesteigerten Cisplatinresistenz in Verbindung gebracht werden (Komatsu et al., 2000; Lin et al., 2002; Nakayama et al., 2002). An dem nach extrazellulär gerichteten Substratstrom sind neben den genannten Transport- proteinen auch weitere Exportmechanismen wie beispielsweise das ATP- abhängige „multidrug resistance related protein 2“ (MRP2) beteiligt. MRP2 besitzt eine Affinität für Cisplatin und gehört zur Familie der ABC („ATP binding cassette“) -Transporter (Higgins, 1992). Es stellt einen Mechanismus der sog. „Multidrug Resistance (MDR)“ dar, die das Auftreten einer unspezifischen Vielfachresistenz gegen strukturell und funktionell unterschiedliche Zytostatika beschreibt. MRP2 konnte bereits in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden und befördert durch Konjugation mit Glutathion inaktiviertes Cisplatin aktiv aus der Zelle (Ishikawa and Ali-Osman, 1993; Leier et al., 1996). Eine Überexpression des

MRP2-Transporters kann daher zu einer Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin beitragen.

2.3.2.2 Intrazelluläre Entgiftung durch Glutathion oder Metallothionein

Intrazellulär reagiert Cisplatin außer mit der DNA bevorzugt mit Aminosäuren und Proteinen, die nukleophile SH-Gruppen besitzen. Neben Veränderungen im transmembranösen Transport kann daher die biologische Inaktivierung von Cisplatin durch zytoplasmatische Thiole wie Glutathion oder Metallothionein als Resistenzmechanismus eine Rolle spielen (Kelley et al., 1988; Micetich et al., 1983). Bei einigen Zelllinien konnte ein erhöhter Glutathion-Gehalt mit einer verminderten Platinsensitivität in Verbindung gebracht werden (Chen et al., 1995; Meijer et al., 1992). Glutathion ist als endogenes Antioxidans der Zellen an der Neutralisation von freien Radikalen, reaktiven Sauerstoffspezies und verschiedenen Schwermetallen beteiligt und hält exogene Antioxidantien wie Vitamin C und A in ihrer reduzierten, aktiven Form. Außerdem entgiftet Glutathion eine Vielzahl zytostatischer Substanzen. Die dazu notwendige Konjugation mit dem Substrat wird über das Enzym Glutathion-S-Transferase katalysiert. Bei Ovarialkarzinomen konnte eine Verminderung der Cisplatinresistenz in vitro durch Behandlung der Zellen mit einem Inhibitor der Glutathion-S-Transferase erreicht werden (Perez et al., 1990). Auch bei HNSCC-Zelllinien konnte eine Korrelation zwischen der Cisplatinresistenz und dem intrazellulären Glutathiongehalt nachgewiesen werden und außerdem durch in vitro Verminderung der Glutathionkonzentration eine Cisplatinsensibilisierung der Zellen erreicht werden (Kato et al., 2000). *Shiga et al.* konnten zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens bei der Behandlung von HNSCC in Abhängigkeit vom Gehalt der Glutathion-S-Transferase steigt (Shiga et al., 1999). Auch die vermehrte Expression von Metallothionein, welches maßgeblich an der Detoxifikation von Schwermetallionen beteiligt ist, kann den Therapieerfolg von Cisplatin limitieren. Metallothionein bindet metallische Noxen und besitzt eine hohe Affinität zu Platinverbindungen.

Die Bedeutung von Metallothionein für die Cisplatinresistenz ist in der Literatur bis dato jedoch umstritten (Kasahara et al., 1991; Meijer et al., 2000).

2.3.2.3 Verminderte Platin-DNA-Adduktbildung

Das Ausmaß der Platin-DNA-Adduktbildung kann ebenfalls an dem Vorhandensein einer Cisplatinresistenz beteiligt sein. Nach Exposition mit Cisplatin zeigt sich in verschiedenen Gewebe- und Tumorzelltypen ein sehr unterschiedliches Ausmaß der initial messbaren Bildung von Cisplatin-DNA-Addukten. Neben Nierenzellen, die in der Regel den größten Adduktgehalt aufweisen (Johnsson et al., 1995), zeigt auch die Leber eine ausgeprägte Platin-Anreicherung (Fichtinger-Schepman et al., 1989). Abgesehen von diesen zelltypabhängigen Schwankungen in der DNA-Addukt-Bildung lassen sich in verschiedenen Studien auch deutliche interindividuelle Unterschiede im Hinblick auf die durch Chemotherapie induzierten DNA-Schäden feststellen (Dabholkar et al., 1992; Fichtinger-Schepman et al., 1987a; Fichtinger-Schepman et al., 1987b; Parker et al., 1991). Die genauen Ursachen dieser Schwankungen sind noch unbekannt. Man nimmt an, dass die initialen Unterschiede in der Adduktbildung zum einen von der Bioverteilung des Wirkstoffs, also von der Organdurchblutung und eventuell vorhandenen Barrieren wie der Blut-Hirn-Schranke, und zum anderen von zelltypabhängigen Transport- und Detoxifizierungsvorgängen abhängen.

2.3.2.4 Veränderungen in der Reparaturkapazität der Zellen

Die durch Cisplatin induzierten DNA-Schäden werden in Säugetierzellen hauptsächlich durch den Mechanismus der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) repariert (Crul et al., 1997), welcher auch für die Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden verantwortlich ist. Bei der NER wird grundsätzlich zwischen einem transkriptionsgekoppelten und einem das globale Genom betreffenden Mechanismus unterschieden. *Futura et al.* konnten in einer Studie zeigen, dass im Zusammenhang mit der Cisplatinresistenz von humanen Zellen die Aktivität der

transkriptionsgekoppelten NER notwendig ist (Furuta et al., 2002). Die NER ist ein komplexer Prozess, der die Erkennung von DNA-Schäden, das Herausschneiden von Oligonukleotidsträngen und den anschließende Einbau neusynthetisierter, intakter DNA beinhaltet (Abb. 2-4). Dabei sind an den einzelnen Reparaturschritten der NER eine Vielzahl von Enzymen beteiligt. Die Leistungsfähigkeit des DNA-Reparaturapparates ist ein wesentliches Kriterium für die zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Platincomplexen (Moorehead et al., 1996). Allerdings sind Zellen trotz der NER nur unzureichend in der Lage, die durch Cisplatin entstandenen DNA-Schäden zu beseitigen. Diese Unfähigkeit zur kompletten Reparatur ist wichtig für die Wirkung von Cisplatin als Tumorthapeutikum. Eine gesteigerte bzw. veränderte DNA-Reparatur kann daher großen Einfluss auf die Entwicklung einer Cisplatinresistenz haben. In verschiedenen Studien konnte bei cisplatinresistenten Zellen eine verstärkte Expression von NER-Proteinen nachgewiesen werden (Britten et al., 2000; Ferry et al., 2000; Li et al., 2000). So kann beispielsweise eine Überexpression des am NER beteiligten ERCC1-XPF-Komplexes eine Cisplatinresistenz vermitteln (Kelland, 1994; Yu et al., 2000).

Neben der NER beeinflussen weitere DNA-Reparaturwege wie das *Mismatch-Repair*-System (MMR) das Überleben der Zellen nach einer Schädigung mit Cisplatin. So wurde eine verminderte Expression der Gene des MMR-Systems in chemoresistenten Tumorzellen beobachtet (Lage and Dietel, 1999). Das MMR-System ist der hauptsächliche Reparaturmechanismus für einzelne Nukleotid-Fehlpaarungen („mismatches“), die während der DNA-Replikation in sich teilenden Zellen auftreten (Kolodner and Marsischky, 1999). Der MMR-Prozess besteht zunächst aus der Erkennung und Bindung des fehlgepaarten Basenpaars durch einen der zwei bekannten Erkennungsheterodimere, hMutS α und hMutS β (Drummond et al., 1995; Risinger et al., 1996). Nachfolgend wird der die Fehlpaarung enthaltende DNA-Abschnitt unter Mitwirkung weiterer Proteinkomplexe entfernt und die entstandene Lücke durch DNA-Neusynthese und Ligation verschlossen. Das MMR-System ist im Gegensatz zur NER bevorzugt während der postreplikativen Phase aktiv, da hier häufig Fehlpaarungen in der neu synthetisierten DNA auftreten. Proteine des MMR-Systems besitzen die Fähigkeit, an Cisplatin-DNA-Addukte zu binden. Cisplatin-induzierte DNA-Schäden werden durch das MMR-System zwar erkannt, aber nicht suffizient repariert. Stattdessen kommt es zu einer Verkürzung der G2-Phase des Zellzyklus (Brown et al., 1997;

Fink et al., 1996; Fink et al., 1997) und zur Einleitung des programmierten Zelltods. Aus einem Defekt des MMR-Mechanismus resultiert daher eine relative Apoptoseresistenz und eine erhöhte Zytostatikatoleranz der Zellen (Aebi et al., 1996; Branch et al., 2000). Eine Inaktivierung der MMR-Proteine führt außerdem zu einer effizienteren NER und zu einer Erhöhung der allgemeinen Mutationsrate (z.B. in Tumorsuppressorgenen), wodurch maligne Transformationen und die Ausbildung weiterer Resistenzmechanismen begünstigt werden (Anthony et al., 1996). Umgekehrt geht eine Überexpression von MMR-Proteinen wie hMSH2 in Ovarial- und Hodentumorzellen mit einer ausgeprägten Cisplatinsensibilität einher (Mello et al., 1996).

2.3.2.5 Defekte in proapoptotischen Signalwegen

Die zytotoxische Wirkung der Cisplatin-DNA-Addukte geht von einer G2-Arretierung des Zellzyklus mit nachfolgender Auslösung des programmierten Zelltods aus (Sorenson and Eastman, 1988). Veränderungen der zellulären Mechanismen, die der eigentlichen Schadenserkennung nachgeschaltet sind, können dazu führen, dass DNA-Schäden toleriert werden und Tumorzellen eine Cisplatinresistenz entwickeln. Die genauen Mechanismen, über die Cisplatin-induzierte DNA-Schäden eine Zellapoptose auslösen, sind noch unbekannt (Jordan and Carmo-Fonseca, 2000). Man vermutet, dass an der Umsetzung der zellschädigenden Wirkung zwei apoptoseauslösende Wege beteiligt sind, die durch Cisplatin induziert werden können. Dabei handelt es sich zum einen um einen p53-abhängigen Signalweg, zum anderen scheint auch eine p73-abhängige Signaltransduktion eine Rolle zu spielen. Beide Proteine werden von Tumorsuppressorgenen kodiert und sind maßgeblich an der Regulation und Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Sie können als Reaktion auf DNA-Schäden einen Zellzyklusarrest auslösen, der es der Zelle ermöglicht, den entstandenen Defekt zu reparieren. Ist dies nicht möglich und die Schädigung zu groß, können sie den programmierten Zelltod einleiten. Die von Tumorsuppressorgenen kodierten Proteine können in ihrer Funktion durch verschiedene Defekte eingeschränkt werden, die z.B. durch Punktmutationen, Deletionen oder durch Bindung an

zelluläre bzw. virale Proteine verursacht sein können (Levine, 1993). p53-Punktmutationen stellen die häufigsten genetischen Veränderungen in humanen Malignomen dar (Nigro et al., 1989). In HNSCC werden solche Mutationen bereits früh (Boyle et al., 1993) mit einer Inzidenz von 50-60 % gefunden (Caamano et al., 1993) und sind mit einer schlechten Prognose von HNSCC assoziiert (Nylander et al., 2000). Jede Veränderung in der Expression von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen oder anderen an der Apoptoseauslösung beteiligten Proteinen beeinflusst die Sensitivität gegenüber Cisplatin. Verschiedene Studien haben nachgewiesen, dass der p53-Status eine wichtige Rolle bei der Resistenzentwicklung spielt (Akiyama et al., 1999; Manic et al., 2003). Daneben wurden viele weitere am Apoptoseprozeß beteiligte Faktoren in zytostatikaresistenten Zellen als verändert exprimiert beschrieben (Kaufmann and Earnshaw, 2000).

2.4 Molekulare Faktoren für die Cisplatinsensitivität von Testistumoren

Zelllinien, die aus Testistumorgewebe hergestellt wurden, behalten ihre Hypersensitivität gegenüber DNA-schädigenden Chemotherapeutika in vitro und stellen ein Modellsystem dar, mit dessen Hilfe die Mechanismen der Chemosensitivität von testikulären Keimzelltumoren (TGCT) erforscht werden können. Viele Studien haben gezeigt, dass TGCT-Zellen ca. 2-4fach sensitiver auf DNA-schädigende Chemotherapeutika reagieren als andere Tumorzellen (Masters et al., 1993; Pera et al., 1987; Walker et al., 1987). Diese Feststellung reflektiert das klinische Ansprechen von Testistumoren auf Chemotherapie und ist ein Zeichen dafür, dass die ausgesprochene Chemosensitivität eine grundlegende biologische Eigenschaft dieser Zellen ist. Das Verständnis dieser zelleigenen molekularen Mechanismen ist wichtig, um Ansätze zur Verbesserung der chemotherapeutischen Therapieerfolge bei anderen Tumoren wie HNSCC zu finden. In verschiedenen Studien wurde bereits damit begonnen, molekulare Faktoren, die den Behandlungserfolgen von Testistumoren zugrunde liegen, zu definieren (Koberle et al., 1997; Koberle et al., 1996). Im Zusammenhang mit der Cisplatinsensitivität umfassen diese Faktoren die intrinsische Permeabilität für Cisplatin, die Funktion des p53-

Systems und anderer proapoptotischer Signalwege sowie Signalwege, die die Fähigkeit zur Reparatur Cisplatin-induzierter DNA-Schäden beeinflussen. Einen Überblick über die bisherigen Forschungsergebnisse liefert ein Review von *Masters et al.* (Masters and Koberle, 2003), aus dem im Folgenden einige Ansatzpunkte beschrieben werden:

Ein verbesserter Transport von Cisplatin über die Zellmembran von Testistumorzellen könnte über eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration zu einer verbesserten Zytostatikawirkung führen. Ein Vergleich der zellulären Cisplatinakkumulation von Testis-, Colon- (Sark et al., 1995) und Blasen-tumorzelllinien erbrachte jedoch keine signifikanten Konzentrationsunterschiede.

Der Stellenwert der biochemischen Inaktivierung von Cisplatin durch Glutathion oder Metallothionin als ursächlicher Faktor für eine verbesserte Chemosensitivität von Testistumoren wird gegenwärtig diskutiert. Es gibt Hinweise darauf, dass neben vielen anderen Faktoren auch die intrazelluläre Glutathionkonzentration an der unterschiedlichen Chemosensitivität verschiedener Tumortypen beteiligt ist (Sark et al., 1995). Bei einer vergleichenden Studie von TGCT- und Blasenkarzinomzelllinien konnten *Masters et al.* allerdings keine Korrelation zwischen Chemosensitivität und der Glutathion- bzw. Glutathion-S-Transferase-Konzentration aufzeigen. Auch wurden ähnliche Metallothionein-Konzentrationen in Testis-, Blasen- (Masters et al., 1996) und Colonkarzinomzelllinien nachgewiesen (Meijer et al., 2000). Diese Studien lassen vermuten, dass zytoplasmatische Thiole wahrscheinlich nicht allein für die ausgesprochene Cisplatinsensitivität von TGCT verantwortlich sind.

Das Ausmaß der DNA-Addukt-Bildung nach Cisplatin-Exposition variiert erheblich zwischen verschiedenen Zelllinien. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Cisplatin in gleichem Ausmaß an die DNA von Testistumorzellen wie an die DNA von anderen neoplastischen Zellen bindet (Bedford et al., 1988; Koberle et al., 1997). Diese Beobachtung ist von besonderer Bedeutung, da sie nahelegt, dass die Cisplatinsensitivität der Testistumoren von Faktoren bestimmt wird, die dem Prozess der DNA-Bindung und -Schädigung nachgeschaltet sind. Eine Therapieresistenz von malignen Tumoren kann z.B. auf Genmutationen beruhen, die die Funktion von proapoptotischen Signalproteinen wie z.B. p53 beeinträchtigen und es den Zellen ermöglichen, die zytotoxischen Effekte der Chemotherapeutika zu umgehen. Testistumorzelllinien zeigen im Vergleich zu Blasenkarzinomzelllinien

keine verminderte spontane oder Cisplatin-induzierte Mutationsfrequenz, die auf eine reduzierte Fähigkeit zur Resistenzentwicklung hinweisen könnte (Parris et al., 1990). Die Bedeutung des p53-Systems wurde bereits in vielen Studien erforscht. p53 ist ein wichtiger Faktor, der infolge eines chemotherapeutisch induzierten Zellschadens die apoptotische Antwort einleitet (Lowe et al., 1993). Eine Überexpression von p53 in Testistumoren könnte mit ihrer Chemosensitivität in Verbindung stehen. *Kersemaekers et al.* untersuchten die Rolle von p53 in Bezug auf den Behandlungserfolg bei TGCT. Es wurde gezeigt, dass ungefähr zwei Drittel der untersuchten TGCT p53 exprimieren. Es konnte dabei jedoch im Vergleich zu klinisch cisplatinresistenten TGCT keine Erhöhung der p53-Expression bei cisplatinsensiblen TGCT nachgewiesen werden. Auch führte die partielle Inaktivierung der p53-Aktivität in einer cisplatinsensitiven TGCT-Zelllinie nicht zur Resistenzentwicklung (Kersemaekers et al., 2002). Unabhängig von der Höhe der p53-Expression können Mutationen im p53-Gen oder andere Veränderungen innerhalb der p53-Kaskade zu Veränderungen in der Funktion des Tumorsuppressorgens führen. Viele in vitro Studien wurden an Zelllinien durchgeführt, die einen bekannten p53-Defekt aufweisen. Verschiedene Tumorzelllinien, bei denen p53-Mutationen nachgewiesen wurden, zeigen im Vergleich zu nicht mutierten Kontroll-Zelllinien eine signifikant höhere Resistenz gegenüber Cisplatin, Bleomycin und 5-Fluorouracil (O'Connor et al., 1997). Untersuchungen an Testistumorzelllinien liefern in diesem Zusammenhang widersprüchliche Ergebnisse. So zeigte sich eine TGCT-Zelllinie, die eine p53-Mutation enthielt, relativ resistent gegenüber Cisplatin (Houldsworth et al., 1998). In einer Studie von *Burger et al.*, in der zwei TGCT-Zelllinien verglichen wurden, wovon eine funktionsfähiges und die andere mutiertes p53 enthielt, zeigten sich dagegen keine Unterschiede bezüglich der Chemosensibilität (Burger et al., 1999). In Anbetracht der Ergebnisse kann nicht von einer generellen Überexpression von p53 bei TGCT ausgegangen werden.

Auch eine mögliche Hochregulierung eines oder mehrerer Proteine, die an der Apoptosekaskade selbst beteiligt sind, wurde bereits untersucht. Keimzelltumorzellen könnten Mechanismen besitzen, die die Apoptoseauslösung erleichtern. Ein solcher Hintergrund scheint naheliegend, da Keimzellen, als Vorläuferzellen der Spermien, besonders anfällig gegenüber Apoptose sind (Brown et al., 1997). Während der Spermatogenese findet fortlaufend eine Qualitätskontrolle statt, bei

der eine hohe Anzahl der potentiellen Spermien durch Apoptose eliminiert werden, um zu verhindern, dass genetische Defekte an die Nachkommen weitergegeben werden. Studien, die sich mit der Fragestellung der erleichterten Apoptose beschäftigt haben, zeigen keine übereinstimmenden Ergebnisse. Testistumorzellen exprimieren hohe Spiegel des proapoptotischen Proteins Bax und niedrige Spiegel des antiapoptotischen Proteins Bcl2 (Chresta et al., 1996). Bcl2 überexprimierende TGCT-Zellen zeigen gleichzeitig eine reziproke Herabregulierung des Apoptoseinhibitors Bcl-xL, woraus auch bei diesen Keimzelltumoren eine Sensibilisierung gegenüber dem chemotherapeutisch induzierten Zelltod resultiert (Arriola et al., 1999). Dagegen untersuchten *Mayer et al.* anhand klinischer Proben von chemosensiblen und chemoresistenten TGCT mehrere Proteine von Signalwegen, die an einer gesteigerten Cisplatinempfindlichkeit ursächlich beteiligt sein könnten. Zu diesen Proteinen gehörten p53, Bax, Bcl2 und Bcl-xL. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen dem Expressionsstatus der Proteine und den klinischen Chemotherapieerfolgen (Mayer et al., 2003).

Wie bereits erwähnt, werden durch Cisplatin verursachte DNA-Schäden hauptsächlich durch das System der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) beseitigt, an dem über 30 Proteine mitwirken. Aktuelle Studien weisen auf einen Defekt im Bereich dieses DNA-Reparatur-Signalweges als Ursache für der Chemosensitivität von TGCT hin. *Köberle et al.* konnten zeigen, dass Testistumorzelllinien ein geringeres Vermögen zur Reparatur Cisplatin-induzierter DNA-Schäden besitzen (Koberle et al., 1997; Koberle et al., 1996). Die Schäden akkumulieren und führen zu einer vermehrten Apoptoseinduktion der Zellen. In weiterführenden Studien konnte die verminderte Reparaturkapazität auf eine reduzierte Expression bestimmter NER-Proteine in Testistumorzelllinien zurückgeführt werden. Die Testistumorzelllinien 833K und GCT-27 zeigen eine reduzierte NER-Kapazität. Nachdem die NER-Proteine XPA und ERCC1-XPF dem Zell-extrakt zugegeben wurden, ließ sich die NER-Kapazität auf normale Werte steigern. Immunoblotting-Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Zellen niedrige Expressionsspiegel der NER-Proteine XPA, ERCC1 und XPF besitzen, während andere Proteine wie XPC, XPG oder TFIIH nicht reduziert sind (Koberle et al., 1999). Untersuchungen von *Welsh et al.* legen nahe, dass eine reduzierte Expression der genannten NER-Proteine ein spezifisches Phänomen von Testistumorzelllinien ist, da in einer Anzahl von Zelllinien unterschiedlicher

Tumorentitäten ausschließlich die 6 untersuchten Testistumorzelllinien signifikant erniedrigte Spiegel von XPA, XPF und ERCC1 aufweisen (Welsh et al., 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass niedrige Expressionsspiegel von bestimmten NER-Proteinen mit der günstigen Reaktion von Testistumoren auf eine Cisplatintherapie zusammenhängen und, dass diese Chemosensitivität durch eine gezielte Manipulation des NER-Mechanismus auch auf andere Neoplasien übertragen werden kann.

2.5 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Die NER (Abb. 2-3) erkennt und entfernt eine große Anzahl unterschiedlicher DNA-Läsionen. Hauptsächlich handelt es sich dabei um UV-induzierte DNA-Schäden und um DNA-Addukte, die unter der Einwirkung verschiedener chemischer Mutagene, darunter Cisplatin, entstehen (Wood et al., 2001). Bei der NER handelt es sich um einen komplexen Signalweg, an dessen Ablauf ca. 30 Polypeptide beteiligt sind. Diese Proteine bilden Funktionskomplexe und lagern sich schrittweise an den DNA-Schaden an (Volker et al., 2001). Der NER-Mechanismus beinhaltet dabei folgende Stadien:

1. Erkennung der Schädigung mit partieller Öffnung der DNA-Helix, Inzision in 3' und in 5' der Läsion und Exzision des veränderten Oligonukleotids.
2. Wiederherstellung des ursprünglichen DNA-Doppelstranges durch DNA-Reparatur-Synthese.

In vitro Experimente haben gezeigt, dass der NER-Signalweg zur Erkennung und Entfernung von DNA-Schäden sechs Hauptfaktoren benötigt. Zu diesen Proteinen gehören der XPC-HR23B-Komplex, die Faktoren XPA, TFIIH und RPA, sowie die Nukleasen XPG und XPF-ERCC1 (Araujo et al., 2000). Bei dem Mechanismus der NER lassen sich zwei Untergruppen des Signalweges differenzieren. Dabei werden die DNA-Schäden entweder aus dem gesamten Genom entfernt („global genom NER“) oder es werden speziell Schäden, die im transkribierten Strang von aktiven Genen lokalisiert sind („transcription-coupled NER“), entfernt (Bohr et al.,

1985). Die beiden Signalwege unterscheiden sich dabei ausschließlich in der initialen Schadenserkenkung. Dieser erste Schritt erfolgt bei der globalen NER für gewöhnlich mit Hilfe eines Heterotrimeres, bestehend aus XPC-HR23B-centrin2 (Araki et al., 2001; Sugasawa et al., 1998), welches bevorzugt an einzelsträngige distordierte DNA-Regionen bindet. Bei der transkriptionsgekoppelten NER wird die RNA-Polymerase II durch die DNA-Schäden an der Transkription gehindert und setzt so den NER-Mechanismus durch Rekrutierung der Proteine CSA, CSB und XAB2 in Gang (Nakatsu et al., 2000). Die nachfolgenden Schritte verlaufen bei beiden Signalwegen identisch. Die Erkennung der beschädigten DNA-Region durch die o.g. Faktoren verändert die DNA-Struktur so, dass nachfolgend auch andere Reparaturmoleküle Zugang zu der Region bekommen. Zunächst binden die Faktoren XPA, RPA und TFIIH an die distordierte DNA. Die Doppelhelix wird lokal durch die Helikaseaktivität von TFIIH aufgewunden. Dieser Proteinkomplex besteht aus insgesamt neun Untereinheiten, darunter die Helikasen XPB und XPD (Svejstrup et al., 1996). Die so im Bereich des DNA-Schadens entstandene aufgewundene DNA-Region umfasst ca. 24-32 bp. Die NER-Faktoren XPA und RPA sind wesentlich an der Bildung eines funktionellen Reparaturkomplexes und an der Stabilisierung der geöffneten DNA-Helix beteiligt. Man nimmt an, dass XPA als DNA- und Protein-bindender Faktor dafür sorgt, die an der Reparatur beteiligten Proteine in der richtigen Position zum DNA-Schaden zu halten (de Laat et al., 1999). Dabei interagiert XPA sowohl mit chemisch- oder UV-induzierten DNA-Schäden als auch mit den NER-Faktoren RPA, ERCC1 und TFIIH und stellt so, obwohl es selbst keine enzymatische Aktivität besitzt, einen wichtigen Bestandteil des NER-Systems dar. Im Folgenden werden durch DNA-Nukleasen Inzisionen im geschädigten DNA-Strang gemacht. Dabei schneidet zunächst XPG in 3' der Läsion und im Anschluss der ERCC1-XPF-Komplex in 5' des DNA-Schadens (O'Donovan et al., 1994; Wakasugi and Sancar, 1999). Das Resultat ist die Freisetzung der Läsion innerhalb eines 24-32 Basen langen Oligonukleotids. Nach der Exzision des Oligonukleotids wird dieses durch eine sog. DNA-Reparatur-Synthese-Reaktion, katalysiert von einem Enzymkomplex, bestehend aus dem DNA-Polymerase-Delta- oder -Epsilon-Holoenzym sowie den Proteinen RFC und PCNA (Wood and Shivji, 1997), ersetzt. Der Reparaturvorgang wird durch eine DNA-Ligase vervollständigt, die das neusynthetisierte Oligonukleotid in den DNA-Strang ligiert (Wood, 1996; Wood, 1997).

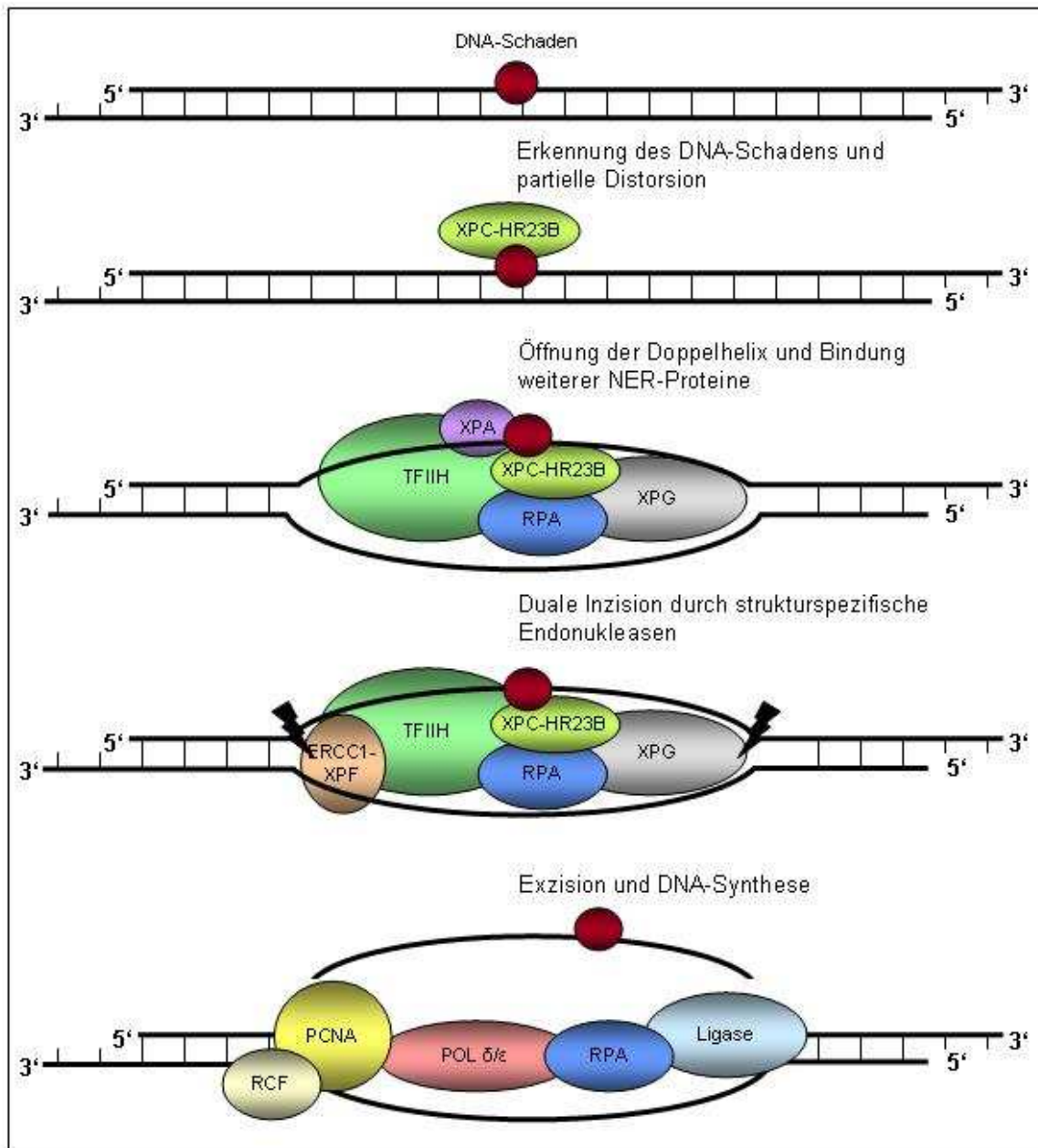


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der globalen Nukleotid-Exzisions-Reparatur und seiner Komponenten.

2.6 RNA-Interferenz (RNAi)

2.6.1 Mechanismus der Genregulation mittels RNAi

RNA-Interferenz (RNAi) ermöglicht die Aufklärung von Genfunktionen durch den gezielten „Knock-down“ von Genen in vielen Organismen und menschlichen Zelllinien. Der Mechanismus der RNA-Interferenz wurde erstmals 1998 bei Untersuchungen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* entdeckt. Fire et al. fanden heraus, dass die Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Wurm zu einer spezifischen Degradation von sequenzkomplementärer mRNA und somit zu einer posttranskriptionalen Genblockade führt (Fire et al., 1998). Die Existenz solcher posttranskriptionaler Genblockaden (PTGS, engl.: „post-transcriptional gene silencing“) wurde zuvor bereits in Pflanzen („co-suppression“) (Jorgensen, 1990) und Pilzen („quelling“) (Romano and Macino, 1992) beschrieben. In weiteren Studien konnte RNAi auch in anderen Organismen wie *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden, und es konnten kürzere, sog. „small interfering“ RNAs (siRNAs) als Mediatoren der sequenzspezifischen mRNA-Degradierung identifiziert werden. Die lange dsRNA wird im Zellzytoplasma durch den Enzymkomplex „Dicer“ in kürzere, 21-23 Nukleotide umfassende siRNAs prozessiert (Elbashir et al., 2001b; Zamore et al., 2000). In Säugetierzellen ist die Anwendung von dsRNAs limitiert, da sie im Zytoplasma sequenzunspezifische Reaktionen auslösen können, welche zur Induktion der Interferon-Synthese führen. Interferon (IFN) induziert die 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase, die wiederum über die Aktivierung von Ribonuklease L eine Degradation von mRNA verursacht. Außerdem aktiviert IFN die Proteinkinase R (PKR), die über eine Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α zu einer globalen Hemmung der mRNA-Translation führt (Stark et al., 1998). Diese unspezifische Interferon-Antwort wird erst dann ausgelöst, wenn zwei PKR-Moleküle mit einer dsRNA aus mindestens 30 Nukleotiden reagieren und kann daher durch die direkte Transfektion kleinerer siRNAs verhindert werden. Durch die direkte Überführung von siRNAs wird die Spaltung von dsRNA durch den Enzymkomplex „Dicer“ umgangen und eine sequenzspezifische Ausschaltung von mRNA erreicht (Elbashir et al., 2001a). Es wird vermutet, dass sich PTGS-Mechanismen wie die RNAi ursprünglich als zelluläre Verteidigungsmechanismen gegen die Aufnahme

von doppelsträngiger RNA entwickelt haben, um die Zelle so gegen virale Infektionen sowie das mutagene Potential von mobilen genetischen Elementen wie Transposons zu schützen. Obwohl die physiologische Bedeutung der RNAi zurzeit noch erforscht wird, stellt die Verwendung von siRNAs bereits jetzt eine neue effektive Technologie zur selektiven Inhibition von spezifischen Genprodukten dar.

2.6.2 Intrazelluläre Prozessierung von dsRNA

Doppelsträngige RNA wird in der Zelle als fremd erkannt, durch das Enzym „Dicer“ gebunden und in einer ATP-abhängigen Reaktion in kleinere Fragmente, die sog. „small interfering“ RNAs (siRNAs), zerteilt (Bernstein et al., 2001; Ketting et al., 2001). Diese Fragmente umfassen 21-23 Nukleotide und besitzen ein phosphoryliertes 5' Ende, eine 19 Nukleotide lange doppelsträngige Region sowie zwei unpaare Nukleotide am unphosphorylierten 3' Ende (Abb. 2-4). Diese Charakteristika sind typisch für Spaltprodukte von Enzymen der RNase III Familie, zu denen „Dicer“ gehört (Elbashir et al., 2001b). siRNA wirkt im Zytoplasma sequenzspezifisch über komplementäre Basenpaarung mit der Ziel-mRNA (Abb. 2-5).

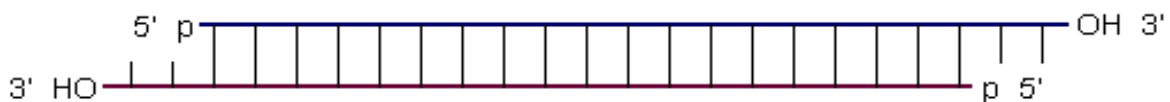


Abbildung 2-4: Molekulare Struktur von siRNA

In der Zelle binden siRNAs zunächst an den Multienzym-Komplex RISC („RNA-induced silencing complex“). Für diese Bindung ist die Phosphorylierung am 5' Ende der siRNA essentiell. Für die Entwindung der doppelsträngigen siRNA wird ATP benötigt (Nykanen et al., 2001). RISC zerstört den Sense-Strang der siRNA, dessen Sequenz mit der zelleigenen mRNA übereinstimmt. Der Antisense-Strang bleibt an RISC gebunden und kann durch komplementäre Basenpaarung spezifisch an die Ziel-mRNA binden. Passen die Sequenzen exakt zueinander, zerschneidet die Nuklease-Untereinheit „Slicer“ die gebundene mRNA und setzt

die Bruchstücke ins Zytoplasma frei, wo sie von zelleigenen RNAsen weiter de-gradiert werden (Hannon, 2002; Sharp, 2001).

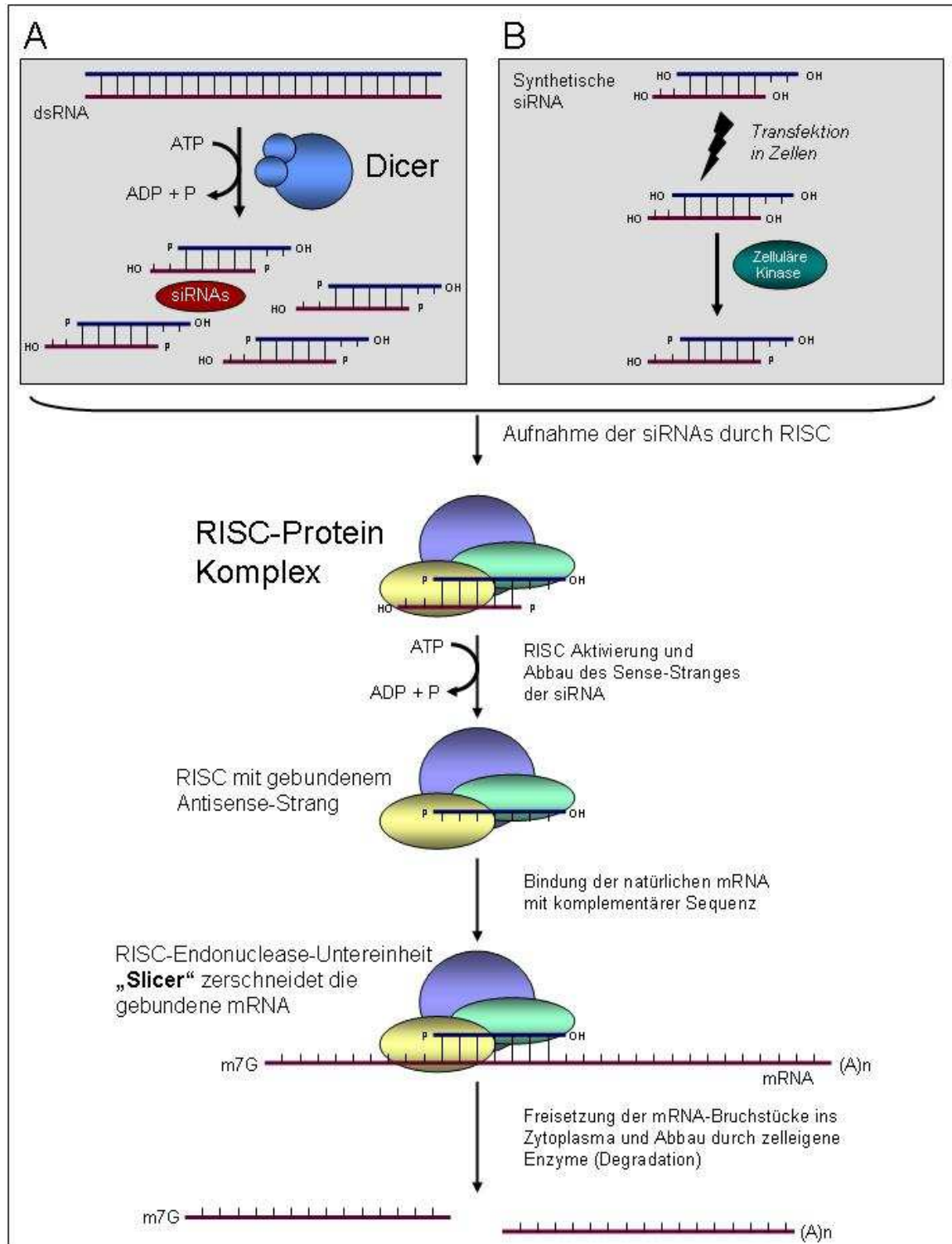


Abbildung 2-5: Intrazelluläre Prozessierung von dsRNA (A) bzw. von synthetischer siRNA (B)

2.7 Stand der Forschung

Obwohl die zelluläre Resistenz gegenüber Cisplatin multifaktoriell begründet zu sein scheint, implizieren aktuelle Studien, dass die gesteigerte NER einen Hauptmechanismus der Cisplatinresistenz darstellt. Erhöhte Expressionsspiegel von NER-Proteinen konnten dabei bereits in mehreren Studien mit einer vermehrten Chemoresistenz der untersuchten Tumorzellen in Verbindung gebracht werden. Hohe ERCC1-Spiegel sind mit einer effizienteren Entfernung Cisplatin-induzierter DNA-Addukte assoziiert und korrelieren mit dem Ausmaß der Cisplatinresistenz von Tumorzellen (Fautrel et al., 2005; Ferry et al., 2000; Li et al., 2000; Yu et al., 2000). Darüber hinaus berichten verschiedene Studien über einen signifikanten Zusammenhang zwischen der ERCC1-Expression von Tumorproben und dem klinischen Ansprechen auf eine Cisplatin-Chemotherapie (Britten et al., 2000; Dabholkar et al., 1994; Lord et al., 2002). In einer größeren Fall-Kontroll-Studie konnte eine niedrige mRNA-Expression von NER-Genen, darunter ERCC1, in peripheren Blutlymphozyten mit einem statistisch signifikant erhöhten Risiko zur Entwicklung von HNSCC in Verbindung gebracht werden (Cheng et al., 2002). *Chang et al.* konnten nach in vitro Herabregulierung der ERCC1-Spiegel mittels siRNA eine Zunahme der Empfindlichkeit der untersuchten Zelllinien gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika nachweisen (Chang et al., 2005). Auch die Inhibition von ERCC1 mit Hilfe der Antisense-RNA Methode führte zur Cisplatin-sensibilisierung zuvor resistenter Ovarialkarzinomzelllinien (Selvakumaran et al., 2003). Diese Studien legen nahe, dass es möglich ist, die Cisplatin-Zytotoxizität durch Hemmung von NER-Genen zu erhöhen und cisplatinresistente Zelllinien gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung zu sensibilisieren. Neben ERCC1 konnte auch für andere Komponenten des NER-Signalweges ein signifikanter Zusammenhang zwischen ihrem Expressionsstatus und der Chemosensibilität der jeweiligen Tumorzellen hergestellt werden. Die effiziente Erkennung geschädigter DNA-Abschnitte stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Nukleotid-Exzisions-Reparatur dar. Aus diesem Grund wurde das NER-Protein XPA, als zentraler Faktor der Schadenserkenung, bereits in mehreren Studien als möglicher Ansatzpunkt für NER-Modulationen untersucht. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte XPA-Expression einen eindrucklichen

resistenzsteigernden Effekt bezüglich der UV-Bestrahlung von humanen Zellen ausübt (Cleaver et al., 1995). Darüber hinaus konnten *States und Reed* nachweisen, dass cisplatinresistente humane Ovarialkarzinome häufig eine erhöhte Expression von XPA-mRNA aufweisen (States and Reed, 1996). Umgekehrt wird eine niedrige XPA-, XPF- und ERCC1-Expression bei Testistumoren mit der besonderen Cisplatinsensitivität dieser Zellen in ursächlichen Zusammenhang gebracht (Koberle et al., 1999). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass durch eine gezielte Inhibition von XPA auch andere Tumorzellen gegenüber Cisplatin sensibilisiert werden können und auf diese Weise der Erfolg einer Chemotherapie signifikant erhöht werden kann. Vor diesem Hintergrund wurden bereits einige Studien an verschiedenen Tumorentitäten durchgeführt. *Wu et al.* transfizierten XPA-Antisense-RNA in humane Lungenadenokarzinomzellen. Durch die Transfektion konnten die XPA-mRNA-Spiegel herunterreguliert und die Tumorzellen gegenüber Cisplatin sensibilisiert werden. Es zeigte sich, dass die XPA-mRNA-Spiegel sowohl mit den IC_{50} -Werten nach Cisplatin-Behandlung als auch mit der zellulären NER-Kapazität der untersuchten Zelllinien korrelieren (Wu et al., 2003). Andere Studien suggerieren jedoch, dass eine niedrige XPA-Protein-Konzentration keinen limitierenden Faktor für die DNA-Reparatur darstellt. Auch eine niedrige XPA-Expression scheint immer noch zu einer suffizienten DNA-Schadensreparatur zu führen. NER-kompetente Zelllinien enthalten ca. 150.000-200.000 XPA-Moleküle. Transfizierte Zelllinien mit einer Expression von ca. 50.000 XPA-Molekülen pro Zelle zeigen im Vergleich zu normalen NER-kompetenten Zellen eine nahezu identische UV-Resistenz. Die Herabregulierung auf ca. 10.000 XPA-Moleküle pro Zelle führt zu einer moderaten, aber signifikanten Zunahme der zellulären Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung. Erst die effektive Reduktion von XPA auf unter 10 % der Ausgangsmenge wirkt limitierend auf die NER und führt zu einer zellulären Sensibilisierung gegenüber DNA-Schädigungen (Koberle et al., 2006; Muotri et al., 2002).

