

Identifizierung und Evaluierung von GDF15 als resistenzvermittelnder Faktor in der Carboplatintherapie anhand der humanen Ovarialkarzinommodelle A2780 und A2780cis

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Julia Meier

aus Potsdam

2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Onkologie der Bayer Pharma AG im Zeitraum von Dezember 2009 bis Mai 2013 unter der Leitung von Dr. Charlotte Kopitz und Dr. Bernard Haendler angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Bernard Haendler

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am _____15.05.2014_____

Danksagung

Ich bedanke mich bei Dr. Charlotte Kopitz für die außerordentliche Betreuung meiner Doktorarbeit über die letzten dreieinhalb Jahre. Mit ihr konnte ich jegliche wissenschaftliche Fragestellung besprechen. Ich bedanke mich für ihre Offenheit und Geduld.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Bernard Haendler für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit. Bei ihm hatte ich die Möglichkeit bei wissenschaftlichen Fragestellungen kreative Ansätze zu finden.

Ich möchte mich natürlich auch für die die Begutachtung der Arbeit bei Prof. Rupert Mutzel bedanken.

Auch Karola Henschel, Bianka Timpner und Katrin Jänsch waren mir in den drei Jahren immer eine hilfreiche technische Hand gewesen, wenn z. B. die Handhabung der Tierexperimente mal nicht so klappen wollte.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Anette Sommer. Sie stand stets für einen wissenschaftlichen Rat beiseite.

Natürlich bedanke ich mich auch bei allen Doktoranden der Bayer Pharma AG. Mit dem *PhD discussion table*, der Organisation der *Postersession* und unseren vielen freundschaftlichen Reisen waren mir diese Jahre eine große Freude. Insbesondere danke ich meiner Labornachbarin Roberta Schmieder, die immer mit Rat und Tat beiseite stand.

Außerdem bedanke ich mich bei meinem Abteilungsleiter Dr. Bertolt Kreft für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können. Ein weiterer Dank gilt natürlich auch allen anderen Wissenschaftlern der Bayer Pharma AG in Berlin für die tiefgründige Unterstützung in bestimmten Fachgebieten der Onkologie.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und Fabian, die meinen Weg hierhin so wunderbar und mit vollem Herzen unterstützt haben. Sie haben mir viel Kraft und immer wieder neuen Mut gegeben.

Für meine Familie und Fabian

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	viii
1. Einleitung	1
1.1. Krebs: Einleitung und Begriffsbestimmung	1
1.2. Eierstockkrebs.....	2
1.2.1. Diagnose und Prognose	2
1.2.2. Klassifikation und „Staging“	4
1.2.3. Entstehung und molekulare Ursache.....	5
1.2.4. Therapie des Ovarialkarzinoms	7
1.3. Platinkomplexe	8
1.3.1. Platinvermittelte Zytotoxizität	8
1.3.2. Resistenz gegenüber der Platintherapie	11
1.3.3. Molekulare Ursachen der Platinresistenz.....	12
1.4. PI3K-AKT im Ovarialkarzinom	15
1.4.1. PI3K-AKT-Signaltransduktion	16
1.4.1. AKT und Platinresistenz.....	17
1.4.2. Zielgerichtete AKT-Inhibition	18
1.5. Die TGF-β-Superfamilie im Ovarialkarzinom.....	19
1.5.1. TGF- β -Signaltransduktion	19
1.5.2. GDF15 - ein heterogenes Mitglied der TGF- β -Superfamilie	20
1.5.3. GDF15 - Funktion und Expression im Gewebe.....	20
1.5.4. GDF15 - genetische Struktur und Signaltransduktion	21
1.5.5. GDF15 im Ovarialkarzinom.....	23
1.5.6. GDF15 und Chemotherapieresistenz.....	23
1.6. Immuntherapien und targetierte Therapien.....	24
1.7. Ziel der Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Material	26
2.1.1. Geräte.....	26
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3. Chemikalien, Reagenzien und Lösungen.....	28
2.1.4. Fertigungssysteme (<i>Kits</i>)	30
2.1.5. ELISA und <i>Multiplex-Assays</i>	30
2.1.6. Medien und Zusätze für die Zellkultur	31
2.1.7. Zelllinien	31