2.8 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Warum lassen sich die günstigen therapeutischen Ergebnisse, die mit adjuvanter Chemotherapie in Testistumoren erreicht werden, nicht auf Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich übertragen? Die Antwort hierauf muss in den grundlegenden biologischen Unterschieden der Tumoren liegen. Es ist deshalb wichtig zu verstehen, warum Cisplatin so besonders erfolgreich in der Behandlung von Testistumoren eingesetzt wird, während andere Tumore im Therapieverlauf eine Chemoresistenz entwickeln. Cisplatin wird als das hauptsächlichste anti-neoplastische Agens sowohl zur Behandlung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich als auch in der Testistumorthherapie verwendet. Aktuelle Studienergebnisse führen zu der grundlegenden Hypothese, dass die Chemosensitivität von TGCT auf einer reduzierten DNA-Reparatur beruht, die mit einer verminderten Expression der NER-Proteine XPA, XPF und ERCC1 einhergeht. Bis heute sind keine Daten über die Expressionsspiegel dieser DNA-Reparaturproteine in HNSCC-Zelllinien oder -Tumorgewebeproben publiziert. Es ist daher unklar, welche Rolle die Expression von NER-Genen bei der Entwicklung der Cisplatinresistenz von HNSCC spielt. Das primäre Ziel dieser Studie war es, den Status der NER-Gene XPA, XPF und ERCC1 in einer größeren Anzahl von HNSCC-Zelllinien im Vergleich zu Testistumorzelllinien zu bestimmen. Es sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen dem Expressionsstatus und dem Ausmaß der Cisplatinresistenz bzw. -sensibilität der verschiedenen Zelllinien vorliegt. Im zweiten Schritt sollte die Relevanz der NER bei der Ausbildung von Chemoresistenz in Patientenproben untersucht werden. Dazu sollte die Expression von XPA, XPF und ERCC1 in klinischen Proben von HNSCC-Patienten im Vergleich zu Testistumorgewebeproben untersucht werden. Durch die Analyse von Tumorgewebeproben vor und nach einer Cisplatintherapie, sollte versucht werden eventuelle Änderungen in der Tumorzellbiologie, die das NER-System betreffen, im Krankheitsverlauf zu erfassen. Durch Vergleich des klinischen Ansprechens auf Chemotherapie mit der Expression von NER-Proteinen sollte überprüft werden, ob mithilfe von Tumormaterial und quantitativen Expressionsanalysen von NER-Genen, Rückschlüsse auf die voraussichtliche Cisplatin-sensibilität eines Tumorpatienten gezogen werden können. Außerdem waren Tumorproben von Patienten, die zunächst klinisch auf die Therapie angesprochen haben, später

jedoch ein Tumorrezidiv entwickelten, von besonderem Interesse. Unterschiedliche Spiegel von NER-Genen in diesen Proben könnten weitere Hinweise auf die Relevanz der NER bei der Entwicklung einer Chemoresistenz geben. Aufbauend auf das neu gewonnene Verständnis biochemischer Ursachen der Cisplatinresistenz von HNSCC sollte eine Methode zur therapeutisch induzierten DNA-Reparatur-Defizienz entwickelt werden, um die Cisplatin-induzierte Chemoresistenz umzukehren und HNSCC-Zelllinien gegenüber einer Chemotherapie zu sensibilisieren. Hierzu sollten in einem in vitro Modellsystem Schlüsselschritte der NER gezielt inhibiert werden. Die Ergebnisse könnten potenziell auf alle Neoplasien übertragen werden, bei denen die NER bei der Chemoresistenzentwicklung eine Rolle spielt.

Der experimentelle Arbeitsplan gliederte sich dabei wie folgt:

1) Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem NER-Expressionsniveau und der Chemoresistenz in HNSCC:

- a) Bestimmung der Expression der NER-Proteine XPA, XPF und ERCC1 in HNSCC-Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene und Korrelation mit der jeweiligen in vitro Cisplatinresistenz der Zelllinien. Als Kontrollen wurden Testistumorzelllinien und eine cisplatinresistente Ovarialkarzinomzelllinie verwendet.
- b) Systematische Quantifizierung der NER-Expression in HNSCC-Tumorgewebe-proben (Primärtumoren, Lymphknoten-Metastasen, Rezidive) im Vergleich zu Testistumorproben mittels quantitativer RT-PCR und Western Blot.

2) Wiederherstellung der in vitro Cisplatin-Chemosensibilität von resistenten Zelllinien durch induzierte DNA-Reparatur-Defizienz:

Zur Entwicklung therapeutischer Ansätze sollte die DNA-Reparatur in vitro auf molekularer Ebene ausgeschaltet werden. Es sollte untersucht werden, ob die gezielte Inhibition der NER zu einer verstärkten Chemosensitivität der Zellen führt. Hierzu wurden siRNAs in cisplatinresistente Tumorzelllinien transferiert. Die Analyse der Daten erfolgte durchflusszytometrisch und molekularbiologisch.

3 Materialien

3.1 Verwendete Laborgeräte

Biophotometer	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Blockthermostat BT 1301	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Brutschrank	<i>Binder GmbH, Tuttlingen</i>
Dampfsterilisator	<i>Systec GmbH, Wettenberg</i>
Durchflusszytometer FACSCanto™	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Elektrische Feinwaage AK 160	<i>Mettler-Toledo GmbH, Giessen</i>
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	<i>Carl Zeiss GmbH, Göttingen</i>
Gefrierkombination (+4 °C, -20 °C)	<i>Siemens AG, Berlin/München</i>
Gefrierschrank (-86 °C)	<i>Sanyo Electric Co., Ltd., Japan</i>
Gelkassetten	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Imagingsystem Gel-Dok XR	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Kreisschüttler MS 1 Minishaker	<i>IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen</i>
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	<i>Haereus Instruments GmbH, Hanau</i>
Laborabzug	<i>Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen</i>
Lichtmikroskop	<i>Helmut Hund GmbH, Wetzlar</i>
LightCycler II	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
Magnetrührer RH basic	<i>IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen</i>
Mikroskopie-Kamera AxioCam MR _m	<i>Carl Zeiss GmbH, Göttingen</i>
Mikrotiterplatten-Photometer MRX	<i>Dynatech Laboratories, Denkendorf</i>
Mikrowelle Privileg 8020	<i>Quelle Aktiengesellschaft, Fürth</i>
Mini-PROTEAN®3 Gelkammer	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Netzgerät PowerPac HC Power Supply	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Netzgerät PowerPac 200 Power Supply	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Netzgerät Power Supply EPS 601	<i>Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg</i>
Neubauer Zählkammer	<i>Brand GmbH & Co. KG, Wertheim</i>
Pipettierhilfe Pipetus®-Akku	<i>Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.</i>

Schütteltisch ST5CAT	<i>KG, Eberstadt</i>
Semi-Dry Transfer Cell Trans Blot [®] SD	<i>neoLab Migge GmbH, Heidelberg</i>
Sterilbank	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Tischzentrifuge CR 4.22	<i>NuAire Inc., Plymouth, USA</i>
TissueLyser	<i>Jouan GmbH, Fernwald</i>
Wasserbad	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
	<i>Köttermann GmbH & Co. KG,</i>
	<i>Uetze/Hänigsen</i>

3.2 Verbrauchsmaterialien

Blot-Papier	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Einfrierbox, Nalgene, IDL	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Einmalspritzen 1,0 ml	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Erlenmeyerkolben	<i>SCHOTT Duran Produktions GmbH & Co. KG, Mainz</i>
FACS-Röhrchen	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
(Filter) Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Gewebekulturschalen	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Glasplatten, Spacer 1,5 mm, 0,75 mm	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Kryoröhrchen (2 ml)	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</i>
Küvette UVette [®]	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
LightCycler [®] Capillaries (20 µl)	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
LightCycler [®] Zentrifugenadapter	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
96-Loch-Flachbodenplatten	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</i>
Magnetrührstäbe	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Mahlkugeln für Gewebe	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Multiply Strip 4er Kette 0,2 ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Nitrozellulose Membran (0,45 µm)	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>

Serologische-Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Skalpelle	<i>Feather Safety Razor Co., Ltd, Japan</i>
Zellkulturflaschen diverse Größen	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Zellschaber	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Zentrifugenröhrchen 1,5 ml, 2 ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>

3.3 Chemikalien und Farbstoffe

Acrylamid	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Agarose	<i>Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf</i>
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Anodenpuffer Roti-Blot A	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Aprotinin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Aqua Spüllösung	<i>Delta Select, Dreieich</i>
β -Mercaptoethanol	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Bio-Rad Protein Assay	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Bromophenolblau	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
Bovines Serum Albumin (BSA)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
Ethanol 99,8 %	<i>Apotheke Uniklinik Lübeck</i>
Ethidiumbromid (1 %)	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Gelantin	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Glycerol	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Glycin	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Igepal CA-630	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Isopropanol (100 %)	<i>Apotheke Uniklinik Lübeck</i>

Kaliumchlorid (KCl)	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
Kathodenpuffer Roti-Blot K	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
6 x Loading Dye Solution	<i>Fermentas GmbH, St.Leon-Rot</i>
Methanol 99,8 %	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
Milchpulver	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Mycoplasma-Off®	<i>Minerva Biolabs GmbH, Berlin</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
Natrium Deoxycholat	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Natrium Orthovanadat	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Platinex®-Cisplatin-Lösung	<i>Bristol-Myers Squibb GmbH, München</i>
Ponceau S	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Protein-Molekulargewichtsstandard	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
RNA Later	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
RNeasy Lysis Buffer (RLT)	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
10 x TBE Puffer	<i>Fermentas GmbH, St.Leon-Rot</i>
TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl- Ethylendiamin)	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Trichloressigsäure (TCA)	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Tris Base	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Tris-HCl	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Trypanblau	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
Trypsin-EDTA (1 x)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
LiChrosolv® Wasser für die Chromato- graphie	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>

3.4 Puffer und Lösungen

Die aufgeführten Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

10 x Elektrophorese Puffer	<i>250 mM Tris Base 1,9 M Glycin 1 % SDS</i>
4 x Higher Tris pH 6,8	<i>0,5 M Tris Base 8 mM EDTA 0,4 % SDS</i>
4 x Lower Tris pH 8,8	<i>1,5 M Tris Base 8 mM EDTA 0,4 % SDS</i>
10 x PBS (phosphate-buffered saline)	<i>80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na₂HPO₄ 2,4 g K₂HPO₄</i>
RIPA-Puffer	<i>1x PBS 1 % Igepal CA-630 0,5 % Natrium Deoxycholat 0,1 % SDS</i>
Vor Gebrauch wurden hinzugefügt:	<i>30 µl/ml Aprotinin (10 %) 10 µl/ml PMSF (10 mg/ml) 10 µl/ml Natrium Orthovanadat</i>

2 x SDS Puffer	<i>4 % SDS</i>
	<i>10 % 2-Mercaptoethanol</i>
	<i>20 % Glycerol</i>
	<i>0,002 % Bromophenolblau</i>
	<i>0,1 M Tris HCL pH 6,8</i>

3.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Dimethylsulfonat (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Dulbecco's Phosphate Buffer (PBS)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
Fetales Kälberserum (FCS)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
L-Glutamin 200 mM (100 x)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
Penicillin/Streptomycin (10000 U/10 mg/ml)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
Sodium Pyruvat (100 mM)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>

3.6 Verwendete Zelllinien

Es wurden HNSCC- und Testistumorzelllinien sowie eine bekannt cisplatin-resistente Ovarialkarzinomzelllinie (Morimoto et al., 1991a; Morimoto et al., 1991b) untersucht. Die in Tab. 3-1 aufgeführten Zelllinien wurden freundlicherweise von der *University of Sheffield, England* (2102 EP, Dr. PW Andrews), der *Universität Göttingen* (NTERA, NCCIT, Dr. S. Schweyer), der *University of Pittsburgh, USA* (833K, GCT27, SuSa, Teral, Dr. B. Köberle) sowie von der *University of Turku, Finnland* (UT-SCC: University of Turku Squamous Cell Carcinoma, Dr. R Grénman) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten HNSCC-Zelllinien FaDu und CAL-27, sowie die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 wurden von der *American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)* bezogen. Die HNSCC-Zelllinie ANT-1 wurde 1998 im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München etabliert.

HNSCC-Zelllinien	A, G ^a	Lokalisation des Ausgangstumors	TNM-Stadium ^b	Grad ^c	P, M, R ^d	VT ^e	Referenz
ANT-1	-	Hypopharynx	-	-	P	K	-
FaDu	56, m	Hypopharynx	-	G2	P	K	(Rangan, 1972)
CAL-27	56, m	Zunge	-	G3	P	K	(Gioanni et al., 1988)
UT-SCC 16A	77, f	Zunge	T ₃ N ₀ M ₀	G3	P	R	(Takebayashi et al., 2004)
UT-SCC 16B	77, f	Zunge	T ₃ N ₀ M ₀	G3	M	R	(Takebayashi et al., 2004)
UT-SCC 42A	43, m	Larynx	T ₄ N ₃ M ₀	G3	P	K	(Takebayashi et al., 2004)
UT-SCC 42B	43, m	Larynx	T ₄ N ₃ M ₀	G3	M	K	(Takebayashi et al., 2004)
UT-SCC 60A	59, m	Tonsille	T ₄ N ₁ M ₀	G1	P	K	(Takebayashi et al., 2004)
UT-SCC 60B	59, m	Tonsille	T ₄ N ₁ M ₀	G1	M	R	(Takebayashi et al., 2004)
UT-SCC 65	68, m	Oropharynx	T ₄ N _{2c} M ₀	G2	P	-	-
UT-SCC 70	72, m	Hypopharynx	T ₄ N ₁ M ₀	G3	P	-	-
UT-SCC 89	71, m	Hypopharynx	T ₄ N ₀ M ₁	G2	P	-	-
UT-SCC 94	52, m	Hypopharynx	T ₄ N _{2b} M ₀	G2	P	-	-

Kontroll-Zelllinien	A, G ^a	Lokalisation und Histologie des Ausgangstumors	Referenz
2102 EP	-	Testis, Nicht seminomatöser Kombinationstumor (Teratokarzinom und Dottersacktumor)	(Andrews et al., 1980)
NCCIT	24, m	Testistumor Metastase (vorderes Mediastinum), Nicht seminomatöser Kombinationstumor (Unreifes Teratom, Embryonales Karzinom und Dottersacktumor)	(Damjanov et al., 1993; Teshima et al., 1988)
NTERA	22, m	Testis, Teratokarzinom (NSGCT)	(Andrews et al., 1984; Schwyer et al., 2004)
833K	19, m	Testistumormetastase (Periaortaler Lymphknoten), Kombinationstumor (Chorionkarzinom mit Anteilen von Embryonalem Karzinom, Teratom und Seminom)	(Bronson et al., 1980)
GCT27	-	Testis, Teratokarzinom (NSGCT)	(Chresta et al., 1996; Pera et al., 1987)
SuSa	30, m	Testis, Teratokarzinom (NSGCT)	(Hogan et al., 1977)
Teral	47, m	Testistumormetastase (Lunge), Teratokarzinom (NSGCT)	(Fogh, 1978; Fogh et al., 1977)
SKOV-3	64, f	Ovarialtumormetastase (Aszitis), Adenokarzinom	(Morimoto et al., 1991b; Morimoto et al., 1993)

Tabelle 3-1: Übersicht über die verwendeten HNSCC- und Kontroll-Zelllinien

^aA = Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Materialgewinnung, G = Geschlecht

^bTNM-Stadium = Tumorgröße, Lymphknoten-Status, (Fern-) Metastasen

^cDifferenzierungsgrad G1-G4 (siehe Kapitel 2.1.2)

^dP = Primärtumor, M = Lymphknoten-Metastase, R = Rezidiv

^eVorausgegangene Therapie: K = Keine, R = Radio

(NSGCT: nonseminomatous germ cell tumor)

3.7 Tumorproben

Zur Untersuchung der NER-Expression in vivo konnten 24 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Hals-Kopf-Bereich untersucht werden. Die Tumorgewebe-
proben wurden während operativer Eingriffe an der Klinik für Hals-, Nasen-, und
Ohrenheilkunde der Universität zu Lübeck entnommen. Darüber hinaus wurden
als Kontrollen Gewebeproben von zehn Patienten mit testikulären Keimzell-
tumoren untersucht, die freundlicherweise von der urologischen Klinik der
Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt wurden. Für die intraoperative
Entnahme von Tumorgewebe-
proben lag ein von der Ethikkommission der
Universität zu Lübeck befürworteter Ethikantrag (Aktenzeichen: 04-158) vor. Alle
Patienten hatten, nach vorangegangener Aufklärung über das Forschungs-
vorhaben, ihre Zustimmung zur Studienteilnahme gegeben. Die histopatho-
logische Befundung aller Proben erfolgte am Institut für Pathologie der Universität
zu Lübeck. In Tabelle 3-2 und 3-3 sind die patienten- und tumorbezogenen Daten
der untersuchten Proben dargestellt.

Pat. Nr.	A ^a	Lokalisation Primärtumor	Histopathologischer Befund	P, M, R ^b	VT ^c	TNM Stadium ^d	Lug ^e
1	49	Testis	Klassisches Seminom	P	K	pT ₂ cN ₃ M ₀	IIc
2	36	Testis	Kombinationstumor (Embryonales Karzinom und Seminom)	P	K	pT ₂ cN ₀ cM ₀	I
3	39	Testis	Klassisches Seminom	P	K	pT ₂ cN ₀ M ₀	I
4	38	Testis	Kombinationstumor (Embryonales Karzinom und Seminom)	P	K	pT ₂ cN ₂ cM ₀	IIb
5	42	Testis	Klassisches Seminom	P	K	pT ₁ cN ₀ M ₀	Ia
6	27	Testis	Nicht seminomatöser Kombinationstumor	P	K	pT ₁ cN ₀ M ₀	Ia
7	24	Testis	Reifes Teratom, kleinherdig Seminom	P	K	pT ₁ pN ₁ cM ₀	IIa
8	42	Testis	Klassisches Seminom	P	K	pT ₁ cN ₀ M ₀	Ia
9	21	Testis	Klassisches Seminom	P	K	pT ₁ cN ₀ M ₀	Ia
10	43	Testis	Seminom (Anaplastischer Subtyp)	P	K	pT ₂ cN ₀ cM ₀	I

**Tabelle 3-2: Untersuchte Testistumorgewebe-
proben (n = 10)**

^aA = Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Materialgewinnung

^bP = Primärtumor, M = Lymphknoten-Metastase, R = Rezidiv

^cVorausgegangene Therapie: K = Keine, O = Operative Entfernung, R = Radiatio, Cx = Chemotherapie

^dTNM-Stadium = Tumorgröße, Lymphknoten-Status, (Fern-) Metastasen. Klassifizierung in T- und N-Stadien aufgrund von histopathologischer („p“) oder klinischer („c“) Untersuchung.

^eLugano-Klassifikation (siehe Kapitel 2.2)

Pat. Nr.	A, G ^a	Lokalisation Primärtumor	Histopathologischer Befund	P, Z, M, R ^b	VT ^c	TNM Stadium ^d	G ^e
11	58, f	Tonsille	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₁ pN ₀ M ₀	G3
12	61, f	Tonsille	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₂ pN _{2a} M ₀	G2
13	60, m	Alveolarfortsatz	Plattenepithelkarzinom	Z	R	pT ₂ pN ₀ M ₀	G3
14	65, m	Larynx, Hypopharynx	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₃ pN _{2b} M ₀	G3
15	50, m	Alveolarfortsatz	Plattenepithelkarzinom	Z	R	pT ₁ pN ₀ M ₀	G2
16	67, m	Larynx	Plattenepithelkarzinom	R	O	pT _{4a} pN ₀ M ₀	G1
17	47, m	Mundboden	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₂ pN _{2b} M ₀	G2
18	68, f	Gaumen, Zungengrund	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₁ pN ₀ M ₀	G3
19	45, m	Mundboden	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₂ pN _{2b} M ₀	G2
20	70, f	Tonsille	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₃ pN _{2b} M ₀	G3
21	56, m	Larynx, Hypopharynx	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₂ pN ₁ M ₀	G3
22	75, m	Larynx	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₃ pN ₀ M ₀	G2
23	44, m	Larynx, Hypopharynx	Plattenepithelkarzinom	R	O, R, Cx	rpT _{4a} pN ₀ M ₀	G3
24	66, m	Tonsille	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₂ pN _{2b} M ₀	G3
25	57, m	Hypopharynx	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₂ pN _{2a} M ₀	G2
26a	50, m	Larynx	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₂ pN _{2b} M ₀	G2
26b	50, m	Larynx	LK-Metastase	M	K	pT ₂ pN _{2b} M ₀	G2
26c	50, m	Larynx	LK-Metastase	M	K	pT ₂ pN _{2b} M ₀	G2
27a	72, m	Hypopharynx	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₂ pN ₁ M ₀	G3
27b	72, m	Hypopharynx	LK-Metastase	M	K	pT ₂ pN ₁ M ₀	G3
28a	70, m	Larynx	Plattenepithelkarzinom	R	O	rpT ₃ pN _{2b} M ₀	G3
28b	70, m	Larynx	LK-Metastase	M	K	pT ₃ pN _{2b} M ₀	G3
28c	70, m	Larynx	LK-Metastase	M	K	pT ₃ pN _{2b} M ₀	G3
29a	43, m	Zungengrund	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₃ pN ₁ M ₀	G3
29b	43, m	Zungengrund	LK-Metastase	M	K	pT ₃ pN ₁ M ₀	G3
30a	53, m	Tonsille	Plattenepithelkarzinom	R	O	rpT ₄ pN ₁ M ₀	G3
30b	53, m	Tonsille	LK-Metastase	M	O	rpT ₄ pN ₁ M ₀	G3
31a	51, m	Larynx	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₃ cN ₁ M ₀	G3
31b	51, m	Larynx	LK-Metastase	M	K	pT ₃ cN ₁ M ₀	G3
32a	57, m	Hypopharynx	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₂ pN ₁ M ₀	G3
32b	57, m	Hypopharynx	LK-Metastase	M	K	pT ₂ pN ₁ M ₀	G3
33a	68, m	Hypopharynx	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT ₂ pN _{2b} M ₀	G3
33b	68, m	Hypopharynx	LK-Metastase	M	K	pT ₂ pN _{2b} M ₀	G3
34a	62, m	Larynx	Plattenepithelkarzinom	P	K	pT _{4a} pN _{2b} M ₀	G2
34b	62, m	Larynx	LK-Metastase	M	K	pT _{4a} pN _{2b} M ₀	G2

Tabelle 3-3: Untersuchte HNSCC-Gewebeproben (n = 36)

^aA = Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Materialgewinnung, G = Geschlecht

^bP = Primärtumor, Z = Zweittumor, M = Lymphknoten-Metastase, R = Rezidiv

^cVorausgegangene Therapie: K = Keine, O = Operative Entfernung, R = Radiatio, Cx = Chemotherapie

^dTNM-Stadium = Tumorgröße, Lymphknoten-Status, (Fern-) Metastasen. Klassifizierung in T- und N-Stadien aufgrund von histopathologischer („p“) oder klinischer („c“) Untersuchung.

^eDifferenzierungsgrad G1-G4 (siehe Kapitel 2.1.2)

3.8 Primer und QuantiProbe-Sonden

Quanti Tect Hs_HPRT1 Assay (100)	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
ERCC1 Quanti Tect Custom Assay (100)	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
XPF Quanti Tect Custom Assay (100)	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
XPA Quanti Tect Custom Assay (100)	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>

Ziel-mRNA	Oligonukleotid-Sequenz (5'→3')*	Länge	T _m	GC %	Position (5'-3')	A (bp)
ERCC1	F667: CTGATGGAGAAGCTAGAG	18	60,4	50	667-684	86
	R752: TGACTGTCCGTTTTGTTG	18	64,2	44	752-735	
	Q714: TCTGACCACCGTGAAGT	17	66,9	53	714-730	
XPF	F519: CTTTGATACTGGTTTTTTG	18	60,2	33	510-527	96
	R605: GAGTTTACTGCTACATGGA	19	64,7	42	605-587	
	Q534: GGAAAGAGTGATGAGAA	17	65,2	41	534-550	
XPA	R266: CACAATGGGGTGATATGA	18	60,7	44	266-283	95
	F360: CTTTGCTTCTTCTAATGCTTCT	22	64,4	36	360-339	
	Q320: TTGAAGTTTGGGGTAGT	17	68,2	41	320-336	
HPRT1 [#]	Qiagen GmbH, Hilden (Katalognummer: 241027)					

Tabelle 3-4: Primer und QuantiProbe-Sonden, die im Rahmen der quantitativen One Step „real-time“ RT-PCR verwendet wurden.

* F = Vorwärts-(forward-)primer; R = Rückwärts-(reverse-)primer; Q = QuantiProbe-Sonde
T_m = Schmelztemperatur in °C; GC % = Guanin/Cytosin-A nteil in %; A (bp) = Amplifikatlänge in Basenpaaren (Angaben entsprechend der Qiagen Design Software)

[#] Aus produktrechtlichen Gründen stellt die Firma Qiagen keine Sequenzdaten der im Quanti Tect Gene Expression Assay enthaltenen Primer und QuantiProbes zur Verfügung.

3.9 Komplett Kits

Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
In Vitro Toxicologie Assay Kit (MTT-Test)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Mycoplasma Detection Kit	<i>Minerva Biolabs GmbH, Berlin</i>
Quanti Tect Probe RT-PCR Kit (200 rxn)	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
RNeasy Mini Kit + QIAshredder Säulen	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
RNase-Free DNase Set	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>

3.10 DNA-Längenmarker

100-Basen-Paar-Marker (1 µg/µl)	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
50-Basen-Paar-Marker (1 µg/µl)	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>

3.11 Antikörper

3.11.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezifität	Firma
Anti-β-Actin	Mouse IgG, monoclonal	<i>Abcam, Cambridge, GB</i>
Anti-ERCC1	Mouse IgG _{2b} ; Clone 3F169	<i>Biomol, Hamburg</i>
Anti-ERCC1	Rabbit IgG, polyclonal	<i>Santa Cruz, CA, USA</i>
Anti-XPA	Mouse IgG _{2a,k} ; Clone 3F396	<i>Biomol, Hamburg</i>
Anti-XPF	Mouse IgG _{2k} ; Clone 3F398	<i>Biomol, Hamburg</i>

3.11.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Markierung	Firma
Goat Anti-Mouse IgG (H + L)	AP	<i>Bio-Rad, München</i>
Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)	AP	<i>Bio-Rad, München</i>

3.12 siRNAs und Transfektionsreagenzien

Bei der verwendeten XPA- und XPF-siRNA der Firma *Santa Cruz* handelt es sich um eine siRNA-Mischung aus drei RNA-Doppelsträngen in einem quantitativen 1:1:1 Verhältnis.

XPA siRNA (h): sc-36853 (10 µM)

Santa Cruz, CA, USA

- Sense Nr. 1: GUACCGUAAGACUUGUACU
- Sense Nr. 2: CCAUGAACUGACAUAUGAA
- Sense Nr. 3: GUCUGUGAUUGCCUUCUUA

XPF siRNA (h): sc-36855 (10 µM)

Santa Cruz, CA, USA

- Sense Nr. 1: CUACCAUGCUUGCUAUACA
- Sense Nr. 2: GGAUAGCAAAGCUGAAGAA
- Sense Nr. 3: GCAUGAAGAAUUUGAUGUA

Die im Folgenden aufgeführte siRNA besitzt keine bekannte Homologie zu Säugetiergenen und wurde daher als Negativkontrolle sowie zur Optimierung der Transfektionseffizienz verwendet:

Negative Control siRNA Alexa Flour 488 (20 µM)

Qiagen GmbH, Hilden

- Sense: UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdT dT
- Antisense: ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdT dT

Lipofectamin™ 2000

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Opti-MEM I-Medium

*Gibco Invitrogen GmbH,
Karlsruhe*

3.13 Computer und Software

Internet-Recherche / Sequenzabgleich (BLAST):

BioEdit Sequence Alignment Editor

*Ibis Therapeutics, Carlsbad,
CA, USA*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Text-, Tabellen-, Abbildungsbearbeitung:

Adobe Photoshop Version 7.0

*Adobe Systems Inc., San
Jose, USA*

Microsoft Office 2003

*Microsoft Corporation,
Redmont, USA*

FACS-Messungen:

BD FACS Diva™ Software Version 4.1.2

BD Biosciences, Heidelberg

Fluoreszenzmikroskopie:

AxioVision Rel. 4.5 Software

Carl Zeiss GmbH, Göttingen

LightCycler:

LightCycler Software Version 3.5.3

*Roche Diagnostics GmbH,
Mannheim*

Ergebnisauswertung und Statistik:

Quantity One® 1-D Analysis Software

*Bio-Rad Laboratories GmbH,
München*

Software GraphPad Prism® Version 4.0

*GraphPad Software, Inc.,
San Diego, USA*

SPSS 12.0 für Windows

SPSS Inc., Chicago, USA

WinMDI 2.9 für Windows

*Copyright® 1993-2000,
Joseph Trotter*

4 Methoden

4.1 Zellkulturarbeiten

Allgemeines: Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank (NuAire) durchgeführt. Um eine Kontaminierung der Zellkultur mit Bakterien und Pilzen zu verhindern, ist auf sauberes und steriles Arbeiten zu achten. Nach UV-Belichtung und 20-minütiger Lüftung der Werkbank wurde die Arbeitsfläche vor Gebrauch mit Mycoplasma-Off[®] (Minerva Biolabs) gereinigt. Alle verwendeten Materialien wie Eppendorf-Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden im Dampfsterilisator (Systec) für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden regelmäßig mit 70 % Ethanol gereinigt. Um Verunreinigungen einer Zelllinie mit einer anderen zu verhindern, wurde immer nur mit einer Zelllinie unter der Sterilbank gearbeitet.

4.1.1 Anzucht der Zellen

Alle Zellkulturen wurden im Begasungsbrutschrank (Binder) bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % in Zellkulturflaschen (Sarstedt) kultiviert. Alle verwendeten Zelllinien wurden als adhärente Monolayerkulturen in DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle Medium*)-Kulturmedium mit 4,5 mg/ml Glucose (Invitrogen) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS, PAA), 1 mM Natrium Pyruvat (PAA) und 1 mM Glutamin (PAA) angezüchtet. Zu Beginn der Zellanzucht wurde dem Kulturmedium 1 mM Penicillin/Streptomycin (PAA) zugesetzt. Vor der Verwendung wurde das fetale Kälberserum bei 56 °C für 30 min hitzeinaktiviert. Die verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen getestet. Der Mycoplasmentest (Mycoplasma Detection Kit, Minerva Biolabs GmbH) war stets negativ.

4.1.1.1 Mediumwechsel

Die Konfluenz der Zellen wurde alle ein bis zwei Tage mikroskopisch beurteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich, sofern die für die entsprechende Zelllinie optimale Zelldichte noch nicht überschritten war. Nach leichtem Schwenken der Zellkulturflasche wurde das Nährmedium mit Hilfe einer Stabpipette (Sarstedt) vorsichtig abgesaugt und damit gleichzeitig nicht adhärente Zellen entfernt. Anschließend wurde das zuvor entnommene Volumen durch frisches auf 37 °C vorgewärmtes Zellkulturmedium ersetzt.

4.1.1.2 Subkultivierung der Zellen

Die Kulturen wurden bei einer Zellkonfluenz von 70-80 % in einem für die jeweilige Zelllinie optimalen Verhältnis passagiert, um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Dazu wurde das Kulturmedium zunächst komplett abgesaugt. Danach wurden die Zellen vorsichtig mit 10-20 ml PBS-Lösung überschichtet und die Zellkulturflasche mehrfach in waagerechter Position geschwenkt, bevor die PBS-Lösung wieder abgesaugt wurde. Die Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Kulturflaschen erfolgte durch die Zugabe von 1-5 ml Trypsin /EDTA-Lösung (PAA). Trypsin ist eine Protease, die z.B. Membranproteine, welche die Haftung der Zellen an der Zellkulturflasche vermitteln, spaltet. Die Zellen wurden dann für 5-10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Einwirkzeit wurde möglichst gering gehalten, da durch Trypsin auch lebenswichtige Proteine der Zellen verdaut werden. Daher wurde der Grad der Ablösung regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und das Ablösen der Zellen gegebenenfalls mechanisch durch mehrfaches Klopfen an der Kulturflasche unterstützt. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde die enzymatische Proteolyse durch Zugabe des vierfachen Volumens an FCS-haltigem Medium (10 %) gestoppt. Die Zellen wurden in ein steriles Röhrchen überführt und bei 300 x g und 30 °C für 8 min abzentrifugiert. Das Zellpräzipitat wurde anschließend in frischem Medium resuspendiert und der Verdünnung entsprechend in neue sterile Zellkulturflaschen eingesät.

4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Alle Zellzählungen erfolgten in einer Neubauer Zählkammer (Brandt). Zur Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen wurde eine Färbung der Zellen mit dem polyanionischen Farbstoff Trypanblau (Merck) durchgeführt. Vitale Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschließen, und erscheinen unter dem Lichtmikroskop ungefärbt. Trypanblau kann nur in irreversibel geschädigte Zellen mit veränderten Membraneigenschaften penetrieren und führt zu einer mikroskopisch nachweisbaren Blaufärbung dieser Zellen. Zur Zählung der vitalen Zellen wurden zu 20 µl Zellsuspension 20 µl einer 0,1 %igen Trypanblaulösung gegeben, die Zellen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren suspendiert und in eine Neubauer Zählkammer (Brand) überführt. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Hund) wurde die Anzahl der lebenden, ungefärbten Zellen in den vier Eckquadranten der Zählkammer ausgezählt und gemittelt. Da Trypanblau zytotoxisch für die Zellen ist, muss die Auswertung innerhalb von 3-5 min nach der Farbstoffzugabe durchgeführt werden. Die Zellzahl in der Zellsuspension wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Mittlere Zellzahl} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^5 = \text{Zellzahl pro ml}$$

4.1.3 Einfrieren von Zellen

Zellen in Kultur wurden während der exponentiellen Wachstumsphase mit Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst, 1:4 mit Medium versetzt und 8 min bei 300 x g und 30 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium, bestehend aus 70 % Kulturmedium, 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, PAA), resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von je ca. 2×10^6 Zellen pro ml in Kryoröhrchen (Greiner) überführt. Die Röhrchen wurden zunächst für 24 h in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox (Sarstedt) bei - 80 °C gelagert, bevor sie zur Langzeitkryokonservierung in Behältern mit flüssigem Stickstoff bei - 196 °C archiviert wurden.

4.1.4 Auftauen von eingefrorenen Zellen

Die in Kryoröhrchen tiefgefrorenen Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und, um das DMSO auszuwaschen, in 10 ml vorgewärmtes FCS-haltiges (10 %) Nährmedium überführt und abzentrifugiert (300 x g, 30 °C, 8 min). Der Waschvorgang wurde wiederholt, und nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpräzipitat in ebenfalls vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen angezüchtet. Nach 24 h erfolgte die mikroskopische Begutachtung der Zellen sowie der erste Mediumwechsel.

4.2 Archivieren von Tumorgewebeproben

Die Gewebeproben wurden intraoperativ aus Primärtumoren bzw. Lymphknoten-Metastasen entnommen und sofort in sterile PBS-Lösung (PAA) überführt. Ein Teil der Probe wurde umgehend in RNA Later (Qiagen) inkubiert, um die vorhandene RNA zu stabilisieren und eine Veränderung im Genexpressionsmuster durch spezifische und unspezifische RNA-Degradation zu verhindern. Dabei ist darauf zu achten, dass der Durchmesser der Gewebeprobe nicht über einem halben Zentimeter liegt, um ein komplettes Durchdringen von RNA Later durch das Gewebe zu gewährleisten. Nach Überbringung in das Labor wurde die Gewebeprobe mit Hilfe eines Skalpell (Feather Safety Razor) in 3-5 mm² große Stücke geschnitten, in Kryoröhrchen überführt und nativ bzw. in RNA Later bei - 80 °C oder in flüssigem Stickstoff bei - 196 °C archiviert.

4.3 MTT-Zytotoxizität-Assay

Die Cisplatinempfindlichkeit der untersuchten Zelllinien wurde mit Hilfe des MTT-Tests (Sigma) bestimmt. Dieser Test dient der Quantifizierung von lebenden Zellen durch folgendes Prinzip:

Das Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) besitzt einen Tetrazolring und ist, gelöst in phenolrotfreiem Medium oder

PBS, gelb gefärbt. Mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen sind in der Lage, diesen Tetrazolring enzymatisch zu spalten. Es bilden sich violett-farbene Formazankristalle, die in wässriger Lösung unlöslich sind und ausfallen. Durch Zugabe von Isopropanol (100 %) werden die Kristalle gelöst und die Absorption der violetten Färbung spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 bis 600 nm messbar. Die optische Dichte des Farbstoffes ist dabei direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und korreliert mit deren Stoffwechselaktivität (Mosmann, 1983).

Typische Versuchsanordnung: Die Zellen wurden bei 70 % Konfluenz, wie oben beschrieben, geerntet, bei 300 x g und 30 °C für 8 min zentrifugiert, in Medium (DMEM mit 10 % FCS und 1 % Natrium Pyruvat) resuspendiert, gezählt und in 96-Loch-Platten (Greiner) ausgesät. Eine festgelegte Dichte pro Loch von 1.000 Zellen pro 100 µl stellte ein exponentielles Zellwachstum während der Dauer des Experimentes sicher. Nach 24 h wurden die Zellen mit Cisplatinkonzentrationen (Platinex[®]-Lösung, Bristol Myers) von 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0 und 30.0 µg/ml bzw. mit cisplatinfreiem Medium inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS (PAA) gewaschen und in 200 µl cisplatinfreiem Medium inkubiert. Nach 3-tägiger Kultivierung im Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % erfolgte die Auswertung mittels MTT-Test. Dazu wurden zunächst 100 µl Medium pro Loch abpipettiert und anschließend 10 % der MTT-Gebrauchslösung (1 Vial MTT Trockensubstanz + 3 ml PBS) pro Volumen Zellkultur hinzugegeben. Die 96-Loch-Platten wurden für 120 min unter Standardbedingungen im Zellkulturschrank inkubiert. Durch Zusatz von MTT Solubilization Solution (Sigma) im Verhältnis 1:1 (110 µl) wurde die Reaktion gestoppt, die Zellen lysiert und die entstandenen Formazankristalle aufgelöst. Bei der anschließenden Messung in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Dynatech) wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. Von diesem Wert wurde die Extinktion bei 650 nm abgezogen, um die durch Medium und Präzipitate entstehende Absorption auszugleichen. Zur Auswertung der gemessenen Werte wird die Extinktion der lebenden zytostatikafrei inkubierten Zellen als 100 % gesetzt und die weiteren gemessenen Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Bei allen Angaben handelt es sich um Mittelwerte, die sich aus der Anzahl der Messungen (n = 4-10) ergeben, die an mindestens zwei verschiedenen

Versuchstagen durchgeführt wurden. Um den Resistenzgrad der Zelllinien zu bestimmen, wurden die im MTT-Assay erhaltenen Werte mit der Software GraphPad Prism[®] Version 4.0 (GraphPad Software, Inc.) ausgewertet. Man erhält Konzentrations-Effekt-Kurven, aus denen sich die IC₅₀- bzw. IC₉₀-Werte bestimmen lassen. Sie geben die Konzentration des Zytostatikums an, bei der nur noch die Hälfte bzw. 10 % lebende Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vorliegen.

4.4 RNA-Isolierung

Allgemeines: Prinzipiell ist bei der Isolierung darauf zu achten, dass die als Einzelstrang vorliegende RNA sehr anfällig gegenüber abbauenden RNasen ist und durch diese leicht degradiert wird. RNasen selbst sind sehr stabil, ubiquitär vorhanden und benötigen in der Regel keine Kofaktoren für den enzymatischen Abbau der Ribonukleinsäuren (Sela et al., 1957). Daher ist für die Präparation von RNA die Verwendung gesonderter, RNase-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Alle Lösungen wurden daher in LiChrosolv[®] Wasser für die Chromatographie (Merck) angesetzt und die verwendeten Reaktionsgefäße und Pipetten für 15 min bei 121 °C im Dampfsterilisator (Systec) autoklaviert. Während der RNA-Präparation wurden zum Schutz vor Kontamination durch auf der Haut befindlicher RNasen Handschuhe getragen. Außerdem wurden die Proben während des Pipettierens auf Eis gelagert.

Prinzip der RNA-Isolierung: Die RNA-Isolierung aus Zell- und Gewebeproben erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) und basiert auf der Methode von *Chomczynski und Sacchi* (Chomczynski and Sacchi, 1987). Bei dieser Methode werden die biologischen Proben zunächst lysiert und homogenisiert. Der hierzu verwendete Lysispuffer enthält stark denaturierendes Guanidium-Isothiocyanat sowie 2-Mercaptoethanol (Roth) und führt zu einer unmittelbaren Inaktivierung von RNasen. Durch Zugabe von Ethanol werden optimale Bedingungen für die anschließende Bindung an die Silicagel-Membran geschaffen. Nachfolgend werden in mehreren Waschschrritten Kontaminationen entfernt und die RNA anschließend

mit RNase-freiem Wasser von der Membran eluiert. Mit dieser Methode können RNA Moleküle ab einer Länge von 200 Nukleotiden isoliert werden.

4.4.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Die in Petrischalen (Durchmesser 100 mm, Sarstedt) unter Standardbedingungen kultivierten Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70 % (ca. 5×10^6 Zellen) geerntet. Dazu wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen durch Zugabe von vorgewärmtem PBS und vorsichtigem Schwenken der Petrischale gewaschen. Nach Aspiration des PBS wurden 600 μ l RLT-Lysis-Puffer, versetzt mit 2-Mercaptoethanol (10 μ l 2-Mercaptoethanol zu je 1 ml Lysis-Puffer), direkt auf die Zellen pipettiert. Das entstehende Zelllysate wurde mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt) gesammelt, in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und durch vorsichtiges Vortexen vermischt. Die folgende RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) erfolgte nach den Angaben des Herstellers:

Zur Homogenisierung wurden je 600 μ l des Lysates direkt auf eine QIAshredder-Säule (Qiagen) gegeben und diese für 2 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Zu dem Lysat wurde ein Volumen (600 μ l) 70 % Ethanol hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Maximal 700 μ l des Reaktionsgemisches wurden auf eine RNeasy-Säule geladen und je 15 sek bei 8.000 x g zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte der DNase-Verdau unter Verwendung des RNase-Free DNase Sets (Qiagen). Dazu wurden die Säulen zunächst mit je 350 μ l RW 1 Puffer gewaschen, für 15 sek bei 8.000 x g zentrifugiert und dann mit je 80 μ l eines frisch hergestellten Ansatzes aus DNase I Stammlösung (10 μ l) und RDD Puffer (70 μ l) für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 350 μ l RW 1 Puffer. Die Säulen wurden unter Verwendung eines neuen Auffangröhrchens (2,0 ml) mit je 500 μ l RPE Puffer gewaschen und wiederum für 15 sek bei 8.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, um die Membran durch 2-minütiges Zentrifugieren bei 8.000 x g zu trocknen. Die Säulen wurden zur Elution auf ein neues Auffangröhrchen (1,5 ml) gesetzt, 40 μ l RNase-freies Wasser auf die Mitte der Membran pipettiert und für 1 min bei über 8.000 x g zentrifugiert. Um eine höhere RNA-Konzentration zu erreichen, schloss sich ein

zweiter Elutionsschritt an, bei dem das gewonnene Eluat erneut auf die Säulenmembran pipettiert wurde.

4.4.2 RNA-Isolierung aus Gewebeproben

30 µg der Gewebeprobe wurden mit Hilfe einer elektrischen Feinwaage (Mettler-Toledo) abgewogen, mit einem Skalpell zerkleinert und zusammen mit einer Mahlkugel (Sarstedt) in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Nach Zugabe von 600 µl RLT-Lysis-Puffer, versetzt mit 2-Mercaptoethanol, wurde das Gewebe für 2 x 5 Minuten bei 20-30 Hz im TissueLyser (Qiagen) homogenisiert und anschließend für 3 min bei 10.000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, ein Volumen (600 µl) 70 % Ethanol hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Das weitere experimentelle Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben.

4.4.3 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Nukleinsäurekonzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurde durch spektralphotometrische Messung mit Hilfe eines Biophotometers (Eppendorf) bestimmt. Die Absorption einer Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) ist der RNA-Konzentration direkt proportional. Die zusätzliche Messung bei 280 nm (A_{280}) gibt Aufschluss über UV-absorbierende Verunreinigungen der Probe, die z.B. durch Proteine verursacht werden. Der Quotient A_{260}/A_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Eine Überschreitung dieses Grenzwertes sollte vermieden werden, da ansonsten keine lineare Abhängigkeit zwischen der Absorption bei 260 nm und der Nukleinsäurekonzentration mehr gegeben ist. 2 µl der Probe wurden mit 48 µl RNase-freiem Wasser (1:25) verdünnt und im Photometer gemessen. Die Messungen wurden in speziellen RNase-freien Küvetten (Eppendorf) gegen RNase-freies Wasser als Vergleichsprobe durchgeführt. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht dabei 40 µg/ml RNA (Sambrook and Gething,

1989). Die RNA-Konzentration der Probe lässt sich durch folgende Formel berechnen:

$$40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA/ml}$$

Die erhaltenen RNA-Lösungen wurden auf eine Konzentration von 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und bei - 80 $^{\circ}\text{C}$ archiviert. Zur qualitativen Kontrolle wurde ein Teil der gewonnenen RNA in einem 1,5 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

4.4.4 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Trennung von Nukleinsäuren wurden horizontale Agarosegele verwendet. Nukleinsäuren besitzen auf ihrer Oberfläche geladene Teilchen, die sie in einem elektrischen Feld wandern lassen. Bei der Agarosegelelektrophorese wird die auf das Agarosegel aufgetragene RNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Aufgrund ihrer bei pH 7 negativ geladenen Phosphatgruppen wandert die RNA in dem elektrischen Feld der Elektrophoresekammer mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Agarosematrix in Richtung Anode. Kleine RNA-Stücke wandern dabei schneller als große, so dass unterschiedlich lange Nukleinsäuremoleküle voneinander räumlich getrennt werden. Zur Herstellung des Gels wurden 3,0 g Agarosepulver (Biozym) in einem Erlenmeyerkolben (SCHOTT Duran Produktions) abgewogen und 180 ml Aqua dest. hinzugegeben. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle (Quelle) erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst und die Flüssigkeit klar war. Die Lösung wurde unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer (IKA[®] Werke) auf ca. 60 $^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Dann wurden 20 ml 10 % TBE-Puffer (Fermentas) hinzupipettiert und vermischt (Endvolumen 200 ml). Das flüssige Gel wurde blasenfrei in den abgedichteten horizontalen Gelträger (Bio-Rad) gegossen und der Gelkamm eingesteckt. Nach Polymerisation des Gels wurden Kamm und Abdichtung entfernt und der Gelträger mit dem Agarosegel in die mit 1 %igem TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer Sub-Cell GT (Bio-Rad) gelegt. Für den RNA-Ansatz wurden je Geltasche

2 µg RNA mit 2,0 µl 6 x Ladepuffer (Fermentas) und 6,0 µl Aqua dest. versetzt und auf das 1,5 %ige Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard dienten 10 µl (1 µg) eines 50- bzw. 100-Basen-Paar-Markers (Invitrogen), verdünnt in Ladepuffer und Aqua dest. Die gelchromatographische Auftrennung erfolgte für 60 min bei einer Spannung von 150 V. Anschließend wurde das Gel für 20 min im Dunkeln in Ethidiumbromid (1 µg/ml Aqua dest.)-Färbelösung (Invitrogen) geschüttelt und danach für 20 min in Aqua dest. entfärbt. Die Nukleinsäurebanden wurden durch den in die RNA interkalierenden und fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid nach Anregung mit kurzweiliger UV-Bestrahlung im Gel sichtbar gemacht und mit Hilfe des Gel-Imaging-Standardsystem (Phase) fotodokumentiert. Anhand des gleichzeitig aufgetragenen Größenstandards konnte die Größe der RNA-Fragmente bestimmt werden. Die sichtbaren Banden repräsentieren die 28S- und 18S-RNA und geben Aufschluss über die Integrität der RNA.

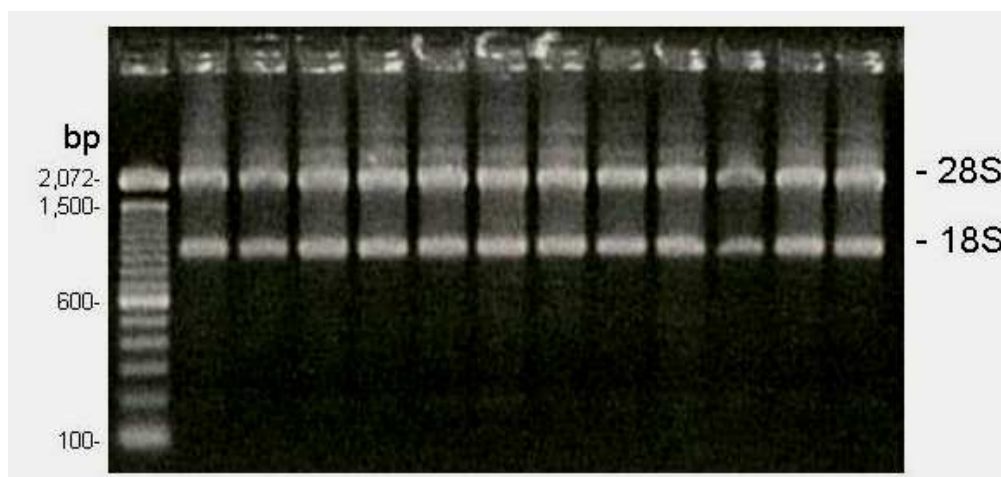


Abbildung 4-1: Qualitätskontrollen der Gesamt-RNA-Präparationen

Pro Bande wurden 2 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die 28S- und 18S-RNA-Banden sind deutlich erkennbar, so dass von einer erfolgreichen RNA-Präparation ausgegangen werden kann.

4.5 Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene mittels One-Step „real-time“ RT-PCR

4.5.1 Allgemeines Prinzip der quantitativen „real-time“ PCR

Bei der „real-time“ RT-PCR handelt es sich um ein schnelles und vollautomatisiertes Verfahren zur Quantifizierung der mRNA-Expression. Sie stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen, semiquantitativen Endpunkt-PCR dar, bei der PCR-Produkte nachgewiesen werden, indem im Anschluss an die PCR das Amplifikat auf ein Agarosegel aufgetragen wird und die gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente nach Anfärben mit Ethidiumbromid dokumentiert werden. Die Bestimmung der Fragmentmenge beruht auf der Größe und Farbintensität der erhaltenen Gelbanden, wodurch die Sensitivität der Methode beeinträchtigt wird. Da die Messung am Endpunkt der Untersuchung erfolgt, ist sie anfällig für Störungen während der Amplifikationsphase. Außerdem können durch diese Methode nur vergleichende Aussagen über die verschiedenen Endproduktmengen getroffen werden. Aufgrund der besonderen PCR-Reaktionskinetik, die in drei Phasen verläuft, ist es nicht möglich, die in den eingesetzten Proben vorhandenen Ausgangs-DNA-Mengen quantitativ exakt zu bestimmen. Zu Beginn der Reaktion (Phase 1) wie auch am Ende (Phase 3) findet keine exponentielle Amplifizierung des Zielproduktes statt, da aufgrund von geringer Templatemenge („Template“ = einzelsträngige DNA, die mit der DNA-Polymerase markiert wird) oder nachlassender Enzymaktivität keine optimalen Reaktionsbedingungen vorliegen. Lediglich im mittleren Reaktionsbereich (Phase 2) kommt es zu einer exponentiellen DNA-Vermehrung. Durch die Entwicklung der quantitativen „real-time“ PCR kann die Ausgangs-Templatmenge einer Probe genauer quantifiziert werden. Die Detektion der PCR-Produktmenge erfolgt dabei über Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden. Weitere Arbeitsschritte im Anschluss an die PCR sind nicht erforderlich. Diese Methode ist somit weniger störanfällig und liefern sehr viel genauere Daten (Giulietti et al., 2001). Die Grundlagen der „real-time“ PCR wurden 1992 durch *Higuchi et al.* geschaffen (Higuchi et al., 1992), indem sie der PCR-Reaktion Ethidiumbromid zufügten. Ethidiumbromid fluoresziert, wenn es in doppelsträngige DNA eingebaut und

durch UV-Licht angeregt wird. Mit Hilfe einer in die PCR-Maschine integrierten UV-Lampe konnte die Fluoreszenz gemessen und die Konzentration der Ziel-DNA bestimmt werden (Higuchi et al., 1993). Bei der heutigen „real-time“ PCR werden andere fluoreszierende Farbstoffe verwendet, die teilweise unspezifisch oder auch sequenzspezifisch mit der Ziel-DNA interagieren und die Detektion der PCR-Produkte ermöglichen. Bei jedem der verschiedenen Detektionssysteme steigt im Laufe der PCR die Fluoreszenz proportional mit der Produktmenge an. Die Messung der Fluoreszenzsignale erlaubt eine quantitative Echtzeit („real time“)-Analyse der PCR, da zu jedem Zeitpunkt während der PCR die Menge des entstehenden Produktes berechnet werden kann. Durch Verwendung von Standards mit bekannten Ausgangskonzentrationen kann die Menge der ursprünglich in der Probe vorhandenen Ziel-DNA bestimmt werden (siehe Kapitel 4.5.4).

4.5.1.1 Verwendete Detektionsmethode

Es stehen mehrere, auf Fluoreszenzfarbstoffmessung basierende, Detektionsprinzipien zur Bestimmung der PCR-Produktmenge zur Verfügung. Man unterscheidet hierbei Farbstoffe, die unspezifisch an doppelsträngige DNA binden, von fluoreszenzmarkierten sequenzspezifischen Sonden. In der vorliegenden Arbeit wurde als Detektionsmethode das QuantiProbe-Prinzip der Firma Qiagen verwendet. QuantiProbe-Sonden sind sequenzspezifische zweifach-markierte Oligonukleotide, die die spezifische Detektion der gesuchten PCR-Produkte ermöglichen, indem sie dem Standard PCR-Ansatz hinzugefügt werden und zwischen den beiden Primern an die Ziel-DNA binden. Die QuantiProbe-Sonden sind an ihrem 3' Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM, Extinktion 490 nm, Emission 530 nm) markiert und besitzen an ihrem 5' Ende ein nicht-fluoreszierendes „Quenching-Molekül“ sowie den sog. „Minor Groove Binder“ (MGB), der sich in die kleine Furche („Minor Groove“) von doppelsträngiger DNA einlagern kann (Abb. 4-2). Liegen die QuantiProbe-Sonden in ungebundener Form vor, bilden sie spontan eine Struktur, von der keine Fluoreszenz ausgeht, da diese durch das in unmittelbarer Nähe liegende „Quenching-Molekül“ unterdrückt wird. Bindet die Sonde jedoch zeitgleich mit der Primer-Anlagerung (Hybridisierung) an

ihre spezifische Zielsequenz, so werden der Fluoreszenzfarbstoff und das "Quenching-Molekül" separiert, und das Fluoreszenzsignal entsteht. Die Stärke des Signals ist direkt proportional zu der zu diesem Zeitpunkt im Ansatz vorhandenen Menge an PCR-Produkt und ermöglicht so die Quantifizierung der Zielsequenz. Der MGB-Komplex verhindert während der Synthese des komplementären DNA-Stranges eine Hydrolyse des QuantiProbe-Oligonukleotids durch die 5' → 3' Exonucleaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase. Während die Probe von der Ziel-DNA abgelöst wird, nähern sich Fluoreszenzfarbstoff und "Quenching-Molekül" wieder einander an, und das Fluoreszenzsignal sistiert.

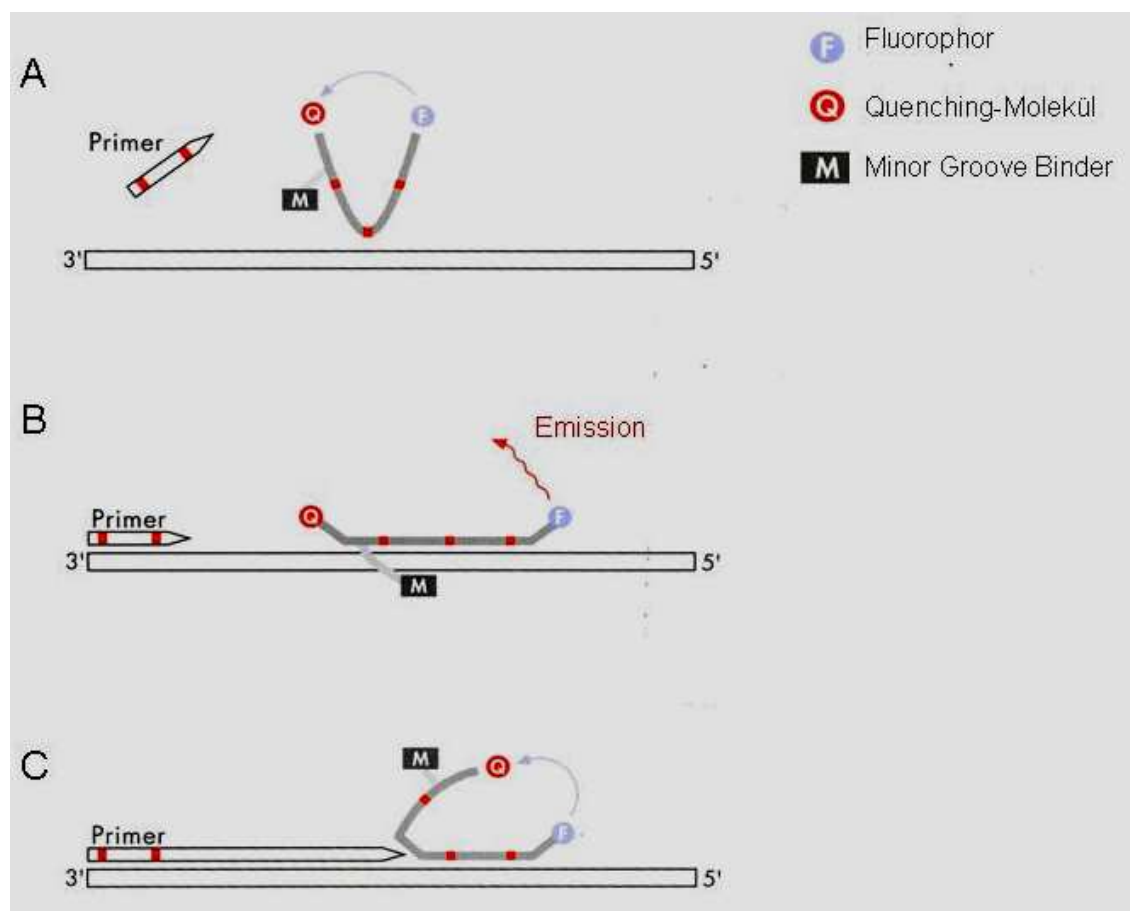


Abbildung 4-2: QuantiProbe-Prinzip

Schematische Darstellung der Funktionsweise von QuantiProbe-Sonden (Bild modifiziert aus QuantiTect RT-PCR Handbook 08/2003 der Firma Qiagen). **(A)** Die ungebundene QuantiProbe-Sonde bildet in Lösung eine Struktur aus, in der das Fluoreszenzsignal durch das "Quenching-Molekül" gehemmt wird. **(B)** Während der Primer-Hybridisierung bindet auch die Sonde an ihre Ziel-DNA. Fluoreszenzfarbstoff und "Quenching-Molekül" werden getrennt, und ein Fluoreszenzsignal ertsteht. **(C)** Die QuantiProbe-Sonde wird während des Verlängerungsschrittes von der Ziel-Sequenz entfernt, Fluoreszenzfarbstoff und "Quenching-Molekül" nähern sich einander an, und das Fluoreszenzsignal erlischt.

4.5.1.2 Funktionsweise der One-Step “real-time” RT-PCR

Für Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene muss die eingesetzte RNA zunächst enzymatisch mit Hilfe von Reversen Transkriptasen (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Reverse Transkriptasen sind retrovirale, RNA-abhängige DNA-Polymerasen, die die virale RNA in eine komplementäre DNA-Sequenz umschreiben, welche dann in die DNA der Wirtszelle integriert werden kann. Eine sog. RT-PCR kann als Zwei-Schritt- oder Ein-Schritt-Reaktion erfolgen (Two-Step bzw. One-Step RT-PCR). Bei der in dieser Arbeit verwendeten One-Step RT-PCR (Quanti Tect Probe RT-PCR Kit, Qiagen) ist es möglich, die cDNA-Synthese durch Reverse Transkriptasen sowie die anschließende PCR in einem Reaktionsgefäß unter Verwendung eines computergesteuerten Programms durchzuführen. In dem Reaktionsansatz sind dNTPs, Reverse Transkriptasen und genspezifische Primer enthalten, mit deren Hilfe die mRNA umgeschrieben wird. Nach Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptasen erfolgt die Vermehrung (Amplifikation) der cDNA. Die Vorteile der One-Step RT-PCR liegen in der hohen Reproduzierbarkeit und dem niedrigen Kontaminationsrisiko. Die Quantifizierung der PCR-Produkte basiert bei allen Systemen auf der Messung der in einem bestimmten Bereich des Versuchablaufs proportional zur PCR-Produkt-Akkumulation ansteigenden Fluoreszenz. Die übermittelten Fluoreszenzwerte werden von der systemeigenen Software gegen die zugehörige Zyklenzahl aufgetragen. Auf diese Weise lässt sich der Verlauf der PCR aufzeichnen. In Abb. 4-3 sind die Phasen der PCR-Produktmessung dargestellt. In der initialen Phase hebt sich das von der fluoreszierenden Sonde erzeugte Signal (sog. „Reportersignal“) noch nicht von der unspezifischen Basis- oder Hintergrundfluoreszenz ab, da die Detektion aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsansatz während der ersten PCR-Zyklen in der Regel noch nicht möglich ist. Der für die Quantifizierung ausschlaggebende Fluoreszenzschwellenwert ist der sog. „Threshold Cycle“ (C_T -Wert oder C_p = „Crossing Point“). Der C_T -Wert ist definiert als der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz erstmalig signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Diese Schwelle wird von der Software vorgegeben und liegt in der exponentiellen Amplifikationsphase (Log-lineare Phase) der PCR. Abhängig von der initialen Menge an Ziel-DNA im Reaktionsansatz wird die Schwelle zu unterschiedlichen Zykluszeiten erreicht. Über die unterschiedlichen C_T -Werte der

einzelnen Proben lassen sich so vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge an Ziel-DNA machen. Parallel dazu werden in jedem PCR-Lauf Proben mit bekannten RNA-Verdünnungen aus einer Standardkurve amplifiziert. Anhand dieser Bezugswerte ist es möglich, aus einem bestimmten C_T -Wert auf eine Templatekonzentration zu schließen (siehe Kapitel 4.5.5).

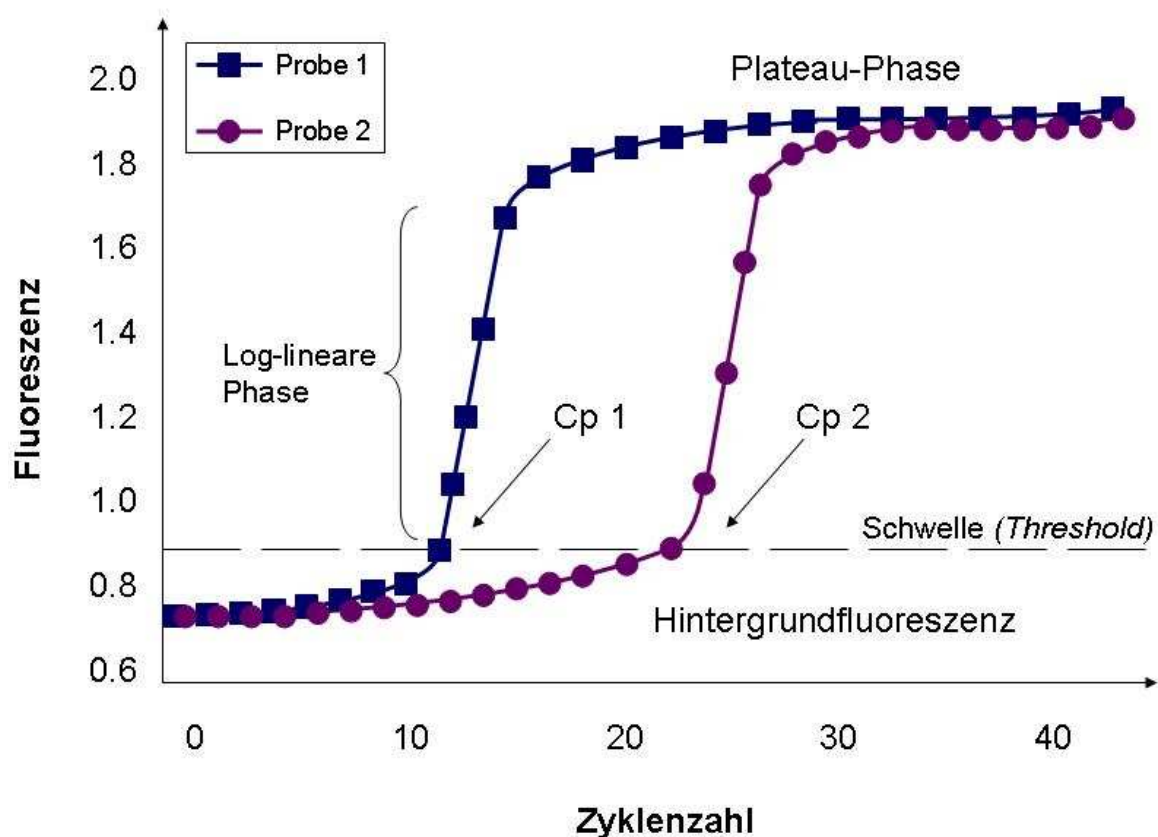


Abbildung 4-3: Phasen der PCR-Produktmessung

Darstellung der ansteigenden Fluoreszenzsignale von zwei Proben (1 und 2), aufgetragen gegen die Zyklenzahl. Die Probe 1 beinhaltet eine höhere Template-Ausgangsmenge als die Probe 2, da die Signalschwelle bereits bei einer niedrigeren Zyklenzahl erreicht wird (Cp 1) (Cp = Crossing Point).

4.5.2 Primerdesign

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen. Das als Referenzgen verwendete Haushaltungs-Gen (Housekeeping-Gen) HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1) wurde als sog. Quanti Tect Hs_HPRT1 Assay (100) geliefert, welches neben dem genspezifischen Primer-Paar auch die zugehörige QuantiProbe-Sonde enthält. Housekeeping-Gene kodieren für Proteine, die für die Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels essentiell sind. Diese Gene werden im Idealfall in jedem Zelltyp und -stadium konstant exprimiert und nicht durch interne oder externe Einflüsse reguliert. Sie dienen daher als endogene Kontrollgene, mit deren Hilfe bei Genexpressionsanalysen relative Quantifizierungen von Zielgenen erfolgen. Die Primer und QuantiProbe-Sonden der zu untersuchenden Ziel-mRNA von XPA, XPF und ERCC1 wurden mit Hilfe der im Internet zugänglichen QuantiProbe Design Software der Firma Qiagen entworfen (<https://customassays.qiagen.com/design/inputsequences.asp>). Dazu wurden die gi-Nummern (engl.: „GenInfo Identifier“) der betreffenden Gene in die Software eingegeben. Die Software entwirft zunächst das sequenzspezifische Primerpaar und im Anschluss eine dazu kompatible QuantiProbe-Sonde. Die Sequenzen der in dem sog. „Custom Assay“ enthaltenen Oligonukleotide sowie deren Lokalisation, Länge, Schmelztemperatur und Guanin-Cytosin-Gehalt werden angegeben (Tab. 3-4). Jedes Quanti Tect Custom Assay beinhaltet eine QuantiProbe-Sonde sowie einen Vorwärts- und einen Rückwärts-Primer in einer je 20 x Konzentration. Ein Sequenzabgleich zur Vermeidung unspezifischer Resultate erfolgte über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> bzw. den BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Therapeutics).

Die verwendeten Primer besitzen folgende gi-Nummern:

ERCC1 gi: 42544170; XPF gi: 4885216; XPA gi: 31543966; HPRT1 gi: 4504482

4.5.3 DNA-Amplifikation mit dem Lightcycler™-System

4.5.3.1 Programmierung des LightCyclers™

In der vorliegenden Arbeit wurde das LightCycler™ „real-time“ PCR System der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Der LightCycler™ besteht im Wesentlichen aus einer beheizbaren Reaktionskammer (Thermocycler), dem Probenkarussell, welches pro Lauf Platz für maximal 32 Proben bietet und einem Fluorimeter als optischer Detektionseinheit. Die Programmierung des LightCyclers™ wurde zu Beginn der Experimente durchgeführt. Die verwendeten Programmeinstellungen basieren auf den im Quanti Tect RT-PCR Handbook (Qiagen) angegebenen Empfehlungen. Die Versuche wurden mit Hilfe der LightCycler Software Version 3.5.3 (Roche) durchgeführt. Wie in Abb. 4-4 ersichtlich, setzt sich das Experiment aus vier Teilen zusammen:

1. Reverse Transkription: Zunächst wurde die eingesetzte RNA mit Hilfe der im Quanti Tect RT Mix (Qiagen) vorhandenen Reversen Transkriptasen in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit maximaler Geschwindigkeit (20 °C/sek) auf 50 °C hochgeheizt und für 20 min inkubiert.

2. PCR Initial Activation Step: Im Anschluss begann die eigentliche PCR mit der initialen Aktivierung der HotStar Taq DNA-Polymerase. Der Reaktionsansatz wurde dazu für 15 min auf 95 °C erhitzt (20 °C/sek). Dieses sog. HotStart-Verfahren ist notwendig, um eine frühzeitige Bildung von doppelsträngiger DNA z.B. in Form von Primerdimeren oder unspezifischen Primer-Anlagerungen zu verhindern (Kellogg et al., 1994). Der Reaktionsansatz enthält einen Antikörper, der die Taq DNA-Polymerase inhibiert. Durch die Temperaturerhöhung auf 95 °C wird der Antikörper denaturiert und das Enzym funktionsfähig. Gleichzeitig werden auf diese Weise die Reversen Transkriptasen inaktiviert.

3. 3-Step-Cycling: Dieser Programmteil beschreibt die eigentliche Amplifikationsreaktion und besteht aus drei Unterpunkten: Zunächst erfolgte bei 95 °C die **Denaturierung** der doppelsträngigen cDNA in Einzelstränge. Im folgenden **Annealing**-Schritt lagerten sich Primer und QuantiProbe-Sonden sequenzspezifisch an die Ziel-DNA an. Dazu erfolgte eine Abkühlung des Ansatzes auf 56 °C für 30 sek. Zu diesem Zykluszeitpunkt wurde die Fluoreszenzmessung durch-

geführt (Acquisition mode: single). Die mit dem Farbstoff FAM markierten Quanti Probe-Detektionssonden wurden im F1-Kanal gemessen. Der Anstieg der PCR-Produkte wurde bereits während der laufenden PCR am Bildschirm sichtbar gemacht. Dazu wurde die Einstellung F1/1 des Detektionskanals gewählt (Darstellungsmodus), während zur späteren Datenanalyse die Messwerte als F1/2 dargestellt wurden (Datenanalysiermodus). Bei beiden genannten Unterpunkten wurde die Temperaturänderung mit maximaler Geschwindigkeit durchgeführt (20 °C/sek). Anschließend fand die Verlängerung („**Elongation**“) des komplementären DNA-Stranges statt. Der PCR-Ansatz wurde mit einer Geschwindigkeit von 2 °C/sek auf 76 °C abgekühlt, um die für die enzymatische Aktivität der HotStar Taq-Polymerase optimale Temperatur zu erreichen, und anschließend bei dieser Temperatur für 30 sek inkubiert. Die drei genannten Amplifikationsschritte wurden in 45 Reaktionszyklen wiederholt.

4. Cooling: Das Gerät wurde zur Abkühlung für 30 sek auf eine Temperatur von 40 °C heruntergekühlt (20 °C/sek).

Experimental Protocol

Program:	RT				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	50	1200	20	0	0	0	None	
Program:	Initial activation step				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	900	20	0	0	0	None	
Program:	3-step cycling				Type:	Quantification	Cycles:	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	94	0	20	0	0	0	None	
2	56	30	20	0	0	0	Single	
3	76	30	2	0	0	0	None	
Program:	Cooling				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	40	30	20	0	0	0	None	

Abbildung 4-4: PCR-Bedingungen

Exemplarischer Ausdruck eines Versuchsprotokolls in englischer Sprache zur Programmierung des LightCyclers™.

4.5.3.2 Vorbereitung des PCR-Ansatzes und Quantifizierungs-PCR auf dem LightCycler™

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der PCR wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Unmittelbar vor der Benutzung erfolgte eine 20-minütige UV-Belichtung der Werkbank. Alle Proben und Reaktionskomponenten wurden in Aliquots bei - 20 °C archiviert, während des Pipettierens auf Eis gelagert und unmittelbar danach wieder eingefroren.

Die für die Amplifikation auf dem LightCycler™ verwendeten PCR-Ansätze wurden in Form eines sog. „Mastermixes“ (Qiagen) angesetzt. Für einen PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl und einer festgelegten MgCl₂-Konzentration von 4,0 mM wurden pro Reaktion die im Folgenden aufgeführten Reagenzien in einem Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

- 10 µl 2 x Quanti Tect Probe RT-PCR Master Mix
- 1 µl 20 x Primer Mix*
- 1 µl 20 x QuantiProbe Lösung* } enthalten im Quanti Tect Custom Assay (Qiagen)
- ** alternativ:* 2 µl 10 x Quanti Tect Assay Mix (enthalten im Quanti Tect Hs_HPRT1 Assay (Qiagen))
- 0,2 µl Quanti Tect RT Mix
- 5,8 µl RNase-freies Wasser

Je nach Anzahl der gleichzeitig durchzuführenden Reaktionen wurden die einzelnen Volumina entsprechend vergrößert, kurz gemischt und dann je 18 µl des Ansatzes in die mit Hilfe des LightCycler® Zentrifugenadapters (Roche) vorgekühlten LightCycler™-Kapillaren (Roche) pipettiert. Die in einer Konzentration von 0,25 µg/µl bei - 80 °C archivierte RNA wurde langsam aufgetaut, kurz anzentrifugiert und auf Eis gelagert. 2 µl der jeweiligen Probe (0,5 µg) wurden unmittelbar vor jedem PCR-Lauf mit 18 µl RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt. Von jeder Probe wurden 0,05 µg RNA (2 µl) in die PCR eingesetzt und in die jeweilige PCR-Kapillare pipettiert. Die Kapillare wurde sofort mit einem kleinen Deckel verschlossen und bis zum Einsetzen in den LightCycler™ auf Eis gekühlt. In jedem PCR-Lauf wurden Negativkontrollen durchgeführt, um die Spezifität der Reaktion

zu überprüfen. Dazu wurden Ansätze pipettiert, die die o.g. Reagenzien des Mastermixes enthielten, denen jedoch statt der RNA-Probe 2 µl RNase-freies Wasser zugegeben wurden (sog. „No Template Control“). Diese Ansätze dienten somit als Kontaminationskontrolle der eingesetzten Reagenzien. Außerdem wurden in jedem PCR-Lauf zur späteren quantitativen Auswertung (siehe 4.5.4) für jedes Primerpaar Standardproben mit 0,1 µg RNA eingesetzt. Für alle zu messenden RNA-Proben wurden Zweifachbestimmungen durchgeführt. Die gefüllten und verschlossenen Kapillaren wurden in entsprechenden Adaptern für 5 sek bei 3000 x g in einer Tischzentrifuge (Jouan) zentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in das Probenkarussell des LightCyclersTM eingesetzt, der Deckel des Gerätes wurde geschlossen und das in Kapitel 4.5.3.2 beschriebene Programm gestartet. Nach Beendigung des Laufes wurde der Rotor entladen und die Kapillaren bei - 20 °C archiviert. Gegebenenfalls wurden die entstandenen PCR-Produkte zur Kontrolle der Produktlänge auf analytische Agarosegele aufgetragen und die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 4.5.3.4)

4.5.4 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die Kontrolle der Produktlänge erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese. Dazu wurden die LightCycler™-Kapillaren geöffnet und mit der Öffnung nach unten in ein FACS-Röhrchen (BD Biosciences) gegeben, in das bereits jeweils 5 µl 6 x Ladepuffer (Fermentas) vorgelegt worden waren. Die Röhrchen wurden mit einem Deckel verschlossen und für 20 sek bei 300 x g zentrifugiert, um das PCR-Produkt aus den Kapillaren zu entfernen. Die leere Kapillare wurde im Anschluss vorsichtig mit einer Pinzette aus dem FACS-Röhrchen entnommen. Der Inhalt wurde in die Taschen eines 2 %igen Agarosegels (Herstellung siehe Kapitel 4.4.4) pipettiert und zusammen mit 10 µl eines geeigneten Größenstandards (50- bzw. 100-Basen-Paar Marker, Invitrogen) bei 120 Volt über 90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Auswertung und Dokumentation erfolgten, wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben, nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid. Die Amplifikationsprodukte wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis fotografisch dokumentiert. Anhand des DNA-Größenmarkers konnte die Amplifikatlänge in Basenpaaren (bp) bestimmt werden. Die Spezifität der PCR-Reaktion kann vorausgesetzt werden, wenn sich im Gel nur eine einzige Amplifikatbande zeigt.

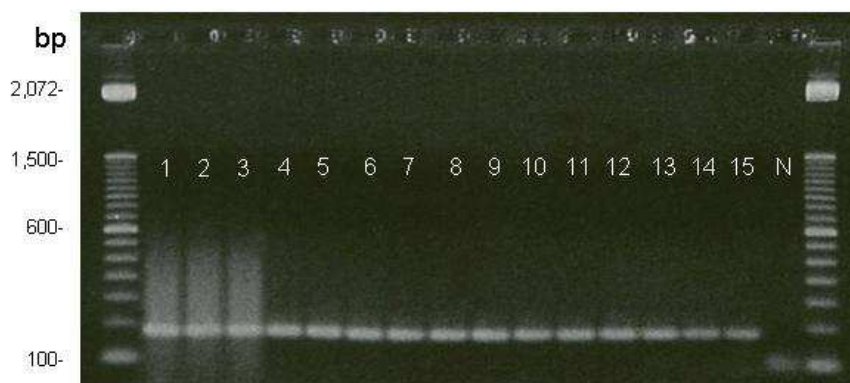


Abbildung 4-5: Fotodokumentation der RT-PCR-Produkte

Fotographie eines 2 %igen Agarosegels nach Färbung mit Ethidiumbromid. Bei dem PCR-Produkt handelt es sich um das Amplifikat von ERCC1. Die Banden 1-15 zeigen eine Verdünnungsreihe von RNA-Proben der Zelllinie hVHF (N = H₂O-Negativkontrolle). Am linken und rechten Rand neben den Proben befindet sich der verwendete Längenmarker.

4.5.5 Auswertung der PCR Ergebnisse mittels relativer Quantifizierung

Zur Ergebnisauswertung stehen bei der „real-time“ RT-PCR zwei generelle Quantifizierungsstrategien zur Verfügung:

Bei der absoluten Quantifizierung über externe Standards wird die absolute Menge einer Ziel-DNA bestimmt. Voraussetzung hierfür ist die Verwendung eines Standards, der die Sequenz der Ziel-DNA in bekannter Konzentration oder Kopienzahl enthält. Zur Generierung eines solchen Standards werden z.B. Verdünnungsreihen von Plasmid-DNA, in vitro transkribierter RNA oder aufgereinigter spezifischer Ziel-DNA, die in einer konventionellen PCR gewonnen werden kann, verwendet.

Bei den relativen Quantifizierungsverfahren wird die Expression der Ziel-DNA auf ein nicht reguliertes endogenes Referenzmolekül, meist aus der Gruppe der Housekeeping-Gene, bezogen. Durch diese Normalisierung kann die Expression der Ziel-DNA in verschiedenen Proben verglichen werden. Da sich die „real-time“ PCR-Effizienzen der Zielgene und des Referenzgens meist aufgrund von Abweichungen des Primer-Annealings, des Guanin-Cytosin-Gehalts und der Länge des PCR-Produktes unterscheiden, müssen diese Unterschiede zur Optimierung der relativen Quantifizierung berücksichtigt werden. Dazu wird für jedes Gen eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt, aus deren Steigung die jeweilige PCR-Effizienz berechnet werden kann (siehe Kapitel 4.5.5.2).

In dieser Arbeit wurde die Methode der relativen Quantifizierung über eine externe Standardkurve verwendet. Die LightCycler Software Version 3.5.3 ermöglicht es, bereits erstellte Standardkurven zur Quantifizierung von Proben aus nachfolgenden PCR-Läufen heranzuziehen. Allerdings muss in diesen PCR-Läufen zumindest eine Probe einer gebräuchlichen Verdünnungsstufe (z.B. 0,1 µg RNA) enthalten sein, um eine externe Standardkurve in den aktuellen PCR-Lauf zu laden. Die Quantifizierung von unbekanntem Proben der Ziel- und Referenzgene erfolgte automatisch anhand ihrer gemessenen C_T -Werte. Die Werte wurden von der Software in kalkulierte Ausgangskonzentrationen umgerechnet, indem sie mit der entsprechenden externen Standardkurve abgeglichen wurden. Die Kalkulation

des Verhältnisses von Ziel- zu Referenzgenen einer Probe erfolgte mit Hilfe des Programms MS Excel (Microsoft).

4.5.5.1 Normalisierung der Expressionsergebnisse anhand eines Referenzgens

Die Ergebnisse der quantitativen „real-time“ RT-PCR-Methode werden durch verschiedene Störfaktoren wie Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge, Variationen in der Effizienz der Reversen Transkriptasen, mögliche RNA-Degradation oder die Anwesenheit von Inhibitoren entscheidend beeinflusst. Auch unbeabsichtigte Unterschiede in der Handhabung der verschiedenen RNA-Proben können zu Fehlinterpretation der ermittelten Expressionspiegel führen. Um die beschriebenen Störfaktoren zu korrigieren, wurde die gemessene Expression des Zielgens auf die eines endogenen Referenzgens bezogen. Der Vergleich der C_T -Werte des Zielgens mit denen des Referenzgens ermöglichte die Normalisierung der Zielgen-Expression zur eingesetzten RNA-Template-Menge. In der gleichen Probe wurden die Expressionsspiegel des Ziel- und Referenzgens parallel erfasst und zueinander ins Verhältnis gesetzt (Abb. 4-5). Als endogenes Referenzgen wurde das Housekeeping-Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1 (HPRT-1, Qiagen) verwendet.

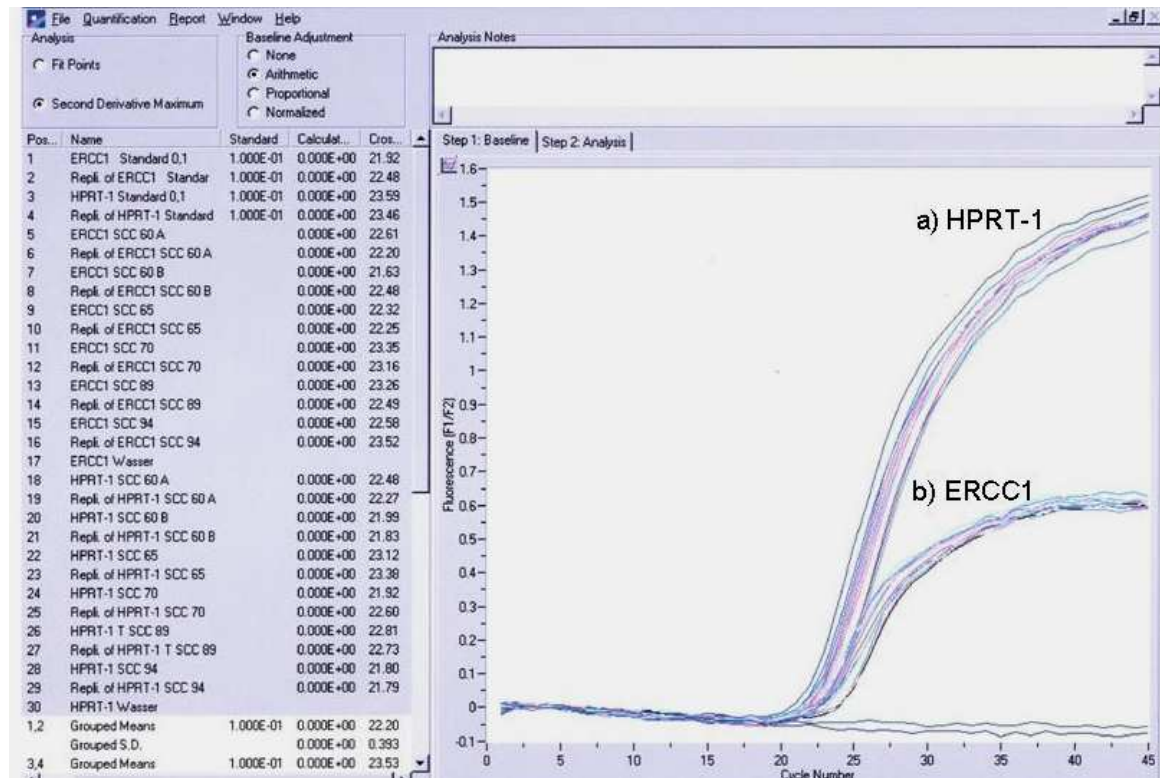


Abbildung 4-6: Typischer Kurvenverlauf der PCR-Amplifikationssignale

Auf der linken Seite ist die Liste der gemessenen Proben sowie die zugehörigen C_T -Werte abgebildet. Amplifiziert wurde das Referenzgen HPRT-1 (a) und das Zielgen ERCC1 (b). Das Diagramm rechts im Bild zeigt die Fluoreszenzsignale der verschiedenen Proben (y-Achse) aufgetragen gegen die Zyklenzahl (x-Achse). Bei den beiden horizontal verlaufenden Signallinien handelt es sich um die Negativ (Wasser)-Kontrollen. Die restlichen Kurven stellen die Fluoreszenzsignale der mitgeführten Standardverdünnungen sowie der verschiedenen Zellkulturproben dar.

4.5.5.2 Erstellung der Standardkurven

Als Standardproben wurden Verdünnungsreihen von 1,0 μg , 0,1 μg , 0,01 μg , 0,001 μg und 0,0001 μg RNA eingesetzt. Die verwendete RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) aus einer humanen Fibroblastenzelllinie (hVHF) isoliert und nach photometrischer Messung mit RNase-freiem H_2O auf eine Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ eingestellt. Die RNA wurde aliquotiert und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Unmittelbar vor dem geplanten PCR-Lauf wurde die archivierte RNA langsam aufgetaut, für 5 sek bei 300 x g zentrifugiert und auf Eis gelagert. 2 μl der jeweiligen Probe (1,0 μg) wurden mit 18 μl RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt. Dieser Schritt wurde zum Erhalt der o.g. Verdünnungen insgesamt viermal wieder-

holt. Die entsprechenden RNA-Verdünnungen wurden zu dem jeweiligen, bereits in den LightCycler™ Kapillaren befindlichen, PCR-Ansatz pipettiert und in die PCR eingesetzt (siehe Kapitel 5.5.2.2). Für jede Konzentration wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Durch die LightCycler Software wurden die C_T -Werte der einzelnen Verdünnungen berechnet und in einer logarithmischen Funktion graphisch gegen die entsprechende RNA-Konzentration dargestellt. Auf diese Weise wurden Standardkurven für die Zielgene XPA, XPF und ERCC1 sowie das Referenzgen HPRT-1 erstellt.

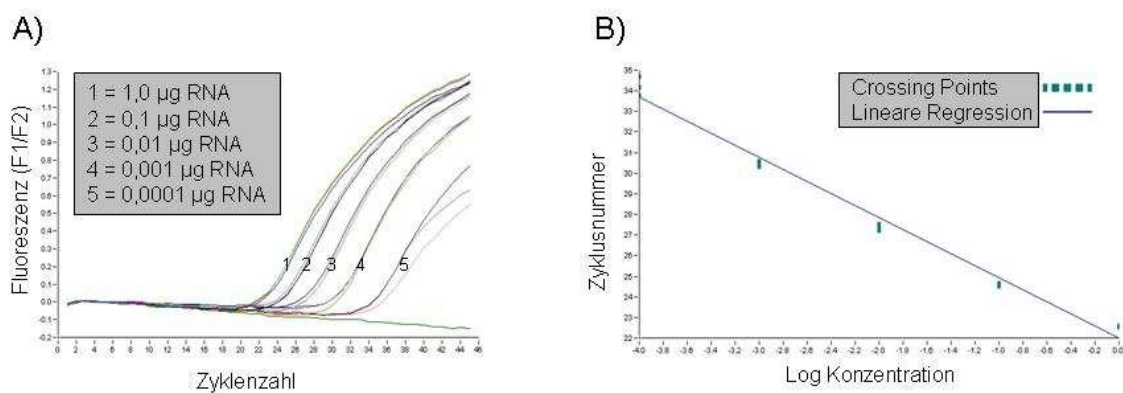


Abbildung 4-7: Datenanalyse und Standardkurve

A) Während der PCR aufgezeichnete Fluoreszenzmessung der fünf verwendeten RNA-Verdünnungen. B) Die C_T -Werte der Verdünnungsstufen (y-Achse) wurden in einer logarithmischen Funktion gegen die Ausgangs-RNA-Konzentration (x-Achse) aufgetragen. Zur Quantifizierung unbekannter RNA-Mengen wurden die C_T -Werte der Proben mit denen der entsprechenden Standardkurve verglichen und so die Konzentration bestimmt.

4.6 Western Blot-Analyse

4.6.1 Proteinisolierung

4.6.1.1 Proteinisolierung aus Zellen

Die in Zellkulturschalen (Sarstedt) ausgesäten Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % geerntet. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium vollständig abpipettiert und die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 600 µl RIPA-Puffer mit Zusatz von Proteinase-Inhibitoren (Herstellung siehe Kapitel 3.4) wurden die Zellkulturschalen geschwenkt, so dass der Puffer die gesamte Fläche benetzte, und für 20 sek inkubiert. Die Ablösung der Zellen von der Oberfläche erfolgte mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt). Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt. Um die Zellmembranen zu zerstören, wurden die Zellen 5-10 mal durch eine dünne Nadel (21 Gauge) gezogen und danach für 30-60 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat für 10 min bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und nach Zugabe von 2 x SDS-Puffer im Verhältnis 1:1 bei - 80 °C eingefroren.

4.6.1.2 Proteinisolierungen aus Gewebe

Die nativen Gewebeproben wurden aus dem Flüssigstickstoff entnommen, 100-150 µg davon abgewogen und zusammen mit einer kleinen Stahlkugel (Sarstedt) in Eppendorfröhrchen überführt. Die Proben wurden in die Kassetten des TissueLyser (Qiagen) eingespannt und zweimal für 2:30 min bei 25 Hz homogenisiert. Anschließend wurde das Gewebe kurz zentrifugiert (ca. 5 sek bei 3.000 x g und 4 °C) und dann in 5 Volumen (500 µl bei 100 µg Gewebe) RIPA-Puffer mit Zusatz von Proteinase-Inhibitoren resuspendiert. Um die Zellmembranen zu zerstören, wurden die Zellen 5-10 mal durch eine dünne Nadel (21 Gauge) gezogen. Das Lysat wurde zunächst für 20 min bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert, der Überstand dann in ein frisches Zentrifugenröhrchen transferiert

und nochmals für 1 h bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und nach Zugabe von 2 x SDS-Puffer im Verhältnis 1:1 bei - 80 °C eingefroren.