2.1.8. Patientenabgeleitetes Gewebe.....	32
2.1.9. Antikörper.....	33
2.1.10. Puffer und andere Lösungen	34
2.1.11. Mausmodell	35
2.1.12. <i>TaqMan</i> ®-Assays.....	35
2.1.13. siRNA (<i>small interfering RNA</i>).....	36
2.1.14. Lentivirale Konstrukte	36
2.1.15. Sonstiges.....	37
2.1.16. <i>Software</i>	37
2.2. Methoden.....	38
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1.1. Isolation, Konzentrationsbestimmung und Qualitätsüberprüfung von RNA	38
2.2.1.2. cDNA-Synthese	38
2.2.1.3. Semiquantitative <i>Real-Time PCR</i> (<i>qRT-PCR</i>).....	39
2.2.1.4. <i>Illumina Whole Genome Bead Chip Array (HT-12v3)</i>	40
2.2.1.5. siRNA-vermittelte RNA-Herunterregulation.....	40
2.2.1.6. shRNA-vermittelte RNA-Herunterregulation	41
2.2.1.7. shRNA-Transduktion und puromycinvermittelte Selektion	42
2.2.2. Zellbiologische Methoden	42
2.2.2.1. Auftauen von Zellen, Routinekultivierung, Einfrieren von Zellen	42
2.2.2.2. Zelltitrierbestimmung.....	43
2.2.2.3. IC ₅₀ -Bestimmung und Kombinationsassay	43
2.2.2.4. <i>xCELLigence</i> TM -Assay	44
2.2.2.5. Migrationsassay.....	45
2.2.2.6. FACS - Propidiumiodid.....	45
2.2.2.7. Koloniebildungsassay	46
2.2.3. <i>In vivo</i> Methoden.....	46
2.2.3.1. Tumorzellinokulation in <i>SCID</i> -Mäuse.....	47
2.2.3.2. Kurzzeittherapie mit Carboplatin	47
2.2.3.3. Langzeittherapie (I) mit Carboplatin	48
2.2.3.4. Langzeittherapie (II) mit Carboplatin	48
2.2.4. Biochemische Methoden	49
2.2.4.1. Herstellung von Zelllysaten und Gewinnung des Mediumüberstandes.....	49
2.2.4.2. Gewinnung von Tumorlysaten	50
2.2.4.3. BCA-Proteinbestimmung	50
2.2.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und „ <i>Westernblotting</i> “	50
2.2.4.5. <i>Proteom Profiler Array</i>	52
2.2.4.6. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	52
2.2.4.7. <i>Meso Scale Discovery (MSD) Assay</i>	53
2.2.5. Histologische Methoden	54

2.2.5.1. Herstellung von Gefrierschnitten	54
2.2.5.2. Herstellung von Paraffinschnitten	54
2.2.5.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H & E)	55
2.2.5.4. Immunhistochemische (IHC) Färbungen.....	55
2.2.5.5. TUNEL-(<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>)-Assay.....	57
2.2.5.6. Dokumentation und Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen.....	57
2.2.6. Bioinformatische Methoden	58
2.2.6.1. <i>Genedata Analyst 7.6</i>	58
2.2.6.2. <i>Pathway enrichment analysis</i>	58
2.2.7. Statistische Methoden	58
2.2.7.1. Lineares Modell	58
2.2.7.2. Modifizierung der Kaplan-Meier-Analyse	59
2.2.7.3. <i>t</i> -Test.....	59
2.2.7.4. <i>N-Way-ANOVA (Analysis of Variance)</i>	60
3. Ergebnisse	61
3.1. Effekte der Carboplatintherapie in humanen Ovarialkarzinomzelllinien	
A2780 und A2780cis <i>in vitro</i>	61
3.1.1. A2780cis-Zellen sind kreuzresistent gegenüber der Carboplatintherapie	61
3.1.2. Verminderter Zellzyklusarrest in A2780cis nach Carboplatintherapie.....	62
3.1.3. Erhöhte Migration von A2780cis in einem FBS-Gradienten nach Carboplatintherapie.....	64
3.2. Effekte der Carboplatinkurzzeittherapie in subkutanen A2780- und	
A2780cis-Tumoren <i>in vivo</i>.....	65
3.2.1. Langsameres Tumorwachstum von A2780cis in <i>SCID</i> -Mäusen.....	65
3.2.2. Geringere Apoptoseinduktion in subkutanen A2780cis-Tumoren nach Carboplatintherapie	66
3.2.3. Verminderte Infiltration von Immunzellen in A2780cis-Tumoren.....	68
3.2.4. P21-vermittelter Zellzyklusarrest in A2780-Tumoren nach Carboplatintherapie.....	69
3.2.5. Erhöhte AKT-Phosphorylierung in A2780cis-Tumoren nach Carboplatintherapie.....	70
3.3. Evaluierung resistenzabgeleiteter Faktoren in A2780 und A2780cis	
<i>in vivo</i>	72
3.3.1. Expressionsanalyse carboplatininduzierter Gene in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden	
.....	72
3.3.2. Expressionsanalyse carboplatininduzierter Gene im Prozess der Seneszenz	74
3.3.3. Expressionsanalyse carboplatininduzierter Gene im Prozess der Apoptose	75
3.3.4. Identifizierung potentiell „neuer“ resistenzvermittelnder Faktoren	77
3.3.5. Evaluierung potentiell „neuer“ resistenzvermittelnder Faktoren.....	78
3.3.5.1. Lamin A/C	78
3.3.5.2. Prolyl-4-hydroxylase, alpha polypeptide II.....	80
3.3.5.3. DNA-damage regulated autophagy modulator 1	81