4.6.1.3 Photometrische Messungen der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte spektrophotometrisch nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays (BioRad). Durch die Bindung des ionischen Farbstoffs Coomassie brilliant blue G-250 an basische Aminosäuren der Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs (465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm wird im Spektralphotometer erfasst und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung, die anhand einer Eichgeraden bestimmt wird. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma)-Lösungen von 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml und 150 µg/ml hergestellt. Bio-Rad Protein Assay wurde im Verhältnis 1:5 zu den entsprechenden BSA-Verdünnungen hinzugegeben, vermischt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei 595 nm photometrisch gemessen (Biophotometer, Eppendorf). Nach erfolgter Proteinisolierung wurden vor Zugabe des 2 x SDS-Puffers 10 µl der Suspension abgenommen und 1:10 mit Aqua Spüllösung (DeltaSelect) verdünnt. 80 µl der verdünnten Probe wurden mit 20 µl Bio-Rad Protein Assay vermischt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend photometrisch gemessen. Lagen die so bestimmten Konzentrationen außerhalb der Eichgeraden, wurden entsprechend weitere Verdünnungsschritten durchgeführt. Die jeweiligen Verdünnungen der Proben wurden bei der anschließenden Berechnung des Proteingehaltes berücksichtigt.

4.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der zu untersuchenden Proteine nach ihrer Größe erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) (Laemmli, 1970). Das negativ geladene Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) lagert sich an hydrophobe Regionen der Proteine an und führt so zu einer einheitlich negativen Ladung der Polypeptidketten. Außerdem denaturiert SDS die Proteine und unterbindet die Ausbildung von Quartärstrukturen. Das im Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol führt zusätzlich durch Reduktion von Disulfidbrücken zur effektiveren Denaturierung der Proteine. Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden, wie in der Tab. 4-2 beschrieben, angesetzt. Zum Gießen der Gele wurde das Mini-PROTEAN 3 Cell-Gelkassettensystem der Firma BioRad benutzt. Zumeist wurde ein 10 %iges Trenngel verwendet. Nach dem Gießen des Trenngels in eine vertikale Gel-Kassette (Mini-PROTEAN 3 Cell, BioRad) mit 0,75 bzw. 1,5 mm Platzhaltern wurde das Gel mit Aqua dest. überschichtet. Auf diese Weise wurde das Trenngel gepresst, und es entsteht eine gleichmäßige Oberfläche für das folgende Sammelgel. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Aqua dest. verworfen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Unmittelbar danach wurde ein Probenkamm in das Sammelgel gedrückt und die Polymerisation abgewartet. Es wurden jeweils 30 bzw. 60 μg Protein eingesetzt, die zuvor für 5 min bei 96 $^{\circ}\text{C}$ in einem Blockthermostat (Sarstedt) denaturiert wurden. Die Volumina der Lysate wurden durch Zugabe von 2 x SDS-Puffer angeglichen. Zur Kontrolle der Proteingrößen diente ein Protein-Molekulargewichtsstandard (BioRad). Die SDS-Gelelektrophorese wurde in einer Mini-PROTEAN 3 Elektrophorese-Kammer (BioRad) durchgeführt. Dazu wurden die Gele mit 1 x Elektrophorese-Puffer überschichtet. Die Separation der Proteine erfolgte bei 220 V und 120 mA.

Gelbestandteile	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %*	10 %*	12,5 %*	4 %*
1 M Tris-HCl pH 8,8	2 ml	2 ml	2 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	-	0,3 ml
1 % SDS	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,25 ml
Acrylamid	1,25 ml	1,65 ml	2,1 ml	0,35 ml
dest. H ₂ O	1,25 ml	0,85 ml	0,4 ml	1,6 ml
APS	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	2,5 µl

* Prozentualer Acrylamidanteil im Gel

Tabelle 4-1: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele

4.6.3 Protein-Transfer mit dem Semi-Dry-Verfahren

Die Proteine wurden im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Hierzu wurde eine Blot-Membran aus Nitrocellulose (BioRad) verwendet, die durch hydrophobe Wechselwirkungen Proteine bindet (Towbin et al., 1979). Das SDS-Polyacrylamid-Gel wurde aus der Elektrophorese-Kammer entnommen und das Sammelgel vorsichtig abgetrennt. Für den Transfer der Proteine wurde eine Semi-Dry-Blotapparatur (BioRad) verwendet. Auf zwei Lagen in Anodenpuffer (1 x Roti-Blot A, Roth) getränktes Blotpapier (BioRad) wurden zunächst die Membran und darüber das Trenngel gelegt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich zwischen Membran und Gel keine Luftblasen befanden. Auf das Gel wurden anschließend zwei Lagen in Kathodenpuffer (1 x Roti-Blot K, Roth) getränktes Blotpapier gelegt. Die Anordnung wurde dann zwischen den zwei Flächenelektroden der Blotkammer eingespannt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 120 mA für 90 min.

4.6.4 Spezifischer Nachweis von Proteinen durch monoklonale Antikörper

Nach erfolgter Übertragung wurde die Membran zunächst kurz in Aqua dest. gewaschen. Durch reversible Färbung der Membran mit Ponceau-S-Lösung (2 % in 3 % Trichloressigsäure, Roth) konnte der erfolgreiche Transfer sowie die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung kontrolliert werden. Dazu wurde der Blot für 1 min in Ponceau-S-Lösung inkubiert und die überschüssige Farbe danach mit Aqua dest. abgewaschen. Die Trichloressigsäure in der Färbelösung fixierte außerdem die Proteine auf der Membran. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Membranen für 1 h in frisch angesetzter 3 %iger Milchpulver/PBS-Lösung geblockt. Anschließend wurde die Membran auf einem Schütteltisch (neoLab) für mindestens 2 h bei RT mit dem in 10 ml PBS verdünnten Primärantikörper (Biomol) in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration inkubiert. Ungebundene Primärantikörper wurden danach durch dreimaliges, je 5-minütiges Waschen mit 10 ml PBS entfernt. Im Anschluss wurde die Membran für 2 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (anti-Mouse- oder anti-Rabbit-IgG) inkubiert. Dazu wurde der mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Sekundärantikörper in 37 °C warmen 1 %igem Gelantine-PBS-Puffer verdünnt. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran für je 5 min mit 10 ml PBS erfolgte die Visualisierung der Bindestellen des Sekundärantikörpers mit Hilfe des Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kits (BioRad) nach den Angaben des Herstellers. Die Umsetzung der im Kit enthaltenen Substrate der Alkalischen Phosphatase in einen sichtbaren Farbkomplex führte dabei zum Nachweis der markierten Proteine. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Kapitel 3.7 aufgelistet. Um Unterschiede in der Proteinbeladung der einzelnen Banden auszugleichen, wurde bei jedem durchgeführten Western Blot die Expression des Housekeeping-Gens β -Actin bestimmt. Die Quantifizierung der Protein-Banden erfolgte mit Hilfe des Imagingsystems Gel-Dok XR und der Quantity One[®] 1-D Analysis Software der Firma BioRad. Dabei wurden die gemessenen relativen Dichtewerte der NER-Proteinbanden anhand der β -Actin-Bande normalisiert.

4.7 „Gene Silencing“ durch siRNA

Die siRNA-Oligonukleotide zur transkriptionellen Inhibition von XPA und XPF wurden von der Firma Santa Cruz (CA, USA) bezogen. Die als Negativkontrolle verwendete, am 3' Ende mit Alexa Fluor 488 markierte „Non-Silencing“-siRNA stammte von der Firma Qiagen (Hilden) und wurde zur Optimierung der Transfektionseffizienz verwendet.

4.7.1 Transfektion von humanen Zelllinien

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von Nukleinsäuren in Zellkulturzellen. Die Transfektion der siRNA-Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe von LipofectaminTM 2000 (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Die kationischen Lipidmoleküle bilden in wässriger Phase positiv geladene Liposomen aus und komplexieren die negativ-geladenen DNA- oder RNA-Moleküle. Diese Lipid-Nukleinsäure-Komplexe lagern sich an die Zelloberfläche an und ermöglichen über die Fusion von Liposomen und Zellmembran die direkte Aufnahme der siRNAs in das Zytoplasma.

Die lyophilisierte siRNA (Santa Cruz) wurde zunächst in 330 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert, so dass eine 10 µM siRNA-Lösung entstand, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Unmittelbar vor der Transfektion wurde die siRNA aufgetaut und resuspendiert. 24 h vor der geplanten Transfektion wurden die Zellen geerntet und in einer Konzentration von $0,7 \times 10^6$ Zellen pro 25 cm² Zellkulturflasche (Sarstedt) ausgesät. Die Zellen wurden in Kulturmedium ohne Zusatz von Antibiotika über Nacht im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Die Konfluenz zum Transfektionszeitpunkt betrug ca. 70-80 %. Zur Transfektion wurde die siRNA in der jeweils gewünschten Konzentration in Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco) auf ein Endvolumen von 625 µl verdünnt, vorsichtig durch Pipettieren resuspendiert und für 10-20 min bei RT inkubiert. In einem separaten Gefäß wurden je 12,5 µl LipofectaminTM 2000 ebenfalls mit Opti-MEM auf 625 µl Gesamtvolumen verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Die beiden Lösungen wurden resuspendiert, gemischt und zur Komplexbildung für 20 min bei RT

inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die zu transfizierenden Zellen zweimal mit je 5 ml Opti-MEM gewaschen und anschließend mit 5 ml Opti-MEM ohne FCS überschichtet. 1250 μ l des Transfektionsgemisches wurden direkt in die 25 cm^2 Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurden Medium und Transfektionskomplexe entfernt und durch FCS-haltiges (10 %) Kulturmedium ersetzt. Im Anschluss wurden die Zellen weiter kultiviert und zur Untersuchung des Transfektionserfolges durch FACS- bzw. Western Blot-Analyse entsprechend geerntet. Bei jeder Transfektion wurden Negativkontrollen durchgeführt, die entweder native Zellen, nur siRNA oder nur Lipofectamin (jeweils mit Opti-MEM) enthielten.

4.7.2 Optimierung der Transfektionseffizienz

Verschiedene Faktoren wie Zellkonfluenz, Lipofectamin- oder siRNA-Menge können einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz und die mit der Transfektion verbundene Zelltoxizität haben. Vor Durchführung der eigentlichen RNAi-Analysen wurden daher die optimalen Transfektionsbedingungen für die jeweiligen Zelllinien bestimmt. Ziel ist dabei, die Versuchsbedingungen dahingehend zu optimieren, dass zwar möglichst viele Zellen transfiziert werden, aber die Todesrate der Zellen nicht zu sehr ansteigt. Für die Optimierungsversuche wurden die Zellen bei einer konstanten Zelldichte von 70-80 % und einer Lipofectamin-Menge von 12,5 μ l pro 25 cm^2 Zellkulturflasche mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen behandelt (20, 60, 120 und 240 pmol). Die Optimierung der Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe einer sog. „Non-Silencing“-siRNA durchgeführt, die keine bekannte Homologie zu Säugetiergenen besitzt und somit nach Aufnahme in das Zellzytoplasma keine transkriptionelle Inhibition von Proteinen auslöst. Die in dieser Arbeit verwendete „Negative Control siRNA Alexa Fluor 488“ der Firma Qiagen besitzt eine fluoreszierende Sonde, die eine quantitative Analyse der transfizierten siRNA-Menge ermöglicht. Vor Gebrauch wurde die siRNA in 250 μ l siRNA Suspension Buffer gelöst, um eine 20 μ M Lösung zu erhalten. Das Röhrchen wurde dann bei 90 $^{\circ}$ C für eine Minute erhitzt und anschließend für 60 min bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Die

so behandelte siRNA wurde aliquotiert und bei - 20 °C gelagert. Die Transfektion erfolgte wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben.

4.7.3 Auswertung der Transfektionsergebnisse

Der Nachweis der mRNA-Inhibition und der daraus resultierenden Herabregulierung der Ziel-Proteine XPA und XPF durch die entsprechende siRNA erfolgte mit Hilfe der in Kapitel 4.6 beschriebenen Western Blot-Analyse. Die Isolierung der Proteine fand 24, 48 und 72 h nach der Transfektion der Zellen statt. Zur quantitativen Auswertung der Transfektionseffizienz wurde die Fluoreszenz der Alexa Fluor 488 markierten siRNA im Fluoreszenzmikroskop sowie durch FACS-Analysen (engl.: „Fluorescence activated cell sorting“) bestimmt (siehe Kapitel 4.8 bzw. 4.9).

4.7.4 Chemosensibilisierungsversuche durch „Gene-Silencing“ mittels siRNA

Die Zellen wurden bei 70 % Konfluenz geerntet, bei 300 x g und 30 °C für 8 min abzentrifugiert, in Standardkulturmedium resuspendiert und gezählt. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 5.000 bzw. 10.000 Zellen pro 100 µl je Loch in 96-Loch-Platten (Greiner) ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation im Be- gasungsbrutschrank unter Standardbedingungen wurden die Zellen, wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben, transfiziert. Dabei wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und durch 100 µl Opti-MEM ersetzt. Für die Transfektion wurden 5 pmol siRNA (0,5 µl) bzw. 0,5 µl Lipofectamin mit Opti-MEM auf ein Endvolumen von je 25 µl verdünnt, so dass insgesamt 50 µl Transfektionsgemisch pro Loch pipettiert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurden Medium und Transfektionskomplexe entfernt und transfizierte sowie nicht-transfizierte Zellen für 24 h mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen (0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 µg/ml) bzw. mit cisplatinfreiem Medium behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abpipettiert, die Zellen mit PBS gewaschen

und in 200 µl pro Loch cisplatinfreiem Medium inkubiert. Nach 48-stündiger Kultivierung im Begasungsbrutschrank erfolgte die Auswertung mittels MTT-Zytoxizitätstest wie in Kapitel 4.3 beschrieben.

4.8 Fluoreszenzmikroskopie

Transfizierte und nicht-transfizierte Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen unter einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop in vitro betrachtet. Dabei wurde für die Fluoreszenzmikroskopie der Alexa Fluor 488-transfizierten Zellen der GFP-Filter verwendet. Zur Darstellung wurden die Zellen mit einer AxioCam MR_m Digital Kamera (Zeiss) fotografiert und die Bilder mit der Computersoftware AxioVision Rel. 4.5 (Zeiss) bearbeitet.

4.9 Durchflusszytometrische Messungen

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem FACSCantoTM der Firma Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) durchgeführt. Es handelt sich um ein acht-parametrisches Analysegerät, mit dem neben den Streulichteigenschaften Zellgröße und Zellgranularität, die Fluoreszenz in bis zu sechs Wellenlängen gleichzeitig gemessen werden kann. Die Steuerung der Messungen sowie die primäre Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe der BD FACS DivaTM Software Version 4.1.2 (BD Biosciences). Bei den im Durchflusszytometer ermittelten Werten handelt es sich nicht um Absolutwerte, sondern um relative Signalgrößen der gemessenen Zellen zueinander. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Bestimmung der siRNA-Transfektionsraten verwendet.

4.9.1 Aufbau und Prinzip des Durchflusszytometers

Die Durchflusszytometrie dient der Zählung und Charakterisierung von Zellen oder anderen Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Die zu untersuchenden Zellen einer Einzelzellsuspension werden aus dem Probengefäß aufgenommen und in einer laminaren Strömung, durch hydrodynamische Fokussierung einzeln hintereinander aufgereiht, in den optischen Messbereich befördert. Dort wird jede Zelle mit einem gebündelten Argon-Laserstrahl angestrahlt, dessen Emissionsmaximum bei 488 nm liegt. An den Zellen kommt es zu einer Lichtstreuung, die von geeigneten Detektoren in Stärke und Richtung gemessen wird und Informationen über die Größe (Forward Scatter, FCS) und Granularität (Side Scatter, SSC) der Zelle liefert. Außerdem ist durch Markierung definierter Strukturen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen eine weitere Zelldifferenzierung möglich (Abb. 4-8).

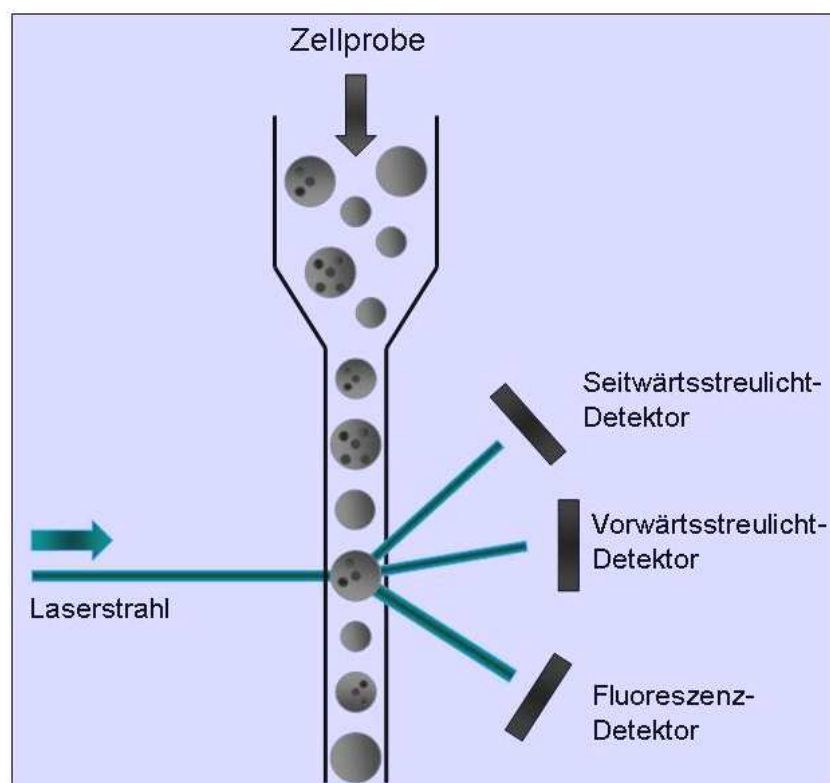


Abbildung 4-8: Streulicht- und Fluoreszenzdetektion im Durchflusszytometer

Nach vorne gestreutes Licht wird vom „Vorwärtsstreulicht-Detektor“ (Forward Scatter, FCS) gemessen und ist proportional zur Größe der Zelle. Die Menge des seitwärts zum Laserstrahl gestreuten Lichtes („Seitwärtsstreulicht-Detektor“, Side Scatter, SSC) ist proportional zur inneren Komplexität, d.h. zur Granularität der Zelle. Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in oder auf der Zelle befinden (z.B. an Antikörper oder siRNA gekoppelt), werden mittels Argon-Laser angeregt und emittieren Licht einer bestimmter Wellenlänge, die für das Fluorochrom charakteristisch ist.

Das Argon-Laserlicht führt zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum bei der Rückkehr in ihren energetischen Grundzustand Fluoreszenzlicht einer charakteristischen Wellenlänge emittieren, das durch empfindliche Photozellen detektiert wird. Auf diese Weise können bestimmte merkmalttragende Zellen innerhalb einer gemischten Population identifiziert werden. Die Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tab. 4-2 dargestellt.

Fluoreszenzfarbstoff	Absorption	Emmission
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	488 nm	525 nm
Phycoerythrocin (PE)	488 nm	585 nm
Alexa Fluor 488	488 nm	519 nm
Propidiumiodid (PI)	488 nm	650 nm

Tabelle 4-2: Charakteristika der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

4.9.2 Vorbereitung und Messung der Proben

Zur Vorbereitung der durchflusszytometrischen Analysen wurde das Zellmedium abgenommen, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und geerntet. Danach wurden die Zellen gezählt, bei 300 x g und 30 °C für 8 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in PBS resuspendiert. Es wurde eine Konzentration von 1×10^5 Zellen pro ml eingestellt, wovon mindestens 300 µl in FACS-Röhrchen (BD Biosciences) gegeben wurden. Unmittelbar vor der Messung wurden 5 µl (50 µg/ml) Propidiumjodid (BD Biosciences) zugegeben, um tote Zellen zu markieren. Der Farbstoff Propidiumjodid diffundiert aufgrund der gestörten Barrierefunktion der Zellmembranen in den Zellkern apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen und interkaliert dort in die DNA-Doppelhelix. Interkaliertes Propidiumjodid besitzt einen Emissionspeak bei 650 nm und wird so im Durchflusszytometer detektiert (Schmid et al., 1992). Vor der Messung wurden die Zellen suspendiert und dann in die Probenhalterung gestellt, so dass nach Starten der Messung die Zellen dem Meß-

system zugeführt wurden. Die Einstellung der Geräteparameter erfolgte anhand nicht-transfizierter Kontrollzellen. Die so eingestellten Parameter wurden für die zu messenden Proben beibehalten. Von jeder Probe wurden 20.000 Ereignisse gemessen. Um Zelltrümmer aus der Untersuchung auszuschließen, wurde mit Hilfe der Parameter Zellgröße und Granularität eine Population P1 definiert, die für die weiteren Analysen herangezogen wurde.

4.9.3 Auswertung der Proben

Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm BD FACS Diva™ Software Version 4.1.2 (BD Biosciences). Die Darstellung der gemessenen Signale kann dabei als zweidimensionales sog. Dot-Blot-Fenster erfolgen, in dem jedes Ereignis, wie z.B. Zellen oder Zelltrümmer, als einzelner Punkt dargestellt wird und so entsprechend seiner Fluoreszenz und Größe bzw. Granularität repräsentiert wird oder als Histogramm, in dem die Zellzahl auf der y-Achse (linear) gegen die Intensität der Fluoreszenz auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen wird. In den Dot-Plot-Fenstern zur Analyse der Transfektionseffizienz wurden folgende Parameterkombinationen dargestellt (Abb. 4-9 a):

- Zellgröße (Vorwärtsstreuung, FSC-H) versus Zellgranularität (Seitwärtsstreuung, SSC-A)
- Zellgröße versus Propidiumjodidfluoreszenz (PI PE-A)
- Zellgröße versus Alexa Fluor 488-Fluoreszenz (Alexa FITC-A)
- Alexa Fluor 488-Fluoreszenz versus Propidiumjodidfluoreszenz

Dabei wurden die Parameter Zellgröße und Granularität linear und die Fluoreszenzen PE-A und FITC logarithmisch dargestellt. Die Fenster dienen der Zuordnung der gemessenen Ereignisse zu den Populationen der toten, lebenden und transfizierten Zellen. Innerhalb der Dot-Plot-Fenster können bestimmte Regionen definiert und zur Identifizierung der Zellpopulationen verwendet werden. Dazu wird das Punktdiagramm in vier Quadranten aufgeteilt, in denen die Zellen in Abhängigkeit von ihren Zelleigenschaften bzw. ihrer relativen Fluoreszenz erscheinen.

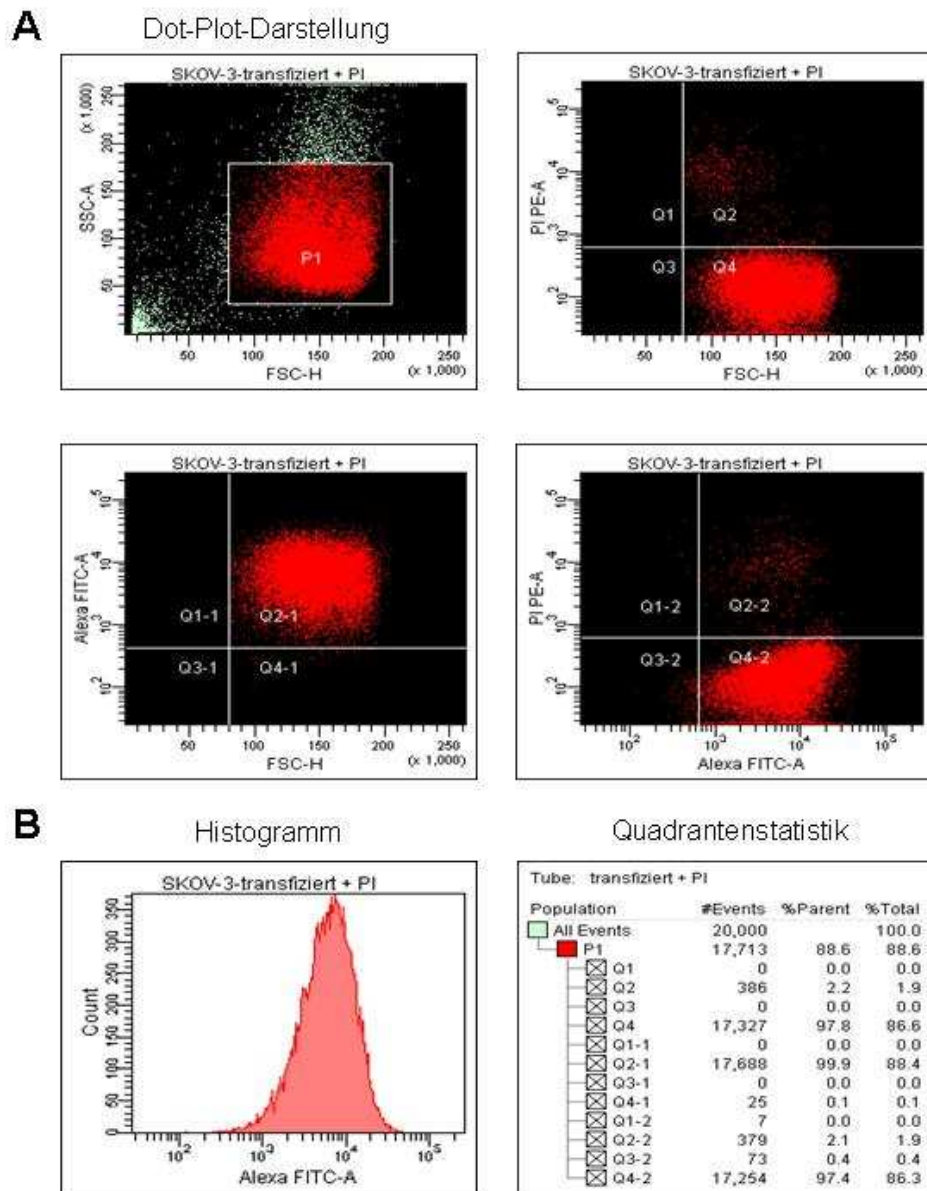


Abbildung 4-9: Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Datenanalyse

A) Darstellung von vier Dot-Plot-Fenstern, in denen durch verschiedene Parameterkombinationen die einzelnen Zellpopulationen definiert und voneinander differenziert werden. Durch die Aufteilung der Punktdiagramme in vier Quadranten (Q1-Q4) können die gemessenen Ereignisse toten und lebenden Zellen zugeordnet werden (Zelltrümmer = grün). Dabei setzen sich die Populationen der lebenden und toten Zellen jeweils wieder aus transfizierten und nicht-transfizierten Zellen zusammen. **B)** Im Histogramm wird die Zellzahl auf der y-Achse gegen die Intensität der Fluoreszenz auf der x-Achse aufgetragen. Die tabellarische Quadrantenstatistik dient der quantitativen Auswertung der durchflusszytometrischen Messung und gibt die Anzahl der Ereignisse innerhalb der vier Quadranten eines Dot-Plot-Fensters wieder. Die verwendete Auswertungssoftware (BD FACS Diva™ Software Version 4.1.2.) berechnet dabei den prozentualen Anteil der Ereignisse in den einzelnen Quadranten an der Bezugspopulation.

4.10 Fehlerbetrachtung der Versuchsergebnisse

Statistische Analysen wurden mit den Softwareprogrammen SPSS 12.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) und GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Falls nicht anders beschrieben, handelt es sich bei den dargestellten Werten um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, wobei die Standardabweichung als Fehlerindikator eingesetzt wurde. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten statistischen Tests werden im Folgenden kurz erläutert:

Zunächst wurden die zu untersuchenden Messwerte mit Hilfe des *Shapiro-Wilk-Tests* auf Normalverteilung geprüft. In Abhängigkeit des Ergebnisses wurden dann verschiedene statistische Tests ausgewählt, um signifikante Unterschiede innerhalb der verschiedenen Gruppen zu objektivieren. Bei der Auswahl der Tests wurde weiterhin unterschieden, ob es sich bei den Messwerten um abhängige oder unabhängige Variablen handelte. Im Falle einer Normalverteilung der Daten wurden parametrische Tests durchgeführt (*Students t-Test* für abhängige bzw. unabhängige Variablen). Bei nicht-normalverteilten Werten wurden nicht-parametrische Tests wie der *Mann-Whitney-U-Test* für unabhängige bzw. der *Wilcoxon-Test* für abhängige Variablen verwendet. Das Ergebnis eines statistischen Tests wurde als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p unter 5 % lag ($p < 0,05$). Bei $p < 0,01$ wurde von einem hochsignifikanten Ergebnis ausgegangen.

Um eine mögliche Beziehung zwischen zwei Variablen zu untersuchen, wurde bei nicht-normalverteilten Werten die *Rangkorrelationsanalyse nach Spearman* durchgeführt. Das Ausmaß eines Zusammenhangs wird mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten r beschrieben, der Werte zwischen - 1 und + 1 annehmen kann. Bei $r = 1$ liegt ein starker Zusammenhang vor; existiert gar kein Zusammenhang zwischen den beiden Variablen, so ist $r = 0$. Bei einem gegenläufigen Zusammenhang finden sich negative Korrelationskoeffizienten.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der untersuchten Zelllinien

5.1.1 Wachstumsverhalten der Zelllinien unter Cisplatinbehandlung

Um die Relevanz der NER-Expression in Bezug auf das unterschiedliche Ansprechen verschiedener Tumorentitäten auf eine Cisplatin-Chemotherapie zu untersuchen, wurden 13 HNSCC-Zelllinien, darunter 3 Primärtumor-Lymphknoten-Metastasen-Paare sowie 7 Testistumorzelllinien ausgewählt. Außerdem wurde als vergleichende Kontrolle eine, als cisplatinresistent geltende Ovariakarzinomzelllinie (SKOV-3) untersucht (siehe Kapitel 3.6). Mit Hilfe des in Kapitel 4.3 beschriebenen MTT-Zytotoxizitäts-Assays wurde das Ausmaß der jeweiligen Cisplatinresistenz bestimmt. Dazu wurden die untersuchten Zelllinien für 24 h mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen behandelt. Die Auswertung durch photometrische Messung der lebenden Zellen erfolgte nach anschließender 3-tägiger Inkubation in zytostatikafreiem Medium. Die Menge der durchgehend zytostatikafrei inkubierten Zellen wurde 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet.

5.1.1.1 Bestimmung der IC_{50} , IC_{90} und des Resistenzgrades (RT)

Durch die Bestimmung der IC_{50} - und IC_{90} -Werte wurde der jeweilige Resistenzgrad der Zelllinien gegenüber Cisplatin ermittelt. Die Werte beschreiben die Cisplatinkonzentration, bei der im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 50 % (IC_{50}) bzw. 90 % (IC_{90}) der Zellen am Wachstum gehindert werden bzw. absterben. Sie sind daher ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Cisplatinsensitivität bzw. -resistenz. Gerade die IC_{90} liefert dabei wichtige Informationen über die Fähigkeit der Zellen, sich auch höheren Cisplatinkonzentrationen zu widersetzen, und gibt Hinweise auf das eventuelle Vorhandensein von höhergradig resistenten Anteilen

innerhalb der Zellpopulation. Zur Berechnung der Resistenzwerte wurden die mit Hilfe des MTT-Assays erhaltenen Daten mit der Software GraphPad Prism[®] Version 4.0 (GraphPad Software, Inc.) ausgewertet. Die durch nichtlineare Regression ermittelten sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Kurven boten dabei die Grundlage der Berechnungen.

Konzentrations-Effekt-Kurven der untersuchten Zelllinien:

Bei den im Folgenden gezeigten Werten der Konzentrations-Effekt-Kurven handelt es sich um Mittelwerte mit Standardabweichungen einer unabhängigen Mehrfachbestimmung (n = 4-10). Der Resistenzfaktor (RF) einer Zelllinie gibt ihre Cisplatinresistenz im Verhältnis zur Zelllinie SKOV-3 an und wurde nach der folgenden Gleichung bestimmt:

$$\text{Resistenzfaktor (RF)} = \frac{\text{IC}_{90} \text{ (Zelllinie X)}}{\text{IC}_{90} \text{ (SKOV-3)}}$$

Die mittels MTT-Zytotoxizitäts-Assay bestimmten Konzentrations-Effekt-Kurven der untersuchten Zelllinien sind in Abb. 5-1 dargestellt. Der Kurvenverlauf gibt die Sensitivität der untersuchten Zelllinien gegenüber Cisplatin wieder und dient als Grundlage zur Berechnung der in Tab. 5-1 wiedergegebenen IC-Werte.

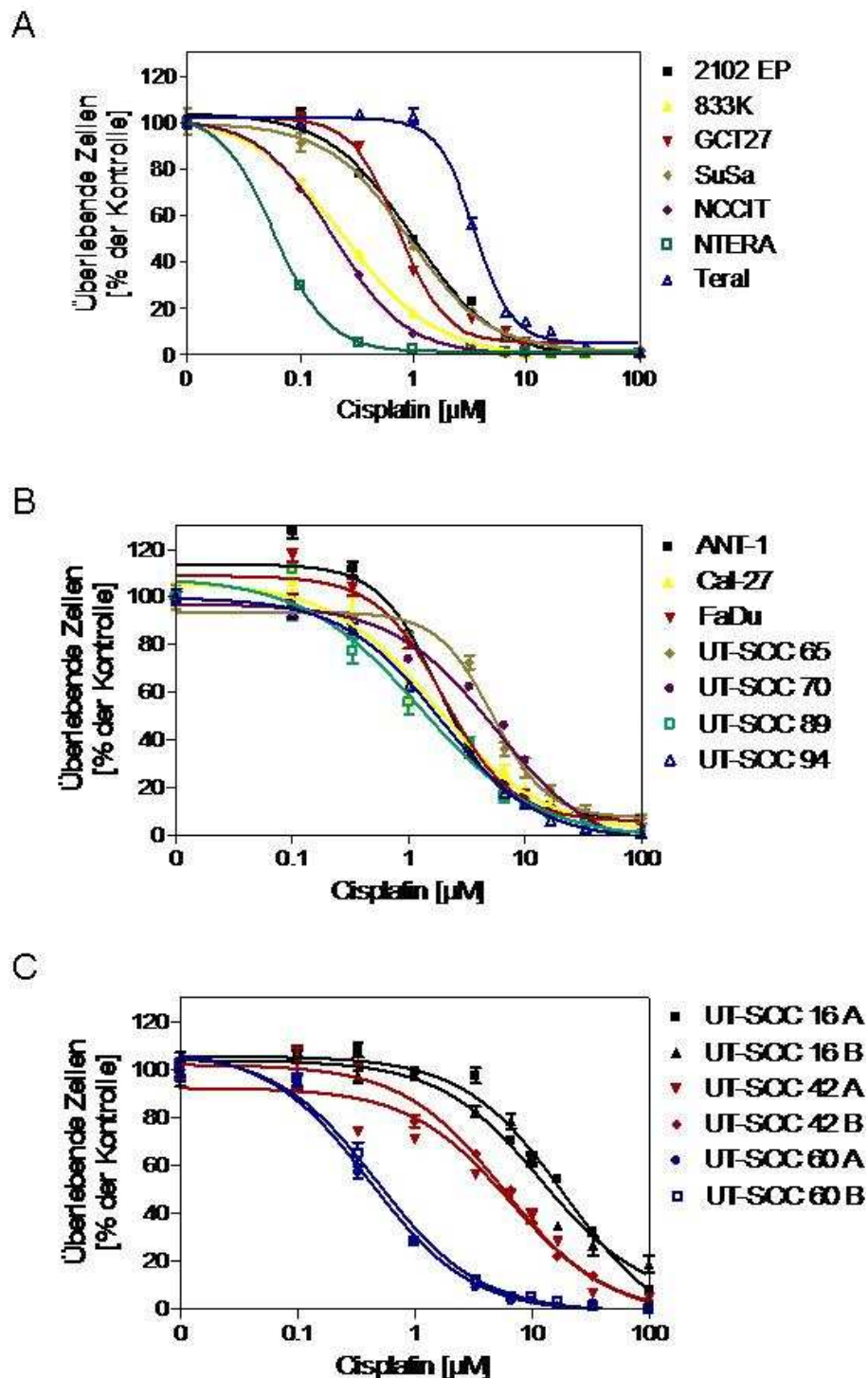


Abbildung 5-1: Konzentrations-Effekt-Kurven nach Cisplatinbehandlung

Konzentrations-Effekt-Kurven der untersuchten Testistumor- (A) und HNSCC-Zelllinien (B, C) nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen (MW \pm SD, n = 4-10). Die verschiedenen Cisplatinkonzentrationen (x-Achse) sind dabei logarithmisch dargestellt. In Graphik C werden die Kurvenverläufe der Primärtumor- und Metastasen-Zelllinien von drei HNSCC-Patienten im Vergleich gezeigt. Die Standardabweichung (SD) war teilweise so niedrig, dass sie in der Graphik durch das Symbol überdeckt wird.

	Zelllinie	IC ₅₀ [µM]	IC ₉₀ [µM]	RF**
TGCT	2102 EP	0,98	5,82	0,38
	833K*	0,24	1,80	0,12
	GCT27	0,75	2,77	0,18
	SuSa	0,90	5,82	0,38
	NCCIT*	0,20	0,97	0,06
	NTERA	0,06	0,21	0,01
	Teral*	3,51	10,16	0,66
HNSCC	ANT-1	1,84	17,71	1,16
	Cal-27	1,73	21,32	1,39
	FaDu	2,03	16,67	1,09
	UT-SCC 65	5,24	32,87	2,15
	UT-SCC 70	5,58	27,31	1,78
	UT-SCC 89	1,25	13,83	0,90
	UT-SCC 94	1,86	13,00	0,85
	UT-SCC 16 A	19,38	88,37	5,78
	UT-SCC 16 B*	12,09	100,00	6,54
	UT-SCC 42 A	6,58	42,09	2,75
	UT-SCC 42 B*	5,75	44,77	2,93
	UT-SCC 60 A	0,41	2,61	0,17
	UT-SCC 60 B*	0,48	3,15	0,21

Tabelle 5-1: Charakterisierung der Cisplatinresistenz der untersuchten Zelllinien

Die angegebenen IC₅₀- bzw. IC₉₀-Werte wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism[®] ermittelt. Die Werte dienen als Grundlage zur Berechnung signifikanter Unterschiede in Bezug auf die Cisplatinresistenz der untersuchten Testistumor- und HNSCC-Zelllinien.

* = Metastasen-Zelllinie, ** = Resistenzfaktor (RF)

Testistumorzelllinien 2102 EP, 833K, GCT27, SuSa, NCCIT, NTERA und Teral:

Die Zelllinie Teral besaß von den getesteten Testistumorzelllinien die höchsten IC₅₀- (3,51 µM) bzw. IC₉₀-Werte (10,16 µM) und zeigte damit die größte Resistenz gegenüber Cisplatin. Bei Teral handelt es sich um eine Lungenmetastasenzelllinie eines testikulären Keimzelltumors. Die übrigen IC₅₀-Werte der Hodentumorzelllinien lagen durchweg unter 1 µM. Im Hinblick auf die IC₉₀-Werte lagen die Zelllinien 2102 EP und SuSa mit Werten von 5,82 µM im mittleren Resistenzbereich dieser Gruppe. Am sensibelsten reagierten die Zelllinien NTERA, NCCIT und 833K mit IC₅₀-Werten von 0,06 bzw. 0,20 und 0,24 µM und IC₉₀-Werten von 0,21

bzw. 0,97 und 1,80 μM . Alle Testistumorzelllinien wiesen deutlich niedrigere Resistenzfaktoren als SKOV-3 auf ($\text{RF} < 1$). Bis auf Teral ($\text{RF} = 0,66$) besitzen die Hodentumorzelllinien eine deutlich herabgesetzte relative Cisplatinresistenz.

HNSCC-Zelllinien ANT-1, Cal-27, FaDu, UT-SCC 65, UT-SCC 70, UT-SCC 89, UT-SCC 94:

Bei den oben genannten Zelllinien handelt es sich um 7 Zelllinien, die aus HNSCC-Primärtumoren etabliert wurden. Die gemessenen IC_{50} -Werte der Zelllinien lagen durchweg über 1 μM . Auch die IC_{90} -Werte ergaben im Vergleich zu den Werten der Testistumorzelllinien deutlich höhere Werte. Die Zelllinien UT-SCC 65 und UT-SCC 70 wiesen mit 5,24 bzw. 5,58 μM die höchsten halbmaximalen Hemmstoffkonzentrationen und ebenfalls mit 32,87 und 27,31 μM die größten IC_{90} -Werte auf. Sie besaßen damit in dieser Gruppe die größte Resistenz gegenüber Cisplatin. Die vergleichsweise niedrigsten IC_{90} -Werte zeigten die Zelllinien UT-SCC 89 und UT-SCC 94 mit Werten von 13,83 bzw. 13,00 μM . Die Analyse der Resistenzfaktoren ergab bei 5 der untersuchten Zelllinien einen höheren Resistenzgrad als bei der Vergleichszelllinie SKOV-3 ($\text{RF} 1,09-2,15$). Nur die Zelllinien UT-SCC 89 und UT-SCC 94 reagierten mit Resistenzfaktoren von 0,90 und 0,85 sensibler auf eine Cisplatinbehandlung.

HNSCC-Zelllinien UT-SCC 16 A und 16 B, UT-SCC 42 A und 42 B, UT-SCC 60 A und 60 B (Primärtumor-Metastasen-Paare):

Neben den oben genannten HNSCC-Primärtumor-Zelllinien standen außerdem Zelllinien von drei Primärtumor-Metastasen-Paaren zur Verfügung, die aus Plattenepithelkarzinom-Primärtumor (A) und zugehöriger Lymphknoten-Metastase (B) eines Patienten etabliert wurden. Das Tumorgewebe der Zelllinien UT-SCC 16 A und B wurde vor der operativen Entnahme bereits radiotherapiert (A = 68 Gy, B = 50 Gy). Primärtumor und Lymphknoten-Metastase wurden zum selben Zeitpunkt entnommen. Die Zelllinien UT-SCC 42 A und B stammen von Tumorgewebe, welches vor der Entnahme noch keine Vorbehandlung erfahren hat. Die Lymph-

knoten-Metastase wurde in diesem Fall einen Monat nach dem Primärtumor entnommen. Das Ausgangsgewebe der Zelllinie UT-SCC 60 A wurde vor der chirurgischen Entfernung nicht vortherapiert. Die Lymphknoten-Metastase, aus der die Zelllinien UT-SCC 60 B etabliert wurde, wurde 3 Monate nach dem Primärtumor, im Anschluss an eine Radiotherapie, entfernt.

Die drei Primärtumor-Metastasen-Paare zeigten im Hinblick auf die Cisplatinresistenz große Unterschiede. Am sensibelsten reagierten die Zelllinien UT-SCC 60 A und B. Sie besaßen mit einem RF von 0,17 bzw. 0,21 die größte Cisplatin-sensibilität aller untersuchten HNSCC-Zelllinien. Die IC_{50} der vorbestrahlten Metastasen-Zelllinie UT-SCC 60 B zeigte mit 0,48 μM nur eine geringe Erhöhung gegenüber der Primärtumor-Zelllinie ($IC_{50} = 0,41 \mu\text{M}$). Auch der IC_{90} -Wert von UT-SCC 60 B liegt mit 3,15 μM nur leicht über dem der Zelllinie UT-SCC 60 A mit 2,61 μM . Die nicht vortherapierten Zelllinien UT-SCC 42 A und B wiesen einen RF von 2,75 bzw. 2,93 auf und besitzen somit eine größere Cisplatinresistenz als SKOV-3. In Bezug auf die IC_{90} -Werte wies die Metastasen-Zelllinie mit 44,77 μM eine geringgradig höhere Resistenz als die Primärtumor-Zelllinie mit 42,09 μM auf. Die größten Cisplatinresistenzen aller untersuchten Zelllinien besaßen die beiden vorbestrahlten Zelllinien UT-SCC 16 A und B auf. Der Grad der Cisplatinresistenz lag mit einem RF von 5,78 bzw. 6,54 stark über der Resistenz von SKOV-3. Hier zeigte sich außerdem ein deutlicher Unterschied zwischen der Primärtumor- und der Metastasen-Zelllinie. Im Hinblick auf die IC_{50} erwies sich UT-SCC 16 A zwar um den Faktor 1,6 resistenter als UT-SCC 16 B. Die errechneten IC_{90} -Werte zeigten jedoch im Bereich höherer Cisplatinkonzentrationen eine ausgeprägtere Resistenz der Metastasen-Zelllinie UT-SCC 16 B im Vergleich zu der Primärtumor-Zelllinie.

5.1.1.2 Vergleich der Cisplatinresistenz von Testistumor- und HNSCC-Zelllinien

Unterschiede in der Cisplatinresistenz der untersuchten Hodentumor- und HNSCC-Zelllinien wurden anhand ihrer IC_{50} - bzw. IC_{90} -Werte definiert. Wie aus Abb. 5-2 ersichtlich, ergab sich eine im Vergleich zu HNSCC-Zelllinien signifikant größere Cisplatinresistenz der Testistumorzelllinien sowohl im Vergleich der IC_{50} - ($p < 0,05$) als auch der IC_{90} -Werte ($p < 0,01$). Insgesamt zeigten die Testistumorzelllinien eine deutlich geringere Varianz in den Cisplatinresistenzen. In der Gruppe der HNSCC-Zelllinien lässt sich hingegen eine größere Streuung der IC -Werte erkennen.

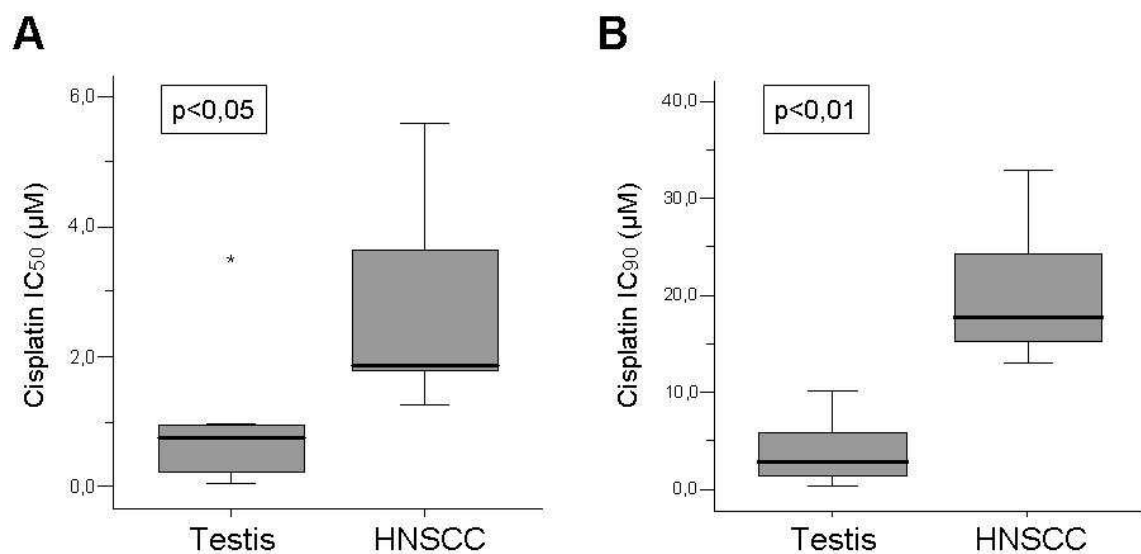


Abbildung 5-2: Vergleich der Cisplatinresistenz von Testistumor- und HNSCC-Zelllinien

Die Testistumorzelllinien zeigten sowohl im Vergleich der IC_{50} - (**A**) als auch der IC_{90} -Werte (**B**) eine signifikant niedrigere Cisplatinresistenz als die HNSCC-Zelllinien. Zur Berechnung des Signifikanzniveaus wurde der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet. Die Werte der HNSCC-Zelllinien UT-SCC 16 A und B liegen außerhalb der Skalierung. (* = Tera1)

5.1.2 Analyse der XPF- und ERCC1-mRNA Expression der Zelllinien

Die Auswertung der in der quantitativen One-Step RT-PCR gemessenen Werte erfolgte wie in Kapitel 4.5.5 beschrieben. Um die Menge eines erhaltenen Amplifikats durch relative Quantifizierung bestimmen zu können, wurden zunächst externe Standardkurven für die zu untersuchenden Gene erstellt. Hierfür wurde die RNA einer humanen Fibroblastenzelllinie (hVHF) in insgesamt fünf Verdünnungsschritten jeweils 1:10 verdünnt (1,0 µg - 0,0001 µg) und in die PCR eingesetzt. Die im LightCycler™-Programm als Standard definierten Werte der Verdünnungsreihe dienten als Grundlage zur Berechnung der Standardkurve, die für die Bestimmung der Amplifikatmenge in den unbekanntenen Proben herangezogen wurde. Trotz verschiedener Optimierungsversuche gelang es nicht, eine reproduzierbare Standardkurve für das NER-Gen XPA zu etablieren. Im Folgenden ist daher ausschließlich die mRNA-Expression von ERCC1 und XPF, nach Normalisierung anhand des Referenzgens HPRT-1, angegeben. Die gemessenen relativen mRNA-Mengen der 20 untersuchten Zelllinien sind in Abb. 5-3 graphisch dargestellt. Die XPF-mRNA-Expression aller untersuchten Testistumorzelllinien (Abb. 5-3, A) lag konstant über dem ERCC1-Expressionsniveau der jeweiligen Zelllinien. Die Hodentumorzelllinien exprimierten signifikant ($p < 0,05$, *Wilcoxon-Test*) höhere mRNA-Mengen des NER-Gens XPF, verglichen zur relativ geringen ERCC1-Menge der gleichen Zelllinie. Die höchsten XPF-Expressionen besaßen die Zelllinien NTERA (1,03), Teral (0,68) und 2102 EP (0,55). NTERA und Teral zeigten mit 0,30 bzw. 0,43 auch die größten ERCC1-Werte. Bei den übrigen Hodentumorzelllinien lag die Expression der NER-Gene unter einem relativen Wert von 0,2.

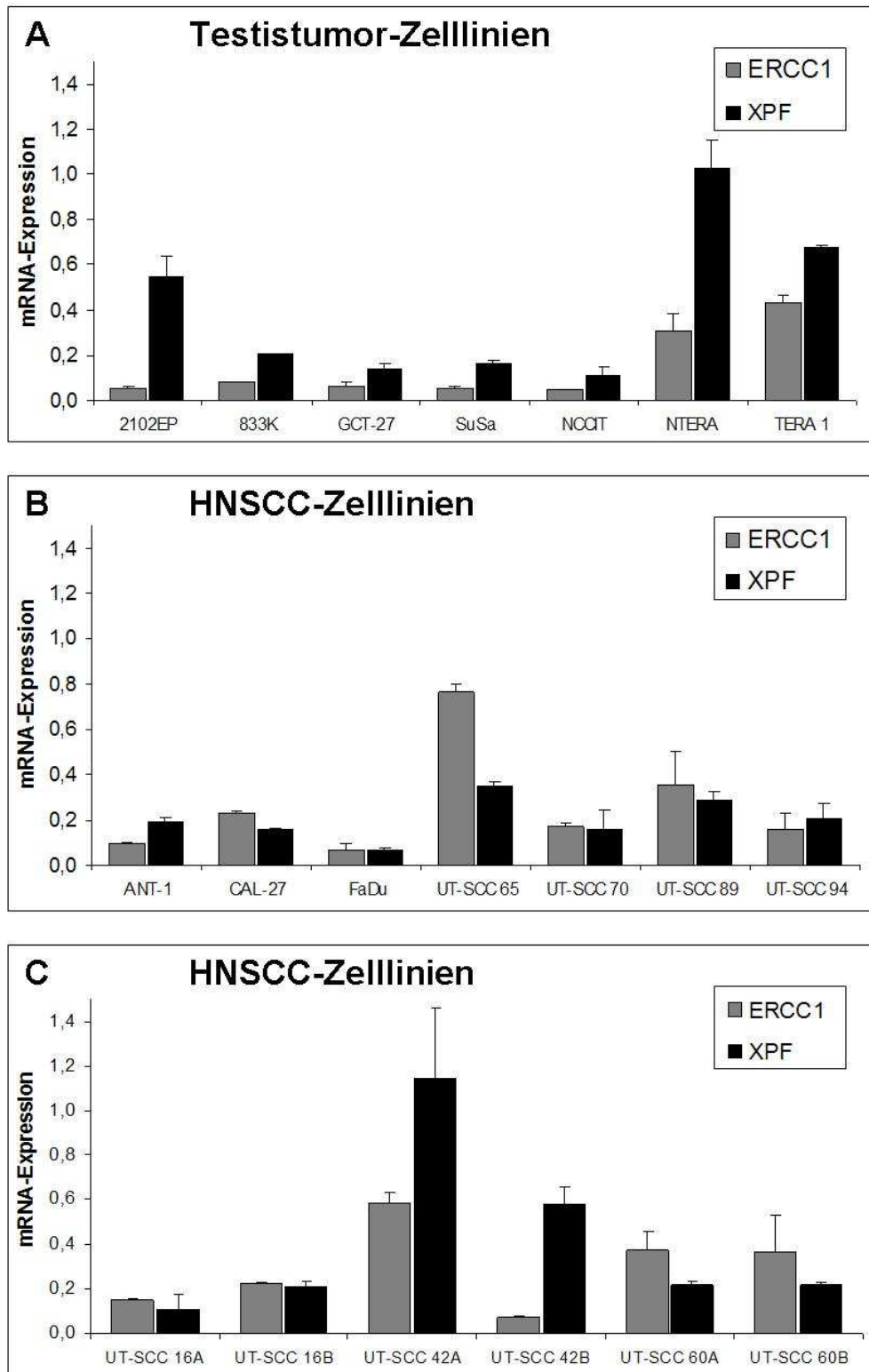


Abbildung 5-3: ERCC1- und XPF-mRNA-Expression der Tumorzelllinien

Vergleichende Darstellung der im LightCycler™ gemessenen relativen mRNA-Mengen der NER-Gene ERCC1 und XPF. Gezeigt sind die Werte der 7 untersuchten Testistumorzelllinien (A) und der 13 HNSCC-Zelllinien (B, C), wobei die Werte der Primärtumor-Metastasen-Paare zur besseren Übersicht in Graphik C dargestellt sind (MW ± SD).

In der Gruppe der HNSCC-Zelllinien (Abb. 5-3, B und C) zeigte sich im Gegensatz zu den TGCT-Zelllinien eine vergleichsweise höhere Expression von ERCC1, wobei die Zelllinien UT-SCC 65 (0,76) und UT-SCC 42 A (0,59) die höchsten ERCC1-Werte aufwiesen. Die stärkste XPF-Expression besaßen die Zelllinien UT-SCC 42 A und B (1,15 und 0,58). Bezüglich der Expression von NER-Genen auf mRNA-Ebene zeigten sich zwischen Hodentumor- und HNSCC-Zelllinien weder für ERCC1 noch für XPF statistisch signifikante Gruppenunterschiede.

In Tabelle 5-2 sind die PCR-Ergebnisse für jede untersuchte Zelllinie als Mittelwert mit Standardabweichung aufgeführt. Es handelt sich bei den dargestellten Ergebnissen um normalisierte Werte, wobei die Messwerte der untersuchten Zelllinien durch die mRNA-Expression der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 dividiert wurden. In der Gruppe der Testistumorzelllinien zeigte die relativ cisplatinresistente Zelllinie Teral (RF 0,66) die höchste ERCC1-Expression und ebenfalls eine hohe XPF-Expression. Allerdings wies auch NTERA, die Hodentumorzelllinie mit der größten Cisplatinempfindlichkeit (RF 0,01), im Vergleich zu SKOV-3 erhöhte NER-mRNA-Spiegel auf. Obwohl die mRNA-Werte der übrigen Testistumorzelllinien unter der Expression von SKOV-3 lagen, lässt sich unter Berücksichtigung der berechneten IC-Werte keine Korrelation zwischen Cisplatinempfindlichkeit und einer niedrigen ERCC1- oder XPF-mRNA-Expression feststellen. In der Gruppe der HNSCC-Zelllinien zeigten 8 bzw. 11 der untersuchten Zelllinien eine gegenüber SKOV-3 herabgesetzte NER-mRNA-Expression (Wert < 1,0), darunter die cisplatinresistenten HNSCC-Zelllinien UT-SCC 70 (RF 1,78) sowie UT-SCC 16 A und B (RF 5,78 bzw. 6,54). Die höchsten ERCC1-mRNA-Expressionen wiesen die chemoresistenten Zelllinien UT-SCC 65 (RF 2,15), UT-SCC 42 A (RF 2,75) sowie die chemosensiblen Zelllinien UT-SCC 60 A und B (RF 0,17 bzw. 0,21) auf. Im Bereich der XPF-Expression zeigten die Zelllinien UT-SCC 42 A und B (RF 2,75 bzw. 2,93) gegenüber SKOV-3 erhöhte Werte. Auch bei den untersuchten HNSCC-Zelllinien lässt sich daher keine signifikante Korrelation zwischen Cisplatinresistenz und NER-Expression der Zelllinien feststellen (siehe Kapitel 5.1.5).

Zelllinie	ERCC1	XPF	
SKOV-3	1,00	1,00	
TGCT	2102 EP	0,18 ± 0,03	1,00 ± 0,16
	833K*	0,28 ± 0,00	0,37 ± 0,00
	GCT27	0,22 ± 0,07	0,25 ± 0,05
	SuSa	0,18 ± 0,03	0,29 ± 0,03
	NCCIT*	0,16 ± 0,00	0,20 ± 0,07
	NTERA	1,05 ± 0,28	1,87 ± 0,22
	Teral*	2,35 ± 0,02	1,24 ± 0,01
HNSCC	ANT-1	0,34 ± 0,02	0,35 ± 0,03
	Cal-27	0,79 ± 0,02	0,28 ± 0,01
	FaDu	0,23 ± 0,10	0,12 ± 0,01
	UT-SCC 65	2,64 ± 0,11	0,64 ± 0,03
	UT-SCC 70	0,58 ± 0,06	0,29 ± 0,15
	UT-SCC 89	1,22 ± 0,51	0,52 ± 0,08
	UT-SCC 94	0,54 ± 0,27	0,37 ± 0,12
	UT-SCC 16 A	0,51 ± 0,03	0,20 ± 0,12
	UT-SCC 16 B*	0,78 ± 0,01	0,39 ± 0,04
	UT-SCC 42 A	2,02 ± 0,16	2,08 ± 0,57
	UT-SCC 42 B*	0,25 ± 0,01	1,05 ± 0,14
	UT-SCC 60 A	1,28 ± 0,29	0,39 ± 0,04
	UT-SCC 60 B*	1,26 ± 0,58	0,40 ± 0,01

Tabelle 5-2: mRNA-Expression der NER-Gene ERCC1 und XPF normalisiert auf SKOV-3

Die gezeigten Werte stellen die relative mRNA-Expression der untersuchten Zelllinien in Bezug auf die Expression der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 dar (MW ± SD).

* = Metastasen-Zelllinie

5.1.3 Analyse der XPA-, XPF- und ERCC1-Protein-Expression der Zelllinien

Um zu überprüfen, ob auf Proteinebene ein Unterschied in der NER-Expression zwischen Testistumor- und HNSCC-Zelllinien besteht, wurden aus den Zellen, wie in Kapitel 4.6.1.1 beschrieben, Proteine isoliert und im Western Blot, unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die NER-Proteine XPA, XPF und ERCC1, analysiert (siehe Kapitel 4.6.2 bis 4.6.4). Um Unterschiede in der Protein-

beladung der einzelnen Banden zu berücksichtigen, wurde bei jedem Western Blot durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern die Expression des Housekeeping-Gens β -Actin bestimmt. Die relativen Expressionen der NER-Proteine in den untersuchten Zelllinien sind in Abb. 5-4 und 5-5 dargestellt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe des Imagingsystem Gel-Dok XR (Bio-Rad) unter Verwendung der Software Quantity One[®] 1-D Analysis (Bio-Rad). Um die Expression der verschiedenen Proben zu vergleichen, wurden die Ergebnisse anhand der β -Actin-Bande normalisiert.

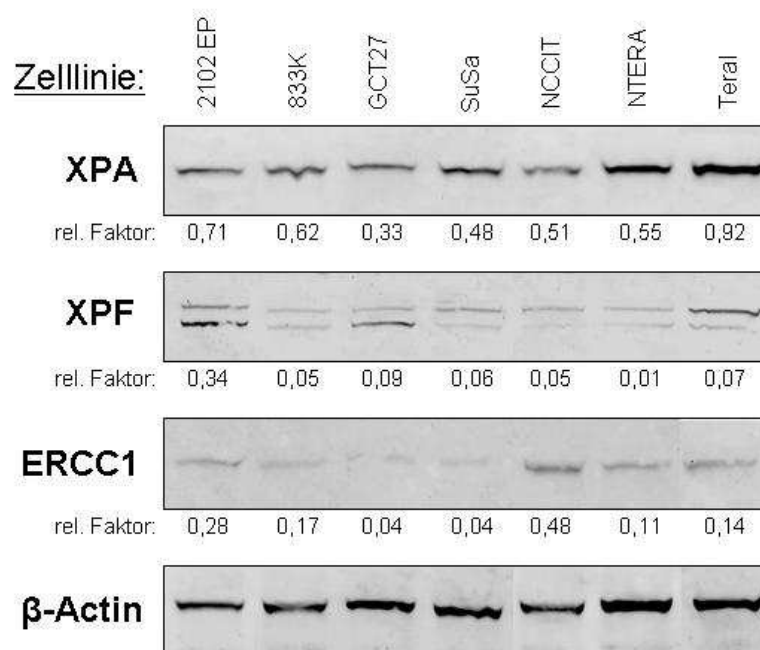


Abbildung 5-4: Western Blot-Analyse der NER-Protein-Expression in Testistumorzelllinien

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot, der die Expression der NER-Proteine XPA, XPF und ERCC1 in den untersuchten Testistumorzelllinien zeigt. Um Unterschiede in der Proteinbeladung der Gele zu berücksichtigen, wurde als interne Kontrolle die β -Actin-Expression jeder Probe bestimmt. Die Protein-Expression der Zelllinien wird als relative Dichte der Banden nach Normalisierung gegen das Housekeeping-Gen angegeben (rel. Faktor).

Die Western Blot-Analysen zeigten eine positive Expression der NER-Proteine XPA, XPF und ERCC1 in allen untersuchten Hodentumorzelllinien (Abb. 5-4), wobei XPA im Vergleich zu den anderen DNA-Reparaturenzymen am stärksten exprimiert wurde. Die Zelllinien Teral und 2102 EP zeigten mit 0,92 und 0,71 die höchsten relativen XPA-Werte. Die stärkste XPF-Expression besaß die Zelllinie 2102 EP. Die übrigen Testistumorzelllinien zeigten niedrige XPF-Expressionspiegel (0,01-0,09). In Bezug auf die ERCC1-Expression zeigte NCCIT die höchste (0,48) und die Zelllinien GCT27 sowie SuSa die niedrigsten relativen Proteinwerte (0,04).

In der Gruppe der HNSCC-Zelllinien besaßen die Zelllinien ANT-1 und FaDu die höchste NER-Protein-Expression (Abb. 5-5). ERCC1 wurde von den Zelllinien UT-SCC 16 A, 16 B und 42 A nicht exprimiert bzw. die Expression lag unter der Nachweisgrenze des verwendeten Detektionsverfahrens. Bei dem Primärtumor-Metastasen-Paar UT-SCC 42 A und B ließ sich eine signifikante Mehrexpression der NER-Proteine bei der Metastasenzelllinie nachweisen. Die beiden weiteren Zelllinien-Paare (UT-SCC 16 A, B und 60 A, B) zeigten eine in etwa identische NER-Protein-Expression.

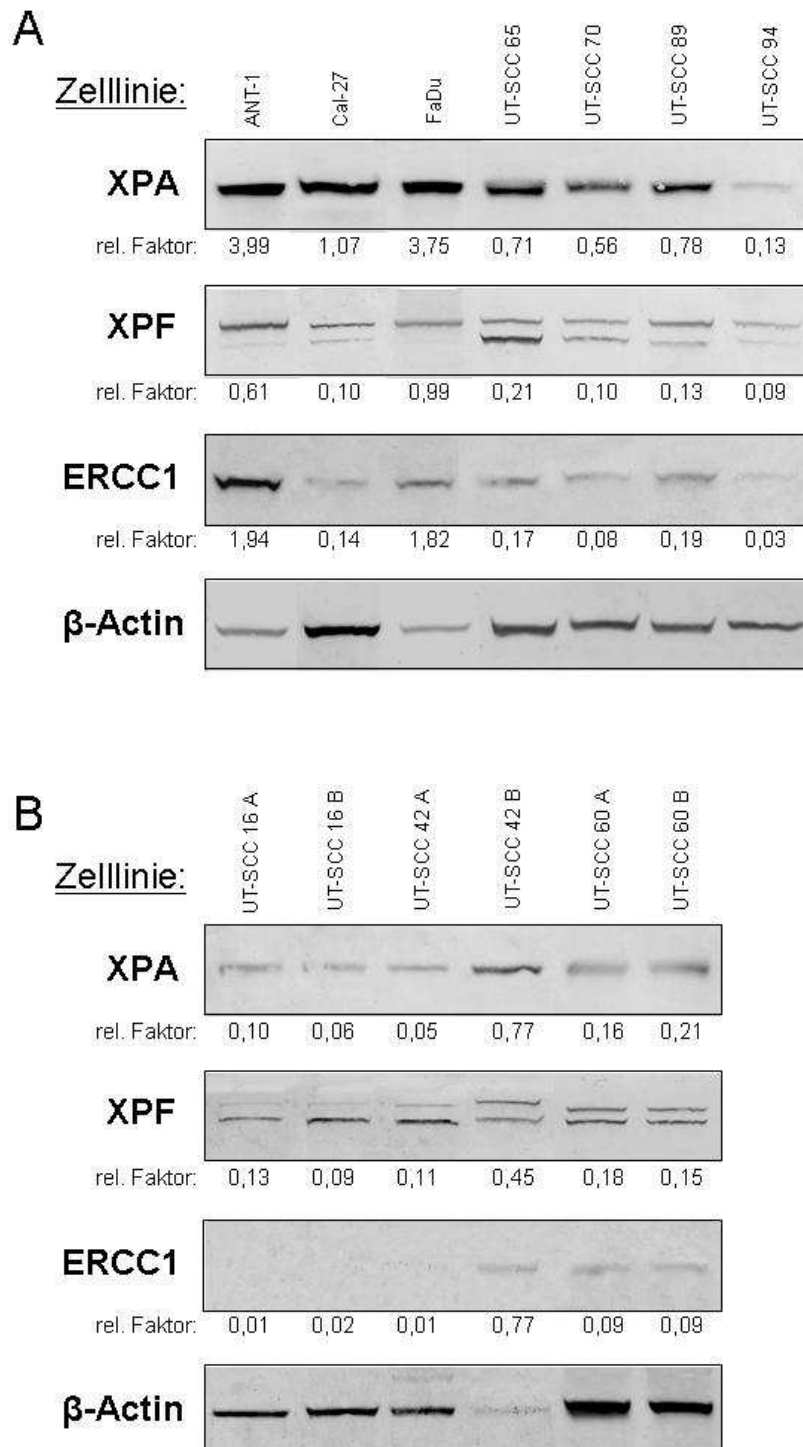


Abbildung 5-5: Western Blot-Analyse der NER-Protein-Expression in HNSCC-Zelllinien

Repräsentativer Western Blot mit Darstellung der NER-Protein-Expression in HNSCC-Primärtumor-Zelllinien (**A**) sowie HNSCC-Primärtumor-Metastasen-Paaren (**B**). Die Angabe der Protein-Expression erfolgte nach Normalisierung gegen β -Actin.

Im Rahmen dieser Studie sollte insbesondere überprüft werden, ob sich ein Unterschied innerhalb der Expression von NER-Genen bei Testistumor- und HNSCC-Zelllinien nachweisen lässt. Bei der statistischen Gruppenuntersuchung (Abb. 5-6) zeigte sich im Vergleich zu Testistumoren eine hochsignifikant höhere XPF-Expression bei den untersuchten HNSCC-Zelllinien ($p < 0,01$, *Mann-Whitney-U-Test*). Auch im Bezug auf XPA und ERCC1 fanden sich im Durchschnitt höhere Expressionen bei den HNSCC-Zelllinien. Die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Sowohl bei Testistumor- als auch bei HNSCC-Zelllinien war die Protein-Expression von XPA signifikant ($p < 0,05$, *Wilcoxon-Test*) höher als die von XPF und ERCC1.

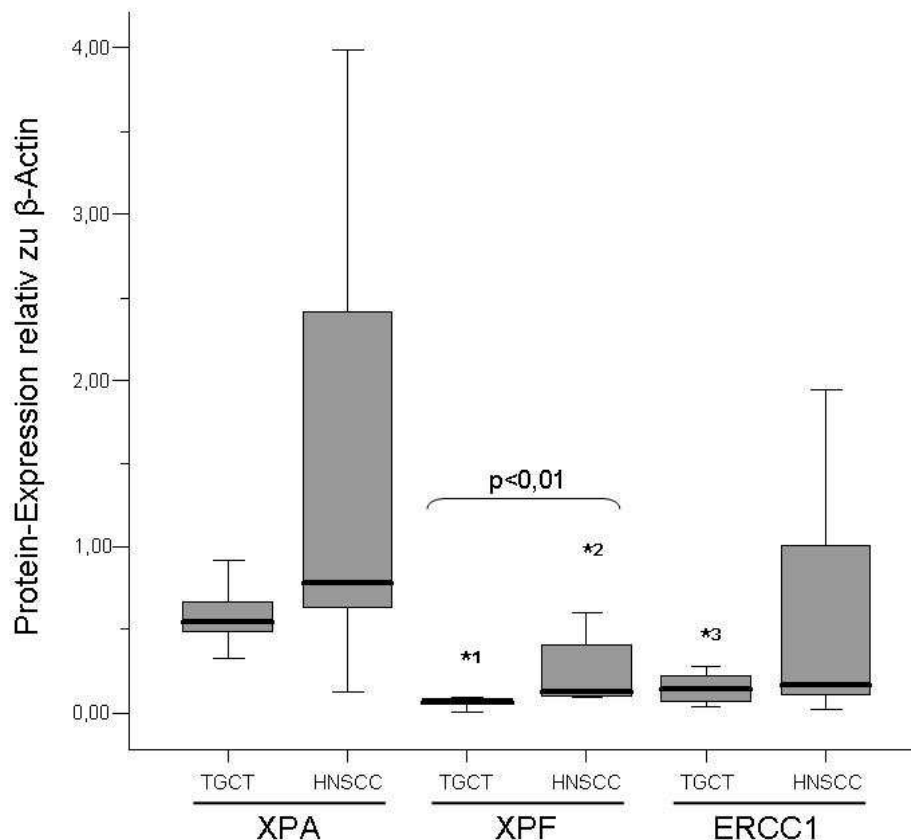


Abbildung 5-6: Box-Plot-Darstellung der relativen NER-Protein-Expression in den untersuchten Testistumor- und HNSCC-Zelllinien

HNSCC-Zelllinien exprimieren hochsignifikant höhere XPF-Proteinmengen als Testistumorzelllinien ($p < 0,01$, *Mann-Whitney-U-Test*). XPA besitzt von den untersuchten NER-Proteinen sowohl bei TGCT als auch bei HNSCC die signifikant höchsten Expressionen ($p < 0,05$, *Wilcoxon-Test*).

(*1 = 2102 EP, *2 = FaDu, *3 = NCCIT)

5.1.4 Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Expression der Zelllinien

Eine mögliche Korrelation zwischen den gemessenen mRNA-Expressionsspiegeln und dem NER-Proteingehalt der Zelllinien wurde mit Hilfe einer nicht-parametrischen Korrelationsanalyse nach *Spearman* untersucht. Es konnten dabei die Expressionen der NER-Gene ERCC1 und XPF verglichen werden. Bei der Analyse der vorliegenden Versuchsergebnisse zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der mRNA- und Protein-Expression von ERCC1 oder XPF (Tab. 5-3). Auch innerhalb der Gruppen der Testistumor- bzw. der HNSCC-Zelllinien ließ sich kein signifikanter Zusammenhang nachweisen.

Protein/mRNA	ERCC1	XPF
Korrel.- Koeffizient (r)	- 0,280	0,216
p	0,23 (n. s.)	0,36 (n. s.)

Tabelle 5-3: Ergebnisse der Korrelationsanalysen zwischen mRNA- und Protein-Expression von ERCC1 und XPF in Tumorzelllinien

(r = Korrelationskoeffizient, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, n. s. = nicht signifikant)

5.1.5 Korrelation zwischen NER-Expression und Cisplatinresistenz (IC₉₀) der Zelllinien

Um zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen der mRNA- bzw. Protein-Expression von NER-Reparaturgenen und dem Ausmaß der Cisplatinresistenz bzw. -sensibilität der untersuchten Testistumor- und HNSCC-Zelllinien vorliegt, wurde ebenfalls eine nicht-parametrische Rangkorrelationsanalyse nach *Spearman* durchgeführt. Es wurden die gemessenen mRNA- und Proteinspiegel in Beziehung zu den jeweiligen IC₉₀-Werten der einzelnen Zelllinien gesetzt.

Auf mRNA-Ebene ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen der ERCC1- oder XPF-Expression und den IC₉₀-Werten der Zelllinien. Auf Proteinebene zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,05$) zwischen der Höhe der XPF-Expression und dem Ausmaß der Cisplatinresistenz. In Bezug auf die ERCC1- und XPA-Protein-Expression ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zu den IC₉₀-Werten nachweisen (Tab. 5-4).

mRNA/IC ₉₀	ERCC1	XPF
Korrel.- Koeffizient (r)	0,225	0,016
p	0,34 (n. s.)	0,95 (n. s.)

Protein/IC ₉₀	ERCC1	XPF	XPA
Korrel.- Koeffizient (r)	- 0,196	0,459	- 0,220
p	0,41 (n. s.)	<0,05	0,926 (n. s.)

Tabelle 5-4: Ergebnisse der Korrelationsanalysen zwischen Cisplatinresistenz und NER-Expression in Tumorzelllinien

(r = Korrelationskoeffizient, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, n. s. = nicht signifikant)

5.2 Charakterisierung der Tumorproben

Um die Expression von NER-Genen in vivo zu untersuchen und mit den Daten der Zelllinien zu vergleichen, wurde im zweiten Teil der Arbeit Tumorgewebe analysiert. Es konnten dabei insgesamt 35 Gewebeproben von 24 Patienten mit histologisch gesicherten HNSCC untersucht werden (Tab. 3.3). Die Proben wurden im Rahmen von operativen Tumorresektionen entnommen. Von insgesamt 9 Patienten (37,5 %) standen zusätzlich zu den HNSCC-Primärtumorproben auch Lymphknoten-Metastasen zu Verfügung, in zwei Fällen aus zwei verschiedenen zervicalen Lokalisationen. Bei den 24 Patienten, bei denen die Diagnose eines primären Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich gestellt worden war, handelte es sich in 18 Fällen (75 %) um ein Erstkarzinom, in 2 Fällen (8,3 %) um ein Zweitkarzinom mehrere Jahre nach Operation und Bestrahlung (60 Gy) eines HNSCC-Ersttumors und in 4 Fällen (16,7 %) um eine Rezidivkrankung. Die Rezidive entstanden nach vorausgegangener alleiniger Operation (n = 3) bzw. in einem Fall nach Tumorresektion und adjuvanter kombinierter Radiochemotherapie (60 Gy, Cisplatin + 5-Fluorouracil). Bei 7 Patienten (29,2 %) war das Karzinom im Hypopharynx, bei 6 Patienten (25 %) im Larynx, bei 5 (20,8 %) im Tonsillengebiet und bei je zwei Patienten (8,3 %) am Zungengrund, am Alveolarfortsatz bzw. im Bereich des Mundbodens lokalisiert.

Neben den HNSCC-Tumoren wurden außerdem 10 Gewebeproben von Patienten mit Hodentumoren untersucht, die von der urologischen Klinik der Universität zu Lübeck für das Forschungsprojekt zur Verfügung gestellt wurden. Diese Proben dienten wiederum als Kontrollen mit dem Ziel, die NER-Expression der chemosensiblen Hodentumoren auch in vivo mit der der HNSCC-Proben zu vergleichen. Es handelte sich in allen Fällen um primäre Hodentumoren, die vor der chirurgischen Entfernung nicht neoadjuvant therapiert wurden (Tab. 3.2).

5.2.1 Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten

Bei den 24 Patienten mit HNSCC, deren Tumorgewebeproben untersucht wurden, handelt es sich um 20 Männer und 4 Frauen (Abb. 5-7). Das Alter zum Zeitpunkt der Probeentnahme betrug im Durchschnitt 59 Jahre (min: 43 Jahre, max: 75

Jahre). Eine Übersicht über die prozentuale Altersverteilung gibt Abb. 5-8. Hodentumoren zeigen eine typische Altersverteilung, die sich mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr deutlich von der der HNSCC unterscheidet. Das Durchschnittsalter der Hodentumorpatienten lag in der vorliegenden Studie bei 36 Jahren (min: 21 Jahre, max: 49 Jahre).

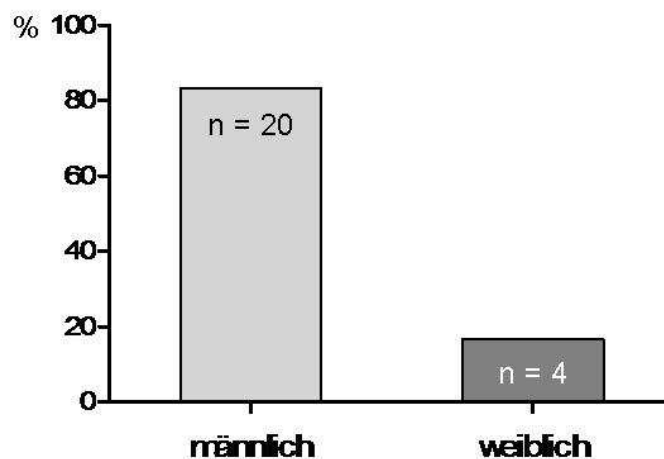


Abbildung 5-7: Geschlechtsverteilung der 24 Patienten mit HNSCC

Der überwiegende Anteil der Patienten waren Männer (83,3 %), nur in 4 Fällen (16,7 %) handelte es sich um HNSCC-Patientinnen.

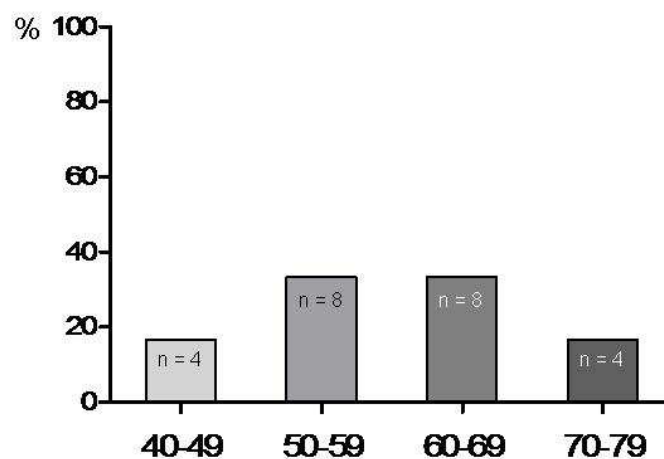


Abbildung 5-8: Altersverteilung der 24 Patienten mit HNSCC

Zwei Drittel der Patienten erkrankten im fünften und sechsten Dezennium (66,7 %).

5.2.2 Tumorstadien und histopathologische Einteilung

Unter Berücksichtigung der UICC Klassifikation lag bei den meisten der HNSCC-Patienten (83,3 %) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit ausgedehntem Primärtumor und/oder Lymphknoten-Metastasierung vor (UICC III-IV). Nur 4 Patienten (16,7 %) konnten aufgrund ihrer TNM-Stadien den prognostisch günstigeren UICC-Stadien I und II zugeordnet werden. Abb. 5-9 A und B zeigt die Häufigkeitsverteilung der T- und N-Kategorie im untersuchten HNSCC-Patientenkollektiv. 11 der 24 Patienten (45,8 %) wiesen ein Tumorstadium T2 auf. Bei 41,7 % lag bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium (T3 oder T4) vor. In über zwei Drittel der Fälle (70,8 %) hatte bereits eine zervicale Lymphknoten-Metastasierung stattgefunden. Bei keinem der Patienten bestand zum Diagnosezeitpunkt eine Fernmetastasierung. Histologisch handelte es sich in allen Fällen um ein Plattenepithelkarzinom. Abb. 5-9 C zeigt eine Übersicht der histopathologischen Differenzierungsgrade. In der überwiegenden Zahl der Fälle (75 %) ergab sich eine geringgradige Differenzierung (G3) der Plattenepithelkarzinome. 33,3 % der Tumoren wurden als mittelgradig differenziert (G2) eingestuft, und nur ein Karzinom (4,2 %) zeigte eine gute Differenzierung (G1). Keines der Karzinome war undifferenziert (G4).

Bei den untersuchten Hodentumorproben ergab sich in Bezug auf die TNM-Einteilung bei 50 % der Proben ein prognostisch günstiges Tumorstadium T1 und bei 50 % ein Stadium T2. Drei Patienten wiesen bereits Lymphknoten-Metastasen auf (Lugano Stadien IIa, IIb und IIc), eine Fernmetastasierung lag nicht vor. Die histopathologische Begutachtung ergab in sechs Fällen den Nachweis eines Seminoms (60 %). In zwei Fällen handelte es sich um einen Kombinationstumor aus einem Seminom und einem embryonalen Karzinom. Daneben ließ sich ein nicht-seminomatöser Kombinationstumor und ein reifes Teratom mit kleinherdigen seminomatösen Anteilen nachweisen.

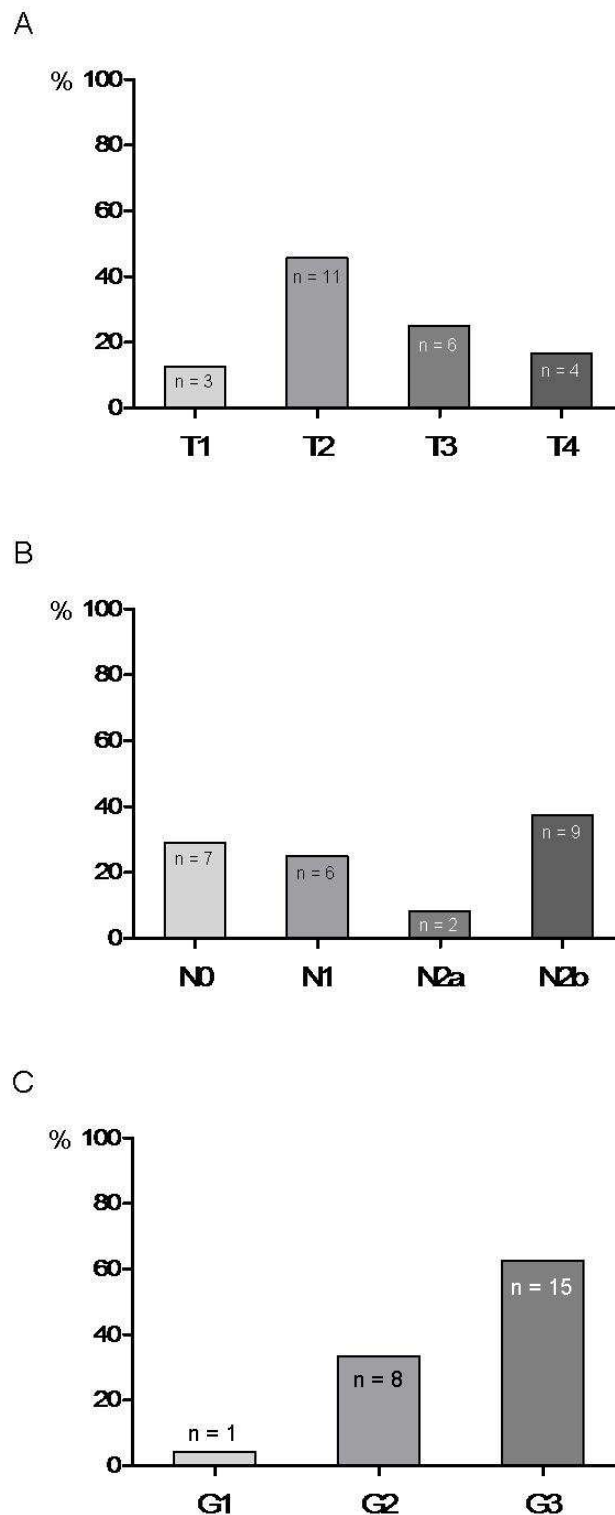


Abbildung 5-9: Tumorstadien und Differenzierungsgrade der HNSCC-Tumoren

A) und **B)** zeigen die Häufigkeitsverteilung der T- und N-Stadien der 24 HNSCC-Proben. **C)** gibt die Verteilung des histopathologischen Differenzierungsgrades an. Mit 62,5 % wiesen über die Hälfte der untersuchten Plattenepithelkarzinome eine geringgradige Differenzierung (G3) auf.

5.3 Differentielle Expression von NER-Genen in HNSCC- und Testistumorgewebebeproben

5.3.1 Analyse der ERCC1- und XPF- mRNA-Expression

In Tab. 5-5 sind die in der quantitativen One-Step RT-PCR gemessenen mRNA-Expressionen von ERCC1 und XPF zusammengefasst. Es handelt sich um relative Werte, nach Normalisierung auf die Expression des Referenzgens HPRT-1. Bei insgesamt 10 der 45 Tumورproben konnte aufgrund einer limitierten Materialgewinnung keine RNA zur PCR-Analyse isoliert werden.

	Patient #	ERCC1	XPF		Patient #	ERCC1	XPF
Testistumoren	1	0,56 ± 0,10	1,28 ± 0,04	HNSCC (Primärtumor-Metastasen-Paare)	26a	0,29 ± 0,10	0,33 ± 0,18
	2	0,19 ± 0,00	0,69 ± 0,04		26b	2,23 ± 0,27	2,32 ± 0,54
	3	0,25 ± 0,04	0,99 ± 0,08		26c	6,64 ± 0,14	1,36 ± 0,31
	4	0,23 ± 0,01	0,49 ± 0,02		27a	0,50 ± 0,09	0,39 ± 0,13
	5	0,47 ± 0,17	0,73 ± 0,10		27b	0,61 ± 0,04	0,31 ± 0,00
	6	n. b.	n. b.		28a	0,36 ± 0,13	0,30 ± 0,06
	7	0,42 ± 0,06	1,11 ± 0,24		28b	0,28 ± 0,11	1,13 ± 0,15
	8	0,32 ± 0,06	0,62 ± 0,39		28c	1,34 ± 0,25	3,40 ± 0,13
	9	0,15 ± 0,02	0,22 ± 0,12		29a	n. b.	n. b.
	10	0,58 ± 0,22	0,82 ± 0,16		29b	4,02 ± 0,20	0,56 ± 0,10
HNSCC (Primärtumoren)	11	0,71 ± 0,06	0,26 ± 0,03	30a	0,22 ± 0,08	0,36 ± 0,01	
	12	0,35 ± 0,00	0,41 ± 0,09	30b	0,95 ± 0,13	0,35 ± 0,07	
	13	n. b.	n. b.	31a	0,40 ± 0,04	0,66 ± 0,33	
	14	0,26 ± 0,05	0,33 ± 0,15	31b	0,85 ± 0,00	1,07 ± 0,29	
	15	3,67 ± 0,13	1,49 ± 0,38	32a	0,23 ± 0,06	0,41 ± 0,13	
	16	n. b.	n. b.	32b	0,49 ± 0,01	0,34 ± 0,17	
	17	0,77 ± 0,01	0,59 ± 0,04	33a	n. b.	n. b.	
	18	1,23 ± 0,39	0,95 ± 0,17	33b	n. b.	n. b.	
	19	0,65 ± 0,14	0,50 ± 0,04	34a	n. b.	n. b.	
	20	1,29 ± 0,19	1,84 ± 0,30	34b	n. b.	n. b.	
	21	0,25 ± 0,06	0,46 ± 0,15				
	22	1,16 ± 0,48	0,60 ± 0,19				
	23	0,83 ± 0,02	0,65 ± 0,02				
	24	n. b.	n. b.				
	25	n. b.	n. b.				

Tabelle 5-5: Ergebnisse der quantitativen One step „real-time“ RT-PCR

Gezeigt ist die auf HPRT-1 normalisierte mRNA-Expression der NER-Gene ERCC1 und XPF in den verschiedenen Tumorgewebebeproben (MW ± SD).

Die XPF-mRNA-Expression in den untersuchten Hodentumoren lag konstant über dem ERCC1-Expressionsniveau. Diese Beobachtung korrelierte mit den RT-PCR-Analysen der Testistumorzelllinien. Die ERCC1-Expression nahm Werte zwischen 0,15 und 0,58 an, während die XPF-Expression zwischen 0,22 und 1,28 lag. Bei den HNSCC-Tumoren zeigte sich ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen der ERCC1- und XPF-mRNA-Expression derselben Probe. 14 (54 %) Proben wiesen eine höhere ERCC1-Expression auf, 12 (46 %) Proben besaßen eine stärkere XPF-Expression. In beiden Gruppen befanden sich in vergleichbarer prozentualer Verteilung Primärtumoren, Metastasen und Rezidive.

In Abb. 5-10 sind die gemessenen relativen mRNA-Mengen der HNSCC-Primärtumor-Metastasen-Paare graphisch dargestellt.