3.3.5.4. Sulfatase 2	82
3.3.5.5. Growth differentiation factor 15.....	83
3.3.5.6. Zusammenfassung der differentiellen Expression potentiell resistenzabgeleiteter Gene	85
3.4. Basal erhöhte RNA- und Proteinexpression von GDF15 in A2780cis-Tumoren unter Carboplatinlangzeittherapie.....	85
3.5. Charakterisierung von GDF15 in malignen Ovarialzelllinien und primären Ovarialkarzinomgeweben	87
3.5.1. Carboplatininduzierte GDF15-Proteinexpression und Sekretion in PA-1-Zelllinien <i>in vitro</i> ...	87
3.5.2. Erhöhte GDF15-Proteinexpression in primären Ovarialkarzinomgeweben	88
3.6. Funktionelle Charakterisierung von GDF15 in A2780cis <i>in vitro</i>	89
3.6.1. Einfluss der siRNA-vermittelten GDF15-RNA-Herunterregulation auf die Expression von SULF1 und DRAM1.....	90
3.6.2. Etablierung stabiler shGDF15-A2780cis-Zelllinien.....	91
3.6.3. Analyse der Kolonisierungseigenschaften von shGDF15-A2780cis-Zellen <i>in vitro</i>	92
3.6.4. Erhöhte Migration von shGDF15-A2780cis-Zellen in einem FBS-Gradienten	93
3.6.5. Analyse der Proliferation von shGDF15-A2780cis-Zellen nach Carboplatintherapie	94
3.7. GDF15-vermittelte AKT-Signaltransduktion	95
3.7.1. Geringere Expression und Phosphorylierung von AKT in shGDF15-A2780cis-Zellen.....	95
3.7.2. Analyse der Proliferation von A2780 und A2780cis unter AKT-Inhibition	96
3.7.3. Analyse der Proliferation von shGDF15-Zelllinien unter AKT-Inhibition.....	98
3.7.4. Verminderte Expression und Sekretion von GDF15 unter AKT-Inhibition.....	99
3.8. Funktionelle Charakterisierung von GDF15 in A2780cis <i>in vivo</i>	100
3.8.1. Evaluierung der Sekretion und Proteinexpression von GDF15 in subkutanen shGDF15-A2780cis-Tumoren	100
3.8.2. Basal erhöhtes Tumorwachstum von shGDF15-A2780cis.....	101
3.8.3. Veränderte Morphologie von shGDF15-A2780cis-Tumoren.....	103
3.8.4. Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion in shGDF15-A2780cis-Tumoren nach Carboplatinlangzeittherapie	105
3.8.5. Erhöhte Expression von p27 und p16 in shGDF15-A2780cis-Tumoren	109
4. Diskussion	111
4.1. A2780cis - ein geeignetes Modell für die Analyse der Carboplatinresistenz ...	111
4.2. Subkutane A2780cis-Tumoren wachsen langsamer	113
4.3. Hauptfaktoren in der A2780cis-Chemotherapieresistenz: P53 und AKT	113
4.4. A2780cis-Tumoren befinden sich in einem „Ruhezustand“	116
4.5. Das Lineare Modell ermöglicht die Identifizierung resistenzabgeleiteter Faktoren	119
4.6. GDF15, SULF2 und DRAM1 stehen zueinander in Relation	125