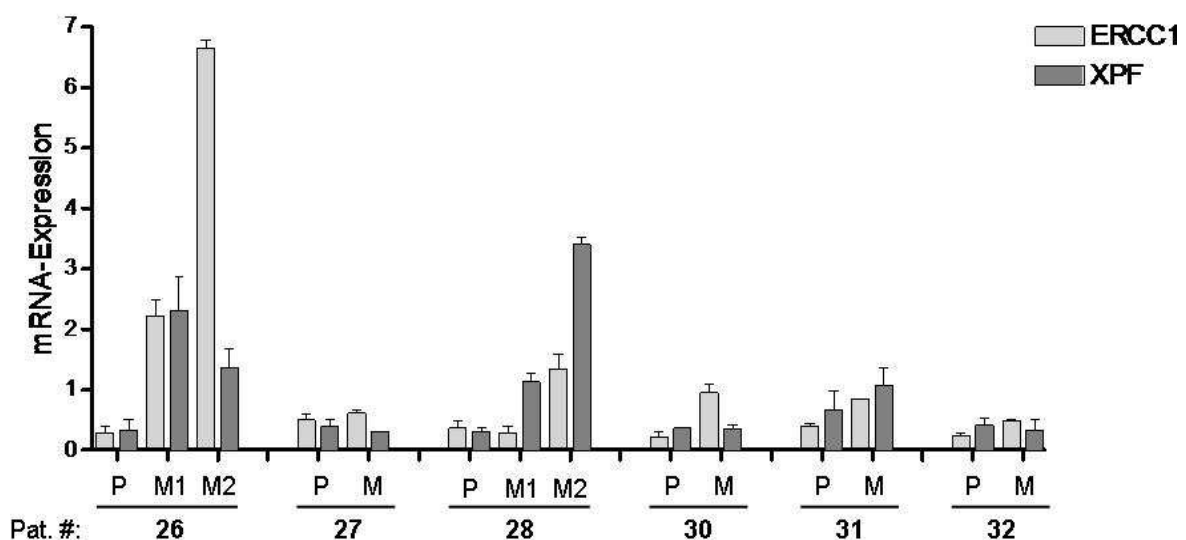


Abbildung 5-10: Darstellung des ERCC1- und XPF-mRNA-Gehaltes in HNSCC-Primärtumoren (P) und ihren Lymphknoten-Metastasen (M)

Vergleichende Darstellung der im LightCycler™ gemessenen relativen mRNA-Mengen der NER-Gene ERCC1 und XPF. Gezeigt sind die Werte der 6 untersuchten Primärtumor-Metastasen-Paare (MW ± SD). Von den Patienten # 26 und 28 standen zwei Metastasenproben aus unterschiedlichen zervicalen Lymphknotengebieten zur Verfügung (M1 und M2).

Bei der Analyse der Primärtumor-Metastasen-Paare zeigte sich vor allem bei den Pat. # 26 und 28 eine deutliche Mehrexpression von NER-Genen in den Metastasengeweben. Bei diesen Patienten konnte Gewebe von je zwei Metastasen aus unterschiedlichen zervicalen Lymphknotenregionen untersucht werden. In beiden Metastasen ließ sich eine im Vergleich zum Primärtumor erhöhte XPF-Expression nachweisen. Die ERCC1-Expression war in beiden Lymphknoten-Metastasen des Pat. # 26 erhöht, während nur die Metastase M2 des Pat. # 28 erhöhte ERCC1-Werte aufwies. Mäßig erhöhte ERCC1- bzw. XPF-Werte zeigten auch die Metastasen der Pat. # 30 und 31. Die Proben-Paare # 27 und 32 wiesen in etwa identische NER-mRNA-Expressionen auf. Bei der statistischen Analyse der 6 Primärtumor-Metastasen-Paare zeigte sich eine signifikante Mehrexpression von ERCC1 ($p < 0,05$) bei HNSCC-Metastasen.

Es wurde eine statistische Gruppenanalyse durchgeführt, in die alle untersuchten Tumorgewebeproben eingeschlossen wurden, um Unterschiede in der mRNA-Expression der NER-Gene ERCC1 und XPF zwischen Hodentumorgewebe und HNSCC-Primärtumoren sowie HNSCC-Metastasen zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-11 graphisch dargestellt. Bei der Analyse der ERCC1-mRNA-Expression lassen sich zwischen Testistumoren und HNSCC-Primärtumoren keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Allerdings bestand in den untersuchten Testistumoren im Vergleich zu HNSCC-Metastasen eine hochsignifikant niedrigere ERCC1-Expression ($p < 0,01$, *Mann-Whitney-U-Test*). Auch im Vergleich zu den HNSCC-Primärtumoren zeigte sich eine signifikante Überexpression von ERCC1-mRNA bei HNSCC-Metastasen ($p < 0,05$).

Bezüglich der XPF-mRNA-Expression ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Hodentumoren und HNSCC-Gewebe nachweisen. Um die Höhe der ERCC1- und XPF-Expression innerhalb der untersuchten Tumorgewebegruppen zu vergleichen, wurde der *Wilcoxon-Test* durchgeführt. Es zeigte sich, dass in den Testistumorproben XPF signifikant höher exprimiert war als ERCC1.

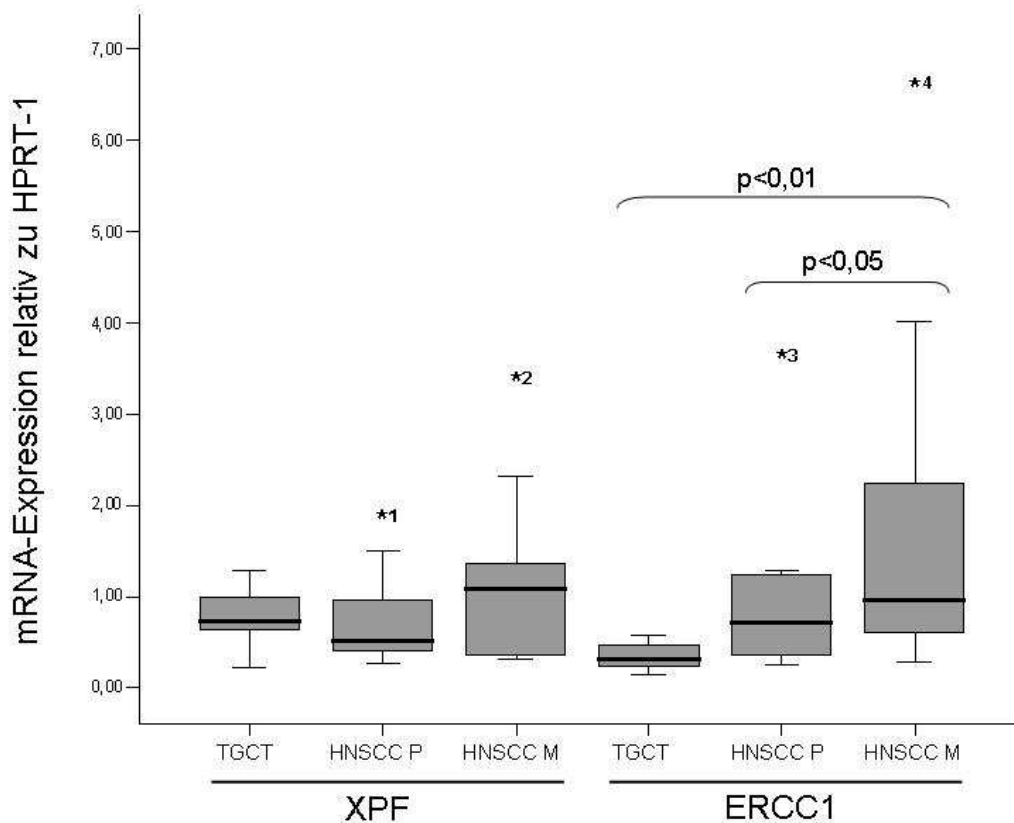


Abbildung 5-11: Box-Plot-Darstellung der ERCC1- und XPF-mRNA-Expression in den untersuchten Testistumor- und HNSCC-Gewebeproben

HNSCC-Metastasen zeigten im Vergleich zu Testistumoren und HNSCC-Primärtumoren eine signifikant höhere ERCC1-mRNA-Expression (*Mann-Whitney-U-Test*). Bezüglich der XPF-Expression ergab sich auf mRNA-Ebene kein statistisch signifikanter Unterschied.

(TGCT: n = 9, HNSCC P: n = 17, HNSCC M: n = 9, *1 = # 20, *2 = # 28c, *3 = # 15, *4 = # 26c)

5.3.2 Analyse der XPA-, XPF- und ERCC1-Protein-Expression

Nach der Bestimmung der NER-mRNA-Expression von Tumorgewebeproben erfolgte die Untersuchung der Proteinspiegel der einzelnen Tumoren durch Western Blot-Analysen. Die Banden der 44 untersuchten Tumorgewebeproben wurden quantifiziert und anhand der β -Actin-Bande normalisiert. Bei der Western Blot-Analyse der Gewebeproben zeigte sich bei XPA und XPF häufig eine mehrbandige Migration, die bei der Analyse der Tumorzelllinien nicht zur Darstellung kam. Für die quantitative Auswertung wurden die Dichtewerte der spezifischen Proteinbanden gemessen, die entsprechend ihres Molekulargewichtes mit Hilfe des Größenstandards definiert wurden.

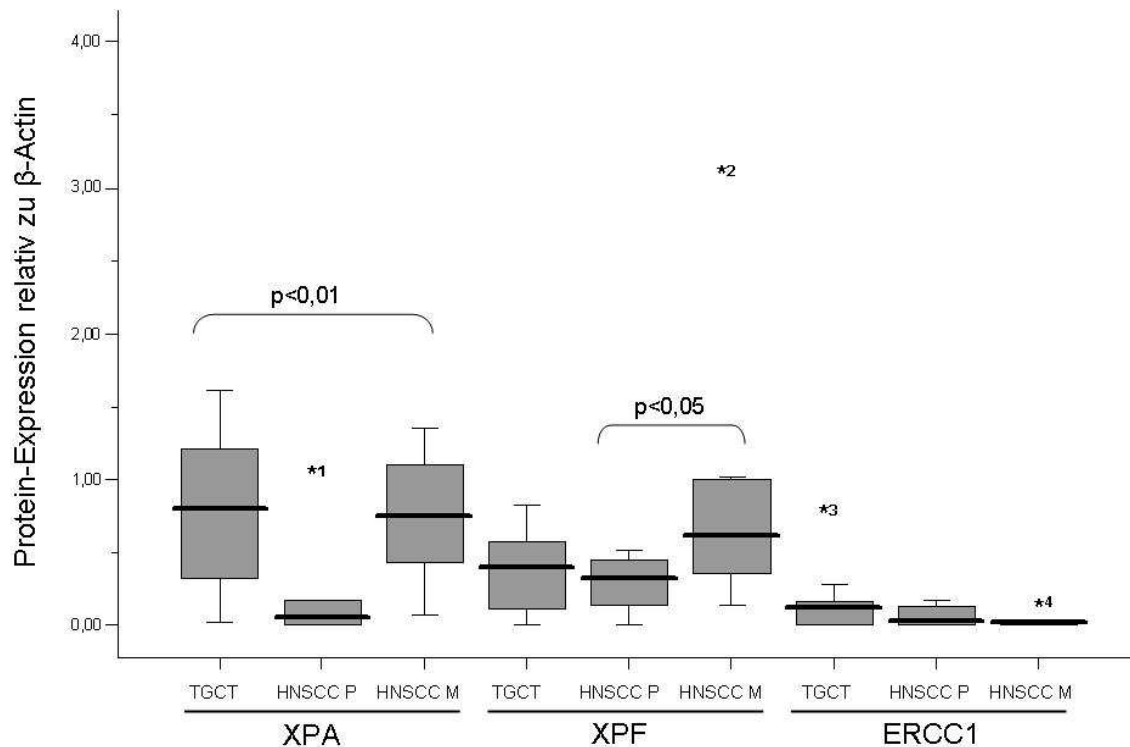


Abbildung 5-12: Box-Plot-Darstellung der relativen NER-Protein-Expression in den untersuchten Testistumoren und HNSCC-Geweben

Testistumoren und HNSCC-Metastasen exprimierten hochsignifikant höhere XPA-Proteinmengen als HNSCC-Primärtumoren ($p < 0,01$, *Mann-Whitney-U-Test*). Auch die Expression von XPF ist bei den Lymphknoten-Metastasen signifikant gegenüber den HNSCC-Primärtumoren erhöht ($p < 0,05$). Hinsichtlich der ERCC1-Expression zeigte sich kein signifikanter Unterschied. (TGCT: $n = 10$, HNSCC P: $n = 24$, HNSCC M: $n = 10$, *1 = # 12, *2 = # 29b, *3 = # 3, *4 = # 18)

In Abb. 5-12 ist die Verteilung der NER-Proteinspiegel in Hodentumoren sowie HNSCC-Primärtumoren bzw. -Metastasen dargestellt. ERCC1 zeigte in den untersuchten Proben insgesamt eine sehr niedrige Expression und konnte in ca. 50 % der Proben gar nicht detektiert werden. Die signifikante Überexpression von ERCC1 in HNSCC-Metastasen, die auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde (Abb. 5-11), konnte in der Western Blot-Analyse nicht bestätigt werden. Im Bezug auf die XPA-Expression besaßen Testistumoren und HNSCC-Metastasen eine deutliche Mehrexpression im Vergleich zu HNSCC-Primärtumoren ($p < 0,01$, *Mann-Whitney-U-Test*). Die Testistumorgewebeproben wiesen dabei eine deutlich positive XPA-Protein-Expression auf. Allein in den Proben # 2 und 10 zeigte sich eine geringe bis nicht nachweisbare relative XPA-Expression (0,10 bzw. 0,02).

Auch in HNSCC-Metastasen ließ sich eine hohe Expression von XPA nachweisen. Die höchsten relativen Werte wiesen dabei die Proben # 29b mit 6,21 und 26b mit 1,36 auf. Nur das Metastasengewebe 34b besaß eine sehr niedrige XPA-Expression (0,07). Der direkte Vergleich der 9 untersuchten HNSCC-Primärtumor-Metastasen-Paare ergab in 6 Fällen (66,6 %) eine deutliche XPA-Mehrexpression der Metastasen (Abb. 5-13). In zwei Fällen lag eine in etwa vergleichbare Expression vor (# 31 und 34), bei einem Probenpaar besaß der Primärtumor eine höhere XPA-Expression als die Metastase (# 32). Im Gegensatz dazu zeigten HNSCC-Primärtumoren niedrige XPA-Spiegel, die in 18 der 24 untersuchten Proben (75 %) unter einem relativen Wert von 0,3 lagen.

Bezüglich der XPF-Protein-Expression zeigte sich im Vergleich zu HNSCC-Primärtumoren eine signifikante Mehrexpression bei Metastasen ($p < 0,05$, *Mann-Whitney-U-Test*). Die XPF-Protein-Expression zeigte insgesamt eine ähnliche Gruppenverteilung wie die in Abb. 5-11 dargestellte mRNA-Expression der Proben. Der direkte Vergleich der HNSCC-Primärtumor-Metastasen-Paare ergab in 4 Fällen (# 26, 28, 29 und 33) eine XPF-Mehrexpression der Metastasen (Abb.5-13).

Vergleichend zu den Untersuchungen an Zelllinien ließ sich feststellen, dass die durchschnittlichen XPA- und XPF-Protein-Expressionen bei Testistumorgewebe höhere Werte zeigten als bei Testistumorzelllinien, während die Expression bei HNSCC-Gewebeproben insgesamt geringer ausfiel als bei den untersuchten Zelllinien. Außerdem sind die Expressionen der NER-Proteine (v. a. XPA und ERCC1) in HNSCC-Gewebeproben im Vergleich zu den Zelllinien homogener verteilt.

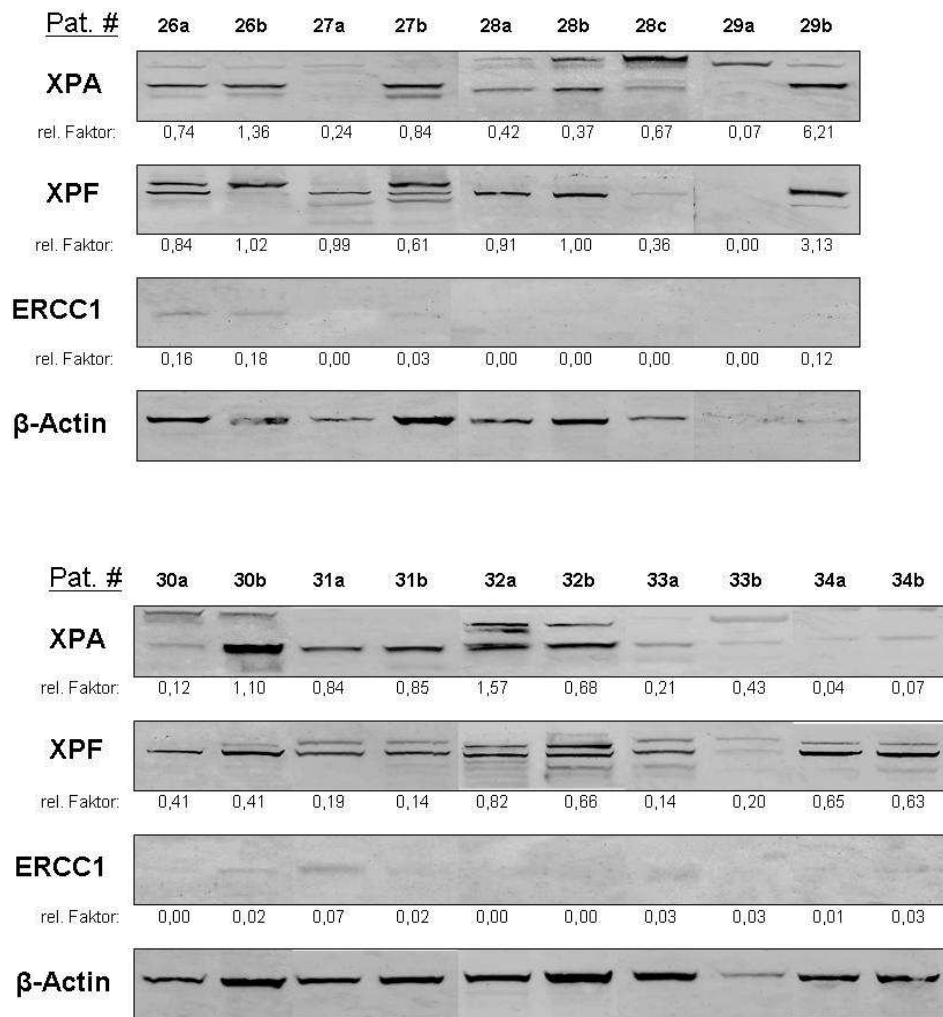


Abbildung 5-13: Western Blot-Analyse der NER-Protein-Expression in HNSCC-Primärtumoren (a) und zugehörigen Lymphknoten-Metastasen (b, c)

Repräsentativer Western Blot mit Darstellung der NER-Protein-Expression in 9 HNSCC-Primärtumor-Metastasen-Paaren. Von Pat. # 28 stand Metastasengewebe aus zwei unterschiedlichen zervicalen Lymphknoten-Regionen zur Verfügung. Die Auswertung der Protein-Expression erfolgte nach Normalisierung auf β -Actin.

5.3.3 Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Expression der Tumorgewebeproben

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der mRNA- bzw. Protein-Expression von ERCC1 und XPF in den untersuchten Tumorgewebeproben wurde die Rangkorrelationsanalyse nach *Spearman* durchgeführt. Dabei konnten nur die Proben in die Analyse miteinbezogen werden, bei denen sowohl mRNA-Werte als auch Protein-Expressionen zur Verfügung standen. Bei der Korrelationsanalyse der Tumorgewebeproben zeigte sich wie bei den untersuchten Zelllinien keine signifikante Korrelation zwischen der mRNA- und Protein-Expression von ERCC1 oder XPF (Tab. 5-6).

Protein/mRNA	ERCC1	XPF
Korrel.- Koeffizient (r)	- 0,073	- 0,203
p	0,68 (n. s.)	0,25 (n. s.)

Tabelle 5-6: Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen mRNA- und Protein-Expression von ERCC1 und XPF in Tumorgewebeproben

(r = Korrelationskoeffizient, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, n. s. = nicht signifikant)

5.4 Transfektion von humanen Zelllinien mit siRNA

Aufbauend auf den Expressionsanalysen von Bestandteilen der NER in Testistumoren und HNSCC sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden mittels siRNA-Transfektion eine Herabregulierung von NER-Genen in cisplatinresistenten Zelllinien zu erreichen. Durch die gezielte Inhibition von Schlüsselenzymen der NER sollte in vitro eine DNA-Reparatur-Defizienz erzeugt werden, um resistente Zelllinien gegenüber Cisplatin zu sensibilisieren. Zur Etablierung der Methode wurde zunächst die bekannt cisplatinresistente Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 verwendet. Außerdem wurden Versuche mit der HNSCC-Primärtumor-Zelllinie ANT-1 durchgeführt. Für die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) wurden synthetische siRNAs der Firma Santa Cruz (CA, USA) verwendet, die sequenzspezifisch zur transkriptionellen Inhibition der Zielgene führen. Es handelt sich dabei um eine siRNA-Mischung aus drei RNA-Doppelsträngen, welche gegen unterschiedliche Regionen der XPA- bzw. XPF-mRNA gerichtet sind. Die Transfektion der siRNA-Oligonukleotide erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers.

5.4.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde eine Alexa Fluor 488-markierte „Non-Silencing“-siRNA der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die fluoreszenzmarkierten siRNA-Moleküle ermöglichten eine quantitative Analyse der transfizierten siRNAs, indem der Anteil der grünfluoreszierender Zellen im Fluoreszenzmikroskop (GFP-Filter) bzw. durchflusszytometrisch (FITC-Kanal) bestimmt wurde. Die Zelllinien SKOV-3 und ANT-1 wurden, wie im Versuchsprotokoll beschrieben (Kapitel 4.7.1 und 4.7.2), transfiziert. Zur Beurteilung des Transfektionsergebnisses wurden die transfizierten Zellen zunächst in den Zellkulturflaschen (25 cm²) unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) betrachtet. In Abb. 5-14 sind exemplarisch die Zelllinien SKOV-3 und ANT-1 24 h nach Transfektion mit 120 pmol siRNA abgebildet. Anhand der intrazellulären Grünfluoreszenz sind die erfolgreich transfizierten siRNA-Moleküle bei 20facher Vergrößerung zu erkennen.

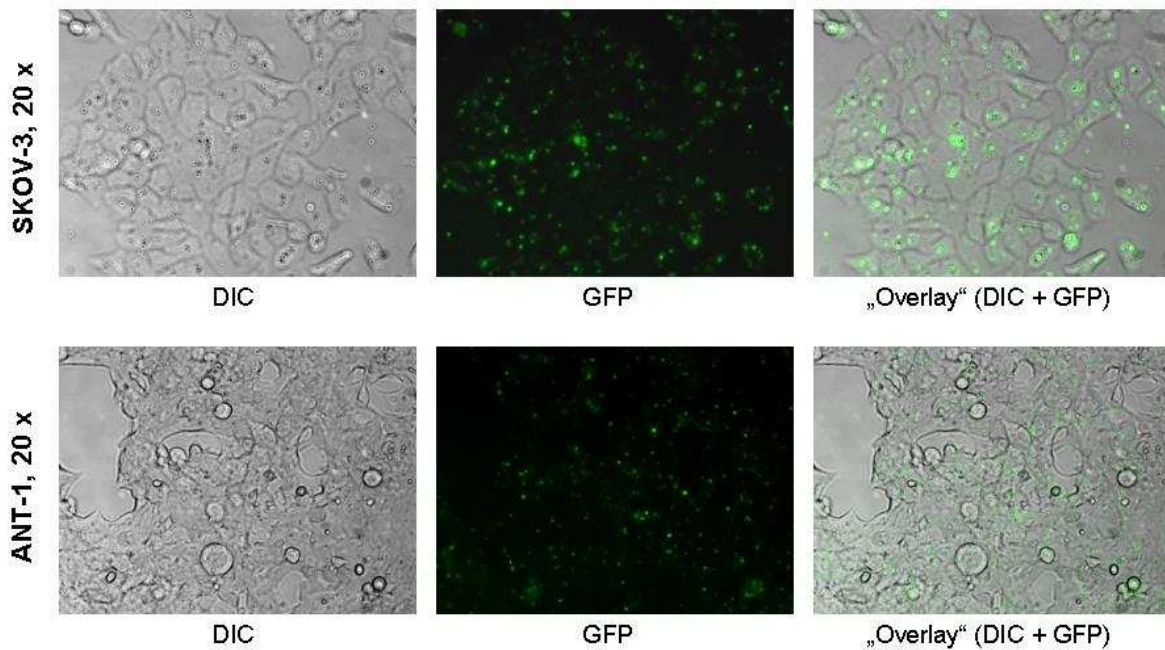


Abbildung 5-14: Transfizierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop

Dargestellt sind die Zelllinien SKOV-3 und ANT-1 24 h nach Transfektion mit 120 pmol Alexa Fluor 488 siRNA in 20facher Vergrößerung. Die Aufnahmen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm durchgeführt und die Grünfluoreszenz im GFP-Emissionsfilter gemessen. (DIC = engl.: Differential interference contrast microscopy, GFP = engl.: Green fluorescent protein)

Die eigentliche quantitative Auswertung der Transfektionseffizienz erfolgte mittels durchflusszytometrischen Analysen. Dazu wurden die transfizierten Zellen sowie die Negativkontrollen, wie in Kapitel 4.9.2 beschrieben, vorbereitet und unmittelbar vor der Messung mit Propidiumjodid gefärbt, um tote Zellen zu markieren. Die Grünfluoreszenz der siRNAs wurde im FITC-Kanal detektiert. Der so bestimmte Anteil der transfizierten Zellen (FITC-A positiv) an der Population der lebenden Zellen (PE-A negativ) ist für die Zelllinie SKOV-3 in Abb. 5-15 und für ANT-1 in Abb. 5-16 dargestellt. Die ermittelte Transfektionseffizienz der Zelllinie SKOV-3 lag bei siRNA-Konzentrationen von 60 und 120 pmol bei ca. 97 %. Die Zelllinie ANT-1 zeigte mit einer Transfektionsrate von ca. 68 % bei einer Konzentration von 60 pmol siRNA niedrigere Werte. Bei höheren siRNA-Konzentrationen stieg die Transfektionsrate nur noch gering an, allerdings zeigte sich dann eine Zunahme des Anteils der toten Zellen auf Werte von 16-22 %.

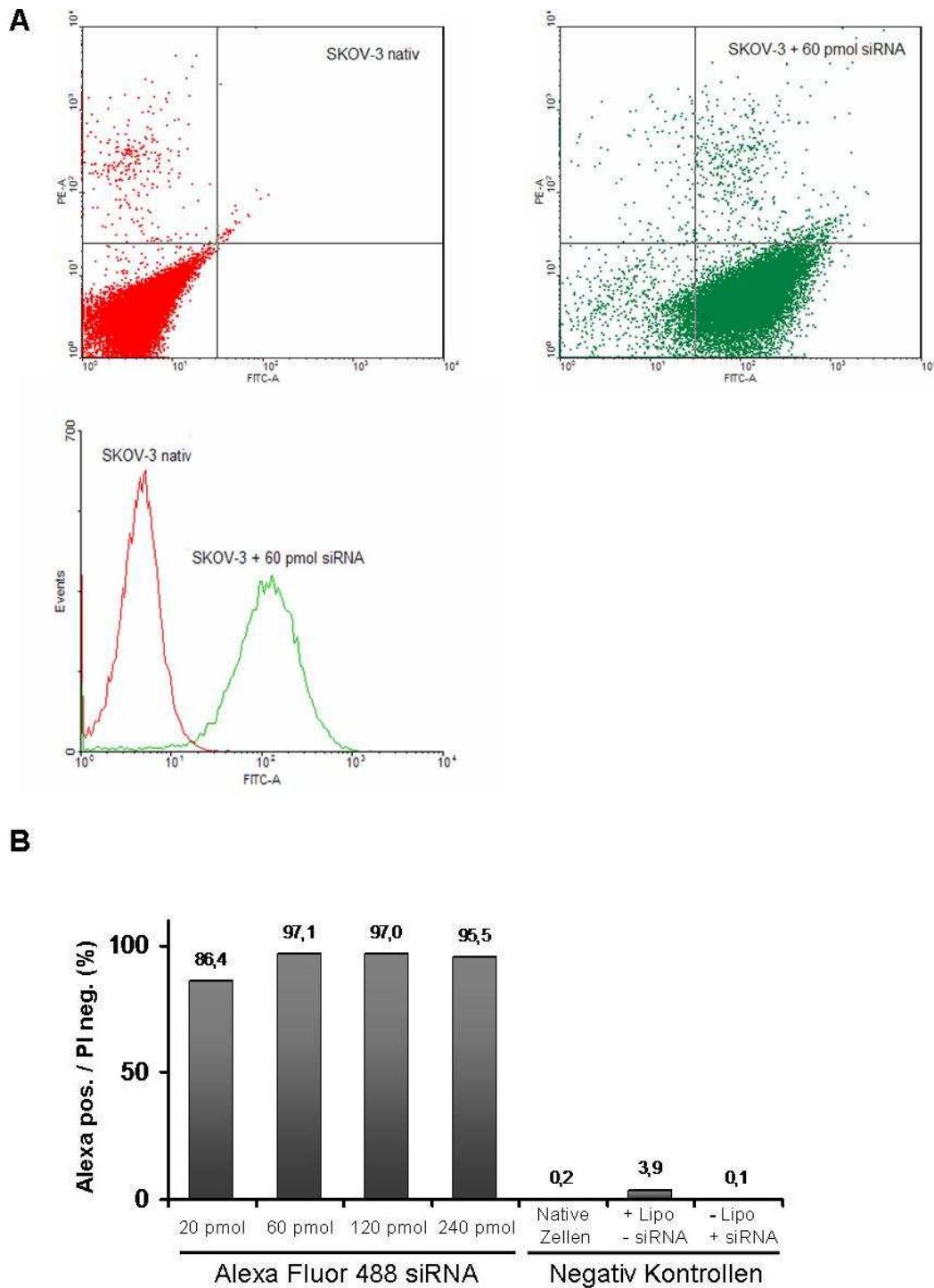


Abbildung 5-15: Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz von SKOV-3

A) Exemplarische Dot-Plot-Darstellung und Histogramm der FACS-Ergebnisse von nicht-transfizierten/nativen (rot) und transfizierten (60 pmol siRNA, grün) Zellen. Auf der x-Achse ist die Intensität der Grünfluoreszenz im FITC-Kanal dargestellt, während auf der y-Achse die Intensität von PI im PE-Kanal (Dot-Plot-Fenster) bzw. die Anzahl der Ereignisse (Histogramm) wiedergegeben wird. Man erkennt die deutliche Zunahme der Grünfluoreszenz bei den transfizierten Zellen. **B)** Quantitative Darstellung der transfizierten, lebenden Zellen (Alexa positiv, PI negativ) bei verschiedenen siRNA-Konzentrationen mit Negativ Kontrollen. Die höchste Transfektionseffizienz wurde bei 60 bzw. 120 pmol siRNA erreicht.

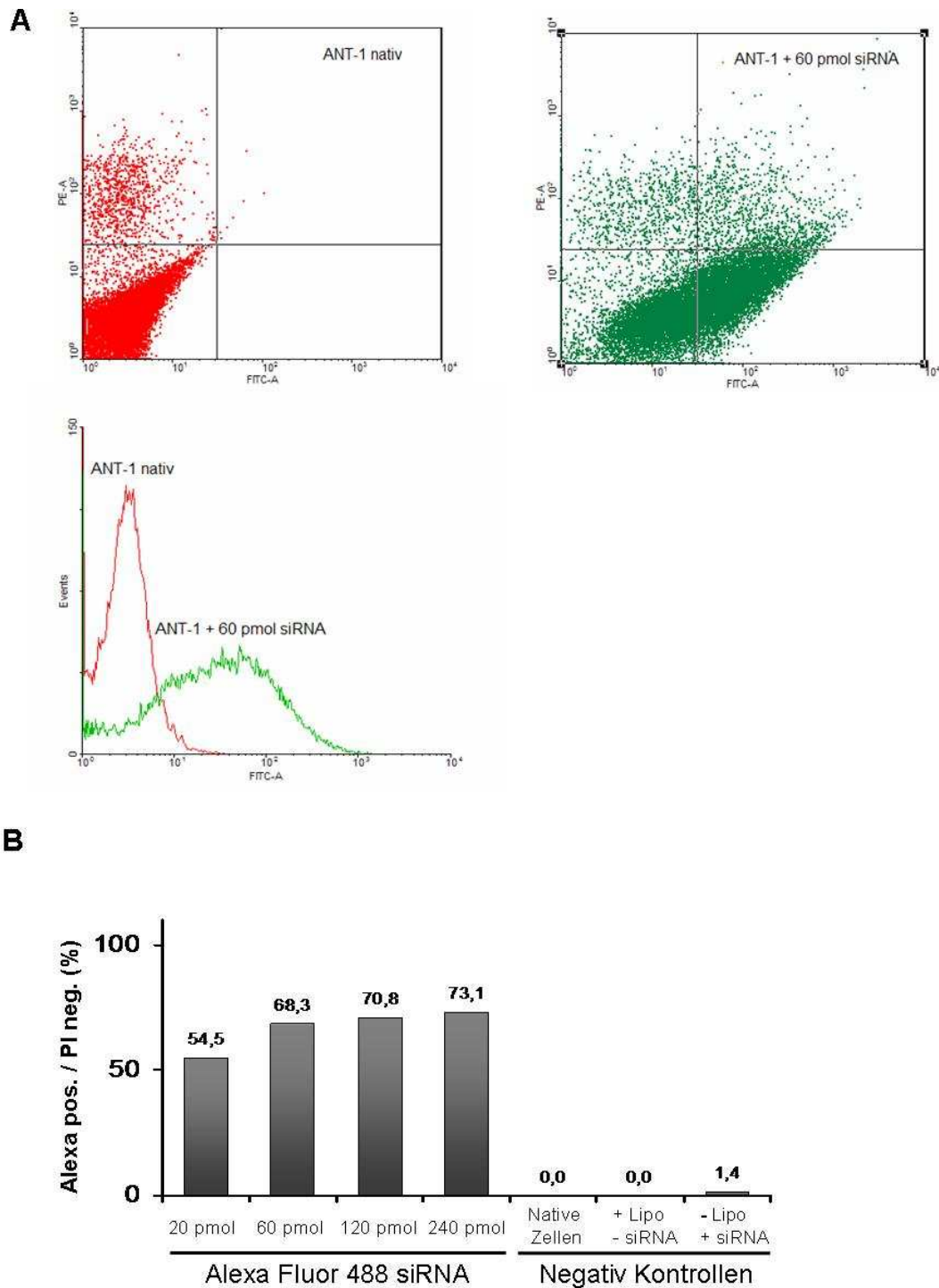


Abbildung 5-16: Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz von ANT-1

A) Exemplarische Dot-Plot-Darstellung und Histogramm der FACS-Ergebnisse von nicht-transfizierten/nativen (rot) und transfizierten (60 pmol siRNA, grün) Zellen. Auf der x-Achse ist die Intensität der Grünfluoreszenz im FITC-Kanal dargestellt, während auf der y-Achse die Intensität von PI im PE-Kanal (Dot-Plot-Fenster) bzw. die Anzahl der Ereignisse (Histogramm) wiedergegeben wird. Man erkennt die deutliche Zunahme der Grünfluoreszenz bei den transfizierten Zellen. **B)** Quantitative Darstellung der transfizierten, lebenden Zellen (Alexa positiv, PI negativ) bei verschiedenen siRNA-Konzentrationen mit Negativ Kontrollen. Es wurden maximale Transfektionseffizienzen von ca. 70 % erreicht.

5.4.2 Nachweis des spezifischen „Knock-downs“ der NER-Gen-Expression im Western Blot

Der Nachweis der Herabregulierung der NER-Gen-Expression erfolgte durch Western Blot-Analysen. Die Zelllinien SKOV-3 und ANT-1 wurden mit 60 pmol XPA- bzw. XPF-spezifischer siRNA transfiziert. Als Negativkontrollen wurden native Zellen sowie nur mit siRNA bzw. nur mit LipofectaminTM behandelte Zellen verwendet. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteine im Western Blot untersucht. Die Analyse von SKOV-3 zeigte, dass die XPA-Expression nach Transfektion im Vergleich zu den Negativkontrollen stark reduziert wurde. Bereits 24 h nach Transfektion der Zellen mit der XPA-spezifischen siRNA war eine deutliche Reduktion der Protein-Expression im Vergleich zu den Kontrollen erkennbar (Blot nicht gezeigt). 72 h nach der siRNA-Behandlung erreichte der Effekt mit einer Herabregulierung von über 75 % Maximalwerte (Abb. 5-17). Im Gegensatz dazu konnte durch Transfektion mit XPF-siRNA nur eine mäßige Reduktion der XPF-Protein-Expression um ca. 25 % erreicht werden.

Für die Transfektion der HNSCC-Zelllinie ANT-1 wurden die gleichen siRNA-Oligonukleotide verwendet. Im anschließend durchgeführten Western Blot konnte jedoch keine Herabregulierung von XPA oder XPF im Vergleich zu der Expressionsstärke der Negativkontrollen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auf nachfolgende Versuche mit der Zelllinie ANT-1, in denen ein möglicher chemosensibilisierender Effekt der Transfektion untersucht worden wäre, verzichtet.

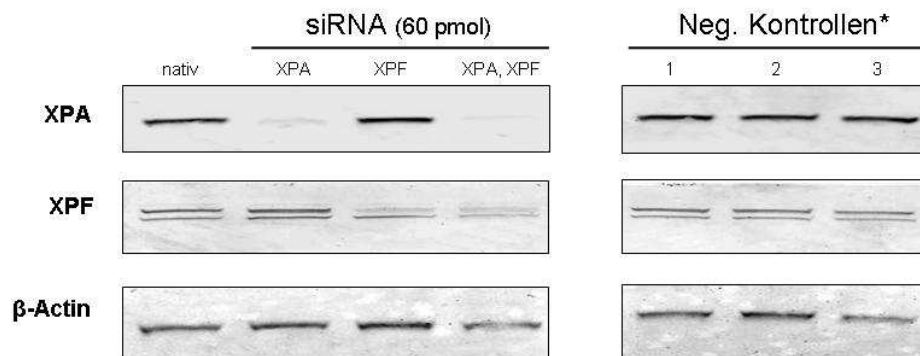
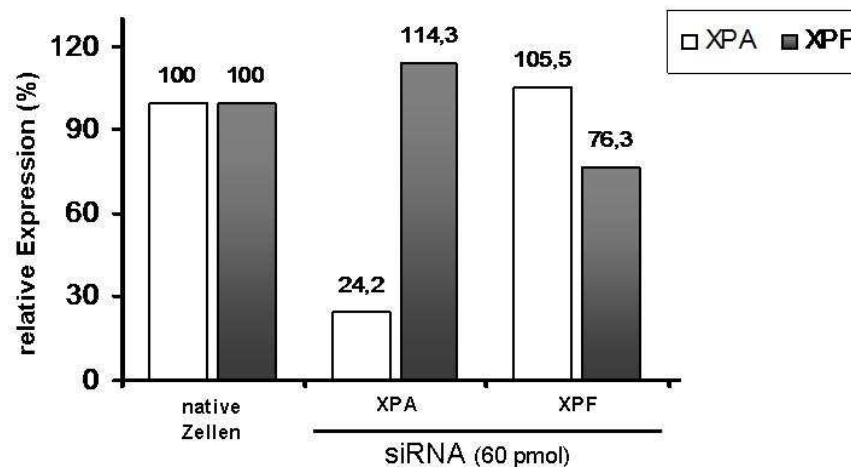
A**B**

Abbildung 5-17: siRNA-vermittelte Inhibition der Expression von XPA und XPF in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3

A) Die Expression auf Proteinebene wurde mittels Western Blot 72 h nach Transfektion mit XPA- bzw. XPF-siRNA bestimmt. Als Beladungskontrolle diente β -Actin. ***Negativ Kontrollen:** XPA- und XPF-siRNA ohne LipofectaminTM (1), LipofectaminTM ohne siRNA (2), Alexa Fluor 488-markierte „Nonsense“-siRNA mit LipofectaminTM (3). **B)** Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung der NER-Proteinspiegel. Die transfizierten Zellen wiesen einen um ca. 75 % reduzierten XPA-Proteingehalt auf. Der XPF-Gehalt konnte um ca. 25 % gesenkt werden.

5.4.3 Chemosensibilisierung von cisplatinresistenten SKOV-3 Zellen durch RNAi

Im letzten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich eine Reduktion der XPA- und XPF-Proteinspiegel durch siRNA-Transfektion auf die Empfindlichkeit der SKOV-3 Zellen gegenüber Cisplatin auswirkt. Die Chemosensibilisierungsversuche wurden im 96-Loch Maßstab durchgeführt, wobei 5.000 bzw. 10.000 Zellen pro Loch in 100 µl Medium ausgesät wurden. Die bei der Transfektion eingesetzte Menge an siRNA lag bei 5 pmol pro Loch (Kapitel 4.7.4). 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen bzw. mit cisplatinfreiem Medium inkubiert. Als Kontrollen wurden nicht-transfizierte Zellen verwendet sowie Zellen, die mit „Non-Silencing“ siRNA (Alexa Fluor 488 siRNA) transfiziert wurden, um eine Erhöhung der Zellsterberate durch den Vorgang der Transfektion selbst zu erfassen. Die Quantifizierung der lebenden Zellen erfolgte mittels MTT-Zytotoxizitäts-Assay.

Die Ergebnisse der Chemosensibilisierungsversuche von SKOV-3 Zellen sind in Abb. 5-18 zusammengefasst. Die Inhibition der XPA-Expression mittels siRNA um ca. 75 % reichte aus, um einen erkennbaren Abfall der Viabilität (y-Achse) zu bewirken. Die mit XPA-siRNA behandelten Zellen (grün) reagierten sensibler auf die Cisplatinbehandlung als die jeweiligen Kontrollen. Allerdings war das Ausmaß der Chemosensibilisierung mit einer Abnahme der lebenden Zellen um ca. 10 % (5.000 Zellen pro Loch, Abb. 5-18 A) im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle relativ gering. Bei einer höheren Konfluenz der Zellen (10.000 Zellen pro Loch, Abb. 5-18 B) konnte nur bei einer Cisplatinkonzentration von 0,5 µg/ml eine mit ca. 20 % deutliche Abnahme der Überlebensrate erreicht werden. Die Transfektion der Zellen mit „Non-Silencing“-siRNA (blau) führte im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen (rot) zu keiner Abnahme der Zellvitalität. Die simultane Transfektion der Zellen mit XPA- und XPF-siRNA erbrachte keine weitere Abnahme der vitalen Zellen nach Cisplatininkubation (Daten nicht gezeigt).

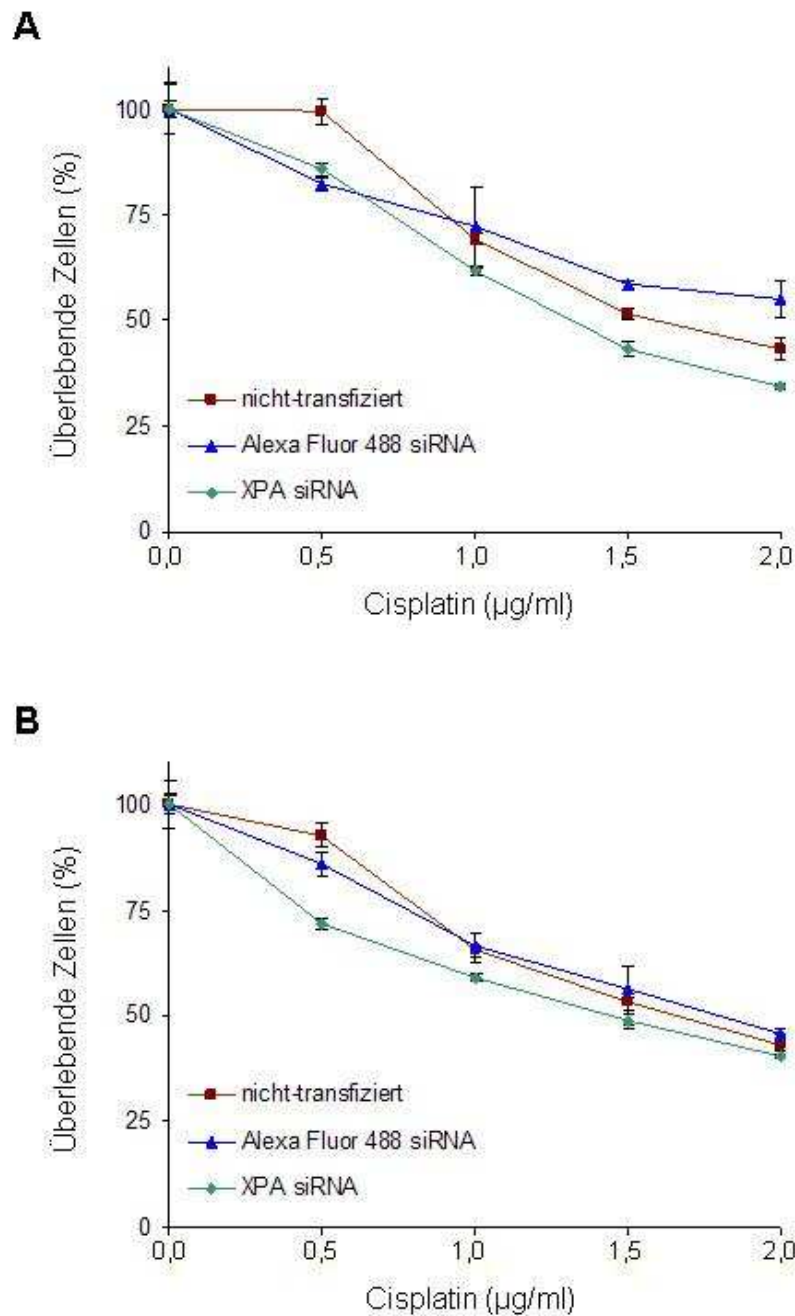


Abbildung 5-18: Die Inhibition der XPA-Expression durch RNAi führt zu einer leichten Sensibilisierung von SKOV-3 Zellen gegenüber Cisplatin.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines MTT-Zytotoxizitäts-Assays. 5.000 **(A)** bzw. 10.000 Zellen **(B)** pro Loch wurden in einer 96-Loch Platte ausgesät und nach 24 h mit der angegebenen XPA-siRNA transfiziert (grün). Als Kontrollen dienten Alexa Fluor 488-transfizierte (blau) und nicht-transfizierte Zellen (rot). Die Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Cisplatinkonzentrationen (µg/ml) inkubiert. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen 48 h nach der Behandlung (MW ± SD, n = 3-5).

6 Diskussion

6.1 Erhöhte in vitro Cisplatinresistenz von HNSCC-Zelllinien

Das Ausmaß der Cisplatinresistenz von Testis- und HNSCC-Zelllinien wurde in der vorliegenden Arbeit anhand ihrer IC_{50} - bzw. IC_{90} -Werte bestimmt. Die Verwendung dieser IC-Werte ist ein allgemein anerkanntes Verfahren, um die Empfindlichkeit von Zelllinien gegenüber Zytostatika zu bestimmen und zu vergleichen. Zur Bestimmung der IC-Werte wurde der MTT-Zytotoxizitätstest verwendet, ein Proliferationsassay, der auf der Messung und Visualisierung der mitochondrialen Aktivität von Zellen basiert. MTT-Assays werden häufig verwendet, da die Methode einfach in Multiwell-Platten durchführbar ist und gut reproduzierbare Ergebnisse mit geringer Standardabweichung liefert. Die Zahl der lebenden Zellen wird dabei anhand der mitochondrialen Aktivität der Zellen abgeschätzt, indem der entstandene Farbstoff im Microplate Reader quantifiziert wird. Schwankungen in der mitochondrialen Aktivität der einzelnen Zelle können dabei nicht berücksichtigt werden und müssen als potentielle Fehlerquelle der Methode angesehen werden.

Das ausgesprochen gute klinische Ansprechen der meisten Testistumoren auf Chemotherapie und Bestrahlung läßt sich auch in vitro bei Chemoresistenzversuchen mit Testistumorzelllinien beobachten. In vielen Studien konnte bereits eine Hypersensitivität von Hodentumorzelllinien gegenüber DNA-schädigenden Substanzen nachgewiesen werden (Masters et al., 1993; Pera et al., 1987; Walker et al., 1987). In der vorliegenden Arbeit wurden als Kontrollen sieben Zelllinien von nicht-seminomatösen testikulären Keimzelltumoren untersucht. Im Einzelnen handelt es sich dabei um die Zelllinien 2102 EP, NTERA, SuSa und GCT27, welche alle aus primären testikulären Teratokarzinomen etabliert wurden. Drei der untersuchten TGCT-Zelllinien stammen von extragonadalen Keimzelltumormanifestationen. Bei der Zelllinie Teral handelt es sich um eine testikuläre Lungenmetastasenzelllinie. NCCIT wurde ausgehend von einem mediastinalen nicht-seminomatösen Kombinationstumor etabliert, und die Zelllinie 833K stammt von einem nicht-seminomatösen Kombinationstumor, der ca. 2 Monate nach einer kombinierten systemischen Chemotherapie mit Methotrexat, Cyclophosphamid

und Actinomycin D aus einer periaortalen Lymphknoten-Metastase gewonnen wurde (Bronson et al., 1980). Um die in der vorliegenden Arbeit bestimmten IC-Werte der Zelllinien miteinander vergleichen zu können, wurden sie in Relation zu den Werten der Zelllinie SKOV-3 gesetzt. Mit Hilfe des so berechneten Resistenzfaktors konnte die jeweilige Zelllinie als cisplatinsensibel bzw. -resistent eingeordnet werden. Die Referenzzelllinie SKOV-3 wurde aus einer Metastase eines ovariellen Adenokarzinoms etabliert und zeigt sich resistent gegenüber einer Vielzahl von zytotoxischen Substanzen, darunter Cisplatin und Adriamycin.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten, dass alle 7 untersuchten Testistumorzelllinien äußerst sensibel auf eine Cisplatinbehandlung reagierten und Resistenzfaktoren < 1 besaßen. Dabei erwiesen sich auch die testikulären Metastasenzelllinien NCCIT und insbesondere 833K, die im Anschluss an eine systemische Polychemotherapie etabliert wurde, als ausgesprochen cisplatinsensibel. Nur die Zelllinie Teral zeigte im Vergleich zu den anderen TGCT-Zelllinien mit einem RF von 0,66 keine stark ausgeprägte Sensitivität gegenüber Cisplatin. Insgesamt stehen die Beobachtungen im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Hypersensitivität von TGCT-Zelllinien gegenüber DNA-schädigenden Substanzen.

Dagegen zeigten die Daten der Plattenepithelkarzinome bei 11 der 13 untersuchten Zelllinien eine ausgeprägte Cisplatinresistenz, deren Ausmaß in etwa vergleichbar mit der Referenzzelllinie SKOV-3 oder sogar noch ausgeprägter war. Interessanterweise zeigte das Zelllinienpaar UT-SCC 16 A und B die mit Abstand größte Cisplatinresistenz aller untersuchten Zelllinien. Beide Zelllinien wurden aus Tumorgewebe etabliert, welches vor der operativen Entnahme bereits bestrahlt wurde. Eine durch die Bestrahlung induzierte Selektion von resistenten Tumorzellen bzw. die Induktion von Mutationen, die evtl. zur Ausbildung von neuen Resistenzmechanismen geführt haben, könnten für die beobachtete ausgeprägte Chemoresistenz der Zelllinien verantwortlich sein. Eine eventuelle Vorbehandlung durch Radiatio oder Chemotherapie führt jedoch nicht immer zu einer erhöhten Cisplatinresistenz der Zelllinie. So ließ sich die Beobachtung anhand des Zelllinienpaares UT-SCC 60 A und B, bei dem nur die Metastasenzelllinie aus vorbestrahltem Gewebe gewonnen wurde, nicht bestätigen, da sich hier keine Zunahme der Resistenz bei der Metastasenzelllinie beobachten ließ. Die beiden Zelllinien UT-SCC 60 A und B zeigten darüber hinaus

eine überraschend hohe Cisplatinempfindlichkeit, die sich von den übrigen untersuchten HNSCC-Zelllinien deutlich unterscheidet und mit der Cisplatinempfindlichkeit von TGCT-Zelllinien vergleichbar war. Interessanterweise wurden diese beiden HNSCC-Zelllinien als Einzige aus Tumoren etabliert, die mit einem Differenzierungsgrad G1 eine gute Differenzierung aufwiesen.

Die Untersuchung von Zelllinien-Paaren, die aus HNSCC-Primärtumor (A) und zugehöriger Lymphknoten-Metastase (B) eines Patienten etabliert wurden, war deshalb von besonderem Interesse, da das klinische Vorliegen von Metastasen von großer prognostischer Bedeutung für den Verlauf der Erkrankung ist. So zeigt sich ein deutlicher Anstieg des Rezidivrisikos für HNSCC in Abhängigkeit von der Anzahl und der Lokalisation befallener Halslymphknoten (Shah et al., 1976).

Die Absiedlung von maligne transformierten Zellen aus einem Primärtumor ist ein mehrschrittiger Prozess, bei dem die Tumorzellen verschiedene Stadien durchlaufen. Die Zellen lösen sich durch Verlust der interzellulären Adhäsionsmoleküle aus dem Tumorverband und migrieren unter Proteolyse der extrazellulären Matrix in Richtung der Blut- oder Lymphgefäße. Intravasal müssen sich die Zellen körpereigenen Immunabwehrmechanismen zur Wehr setzen, um schließlich an anderer Stelle die Gefäßsysteme zu verlassen und Metastasen auszubilden. Innerhalb eines Primärtumors findet ein Selektionsprozess statt, wodurch bestimmte Zellen aufgrund molekularer genetischer Veränderungen die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen. Solche Zellen könnten durch Mutationen auch ein verändertes Resistenzspektrum gegenüber Chemotherapeutika aufweisen. Im Rahmen dieser Studie sollte daher anhand von Zelllinienmodellen überprüft werden, ob die klinische Beobachtung einer im Vergleich zum Primärtumor häufig stärker ausgeprägten Cisplatinresistenz bei HNSCC-Metastasen auch *in vitro* zu beobachten ist und ursächlich auf Veränderungen innerhalb des NER-Systems beruhen könnte. Bei Betrachtung der Ergebnisse der untersuchten Zelllinienpaare aus Primärtumor und Lymphknoten-Metastase eines Patienten, ließ sich bei zwei der drei Paare (UT-SCC 42 A, B und UT-SCC 60 A, B) bezüglich der IC_{90} eine leicht erhöhte Cisplatinresistenz der Metastasenzelllinien im Vergleich zum Ausgangstumor nachweisen. Das Zelllinienpaar UT-SCC 16 A und B zeigte dagegen mit einem RF von 5,78 (A) bzw. 6,54 (B) eine deutlich gesteigerte Cisplatinresistenz der Metastasenzelllinie.

Zusammenfassend bestätigte sich bei Betrachtung der Zytotoxizitätsergebnisse der vorliegenden Studie die in der Literatur beschriebene sowie klinisch zu beobachtende Cisplatin-Hypersensitivität von Testistumoren, wohingegen sich HNSCC als relativ resistent erwiesen. Sowohl bezüglich der IC_{50} - als auch der IC_{90} -Werte ergab sich eine signifikant größere Cisplatinsensibilität der Testistumorzelllinien verglichen zu den HNSCC-Zelllinien (Abb. 5-2). Diese in vitro Ergebnisse reflektieren also die zu beobachtenden Unterschiede im klinischen Ansprechen von Keimzelltumoren des Hodens und HNSCC auf eine systemische Chemotherapie mit DNA-schädigenden Substanzen wie Cisplatin. Die Resistenzfaktoren der HNSCC-Zelllinien zeigten darüber hinaus eine insgesamt große Varianz. Diese deutlichen Unterschiede in den Resistenzniveaus der untersuchten HNSCC-Zelllinien lassen vermuten, dass bei den verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Resistenzmechanismen bzw. deren Kombination eine Rolle spielen und sich die Zelllinien hinsichtlich ihres molekularen Mutationsspektrums unterscheiden. Die beschriebenen Schwankungen der IC-Werte zwischen den Zelllinien können dabei auf die Tumorzellen selbst zurückzuführen sein, da diese sich verändern, wenn sie in Kultur wachsen. Schon nach wenigen Passagen können Zelllinien ihre Eigenschaften ändern und somit eine veränderte Cisplatinempfindlichkeit aufweisen. Außerdem können bei jedem neuen Kontakt mit Cisplatin Mutationen induziert und Resistenzmechanismen aktiviert werden.

6.2 Expression von NER-Genen in HNSCC- und Testistumorzelllinien und -Gewebeproben

6.2.1 Erhöhte XPF-Protein-Expression in HNSCC-Zelllinien

Die 20 humanen Tumorzelllinien wurden zunächst mittels One-Step „real-time“ RT-PCR hinsichtlich der Expression der NER-Gene XPF und ERCC1 untersucht. Die Ergebnisse der vergleichenden Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene zeigten weder für ERCC1 noch für XPF statistisch signifikante Unterschiede zwischen Hodentumor- und HNSCC-Zelllinien (Abb. 5-3).

Die Ergebnisse der Protein-Expressionsanalysen ergaben dagegen eine hochsignifikante Überexpression von XPF in der Gruppe der HNSCC-Zelllinien (Abb. 5-6). Auch XPA und ERCC1 waren im Vergleich zu den TGCT-Zelllinien bei HNSCC erhöht, jedoch war hier die Überexpression statistisch nicht signifikant. Obwohl alle untersuchten Hodentumorzelllinien in den Western Blot-Analysen eine positive Expression der NER-Proteine XPA, XPF und ERCC1 zeigten (Abb. 5-4), erwiesen sich die Werte insgesamt als gegenüber den HNSCC-Zelllinien vermindert. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Untersuchungen von *Welsh et al.* (Welsh et al., 2004), die bei Gruppenanalysen von je 6 Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft eine signifikant niedrigere Expression von XPA, XPF und ERCC1 bei Testistumorzelllinien nachweisen konnten. Die mittleren Protein-Expressionsspiegel lagen dabei signifikant unter den Werten der Vergleichsgruppen, bestehend aus Prostata-, Blasen-, Brust-, Lungen-, Cervix- und Ovarialkarzinomzelllinien. In der Studie wird allerdings auch beschrieben, dass einige Zelllinien innerhalb der Kontrollgruppen niedrige Spiegel von NER-Proteinen aufwiesen. So zeigten beispielsweise eine Blasen- sowie eine Lungenkarzinomzelllinie niedrige XPA-Expressionen. Auch bei unseren Ergebnissen fielen bei Betrachtung der einzelnen HNSCC-Zelllinien Unterschiede in der NER-Protein-Expression auf. So zeigten die Zelllinie UT-SCC 94 sowie die meisten Primärtumor-Metastasen-Paare eine verminderte Expression vor allem von XPA, aber auch von XPF und ERCC1 und besaßen damit deutlich niedriger XPA-Werte als alle untersuchten TGCT-Zelllinien. Die Ursache dieser deutlichen Expressionsschwankungen bei HNSCC-Zelllinien ist nicht geklärt. Da besonders

das Zelllinienpaar UT-SCC 16 A und B eine enorme Diskrepanz zwischen der ausgeprägten Chemoresistenz und der niedrigen NER-Expression auf Proteinebene zeigt, ist davon auszugehen, dass die Chemoresistenz dieser Zelllinien durch andere Resistenzmechanismen vermittelt wird und die NER eine untergeordnete Rolle spielt. Die insgesamt in HNSCC-Zelllinien beobachteten großen NER-Expressionsunterschiede lassen genau wie die Ergebnisse vorausgegangener Studien das Vorhandensein von multifaktoriellen Resistenzmechanismen vermuten.

Bei dem Vergleich der drei Primärtumor-Metastasen-Paare zeigte sich nur bei den Zelllinien UT-SCC 42 A und B eine signifikante Überexpression von XPA, XPF und ERCC1 bei der Metastasenzelllinie, während die NER-Expressionen der Zelllinienpaare UT-SCC 16 A und B bzw. UT-SCC 60 A und B zwischen Primärtumor- und Metastasenzelllinie keine wesentlichen Unterschiede aufwiesen. Eine mögliche NER-Überexpression chemoresistenter HNSCC-Metastasen ließ sich anhand der Zelllinienmodelle nicht bestätigen.

6.2.2 NER-Expression in Testistumorzelllinien

Zwar bestätigten die vorliegenden Ergebnisse vergleichsweise niedrigere NER-Spiegel bei TGCT-Zelllinien, jedoch ließen sich bei den Western Blot-Analysen deutlich positive Expressionen der NER-Proteine XPA, XPF und ERCC1 in allen untersuchten Hodentumorzelllinien nachweisen (Abb. 5-4), wobei XPA am stärksten exprimiert wurden. Es muss davon ausgegangen werden, dass auch niedrige XPA-Spiegel der Testistumorzelllinien noch zu einer suffizienten DNA-Schadensreparatur führen. Aktuelle Forschungsergebnisse belegen, dass erst eine Reduktion von XPA auf unter 10 % der Ausgangsmenge limitierend auf die NER wirkt und so zu einer zellulären Sensibilisierung gegenüber DNA-Schädigungen führt (Koberle et al., 2006; Muotri et al., 2002). In einer Studie von *Honecker et al.* wurde die Bedeutung der XPA-Protein-Expression für die Chemosensibilität von testikulären Keimzelltumoren hinterfragt. Es wurden Tumorproben und Zelllinien mit unterschiedlichem Ansprechen auf Chemotherapie vor und nach einer Cisplatinbehandlung untersucht. Die Resultate ergaben zwar einen positiven XPA-

Nachweis in allen Tumorproben, die aus Rezidiven nach Chemotherapie gewonnen wurden. Es zeigten sich jedoch insgesamt keine Unterschiede hinsichtlich der XPA-Expression von chemosensitiven und -resistenten Testistumoren. Die *in vitro* Ergebnisse von drei TGCT-Zelllinien zeigten außerdem keine Korrelation zwischen XPA-Proteinspiegeln und Cisplatinsensibilität der Zelllinien. Darüber hinaus ließ sich nach wiederholter subletaler Cisplatinbehandlung der Zelllinien keine Induktion von XPA hervorrufen (Honecker et al., 2003). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen XPA-Proteinspiegel bei TGCT-Zelllinien implizieren übereinstimmend mit den Beobachtungen von *Honecker et al.*, dass die Höhe der XPA-Expression keine entscheidende ursächliche Rolle für die Chemosensibilität von Testistumoren zu spielen scheint.

6.2.3 Die XPF-Protein-Expression korreliert mit der Cisplatinresistenz bzw. -sensibilität der Zelllinien

Als wichtiges Ziel dieser Studie sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen dem Expressionsniveau von DNA-Reparaturgenen und dem Ausmaß der Cisplatinresistenz bzw. -sensibilität der verschiedenen Zelllinien vorliegt und sich insbesondere die erhöhte Cisplatinresistenz von HNSCC-Zelllinien in einer vermehrten Expression von NER-Reparaturgenen auf mRNA- oder Proteinebene widerspiegelt. Eine solche Korrelation zwischen der NER-Expression und dem Ansprechen bzw. Nichtansprechen auf Chemotherapie, könnte zur Etablierung eines diagnostischen Markers für zelluläre Sensitivität gegenüber Cisplatin verwendet werden. Bei der Beurteilung der *in vitro*-Ergebnisse ist insgesamt zu beachten, dass sich die untersuchten Zelllinien in verschiedenen Passagen befinden und nicht nachvollzogen werden kann, in welchem Ausmaß die einzelnen Zelllinien bereits mit Cisplatin in Kontakt gekommen sind. Daher ist es nicht möglich identische Untersuchungsbedingungen zur Bestimmung der Cisplatinresistenz zu schaffen. Wie bereits beschrieben gibt es eine Vielzahl von anderen Faktoren neben der Nukleotid-Exzisions-Reparatur, wie z.B. der p53-Status oder der Gehalt an Glutathion-S-Transferase, die die Cisplatinsensibilität von Zelllinien beeinflussen können. Diese vielen Faktoren sind nicht konstant, sondern variieren

zwischen den einzelnen Zelllinien und müssen daher bei der Interpretation der Korrelationsergebnisse berücksichtigt werden.

Vergleicht man die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien mit ihren zuvor bestimmten IC_{90} -Werten, so zeigten einige cisplatinresistente Zelllinien zwar hohe ERCC1- und XPF-mRNA-Spiegel, andere wiesen jedoch niedrige Expressionen auf. Insgesamt ließen sich bei den cisplatinresistenten HNSCC-Zelllinien keine signifikant erhöhten NER-mRNA-Spiegel nachweisen (Abb. 5-3). Bei den durchgeführten Korrelationsanalysen zeigte sich daher sowohl bei TGCT- als auch bei HNSCC-Zelllinien kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ansprechen der Zellen auf eine Cisplatinbehandlung und dem Ausmaß der ERCC1- oder XPF-mRNA-Expression.

Bei der Auswertung unserer Western Blot-Ergebnisse ließ sich in Bezug auf die ERCC1- und XPA-Protein-Expression ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zu den IC_{90} -Werten und damit zu der Cisplatinempfindlichkeit von TGCT- oder HNSCC-Zelllinien nachweisen. Allerdings zeigte sich eine positive Korrelation zwischen einer hohen XPF-Protein-Expression und einer gesteigerten Cisplatinresistenz. Da sich außerdem, wie oben beschrieben, eine signifikante Überexpression von XPF in der Gruppe der untersuchten HNSCC-Zelllinien nachweisen ließ, weisen unsere in vitro Ergebnisse auf eine mögliche Beteiligung der XPF-Expression an der Chemoresistenz von HNSCC-Zelllinien hin.

6.2.4 Fehlende Korrelation zwischen der mRNA- und Protein-Expression von NER-Genen

Von einem gemessenen mRNA-Spiegel eines Gens kann nicht automatisch auf die Expression des funktionellen Proteins rückgeschlossen werden. Vielmehr kann sich die Höhe der mRNA-Expression durch posttranslationale Modifikationen des Proteins oder andere noch unbekannte Mechanismen deutlich von der Menge des tatsächlich vorhandenen funktionsfähigen Proteins unterscheiden. Erniedrigte XPA-, XPF- und ERCC1-Spiegel bei Testistumorzelllinien konnten in vorausgegangenen Studien bisher nur auf Proteinebene nachgewiesen werden. *McGurk*

et al. versuchten in einer detaillierten Studie ursächliche Mechanismen dieser verminderten Protein-Expression zu identifizieren und analysierten dazu die mRNA-Expression der Gene (McGurk et al., 2006). Die Messung der XPA-, XPF- und ERCC1-mRNA mittels quantitativer „real-time“ PCR ergab dabei keine reduzierte mRNA-Expression bei den untersuchten Testistumorzelllinien.

Die quantitativen RT-PCR-Analysen der vorliegenden Arbeit zeigten ähnliche Ergebnisse. Auch hier zeigten sich die mRNA-Spiegel der untersuchten NER-Gene bei den Testistumorzelllinien nicht gegenüber den HNSCC-Zelllinien reduziert. Die bei Testistumorzelllinien herabgesetzte XPF-Expression auf Proteinebene ließ sich bei den mRNA-Messungen nicht nachweisen. In den durchgeführten Korrelationsanalysen der Zelllinien zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der mRNA- und Protein-Expression der NER-Gene ERCC1 und XPF (Kapitel 5.1.4). Auch bei den Tumorgewebeproben ergab sich kein Zusammenhang zwischen den gemessenen mRNA-Spiegeln von ERCC1 und XPF und den Ergebnissen der Western Blot-Analysen (Kapitel 5.3.3). Diese Beobachtung ist von besonderer Wichtigkeit, da sie belegt, dass die Protein-Spiegel von ERCC1 und XPF nicht auf Transkriptionsebene, d.h. über die mRNA-Menge, reguliert werden, sondern sie stützt vielmehr die Vermutung, dass verminderte Spiegel dieser DNA-Reparatur-Proteine auf eine reduzierte Protein-stabilität zurückzuführen sein könnten. Während der NER bilden die Proteine ERCC1 und XPF eine funktionelle Einheit als Endonuklease. Der sog. ERCC1-XPF-Komplex sorgt, gemeinsam mit XPG, für die Inzision in 3' und in 5' der DNA-Läsion, wodurch nachfolgend die Exzision des veränderten Oligonukleotids ermöglicht wird.

In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise auf eine fehlende Korrelation zwischen der gemessenen mRNA- und Proteinmenge von ERCC1. So untersuchten *Britten et al.* in einer Studie die ERCC1-mRNA- und -Proteinspiegel von insgesamt 15 Cervixkarzinomzelllinien, die unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Cisplatin aufwiesen (Britten et al., 2000). Bei den Untersuchungen ließ sich kein Zusammenhang zwischen mRNA- und Protein-Expression nachweisen. Da sich die Transkription von ERCC1-mRNA auch dann als normal erweist, wenn reduzierte ERCC1-Proteinspiegel vorliegen und daher eine hohe ERCC1-mRNA-Expression nicht notwendigerweise auch in erhöhten ERCC1-Proteinspiegeln resultiert, wird ERCC1 als unstabiles Protein angesehen, welches für seine

Stabilität und Funktion die Anwesenheit des Enzympartners XPF benötigt (Biggerstaff et al., 1993; van Duin et al., 1989; van Vuuren et al., 1993; Yagi et al., 1997). Yagi et al. transfizierten mit Hilfe eines Plasmids XPF cDNA in Zellen von Patienten mit der hereditären Erkrankung Xeroderma Pigmentosum, Komplementationsgruppe XP-F, welche eine reduzierte Expression sowohl von XPF- als auch von ERCC1-Protein aufwiesen. Hautfibroblasten dieser Patienten zeigen eine vermehrte Sensitivität gegenüber UV-Strahlung und reparieren Pyrimidin-Dimere mit einer deutlich verlangsamten Rate (Hayakawa et al., 1981). Die Zellen des transfizierten Klonen zeigten nicht nur eine Zunahme der XPF-Proteinmenge, sondern auch eine hohe Expression von ERCC1, obwohl die Ausgangszellen nur geringe ERCC1-Proteinspiegel aufwiesen. Bei normaler ERCC1-mRNA-Expression der Zellen sprechen auch diese Ergebnisse für eine generelle Instabilität des ERCC1-Proteins. Erst durch die Bindung an XPF findet eine posttranslationale Stabilisierung von ERCC1 statt (Yagi et al., 1998).

Die Resultate implizieren, dass das Expressionsverhältnis von ERCC1 und XPF, die in ihrer Funktion als DNA-Nuklease eine Einheit bilden, direkt die Funktion des Enzymkomplexes beeinflusst. Die niedrige Expression einer der beiden Untereinheiten genügt, um die Funktion des Enzymkomplexes negativ zu beeinflussen. Es liegt nahe, dass sich die in der vorliegenden Arbeit gemessene hochsignifikant erniedrigte XPF-Protein-Expression in Testistumorzelllinien auch negativ auf die Stabilität des ERCC1-Proteins auswirkt. Umgekehrt scheint die isolierte Überexpression von XPF über eine Stabilisierung von ERCC1 zu einer suffizienteren NER zu führen (Yagi et al., 1998).

6.2.5 NER-Expressionsunterschiede zwischen TGCT- und HNSCC-Primärtumorgewebeproben

Untersuchungen an Zelllinien, die aus Tumorgewebe etabliert wurden, stellen ein probates Modellsystem zur Erforschung molekularer Zellmechanismen dar. Die mit Hilfe von Zelllinien gewonnenen Erkenntnisse sind jedoch nur eingeschränkt auf die Gegebenheiten in vivo übertragbar. In Zellen, die aus ihrem Gewebeverband gelöst und anschließend über viele Passagen in Kultur gehalten werden, finden molekulare Veränderungen statt, die zu einer Diskrepanz zwischen den Beobachtungen in vitro und in vivo führen können. Besonders bei der Etablierung einer Zelllinie, aber auch bei der späteren Kultivierung sind die Zellen einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt, der dazu führen kann, dass sich Zellen genetisch zunehmend von ihrem Ausgangsgewebe unterscheiden und neue Resistenzmechanismen aktivieren können. Mechanismen, die in vitro eine Rolle spielen, müssen daher auch in klinischen Proben untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die mRNA- und Protein-Expression von NER-Genen in HNSCC-Tumorgewebeproben im Vergleich zu Testistumorgewebe untersucht.

Die statistischen Gruppenanalysen der NER-mRNA-Expression zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der XPF- bzw. ERCC1-Expression von TGCT- und primärem HNSCC-Gewebeproben und bestätigten damit die Zelllinienergebnisse. Allerdings ergaben die Western Blot-Untersuchungen der Tumorgewebeproben andere, von den in vitro-Analysen abweichende, Ergebnisse. Auf Proteinebene zeigte sich interessanterweise eine starke Expression von XPA bei den untersuchten Testistumoren, die insbesondere im statistischen Gruppenvergleich hochsignifikant über der XPA-Expression von HNSCC-Primärtumoren lag (Abb. 5-12). Auch die Expression von XPF und ERCC1 war in Testistumoren durchschnittlich höher als in HNSCC-Primärtumoren, welche insgesamt überraschend niedrige Proteinspiegel aller drei untersuchten NER-Gene aufwiesen. Diese Beobachtungen an Tumorgewebeproben stehen in deutlichem Gegensatz zu vorausgegangen Studien, die zeigten, dass XPA-defiziente Zellen extrem empfindlich auf Cisplatin reagieren (Dijt et al., 1988; Hansson and Wood, 1989), während cisplatinresistente Zellen häufig XPA

überexprimieren (Dabholkar et al., 1994; States and Reed, 1996). Die Hypothese einer verminderten Expression von NER-Proteinen als ursächlichen Mechanismus für die Cisplatinresistenz von Testistumoren wird durch diese Ergebnisse nicht gestützt. Eine verminderte Protein-Expression von XPA, XPF und ERCC1, wie sie *Welsh et al.* bei in vitro-Versuchen mit Testistumorzelllinien nachweisen konnten (Welsh et al., 2004), konnte in der vorliegenden Arbeit in Tumorgewebeproben also nicht bestätigt werden. Vielmehr stützen unsere Ergebnisse die Vermutung, dass insbesondere die Höhe der XPA-Expression in keinem wesentlichen ursächlichen Zusammenhang zu der Chemosensibilität von Hodentumoren steht (Honecker et al., 2003). Die niedrigen NER-Expressionsspiegel, die in HNSCC-Primärtumoren auf Proteinebene gemessen wurden, sprechen nicht für eine erhöhte NER-Reparaturkapazität in cisplatinresistenten HNSCC-Tumoren.

6.2.6 Erhöhte NER-Expression in HNSCC-Metastasengewebe

Bei der Ergebnisauswertung der HNSCC-Gewebeproben waren besonders Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen von Interesse. Zwar konnte keine NER-Expressionserhöhung in HNSCC-Primärtumoren nachgewiesen werden, jedoch ergaben sich sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene Hinweise auf eine vermehrte Expression von NER-Genen in HNSCC-Metastasengewebeproben. Die untersuchten zervicalen HNSCC-Metastasen zeigten auf mRNA-Ebene eine signifikant höhere ERCC1-Expression als HNSCC-Primärtumoren und Testistumoren. Auch die XPF-Expression lag bei den Metastasen durchschnittlich höher, die Werte waren jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 5-11). Bei dem direkten Vergleich der Ergebnisse der entnommenen Primärtumoren und Lymphknoten-Metastasen eines Patienten zeigten die mRNA-Messungen bei vier der sechs untersuchten Primärtumor-Metastasen-Paare eine Mehrexpression der NER-Gene in Metastasen, während zwei Primärtumor-Metastasen-Paare in etwa identische NER-mRNA-Expressionen aufwiesen (Abb. 5-10). In den Western Blot-Analysen exprimierten HNSCC-Metastasen darüber hinaus hochsignifikant höhere XPA-Proteinmengen als HNSCC-Primärtumoren. Auch die Expression von XPF war bei den Lymphknoten-

Metastasen signifikant gegenüber den HNSCC-Primärtumoren erhöht. Trotz der erhöhten ERCC1-mRNA-Expression und des zu erwartenden stabilisierenden Effektes der vermehrten XPF-Protein-Expression zeigte sich auf Proteinebene kein signifikanter Unterschied zwischen der ERCC1-Expression von HNSCC-Primärtumoren und -Metastasen. Bei der Detektion der ERCC1-Banden im Western Blot ergaben sich allerdings im Gegensatz zu den Zelllinien-Analysen Schwierigkeiten bei der vergleichenden Quantifizierung der ERCC1-Protein-Expressionen. Bei der Auswertung der Blots zeigten sich im Vergleich zu den Zelllinien nur sehr schwache ERCC1-Banden. In ca. 50 % der Tumorproben konnte ERCC1 gar nicht detektiert werden. Die Ursache kann zum einen in einer insgesamt erniedrigten Expression von ERCC1 in den Tumorgewebeproben liegen. Auf der anderen Seite muss in Betracht gezogen werden, dass die verwendete Detektionsmethode zur Visualisierung der Banden nicht sensitiv genug war, um geringe Unterschiede in der ERCC1-Expression zwischen den Tumorgewebeproben zu dokumentieren.

Obwohl die NER-Expression in HNSCC-Metastasen zum Teil deutlich über der der HNSCC-Primärtumoren lag, ließ sich auf Proteinebene kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von XPA, XPF oder ERCC1 zwischen HNSCC-Metastasen und chemosensiblen Testistumoren nachweisen. Insgesamt deuten die Ergebnisse der Untersuchungen an HNSCC-Primärtumoren und -Metastasen jedoch darauf hin, dass die bei der Absiedlung von Metastasen aus einem malignen Primärtumor stattfindenden molekularen Veränderungen evtl. auch das NER-System betreffen und zu einer ausgeprägteren Chemoresistenz der Metastasen führen könnten.

6.2.7 Mehrbandige Migration von XPA und XPF im Western Blot

Die Western Blot-Analysen der Tumorproben wurden nach der gleichen Methodik durchgeführt wie die Zelllinienuntersuchungen. Bei der Analyse der XPF-Protein-Expression zeigte sich sowohl bei Zelllinien- als auch bei Tumorgewebeproben eine zweibandige Migration des XPF-Proteins. Die Ursache dieser Doppelbanden, die bei TGCT und HNSCC gleichermaßen zu beobachten waren, ist unklar. Neben

der 110 kDa großen spezifischen XPF-Bande kam eine weitere Bande zur Darstellung, deren Molekulargewicht nach SDS-Page Analyse über dem kalkulierten Molekulargewicht von XPF lag. Es könnte sich daher um eine schwerere, glykosylierte Form des Proteins handeln. Ob posttranslationale Modifikationen des XPF-Proteins stattfinden und zu unterschiedlichen Glykosylierungsvarianten des Proteins führen, ist nicht bekannt.

Die mehrbandige Migration von XPA wurde dagegen bereits eingehender untersucht. Meist handelt es sich um 2-4 Banden mit einer durchschnittlichen Größe von 40-45 kDa, die hauptsächlich durch Disulfidbrückenbindungen während der Elektrophorese entstehen (Iakoucheva et al., 2001b). Darüber hinaus zeigt XPA eine deutliche Diskrepanz zwischen dem anhand der Gensequenz kalkulierten Molekulargewicht von 31 kDa und dem auf der SDS-Page abzulesenden Molekulargewicht von 40-45 kDa. Iakoucheva et al. konnten nachweisen, dass dieses Phänomen nicht durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Glykosylierung von XPA entsteht, sondern hauptsächlich auf geladene, glutamatreiche Regionen sowie auf die ungewöhnliche Form des Proteins zurückzuführen ist. Diese besondere Form wird durch ungeordnete N- und C-terminale Bereiche hervorgerufen und spielt wahrscheinlich eine bedeutende funktionelle Rolle bei der DNA-Schadenserkennung und -Reparatur durch XPA (Iakoucheva et al., 2001a). Die Western Blot-Analysen der vorliegenden Arbeit zeigten bei den untersuchten TGCT- und HNSCC-Zelllinien konstant eine spezifische Bande bei ca. 40 kDa. Dagegen kamen bei den Tumorgewebeproben zumeist mehrere Banden zur Darstellung. Zum einen zeigten sich bei einigen Proben zwei Banden im Molekulargewichtsbereich von 40-45 kDa (siehe z.B. Probe # 27b, Abb. 5-13), die wahrscheinlich auf eine Disulfidbrückenbildung bei unzureichender Reduktion von SH-Gruppen zurückzuführen sind. Darüber hinaus zeigte sich bei den meisten TGCT- und HNSCC-Gewebeproben eine weitere, unterschiedlich stark ausgeprägte Bande bei einem deutlich größeren Molekulargewicht von ca. 95 kDa (siehe z.B. Probe # 28b und c, Abb. 5-13), die aufgrund dieser starken Größenabweichung nicht in die Quantifizierung von XPA miteingeschlossen wurde. Die Ursache dieser zusätzlichen Bande, die interessanterweise ausschließlich in Gewebeproben und nie bei Zelllinien zu beobachten war, ist nicht bekannt. Es könnte sich zum einen um unspezifische Banden oder um eine Kreuzreaktion des primären Antikörpers mit

einem anderen Protein handeln. Zum anderen müssen strukturelle tumorgewebs-spezifische Veränderungen von XPA in Betracht gezogen werden, die zu Molekulargewichtsverschiebungen und eventuell auch zu funktionellen Konsequenzen bei der Reparatur von DNA-Schäden führen könnten. Da XPA zwar selbst keine enzymatische Aktivität besitzt, jedoch durch die Interaktion mit beschädigter DNA sowie den NER-Bestandteilen RPA, ERCC1 und TFIIH wesentlich an den initialen Reaktionen der NER beteiligt ist, könnten strukturelle Veränderungen von XPA zu einer negativen Beeinflussung dieser Protein-Interaktionen führen (Saijo et al., 2004).

Bei weiteren schwachen Signalen, die bei einigen Proben detektiert wurden, handelte es sich um unspezifische Banden bzw. Degradationsprodukte der Proteine.

6.2.8 Schlussfolgerungen der NER-Expressionsanalysen

Die vorliegende Arbeit liefert erstmals grundlegende Daten über den Expressionsstatus von NER-Genen in HNSCC-Zelllinien und -Gewebeproben.

Die in der Literatur beschriebene verminderte Expression der NER-Bestandteile XPA, XPF und ERCC1 in Testistumorzelllinien als ursächlichen Mechanismus für die ausgeprägte Cisplatinsensibilität dieser Zellen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei der Analyse von Tumorgewebeproben nicht bestätigt werden. Es zeigte sich keine Überexpression von NER-Genen bei klinisch chemoresistenten HNSCC-Primärtumoren. Die Expression lag im Durchschnitt sogar niedriger als bei Testistumorgewebeproben. Allerdings zeigten die in vitro-Versuche eine Überexpression von NER-Genen in HNSCC-Zelllinien. Als weiteres interessantes Ergebnis ließ sich bei der Analyse der Tumorgewebeproben eine Überexpression von NER-Genen bei HNSCC-Metastasen im Vergleich zu -Primärtumoren beobachten.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der Expressionsanalysen der NER-Bestandteile XPA, XPF und ERCC1 auf eine mögliche Relevanz der XPF-Expression hin, da sich hier im Zusammenschluss der Zelllinien- und Tumorprobenuntersuchungen konstante Beobachtungen ergaben. So zeigte sich bei den Zelllinienunter-

suchungen neben einer positiven Korrelation zwischen hohen XPF-Proteinwerten und einer vermehrten Cisplatinresistenz außerdem eine signifikante XPF-Überexpression bei HNSCC-Zelllinien gegenüber Testistumorzelllinien. Bei den Tumorgewebeproben ließ sich eine erhöhte XPF-Expression auf mRNA- (n.s.) sowie Proteinebene ($p < 0,05$) bei HNSCC-Metastasen nachweisen. XPF stellt einen wichtigen Bestandteil des NER-Systems dar, da es maßgeblich am initialen Inzisionsschritt der NER beteiligt ist. Schwankungen in der Expressionsmenge des XPF-Proteins wirken sich über einen proteinstabilisierenden Effekt gleichzeitig auf die Expressionsspiegel und Proteinfunktion von ERCC1 aus.

Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse sowie der Literatur kann die Cisplatinresistenz von HNSCC derzeit keinem bestimmten Mechanismus zugeschrieben werden, sondern es muss insgesamt von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das Phänomen „Cisplatinresistenz“ durch das Zusammenwirken verschiedener Faktoren entsteht und, dass in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie bzw. der Tumorgewebeprobe unterschiedliche Resistenzmechanismen zum Tragen kommen können. Dabei haben sowohl die Herkunft als auch die Bedingungen, unter denen die Tumorzellen in vivo entstehen und wachsen bzw. ex vivo kultiviert werden einen deutlichen Einfluss auf die Resistenzentwicklung. Dieser Zusammenhang wird bereits bei der Betrachtung der grundsätzlichen Unterschiede bezüglich des durchschnittlichen Manifestationsalters sowie des ätiologischen Hintergrundes von TGCT und HNSCC deutlich. Im Gegensatz zu testikulären Keimzelltumoren sind HNSCC Tumoren des mittleren und höheren Lebensalters, die ätiologisch zum einen auf einen chronischen Nikotin- und/oder Alkoholkonsum zum anderen auf HPV-Infektionen zurückzuführen sind. Durch den langjährigen Kontakt der Plattenepithelzellen mit chemischen Noxen bzw. durch Inaktivierung von p53 durch HPV-Proteine wie E6 werden Mutationen begünstigt und damit ggf. weitere, an der Entwicklung einer Chemoresistenz beteiligte Mechanismen, induziert.

Darüber hinaus weisen neuste wissenschaftliche Forschungsergebnisse auf eine mögliche Bedeutung sog. Tumorstammzellen bei der Entwicklung und Progression maligner Tumoren hin. Dieses „Tumorstammzellmodell“ geht davon aus, dass eine kleine Population von Krebszellen, ähnlich wie adulte Stammzellen, die Fähigkeit zu unbegrenzter Selbsterneuerung besitzt und gleichzeitig den Ausgangspunkt für eine große Anzahl verschieden differenzierter Tumorzellen bildet. Außerdem

scheinen sich Tumorstammzellen durch eine hohe Migrationskapazität sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber konventioneller Chemotherapie auszuzeichnen und könnten daher an der Entstehung von Tumorrezidiven oder an der Ausbildung von Metastasen maßgeblich beteiligt sein (Giordano et al., 2007). Tumorstammzellen konnten bereits bei einer Vielzahl von Tumorentitäten, darunter HNSCC, identifiziert und isoliert werden (Graziano et al., 2007; Tang et al., 2007).

6.3 Steigerung der in vitro-Cisplatin-sensibilität durch gezielte Hemmung der NER mittels siRNA

Im Anschluss an die oben beschriebenen Expressionsanalysen wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden zur therapeutisch induzierten DNA-Reparatur-Defizienz untersucht. Durch Transfektion von cisplatinresistenten Zelllinien mit spezifisch gegen NER-mRNA gerichteter siRNA wurde versucht, Schlüsselschritte der NER gezielt zu inhibieren, um die Zelllinien so gegenüber Cisplatin zu sensibilisieren und die Relevanz des NER-Systems in Bezug auf die Cisplatin-resistenz von Tumoren zu belegen. Außerdem sollte im Hinblick auf die Entwicklung zukünftiger Therapien durch Herabregulierung von NER-Genen versucht werden, den klinischen Erfolgen, wie sie bei der Therapie von testikulären Keimzelltumoren erzielt werden, auch bei der Behandlung von HNSCC näher zu kommen. Die Ergebnisse verschiedener vorausgegangener Studien legen nahe, dass es möglich ist, die Cisplatinzytotoxizität bei resistenten Zelllinien durch Hemmung von NER-Genen zu erhöhen. Dabei wurden von den Autoren vor allem ERCC1 und XPA als zu inhibierende Zielgene ausgewählt, da ihre Expressionsspiegel in verschiedenen wissenschaftlichen Artikeln mit dem Ausmaß der Cisplatinresistenz von Tumorzellen in Verbindung gebracht wurden. So konnte durch Herabregulierung von ERCC1 mittels siRNA bereits eine reduzierte Reparaturaktivität sowie eine vermehrte Empfindlichkeit von transfizierten Ovarial- und Mammakarzinomzelllinien gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika wie Cisplatin, Carboplatin oder Oxaliplatin nachgewiesen werden (Chang et al., 2005; Liu et al., 2006). Daneben ließ sich durch Inhibition von ERCC1 mit Hilfe der Antisense-RNA Methode ebenfalls eine Cisplatin-

sensibilisierung von zuvor mäßig bis hoch resistenten Ovarialkarzinomzelllinien erreichen (Selvakumaran et al., 2003). Mit einer ähnlichen Methode konnten *Wu et al.* humane Lungenadenokarzinomzelllinien durch Transfektion mit XPA-Antisense-RNA gegenüber Cisplatin sensibilisieren (Wu et al., 2003). Bisher existieren keine Studien über eine siRNA- oder Antisense-RNA-vermittelte Inhibition von XPF.

In der vorliegenden Arbeit wurden die siRNA-Transfektionsversuche zunächst an der bekannt cisplatinresistenten Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 durchgeführt und im Anschluss auf HNSCC-Zelllinien erweitert. Es wurden spezifische synthetische siRNAs gegen XPA und XPF verwendet, da sich diese in den Western Blot-Analysen mit ausreichender Intensität nachweisen ließen und so eine Dokumentation der Herabregulierung auf Proteinebene gewährleistet war. Aufgrund der methodischen Schwierigkeiten bei der Visualisierung der ERCC1-Banden wurde auf eine Inhibition durch ERCC1-siRNA verzichtet. Da in der Literatur gegenwärtig noch keine erfolgreiche Transfektion von Zelllinien mit XPF-siRNA beschrieben ist und die vorliegenden Ergebnisse der Expressionsanalysen auf eine Beteiligung von XPF bei der Cisplatinresistenz von HNSCC hinweisen, waren die siRNA-Versuche zur Inhibition von XPF von besonderem Interesse. Unter den optimierten Transfektionsbedingungen ließen sich fluoreszenzmikroskopisch bzw. durchflusszytometrisch maximale Transfektionseffizienzen von ca. 97 % bei der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 erzielen. Die HNSCC-Zelllinie ANT-1 zeigte dagegen mit ca. 68 % deutlich niedrigere Transfektionsraten. Außerdem nahm bei steigenden siRNA-Konzentrationen auch der prozentuale Anteil der toten Zellen stärker zu als bei SKOV-3. Anhand dieser Ergebnisse ließ sich bereits erkennen, dass die Zelllinie ANT-1 zum einen schlechter zu transfizieren ist und zum anderen empfindlicher auf die Behandlung mit siRNA und Transfektionsreagenz reagiert. In der Western Blot-Analyse nach Transfektion mit sequenzspezifischen siRNAs konnte bei der HNSCC-Zelllinie ANT-1 dann auch keine Herabregulierung von XPA oder XPF nachgewiesen werden, so dass sich nachfolgend keine Chemosensibilisierungsversuche mit dieser Zelllinie durchführen ließen. Dagegen zeigte sich bei den transfizierten SKOV-3-Zellen eine Verringerung der Protein-Expression von XPA und XPF im Western Blot. Besonders stark ließ sich die XPA-Expression durch die siRNA-Behandlung inhibieren. 72 h nach der Transfektion erreichte der Effekt mit einer Herabregulierung von XPA um

über 75 % im Vergleich zu den Negativkontrollen Maximalwerte (Abb. 5-17). Leider konnte durch Transfektion mit XPF-siRNA nur eine mäßige Reduktion der XPF-Expression um maximal ca. 25 % erreicht werden. Die Reduktion der NER-Proteinspiegel durch siRNA-Transfektion wirkte sich auf die Empfindlichkeit der SKOV-3 Zellen gegenüber Cisplatin aus (Abb. 5-18). Die mit XPA-siRNA transfizierten Zellen reagierten sensitiver auf die Cisplatinbehandlung als die jeweiligen Kontrollen. Mit einer Abnahme der lebenden Zellen um ca. 10-20 % im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle ließ sich allerdings nur eine mäßige Chemosensibilisierung erreichen. Auch die kombinierte Transfektion der Zellen mit XPA- und XPF-siRNA erbrachte keine weitere Abnahme der vitalen Zellen nach Cisplatininkubation.