4.7.	GDF15 fungiert als Biomarker im Ovarialkarzinom.....	126
4.8.	GDF15 - ein Tumorsuppressorgen in A2780cis?	128
4.9.	GDF15-vermittelte AKT-Regulation – ein Überlebensmechanismus für A2780cis	129
4.10.	GDF15 ist verantwortlich für ein verlangsamtes Tumorwachstum	131
4.11.	GDF15 trägt zu der Resistenz von A2780cis-Tumoren bei	133
4.12.	Ein Zusammenspiel von GDF15 und P27: potentielle Ursache der Carboplatinresistenz in A2780cis	135
4.13.	Modell zu der GDF15-vermittelten Carboplatinresistenz in A2780cis.....	136
5.	Ausblick.....	137
6.	Zusammenfassung.....	138
7.	Summary.....	139
8.	Literaturverzeichnis.....	141
9.	Publikationen.....	155
10.	Lebenslauf.....	156

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgemeinschaft
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AS	Aminosäure
ATP / ADP	Adenosintriphosphat / Adenosindiphosphat
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
d. h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbrüche
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
etc.	<i>et cetera</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FBS	Fötales Bovines Serum
FDR	<i>false discovery rate</i> , Falschpositivrate
FIGO	<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>

ggf.	gegebenenfalls
GO	<i>Gene Ontology</i>
H & E	Hämatoxylin und Eosin
i. v.	intravenös
ICD	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
KI	Kombinationsindex
lat.	Latein
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> , Verlust der Heterozygotie
MMR	<i>DNA-Mismatch repair</i> , DNA-Basenfehlpaarungsreparatur
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
NADP	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NER	<i>Nucleotide excision repair</i> , Nukleotidexzisionsreparatur
nl, µl, ml, l	Nano-, Mikro-, Milliliter, Liter
nm, cm, mm, m	Nano-, Zenti-, Millimeter, Meter
nM, mM, M	Nano-, Millimolar, Molar
NSAID	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>
OSE	<i>Ovarian surface epithelium</i> , Oberflächenepithel des Ovars
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pg, ng, µg, mg, g	Piko-, Nano-, Mikro-, Milligramm, Gramm
PIP2/PIP3	Phosphatidylinositol-bis/tris-bisphosphat
Pt	Platinkomplex
qRT-PCR	<i>quantitative Real-Time PCR</i>

RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s, min, h	Sekunde, Minute, Stunde
s. c.	subkutan
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i> , schwerer kombinierter Immundefekt
shRNA / siRNA	<i>small hairpin RNA</i> , <i>small interfering RNA</i> ,
T/C	<i>Treatment/Control</i> , Behandlung/Kontrolle
TRC	<i>The RNAi Consortium</i> , Das RNAi Konsortium
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
U	<i>Unit</i>
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
untransd.	untransduziert
UV/VIS	Ultraviolett/ <i>Visible</i> (sichtbar)
WB	<i>Westernblot</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
z. T.	zum Teil
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Krebs: Einleitung und Begriffsbestimmung

Krebs ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Jeder zweite Mann (51 %) und 43 % aller Frauen müssen laut Hochrechnung des Robert-Koch-Instituts derzeit damit rechnen, an Krebs zu erkranken. Die Diagnose „Krebs“ wird bis heute trotz des medizinischen Fortschrittes mit Hoffnungslosigkeit und einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht. Dabei konnte mit der Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien und verbesserter diagnostischer Hilfsmittel sogar die Heilung von einigen Krebsarten erreicht werden. Dennoch bleiben einige Krebsarten, wie Eierstockkrebs, in fortgeschrittenen Stadien und bei der Entwicklung einer Chemotherapieresistenz nahezu unbehandelbar [1].

Krebs ist eine Erkrankung, die von einem Tumor (lat. *tumor*: Schwellung) verursacht wird. Unter einem Tumor versteht man die Neubildung oder Neoplasie von Körpergewebe durch dereguliertes Wachstum. Dabei können Tumoren klonalen Ursprungs sein, bei dem sich eine Körperzelle durch Mutationen Eigenschaften aneignet, die zu einem Überlebens- und Wachstumsvorteil führen. Das Modell der Tumorstammzelle beschreibt hingegen, dass eine oder wenige Tumorzellen aus der schrittweisen Veränderung von Gewebstammzellen hervorgehen. Gewebstammzellen haben die Eigenschaft zur Regenerationsfähigkeit, Proliferation und Differenzierung. So haben die daraus hervorgehenden „Tumorstammzellen“ die Eigenschaft zu einer erhöhten Selbsterneuerung, die z. B. das Überleben in der Chemotherapie ermöglicht.

Des Weiteren wird die Ausbreitung von Tumorzellen im Organismus als maligne Progression bezeichnet. Deregulationen sogenannter Onkogene und Tumorsuppressorgene in den Tumorzellen tragen dazu ganz entscheidend bei. Onkogene sind Gene, die z. B. durch Mutationen aktiviert werden und den Prozess der malignen Progression unterstützen. Während der Verlust der Genfunktion bei Tumorsuppressorgen zu einem malignen Phänotyp führt.

Von einem *Carcinoma in situ* (CIS), bei dem bereits polymorphe, sich teilende Zellen vorliegen, entwickelt sich das Karzinom durch den Verlust der Gewebestruktur und einem abnehmenden Differenzierungsgrad. Das Karzinom entsteht dabei definitionsgemäß aus Epithelien und Sarkome aus Mesothelien. Während des Tumorwachstums entstehen außerdem sauerstoffarme (hypoxische) Bereiche im Tumor. Dies führt zum Auswandern der Zellen in umliegende Gewebe (Invasion), wobei die Tumorzellen in Kontakt mit der Tumorumgebung (Stroma) treten können. Des Weiteren kann die Aussendung von Botenstoffen zu einer Neubildung von Blutgefäßen im

Tumor führen (Angiogenese). Der anschließende Einbruch in die Blut- oder Lymphgefäße setzt dabei den Verlust der Zell-Zell-Kontakte voraus. Die Konsequenz ist der Prozess der Metastasierung, bei dem Tochtergeschwülste aus den Zellen des Primärtumors entstehen [2, 3].

1.2. Eierstockkrebs

Eierstockkrebs ist die vierthäufigste maligne Erkrankung des gynäkologischen Traktes und die häufigste Todesursache bei Frauen mit gynäkologischen Krebserkrankungen in den westlichen Ländern [4]. Die aktuelle EUCAN-Studie der *World Health Organization* (WHO) prognostizierte für das Jahr 2012 eine Inzidenzrate von 10,2 Neuerkrankungen pro 100 000 Frauen und eine Mortalitätsrate von 7,0 pro 100 000 Frauen für Deutschland. Damit ist Eierstockkrebs in Deutschland die siebthäufigste Todesursache aller Krebserkrankungen [1, 5]. Das mittlere Diagnosealter liegt bei 69 Jahren, wobei die Neudiagnostizierungen vor allem auf die Lebensabschnitte nach der Menopause fallen. Trotz einer Stabilisierung der Inzidenz- und Mortalitätsraten in den letzten Jahren und einer nahezu Verdopplung der 5-Jahres-Überlebensrate durch verbesserte Diagnostik- und Chemotherapieverfahren, bleibt das Ovarialkarzinom eine der schwerwiegendsten Krebserkrankungen weltweit (Abbildung 1.1.) [6].