Es ist anzunehmen, dass die Herabregulierung von XPF um ca. 25 % nicht ausreichte, um die Funktion des Enzyms maßgeblich zu beeinträchtigen. Bezüglich der XPA-Expression zeigte sich mit 75 % eine deutliche Herabregulierung des Proteins. Berücksichtigt man jedoch, dass erst eine Reduktion von XPA auf unter 10 % der Ausgangsmenge zu einem deutlichen Verlust der NER-Kapazität führt, so scheint die in der vorliegenden Arbeit erzielte Inhibition von XPA noch nicht auszureichen, um eine ausgeprägtere Chemosensibilisierung der Zellen zu bewirken.

6.4 Ausblick

In nachfolgenden Studien sollte die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Überexpression von NER-Genen bei HNSCC-Metastasen im Vergleich zu Primärtumoren anhand einer größeren Anzahl von Gewebeproben weiter untersucht werden. Insbesondere sind dabei auch Proben von HNSCC-Rezidiven und -Zweitumoren nach Chemotherapie oder Bestrahlung, von Interesse. Die Anzahl solcher Proben war in der vorliegenden Arbeit zu gering ($n = 4$), um Expressionsunterschiede herauszustellen. Bei den hier untersuchten Proben ließ sich keine Induktion oder Selektion von NER-positiven Zellen durch eine chemotherapeutische Behandlung oder Strahlentherapie nachweisen. Daher sollte in

weiterführenden Studien untersucht werden, ob Veränderungen im NER-Expressionsmuster solcher Proben stattfinden.

Bei zukünftigen Untersuchungen der Nukleotid-Exzisions-Reparatur bei HNSCC sollten neben dem Expressionsniveau der beteiligten Reparaturenzyme auch funktionelle Untersuchungen zur Reparaturkinetik durchgeführt werden. Obwohl die Ergebnisse unserer Studie deutliche Hinweise auf NER-Expressionsunterschiede zwischen HNSCC-Primärtumoren und -Metastasen geben, scheint ein unterschiedliches Ansprechen von Tumoren auf eine Cisplatin-Chemotherapie nicht allein auf differenten Expressionsspiegeln der NER-Gene XPA, XPF oder ERCC1 zu beruhen. Durch funktionelle Analysen könnten weitere Unterschiede in der DNA-Reparaturkapazität zwischen malignen Tumoren nachgewiesen werden. In Bezug auf die Chemosensibilisierungsversuche mittels siRNA sollte in weiterführenden Studien versucht werden, die Expression von XPA und XPF durch Verbesserung der Transfektionsbedingungen bzw. Verwendung effizienterer siRNA-Moleküle mit anderen Oligonukleotidsequenzen noch stärker zu inhibieren und auch eine Herabregulation der NER-Gene in HNSCC-Zelllinien zu erreichen. Darüber hinaus sollte versucht werden das Ausmaß der Chemosensibilisierung durch Kombination von XPA- mit XPF-siRNA weiter zu erhöhen. Gerade die erfolgreiche Inhibition von XPF könnte dabei eine Schlüsselrolle bei der Chemosensibilisierung von resistenten Zelllinien spielen, da eine Verringerung der XPF-Proteinmenge auch zu einer zunehmenden Instabilität des Enzympartners ERCC1 führt und die NER so entscheidend hemmt.

Im Hinblick auf die, in der Literatur beschriebenen, Chemosensibilisierungserfolge durch Inhibition der ERCC1-Expression selbst, bietet es sich außerdem an, in nachfolgenden Versuchen spezifische siRNAs gegen ERCC1 zu verwenden. Neben dem chemosensibilisierenden Effekt durch Beeinträchtigung der NER, gibt es auch Hinweise auf eine Beteiligung von ERCC1 an dem Reparaturmechanismus der „Hererologen Rekombination“ (Cummings et al., 2006). Auch aus diesem Grund scheint ERCC1 als Ziel von Chemosensibilisierungsversuchen besonders geeignet.

7 Zusammenfassung

Trotz vieler neuer therapeutischer Ansätze hat sich die ungünstige Prognose von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) in den vergangenen drei Jahrzehnten nicht verbessert. Initiale Therapieerfolge werden durch das Auftreten von chemoresistenten Tumorrezidiven limitiert. Testikuläre Keimzelltumoren weisen dagegen eine hohe Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wie Cisplatin auf. Selbst bei metastatischen Tumoren werden dauerhafte Heilungsraten von über 80 % erreicht. Testistumorzellen besitzen eine geringe Kapazität DNA-Cisplatin-Addukte, welche hauptsächlich durch die sog. Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) beseitigt werden, zu reparieren. Diese defiziente Reparatur könnte mit einer reduzierten Expression der NER-Faktoren XPA, XPF und ERCC1 in Testistumorzellen assoziiert sein. Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung der NER für die Chemoresistenz von HNSCC zu bestimmen und durch in vitro Inhibition der NER resistente Zellen gegenüber Cisplatin zu sensitivieren. Dazu wurde die Expression von XPA, XPF und ERCC1 in HNSCC-Zelllinien sowie in Gewebeproben von Primärtumoren und Metastasen mittels Western Blot und quantitativer „real-time“ RT-PCR bestimmt. HNSCC-Zelllinien erwiesen sich signifikant cisplatinresistenter als Testistumorzelllinien. Es konnte auf Proteinebene eine signifikante Überexpression von XPF bei HNSCC-Zelllinien nachgewiesen werden. Die erhöhte XPF-Protein-Expression korrelierte dabei mit einer vermehrten Cisplatinresistenz. Bei der Analyse der Tumorgewebeproben ließ sich eine erhöhte Expression von NER-Genen bei HNSCC-Metastasen nachweisen. Die in der Literatur beschriebene reduzierte Protein-Expression von NER-Genen bei Testistumorzelllinien, konnte bei der Untersuchung von Tumorgewebeproben nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass die mRNA-Spiegel der NER-Gene nicht mit den tatsächlichen Protein-Expressionen korrelieren.

Durch Herabregulierung von XPA in der cisplatinresistenten Zelllinie SKOV-3 mittels siRNA-Transfektion konnte eine Cisplatinsensibilisierung der Zellen um 10-20 % erreicht werden. Obwohl es sich bei der Cisplatinresistenz von Tumorzellen um ein multifaktorielles Geschehen zu handeln scheint, liefert die vorliegende Arbeit Hinweise auf eine ursächliche Beteiligung einer erhöhten NER-Expression an der Chemoresistenz insbesondere von HNSCC-Metastasen.

8 Literaturverzeichnis

- Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R.D., Boland, C.R., Koi, M., Fishel, R. and Howell, S.B. (1996) Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res*, **56**, 3087-3090.
- Akiyama, S., Chen, Z.S., Sumizawa, T. and Furukawa, T. (1999) Resistance to cisplatin. *Anticancer Drug Des*, **14**, 143-151.
- Andrews, P.W., Bronson, D.L., Benham, F., Strickland, S. and Knowles, B.B. (1980) A comparative study of eight cell lines derived from human testicular teratocarcinoma. *Int J Cancer*, **26**, 269-280.
- Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C. and Fogh, J. (1984) Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest*, **50**, 147-162.
- Anthony, D.A., McIlwrath, A.J., Gallagher, W.M., Edlin, A.R. and Brown, R. (1996) Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells. *Cancer Res*, **56**, 1374-1381.
- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugasawa, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y. and Hanaoka, F. (2001) Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem*, **276**, 18665-18672.
- Araujo, S.J., Tirode, F., Coin, F., Pospiech, H., Syvaoja, J.E., Stucki, M., Hubscher, U., Egly, J.M. and Wood, R.D. (2000) Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev*, **14**, 349-359.
- Arriola, E.L., Rodriguez-Lopez, A.M., Hickman, J.A. and Chresta, C.M. (1999) Bcl-2 overexpression results in reciprocal downregulation of Bcl-X(L) and sensitizes human testicular germ cell tumours to chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene*, **18**, 1457-1464.
- Bamberg, M., Schmoll, H.J., Weissbach, L., Beyer, J., Bokemeyer, C., Harstrick, A., Holtl, W., Souchon, R. and Vogler, H. (1997) [An interdisciplinary consensus conference on the diagnosis and therapy of testicular tumors]. *Strahlenther Onkol*, **173**, 397-406.
- Bedford, P., Fichtinger-Schepman, A.M., Shellard, S.A., Walker, M.C., Masters, J.R. and Hill, B.T. (1988) Differential repair of platinum-DNA adducts in human bladder and testicular tumor continuous cell lines. *Cancer Res*, **48**, 3019-3024.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Biggerstaff, M., Szymkowski, D.E. and Wood, R.D. (1993) Co-correction of the ERCC1, ERCC4 and xeroderma pigmentosum group F DNA repair defects in vitro. *Embo J*, **12**, 3685-3692.
- Bohlen, D., Borner, M., Sonntag, R.W., Fey, M.F. and Studer, U.E. (1999) Long-term results following adjuvant chemotherapy in patients with clinical stage I testicular nonseminomatous malignant germ cell tumors with high risk factors. *J Urol*, **161**, 1148-1152.

- Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S. and Hanawalt, P.C. (1985) DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, **40**, 359-369.
- Bosl, G.J. and Motzer, R.J. (1997) Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med*, **337**, 242-253.
- Boyle, J.O., Hakim, J., Koch, W., van der Riet, P., Hruban, R.H., Roa, R.A., Correo, R., Eby, Y.J., Ruppert, J.M. and Sidransky, D. (1993) The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res*, **53**, 4477-4480.
- 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.
- Branch, P., Masson, M., Aquilina, G., Bignami, M. and Karran, P. (2000) Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells. *Oncogene*, **19**, 3138-3145.
- Britten, R.A., Liu, D., Tessier, A., Hutchison, M.J. and Murray, D. (2000) ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells. *Int J Cancer*, **89**, 453-457.
- Bronson, D.L., Andrews, P.W., Solter, D., Cervenka, J., Lange, P.H. and Fraley, E.E. (1980) Cell line derived from a metastasis of a human testicular germ cell tumor. *Cancer Res*, **40**, 2500-2506.
- Brown, R., Hirst, G.L., Gallagher, W.M., McIlwrath, A.J., Margison, G.P., van der Zee, A.G. and Anthony, D.A. (1997) hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene*, **15**, 45-52.
- Burger, H., Nooter, K., Boersma, A.W., van Wingerden, K.E., Looijenga, L.H., Jochemsen, A.G. and Stoter, G. (1999) Distinct p53-independent apoptotic cell death signalling pathways in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer*, **81**, 620-628.
- Caamano, J., Zhang, S.Y., Rosvold, E.A., Bauer, B. and Klein-Szanto, A.J. (1993) p53 alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines. *Am J Pathol*, **142**, 1131-1139.
- Cavalli, F., Monfardini, S. and Pizzocaro, G. (1980) Report on the International Workshop on Staging and Treatment of Testicular Cancer. *Eur J Cancer*, **16**, 1367-1372.
- Chang, I.Y., Kim, M.H., Kim, H.B., Lee do, Y., Kim, S.H., Kim, H.Y. and You, H.J. (2005) Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun*, **327**, 225-233.
- Chen, G., Hutter, K.J. and Zeller, W.J. (1995) Positive correlation between cellular glutathione and acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Cell Biol Toxicol*, **11**, 273-281.
- Cheng, L., Sturgis, E.M., Eicher, S.A., Spitz, M.R. and Wei, Q. (2002) Expression of nucleotide excision repair genes and the risk for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, **94**, 393-397.
- Chin, D., Boyle, G.M., Theile, D.R., Parsons, P.G. and Coman, W.B. (2004) Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg*, **57**, 595-602.

- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Chresta, C.M., Masters, J.R. and Hickman, J.A. (1996) Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. *Cancer Res*, **56**, 1834-1841.
- Cleaver, J.E., Charles, W.C., McDowell, M.L., Sadinski, W.J. and Mitchell, D.L. (1995) Overexpression of the XPA repair gene increases resistance to ultraviolet radiation in human cells by selective repair of DNA damage. *Cancer Res*, **55**, 6152-6160.
- Copper, M.P., Jovanovic, A., Nauta, J.J., Braakhuis, B.J., de Vries, N., van der Waal, I. and Snow, G.B. (1995) Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **121**, 157-160.
- Crul, M., Schellens, J.H., Beijnen, J.H. and Maliapaard, M. (1997) Cisplatin resistance and DNA repair. *Cancer Treat Rev*, **23**, 341-366.
- Cummings, M., Higginbottom, K., McGurk, C.J., Wong, O.G., Koberle, B., Oliver, R.T. and Masters, J.R. (2006) XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: role of ERCC1 in homologous recombination repair. *Biochem Pharmacol*, **72**, 166-175.
- Dabholkar, M., Bradshaw, L., Parker, R.J., Gill, I., Bostick-Bruton, F., Muggia, F.M. and 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. and Reed, E. (1994) Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest*, **94**, 703-708.
- Damjanov, I., Horvat, B. and Gibas, Z. (1993) Retinoic acid-induced differentiation of the developmentally pluripotent human germ cell tumor-derived cell line, NCCIT. *Lab Invest*, **68**, 220-232.
- de Laat, W.L., Jaspers, N.G. and Hoeijmakers, J.H. (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*, **13**, 768-785.
- de Wit, R. (1999) Treatment of disseminated non-seminomatous testicular cancer: the European experience. *Semin Surg Oncol*, **17**, 250-256.
- Decker, J. and Goldstein, J.C. (1982) Risk factors in head and neck cancer. *N Engl J Med*, **306**, 1151-1155.
- Dijt, F.J., Fichtinger-Schepman, A.M., Berends, F. and 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.
- Drummond, J.T., Li, G.M., Longley, M.J. and Modrich, P. (1995) Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science*, **268**, 1909-1912.
- Einhorn, L.H. (1981) Testicular cancer as a model for a curable neoplasm: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res*, **41**, 3275-3280.
- Einhorn, L.H. (2002) Curing metastatic testicular cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4592-4595.
- Einhorn, L.H. and Donohue, J. (1977) Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann Intern Med*, **87**, 293-298.

- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, **15**, 188-200.
- Fautrel, A., Andrieux, L., Musso, O., Boudjema, K., Guillouzo, A. and Langouet, S. (2005) Overexpression of the two nucleotide excision repair genes ERCC1 and XPC in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, **43**, 288-293.
- Ferry, K.V., Hamilton, T.C. and Johnson, S.W. (2000) Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol*, **60**, 1305-1313.
- Fichtinger-Schepman, A.M., Baan, R.A. and Berends, F. (1989) Influence of the degree of DNA modification on the immunochemical determination of cisplatin-DNA adduct levels. *Carcinogenesis*, **10**, 2367-2369.
- Fichtinger-Schepman, A.M., van der Veer, J.L., den Hartog, J.H., Lohman, P.H. and Reedijk, J. (1985) Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*, **24**, 707-713.
- Fichtinger-Schepman, A.M., van Oosterom, A.T., Lohman, P.H. and Berends, F. (1987a) cis-Diamminedichloroplatinum(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., van Oosterom, A.T., Lohman, P.H. and Berends, F. (1987b) Interindividual human variation in cisplatin sensitivity, predictable in an in vitro assay? *Mutat Res*, **190**, 59-62.
- Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R.D. and 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. and 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.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fogh, J. (1978) Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors. *Natl Cancer Inst Monogr*, 5-9.
- Fogh, J., Wright, W.C. and Loveless, J.D. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*, **58**, 209-214.
- Foulkes, W.D., Brunet, J.S., Sieh, W., Black, M.J., Shenouda, G. and Narod, S.A. (1996) Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *Bmj*, **313**, 716-721.
- Fujishima, H., Nakano, S., Masumoto, N., Esaki, T., Tatsumoto, T., Kondo, T. and Niho, Y. (1997) 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**, 167-172.
- Furuta, T., Ueda, T., Aune, G., Sarasin, A., Kraemer, K.H. and Pommier, Y. (2002) Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res*, **62**, 4899-4902.
- Gillison, M.L., Koch, W.M., Capone, R.B., Spafford, M., Westra, W.H., Wu, L., Zahurak, M.L., Daniel, R.W., Viglione, M., Symer, D.E., Shah, K.V. and Sidransky, D. (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 709-720.
- Gioanni, J., Fischel, J.L., Lambert, J.C., Demard, F., Mazeau, C., Zanghellini, E., Ettore, F., Formento, P., Chauvel, P., Lalanne, C.M. and et al. (1988) Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol*, **24**, 1445-1455.
- Giordano, A., Fucito, A., Romano, G. and Marino, I.R. (2007) Carcinogenesis and environment: the cancer stem cell hypothesis and implications for the development of novel therapeutics and diagnostics. *Front Biosci*, **12**, 3475-3482.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. and Mathieu, C. (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, **25**, 386-401.
- Gottesman, M.M. (2002) Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med*, **53**, 615-627.
- Graziano, A., d'Aquino, R., Tirino, V., Desiderio, V., Rossi, A. and Pirozzi, G. (2007) The stem cell hypothesis in head and neck cancer. *J Cell Biochem*.
- Greenlee, R.T., Hill-Harmon, M.B., Murray, T. and Thun, M. (2001) Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*, **51**, 15-36.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
- Hansson, J. and Wood, R.D. (1989) Repair synthesis by human cell extracts in DNA damaged by cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II). *Nucleic Acids Res*, **17**, 8073-8091.
- Hayakawa, H., Ishizaki, K., Inoue, M., Yagi, T., Sekiguchi, M. and Takebe, H. (1981) Repair of ultraviolet radiation damage in xeroderma pigmentosum cells belonging to complementation group F. *Mutat Res*, **80**, 381-388.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, **8**, 67-113.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, **10**, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 1026-1030.
- Hogan, B., Fellous, M., Avner, P. and Jacob, F. (1977) Isolation of a human teratoma cell line which expresses F9 antigen. *Nature*, **270**, 515-518.
- Honecker, F., Mayer, F., Stoop, H., Oosterhuis, J.W., Koch, S., Bokemeyer, C. and Looijenga, L.H. (2003) Xeroderma pigmentosum group a protein and chemotherapy resistance in human germ cell tumors. *Lab Invest*, **83**, 1489-1495.

- Houldsworth, J., Xiao, H., Murty, V.V., Chen, W., Ray, B., Reuter, V.E., Bosl, G.J. and Chaganti, R.S. (1998) Human male germ cell tumor resistance to cisplatin is linked to TP53 gene mutation. *Oncogene*, **16**, 2345-2349.
- Iakoucheva, L.M., Kimzey, A.L., Masselon, C.D., Bruce, J.E., Garner, E.C., Brown, C.J., Dunker, A.K., Smith, R.D. and Ackerman, E.J. (2001a) Identification of intrinsic order and disorder in the DNA repair protein XPA. *Protein Sci*, **10**, 560-571.
- Iakoucheva, L.M., Kimzey, A.L., Masselon, C.D., Smith, R.D., Dunker, A.K. and Ackerman, E.J. (2001b) Aberrant mobility phenomena of the DNA repair protein XPA. *Protein Sci*, **10**, 1353-1362.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D.J. and Herskowitz, I. (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14298-14302.
- Ishikawa, T. and 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**, 20116-20125.
- Johnsson, A., Olsson, C., Nygren, O., Nilsson, M., Seiving, B. and Cavallin-Stahl, E. (1995) Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin in nude mice: platinum levels and cisplatin-DNA adducts. *Cancer Chemother Pharmacol*, **37**, 23-31.
- Jones, A.S., Morar, P., Phillips, D.E., Field, J.K., Husband, D. and Helliwell, T.R. (1995) Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, **75**, 1343-1353.
- Jordan, P. and Carmo-Fonseca, M. (2000) Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 1229-1235.
- Jorgensen, R. (1990) Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol*, **8**, 340-344.
- Kartalou, M. and Essigmann, J.M. (2001) Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res*, **478**, 23-43.
- Kasahara, K., Fujiwara, Y., Nishio, K., Ohmori, T., Sugimoto, Y., Komiya, K., Matsuda, T. and Saijo, N. (1991) Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res*, **51**, 3237-3242.
- Katano, K., Kondo, A., Safaei, R., Holzer, A., Samimi, G., Mishima, M., Kuo, Y.M., Rochdi, M. and Howell, S.B. (2002) Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res*, **62**, 6559-6565.
- Kato, T., Duffey, D.C., Ondrey, F.G., Dong, G., Chen, Z., Cook, J.A., Mitchell, J.B. and Van Waes, C. (2000) Cisplatin and radiation sensitivity in human head and neck squamous carcinomas are independently modulated by glutathione and transcription factor NF-kappaB. *Head Neck*, **22**, 748-759.
- Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*, **256**, 42-49.
- Kelland, L.R. (1994) The molecular basis of cisplatin sensitivity/resistance. *Eur J Cancer*, **30A**, 725-727.
- Kelley, S.L., Basu, A., Teicher, B.A., Hacker, M.P., Hamer, D.H. and Lazo, J.S. (1988) Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science*, **241**, 1813-1815.

- Kellogg, D.E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P.D. and Chenchik, A. (1994) TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques*, **16**, 1134-1137.
- Kersemaekers, A.M., Mayer, F., Molier, M., van Weeren, P.C., Oosterhuis, J.W., Bokemeyer, C. and Looijenga, L.H. (2002) Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J Clin Oncol*, **20**, 1551-1561.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. and Plasterk, R.H. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, **15**, 2654-2659.
- Koberle, B., Grimaldi, K.A., Sunters, A., Hartley, J.A., Kelland, L.R. and Masters, J.R. (1997) DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer*, **70**, 551-555.
- Koberle, B., Masters, J.R., Hartley, J.A. and Wood, R.D. (1999) Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol*, **9**, 273-276.
- Koberle, B., Payne, J., Grimaldi, K.A., Hartley, J.A. and Masters, J.R. (1996) DNA repair in cisplatin-sensitive and resistant human cell lines measured in specific genes by quantitative polymerase chain reaction. *Biochem Pharmacol*, **52**, 1729-1734.
- Koberle, B., Roginskaya, V. and Wood, R.D. (2006) XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells. *DNA Repair (Amst)*.
- Kolodner, R.D. and Marsischky, G.T. (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 89-96.
- Komatsu, M., Sumizawa, T., Mutoh, M., Chen, Z.S., Terada, K., Furukawa, T., Yang, X.L., Gao, H., Miura, N., Sugiyama, T. and Akiyama, S. (2000) Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res*, **60**, 1312-1316.
- Krege, S., Schmoll, H.J. and Souchon, R. (2001) [Interdisciplinary consensus in diagnosis and therapy of testicular tumors. Results of an update conference founded on evidence-based medicine (EBM)]. *Urologe A*, **40**, 137-147.
- Kruh, G.D. (2003) Lustrous insights into cisplatin accumulation: copper transporters. *Clin Cancer Res*, **9**, 5807-5809.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lage, H. and Dietel, M. (1999) Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J Cancer Res Clin Oncol*, **125**, 156-165.
- Leemans, C.R., Tiwari, R., Nauta, J.J., van der Waal, I. and Snow, G.B. (1994) Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer*, **73**, 187-190.
- Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Center, M., Cole, S.P., Deeley, R.G. and Keppler, D. (1996) ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J*, **314 (Pt 2)**, 433-437.
- Levine, A.J. (1993) The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem*, **62**, 623-651.

- Lewin, F., Norell, S.E., Johansson, H., Gustavsson, P., Wennerberg, J., Biorklund, A. and Rutqvist, L.E. (1998) Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer*, **82**, 1367-1375.
- Li, Q., Yu, J.J., Mu, C., Yunmbam, M.K., Slavsky, D., Cross, C.L., Bostick-Bruton, F. and 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**, 645-652.
- Lin, X., Okuda, T., Holzer, A. and Howell, S.B. (2002) The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol*, **62**, 1154-1159.
- Liu, G.Y., Qu, Q.X., Mi, R.R. and Qi, J. (2006) [Enhanced cisplatin cytotoxicity by RNA interfering the excision repair cross-complementing 1 gene in ovarian cancer cell lines]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, **41**, 339-342.
- Lord, R.V., Brabender, J., Gandara, D., Alberola, V., Camps, C., Domine, M., Cardenal, F., Sanchez, J.M., Gumerlock, P.H., Taron, M., Sanchez, J.J., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V. and Rosell, R. (2002) Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, **8**, 2286-2291.
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T. and Housman, D.E. (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, **74**, 957-967.
- Manetta, A., Blessing, J.A. and Hurteau, J.A. (1998) Evaluation of cisplatin and cyclosporin A in recurrent platinum-resistant ovarian cancer: a phase II study of the gynecologic oncology group. *Gynecol Oncol*, **68**, 45-46.
- Manic, S., Gatti, L., Carenini, N., Fumagalli, G., Zunino, F. and Perego, P. (2003) Mechanisms controlling sensitivity to platinum complexes: role of p53 and DNA mismatch repair. *Curr Cancer Drug Targets*, **3**, 21-29.
- Mashberg, A. (1993) Head and neck cancer. *N Engl J Med*, **328**, 1783; author reply 1784.
- Masters, J.R. and Koberle, B. (2003) Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer*, **3**, 517-525.
- Masters, J.R., Osborne, E.J., Walker, M.C. and Parris, C.N. (1993) Hypersensitivity of human testis-tumour cell lines to chemotherapeutic drugs. *Int J Cancer*, **53**, 340-346.
- Masters, J.R., Thomas, R., Hall, A.G., Hogarth, L., Matheson, E.C., Cattani, A.R. and Lohrer, H. (1996) Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. *Eur J Cancer*, **32A**, 1248-1253.
- Mayer, F., Stoop, H., Scheffer, G.L., Scheper, R., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H. and Bokemeyer, C. (2003) Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors. *Clin Cancer Res*, **9**, 767-773.
- McGurk, C.J., Cummings, M., Koberle, B., Hartley, J.A., Oliver, R.T. and Masters, J.R. (2006) Regulation of DNA repair gene expression in human cancer cell lines. *J Cell Biochem*, **97**, 1121-1136.
- Meijer, C., Mulder, N.H., Timmer-Bosscha, H., Sluiter, W.J., Meersma, G.J. and de Vries, E.G. (1992) Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res*, **52**, 6885-6889.

- Meijer, C., Timmer, A., De Vries, E.G., Groten, J.P., Knol, A., Zwart, N., Dam, W.A., Sleijfer, D.T. and Mulder, N.H. (2000) Role of metallothionein in cisplatin sensitivity of germ-cell tumours. *Int J Cancer*, **85**, 777-781.
- Mellin, H., Friesland, S., Lewensohn, R., Dalianis, T. and Munck-Wikland, E. (2000) Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer*, **89**, 300-304.
- Mello, J.A., Acharya, S., Fishel, R. and Essigmann, J.M. (1996) The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem Biol*, **3**, 579-589.
- Micetich, K., Zwelling, L.A. and Kohn, K.W. (1983) Quenching of DNA:platinum(II) monoadducts as a possible mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in L1210 cells. *Cancer Res*, **43**, 3609-3613.
- Moorehead, R.A., Armstrong, S.G., Rainbow, A.J. and Singh, G. (1996) Nucleotide excision repair in the human ovarian carcinoma cell line (2008) and its cisplatin-resistant variant (C13*). *Cancer Chemother Pharmacol*, **38**, 245-253.
- Morimoto, H., Broquet, C., Principe, P., Mencia-Huerta, J.M., Braquet, P. and Bonavida, B. (1991a) Cytotoxic activity of synthetic aza alkyl lysophospholipids against drug sensitive and drug resistant human tumor cell lines. *Anticancer Res*, **11**, 2223-2229.
- Morimoto, H., Safrit, J.T. and Bonavida, B. (1991b) Synergistic effect of tumor necrosis factor- α - and diphtheria toxin-mediated cytotoxicity in sensitive and resistant human ovarian tumor cell lines. *J Immunol*, **147**, 2609-2616.
- Morimoto, H., Yonehara, S. and Bonavida, B. (1993) Overcoming tumor necrosis factor and drug resistance of human tumor cell lines by combination treatment with anti-Fas antibody and drugs or toxins. *Cancer Res*, **53**, 2591-2596.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.
- Muotri, A.R., Marchetto, M.C., Suzuki, M.F., Okazaki, K., Lotfi, C.F., Brumatti, G., Amarante-Mendes, G.P. and Menck, C.F. (2002) Low amounts of the DNA repair XPA protein are sufficient to recover UV-resistance. *Carcinogenesis*, **23**, 1039-1046.
- Nakatsu, Y., Asahina, H., Citterio, E., Rademakers, S., Vermeulen, W., Kamiuchi, S., Yeo, J.P., Khaw, M.C., Saijo, M., Kodo, N., Matsuda, T., Hoeijmakers, J.H. and Tanaka, K. (2000) XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J Biol Chem*, **275**, 34931-34937.
- Nakayama, K., Kanzaki, A., Ogawa, K., Miyazaki, K., Neamati, N. and Takebayashi, Y. (2002) Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *Int J Cancer*, **101**, 488-495.
- Nichols, C.R. (2001) Chemotherapy of disseminated germ cell tumors. *World J Urol*, **19**, 82-89.
- Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P. and et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, **342**, 705-708.

- Nykanen, A., Haley, B. and Zamore, P.D. (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, **107**, 309-321.
- Nylander, K., Dabelsteen, E. and Hall, P.A. (2000) The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med*, **29**, 413-425.
- O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., Friend, S., Fornace, A.J., Jr. and Kohn, K.W. (1997) Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res*, **57**, 4285-4300.
- O'Donovan, A., Davies, A.A., Moggs, J.G., West, S.C. and Wood, R.D. (1994) XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature*, **371**, 432-435.
- Oguri, T., Fujiwara, Y., Miyazaki, M., Takahashi, T., Kurata, T., Yokozaki, M., Ohashi, N., Isobe, T., Katoh, O. and Yamakido, M. (1999) Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression by platinum drugs in peripheral mononuclear cells of lung cancer patients. *Ann Oncol*, **10**, 455-460.
- Parker, R.J., Gill, I., Tarone, R., Vionnet, J.A., Grunberg, S., Muggia, F.M. and Reed, E. (1991) Platinum-DNA damage in leukocyte DNA of patients receiving carboplatin and cisplatin chemotherapy, measured by atomic absorption spectrometry. *Carcinogenesis*, **12**, 1253-1258.
- Parker, S.L., Tong, T., Bolden, S. and Wingo, P.A. (1996) Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin*, **46**, 5-27.
- Parkin, D.M., Pisani, P. and Ferlay, J. (1999a) Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer*, **80**, 827-841.
- Parkin, D.M., Pisani, P. and Ferlay, J. (1999b) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, **49**, 33-64, 31.
- Parris, C.N., Walker, M.C., Masters, J.R. and Arlett, C.F. (1990) Inherent sensitivity and induced resistance to chemotherapeutic drugs and irradiation in human cancer cell lines: relationship to mutation frequencies. *Cancer Res*, **50**, 7513-7518.
- Paz, I.B., Cook, N., Odom-Maryon, T., Xie, Y. and Wilczynski, S.P. (1997) Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer*, **79**, 595-604.
- Pera, M.F., Friedlos, F., Mills, J. and Roberts, J.J. (1987) Inherent sensitivity of cultured human embryonal carcinoma cells to adducts of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA. *Cancer Res*, **47**, 6810-6813.
- Perez, R.P., Hamilton, T.C. and Ozols, R.F. (1990) Resistance to alkylating agents and cisplatin: insights from ovarian carcinoma model systems. *Pharmacol Ther*, **48**, 19-27.
- Pinto, A.L. and Lippard, S.J. (1985) Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochim Biophys Acta*, **780**, 167-180.
- Rangan, S.R. (1972) A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer*, **29**, 117-121.

- Risinger, J.I., Umar, A., Boyd, J., Berchuck, A., Kunkel, T.A. and Barrett, J.C. (1996) Mutation of MSH3 in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair. *Nat Genet*, **14**, 102-105.
- Romano, N. and Macino, G. (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*, **6**, 3343-3353.
- Rosenberg, B., Vancamp, L. and Krigas, T. (1965) Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, **205**, 698-699.
- Saijo, M., Matsuda, T., Kuraoka, I. and Tanaka, K. (2004) Inhibition of nucleotide excision repair by anti-XPA monoclonal antibodies which interfere with binding to RPA, ERCC1, and TFIIH. *Biochem Biophys Res Commun*, **321**, 815-822.
- Sambrook, J. and Gething, M.J. (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*, **342**, 224-225.
- Sankaranarayanan, R., Masuyer, E., Swaminathan, R., Ferlay, J. and Whelan, S. (1998) Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res*, **18**, 4779-4786.
- Sark, M.W., Timmer-Bosscha, H., Meijer, C., Uges, D.R., Sluiter, W.J., Peters, W.H., Mulder, N.H. and de Vries, E.G. (1995) Cellular basis for differential sensitivity to cisplatin in human germ cell tumour and colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer*, **71**, 684-690.
- Schmid, I., Krall, W.J., Uittenbogaart, C.H., Braun, J. and Giorgi, J.V. (1992) Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*, **13**, 204-208.
- Schweyer, S., Soruri, A., Meschter, O., Heintze, A., Zschunke, F., Miosge, N., Thelen, P., Schlott, T., Radzun, H.J. and Fayyazi, A. (2004) Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. *Br J Cancer*, **91**, 589-598.
- Sela, M., Anfinsen, C.B. and Harrington, W.F. (1957) The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochim Biophys Acta*, **26**, 502-512.
- Selvakumaran, M., Pisarcik, D.A., Bao, R., Yeung, A.T. and Hamilton, T.C. (2003) Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, **63**, 1311-1316.
- Shah, J.P., Cendon, R.A., Farr, H.W. and Strong, E.W. (1976) Carcinoma of the oral cavity. factors affecting treatment failure at the primary site and neck. *Am J Surg*, **132**, 504-507.
- Sharp, P.A. (2001) RNA interference--2001. *Genes Dev*, **15**, 485-490.
- Shiga, H., Heath, E.I., Rasmussen, A.A., Trock, B., Johnston, P.G., Forastiere, A.A., Langmacher, M., Baylor, A., Lee, M. and 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**, 4097-4104.
- Sorenson, C.M. and Eastman, A. (1988) Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res*, **48**, 4484-4488.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.

- States, J.C. and Reed, E. (1996) Enhanced XPA mRNA levels in cisplatin-resistant human ovarian cancer are not associated with XPA mutations or gene amplification. *Cancer Lett*, **108**, 233-237.
- Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1998) Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*, **2**, 223-232.
- Sundquist, W.I., Lippard, S.J. and Stollar, B.D. (1986) Binding of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) to deoxyribonucleic acid exposes nucleosides as measured immunochemically with anti-nucleoside antibodies. *Biochemistry*, **25**, 1520-1524.
- Svejstrup, J.Q., Vichi, P. and Egly, J.M. (1996) The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH. *Trends Biochem Sci*, **21**, 346-350.
- Takebayashi, S., Hickson, A., Ogawa, T., Jung, K.Y., Mineta, H., Ueda, Y., Grenman, R., Fisher, S.G. and Carey, T.E. (2004) Loss of chromosome arm 18q with tumor progression in head and neck squamous cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, **41**, 145-154.
- Tang, C., Ang, B.T. and Pervaiz, S. (2007) Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *Faseb J*.
- Teshima, S., Shimosato, Y., Hirohashi, S., Tome, Y., Hayashi, I., Kanazawa, H. and Kakizoe, T. (1988) Four new human germ cell tumor cell lines. *Lab Invest*, **59**, 328-336.
- Thekdi, A.A. and Ferris, R.L. (2002) Diagnostic assessment of laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin North Am*, **35**, 953-969, v.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Trimmer, E.E. and Essigmann, J.M. (1999) Cisplatin. *Essays Biochem*, **34**, 191-211.
- van Duin, M., Vredeveldt, G., Mayne, L.V., Odijk, H., Vermeulen, W., Klein, B., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H., Bootsma, D. and Westerveld, A. (1989) The cloned human DNA excision repair gene ERCC-1 fails to correct xeroderma pigmentosum complementation groups A through I. *Mutat Res*, **217**, 83-92.
- van Vuuren, A.J., Appeldoorn, E., Odijk, H., Yasui, A., Jaspers, N.G., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1993) Evidence for a repair enzyme complex involving ERCC1 and complementing activities of ERCC4, ERCC11 and xeroderma pigmentosum group F. *Embo J*, **12**, 3693-3701.
- Vikram, B. (1998) Adjuvant therapy in head and neck cancer. *CA Cancer J Clin*, **48**, 199-209.
- Vikram, B., Strong, E.W., Shah, J.P. and Spiro, R. (1984a) Failure at distant sites following multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg*, **6**, 730-733.
- Vikram, B., Strong, E.W., Shah, J.P. and Spiro, R. (1984b) Second malignant neoplasms in patients successfully treated with multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg*, **6**, 734-737.
- Vokes, E.E., Weichselbaum, R.R., Lippman, S.M. and Hong, W.K. (1993) Head and neck cancer. *N Engl J Med*, **328**, 184-194.
- Volker, M., Mone, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A. and Mullenders, L.H.

- (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell*, **8**, 213-224.
- Wakasugi, M. and Sancar, A. (1999) Order of assembly of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem*, **274**, 18759-18768.
- Walker, M.C., Parris, C.N. and Masters, J.R. (1987) Differential sensitivities of human testicular and bladder tumor cell lines to chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst*, **79**, 213-216.
- Waud, W.R. (1987) Differential uptake of cis-diamminedichloroplatinum (II) by sensitive and resistant murine L1210 leukemia cells. *Cancer Res*, **47**, 6549-6555.
- Welsh, C., Day, R., McGurk, C., Masters, J.R., Wood, R.D. and Koberle, B. (2004) Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer*, **110**, 352-361.
- Williams, S.D., Birch, R., Einhorn, L.H., Irwin, L., Greco, F.A. and Loehrer, P.J. (1987) Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N Engl J Med*, **316**, 1435-1440.
- Wood, R.D. (1996) DNA repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, **65**, 135-167.
- Wood, R.D. (1997) Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem*, **272**, 23465-23468.
- Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J. and Lindahl, T. (2001) Human DNA repair genes. *Science*, **291**, 1284-1289.
- Wood, R.D. and Shivji, M.K. (1997) Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes? *Carcinogenesis*, **18**, 605-610.
- Wu, X., Fan, W., Xu, S. and Zhou, Y. (2003) Sensitization to the cytotoxicity of cisplatin by transfection with nucleotide excision repair gene xeroderma pigmentosum group A antisense RNA in human lung adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res*, **9**, 5874-5879.
- Yagi, T., Matsumura, Y., Sato, M., Nishigori, C., Mori, T., Sijbers, A.M. and Takebe, H. (1998) Complete restoration of normal DNA repair characteristics in group F xeroderma pigmentosum cells by over-expression of transfected XPF cDNA. *Carcinogenesis*, **19**, 55-60.
- Yagi, T., Wood, R.D. and Takebe, H. (1997) A low content of ERCC1 and a 120 kDa protein is a frequent feature of group F xeroderma pigmentosum fibroblast cells. *Mutagenesis*, **12**, 41-44.
- Young, L.C., Campling, B.G., Voskoglou-Nomikos, T., Cole, S.P., Deeley, R.G. and Gerlach, J.H. (1999) Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin Cancer Res*, **5**, 673-680.
- Yu, J.J., Lee, K.B., Mu, C., Li, Q., Abernathy, T.V., Bostick-Bruton, F. and 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**, 555-560.
- Zamble, D.B. and Lippard, S.J. (1995) Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci*, **20**, 435-439.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg, die mir die Durchführung der vorliegenden Dissertation ermöglichte. Insbesondere möchte ich mich für ihr stetes Interesse am erfolgreichen Fortgang der Arbeit und ihre wissenschaftliche Förderung bedanken. Herrn Dr. med. Andreas Albers danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie die vielen hilfreichen Diskussionen. Außerdem möchte ich Dr. rer. nat. Ralph Pries für die „seelische Unterstützung“ und ständige Ansprechbarkeit danken. Allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Forschungslabor und die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Hervorheben möchte ich dabei Frau Nicole Bohnert, die mich zu Beginn mit viel Geduld in die Methodik der Zellkultivierung einarbeitete. Außerdem sei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dr. Björn Wenzel für die gute Zusammenarbeit gedankt. Besonderer Dank gilt auch Frau Beate Thode aus der Klinik für Urologie, die mich immer mit Rat und Tat bei jeglichen Laborfragen unterstützt hat. Den Kollaborationspartnern des Projektes Frau Dr. med. Beate Köberle, Department of Molecular Biology, University of Pittsburgh Cancer Center, USA und Dr. med. Carsten Schaefer, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Mannheim, danke ich für ihre Unterstützung der Arbeit. Herrn PD Dr. med. Ingo Kausch, Klinik für Urologie der Universität zu Lübeck, sei für die zuverlässige Zusammenarbeit und die freundliche Bereitstellung der urologischen Gewebeproben gedankt. Dr. R Grénman, University of Turku, Finnland, Dr. S. Schweyer, Universität Göttingen, und Dr. P.W. Andrews, University of Sheffield, England, danke ich für die Überlassung einiger der untersuchten Testistumor- bzw. HNSCC-Zelllinien.

Der größte Dank gilt meinen Eltern. Ohne ihre Unterstützung wäre das Studium und die Durchführung der Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Sie haben mir stets starken Rückhalt bei allen meinen Entscheidungen gegeben und mich gerade in schwierigen Phasen sehr unterstützt. Meiner Freundin Katja danke ich für das entgegengebrachte Verständnis, ihre große Geduld und die moralische Unterstützung.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zunahme: Claudia Ditz
Geburtsdatum / -ort: 13.12.1978 in Waldbröl, Nordrhein-Westfalen
Eltern: Dipl.-Hdl. Werner Ditz, Studiendirektor
Monika Ditz, Rektorin

Schulbildung

- 1985 - 1989 Grundschule Wiedenhof, Waldbröl
- 1989 - 1998 Hollenberg-Gymnasium, Waldbröl
- 06/1998 Allgemeine Hochschulreife

Praktikum

- 10/1998 - 12/1998 Chirurgisches Pflegepraktikum, Kreiskrankenhaus Waldbröl

Berufsausbildung

- 01/1999 - 12/1999 Lehrgang Rettungsassistent/-in (DAA, Köln)
- 01/2000 - 12/2000 Anerkennungsjahr an der Feuer- und Rettungswache der Stadt Siegburg

Studium der Humanmedizin

- 10/2000 - 09/2002 Vorklinischer Studienabschnitt an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
- 08/2002 Ärztliche Vorprüfung
- 09/2002 - 11/2006 Klinischer Studienabschnitt an der Universität zu Lübeck, Approbation 03.11.2006
- 09/2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 09/2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 11/2006 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

- **10/2005 - 02/2006** Klinik für Neurochirurgie, Universität zu Lübeck
- **02/2006 - 05/2006** Medizinische Klinik III: Pulmologie und Medizinische Klinik I: Gastroenterologie, Universität zu Lübeck
- **05/2006 - 09/2006** Texas Heart Institute, University of Texas Medical School at Houston, USA: Herzchirurgie, Klinik für Chirurgie, Universität zu Lübeck: Allgemeinchirurgie

Promotion und Berufstätigkeit

- **2004 - 2007** Experimentelle Studie zur Anfertigung der Doktorarbeit im Forschungslabor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universität zu Lübeck unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. B. Wollenberg
- **Seit 12/2006** Assistenzärztin an der Klinik für Neurochirurgie der Universität zu Lübeck

Präsentationen und Veröffentlichungen

Ditz C., Koeberle B., Bohnert N., Wollenberg B. and Albers A., Bedeutung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur für die Chemoresistenz von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, *76. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e. V., Erfurt 2005, Poster 623*

Ditz C., Koeberle B., Schaefer C., Pries R., Wollenberg B. and Albers A., Relevance of Nucleotide Excision Repair for Cisplatin-Induced Chemoresistance in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, *GMS Curr Posters Otorhinolaryngol Head Neck Surg 2005;1:Doc090*

Ditz C., Koeberle B., Schaefer C., Pries R., Wollenberg B. and Albers A., Chemoresistenz von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC): Differenzielle Expression von Nukleotid-Exzisions-Reparatur-Proteinen (NER), *6. Jahrestagung der Norddeutschen Gesellschaft für Otorhinolaryngologie und zervikofaziale Chirurgie, Hamburg 2006, Vortrag 63*

Ditz C., Schaefer C., Koeberle B., Kausch I., Pries R., Wollenberg B. and Albers A., Chemoresistenz von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC): Biologische und klinische Signifikanz der Nukleotid-Exzisions-Reparatur

(NER), *77. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e. V., Mannheim 2006, Poster 643*

Ditz C., Kausch I., Koeberle B., Pries R., Wollenberg B. and Albers A., Relevance of Nucleotide Excision Repair of Cisplatin-Induced Chemoresistance in Testis Cancer compared to Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (SCCHN), *58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., Hamburg 2006.*

Pries R., Hogrefe L., Xie L., Frenzel H., Brocks C., **Ditz C.** and Wollenberg B., Induction of c-Myc-dependent cell proliferation through toll-like receptor 3 in head and neck cancer. *Accepted for publication, 2007*