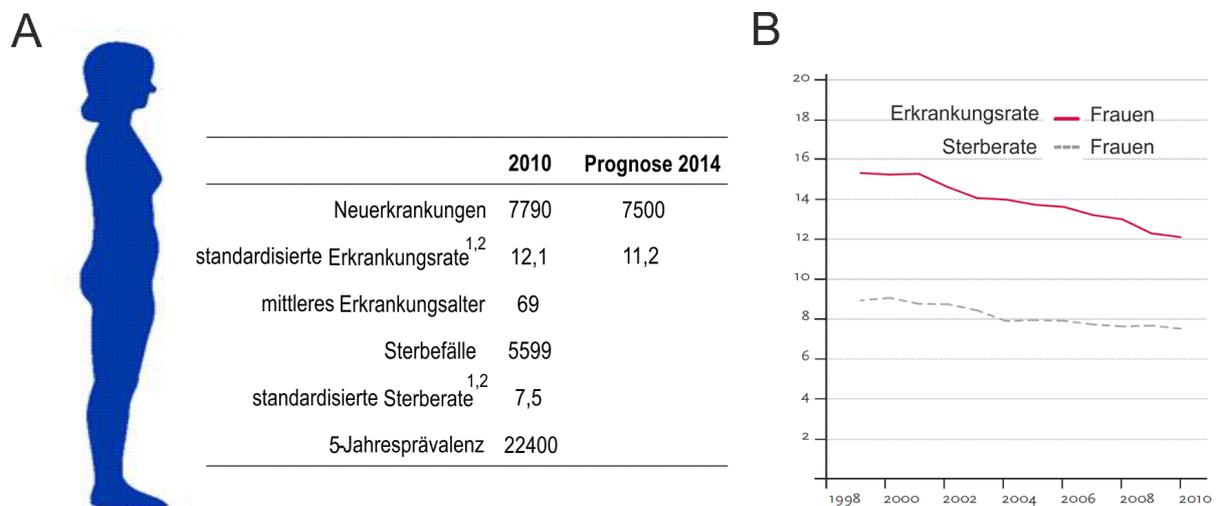


Abbildung 1.1. Epidemiologie von Eierstockkrebs in Deutschland. (A) Mediane Neuerkrankungen und Sterbefälle im Jahr 2010 mit Prognose für das Jahr 2014, ¹ je 100 000 Personen, ² Median (B) Graphische Darstellung der Erkrankungs- sowie Sterberate je 100 000 Personen in den Jahren 1998 – 2010. Ein leichter absteigender Trend ist zu verzeichnen. Abbildung verändert nach Laudi A. *et al.*, Krebs in Deutschland 2012 [1].

1.2.1. Diagnose und Prognose

Eierstockkrebs bekannt als der „*Silent Killer*“, verläuft bis in das fortgeschrittene Stadium asymptomatisch oder ist zumeist von unspezifischen, gastrointestinal-urogenitalen Symptomen

begleitet. Deshalb erfolgt die Diagnose oft zu spät, und die Patientinnen befinden sich bereits im fortgeschrittenen Stadium der Krebserkrankung. Die Diagnose zum Eierstockkrebs wird über die Laparoskopie und über die Bestimmung der CA125-Konzentration im Blutplasma (> 35 U/ml) vorgenommen. Allerdings exprimieren nur 20 % der Patientinnen dieses Antigen [7, 8]. Aus diesem Grund ist die Bestimmung von CA125 allein nicht ausreichend. Andere Marker wie das 110-kDa-Fragment vom Epidermalen Wachstumsfaktor (sEGFR, *soluble epidermal growth factor receptor*), das Lipoprotein A (LPA, *lipoprotein, Lp(a)*) sowie Prostatin, Osteopontin und die humanen Kallikreine 6 und 10 können mit relativ geringem Aufwand in einem Multiplex-ELISA gemessen werden und gelten daher als besonders vielversprechend [8-11]. Des Weiteren werden die ovariellen Neoplasien während der chirurgischen Entnahme anhand der Ausbreitung des Tumors im Körper eingestuft (FIGO, *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) (Tabelle 1.1.) [12]. Ist der Tumor auf die Ovarien beschränkt, ist die Chance auf Heilung relativ hoch. Sobald der Eierstockkrebs jedoch streut, sinken die Überlebenschancen rapide [13].

Tabelle 1.1. Einteilung des Tumorgrades nach FIGO bezüglich der Invasivität von Eierstockkrebs [14].

FIGO/ Stadium	Charakteristikum	5-Jahres- Überlebensrate
IA,B,C	Tumorwachstum auf die Ovarien begrenzt	92 %
IIA,B,C	Tumorwachstum in einem oder beiden Ovarien mit Ausbreitung in den Beckenbereich	55,1 %
IIIA,B,C	Tumor in einem oder beiden Ovarien und/oder mit retroperitonealen oder inguinalen Knoten. Oberflächliche Lebermetastasen. Tumor ist auf den Beckenbereich begrenzt, zeigt jedoch eine maligne, histologische Ausbreitung in den Dünndarm und das Omentum.	21,9 %
IV	Tumorwachstum involviert eine oder beide Ovarien mit Metastasierung in entfernte Organe. Pleurale Effusionen und Metastasen im Leberparenchym.	5,6 %

Ovariale Neoplasien entstehen hauptsächlich sporadisch, wobei ca. 5 - 10 % der Fälle erblichen (hereditären) Ursprungs sind [15]. Bei dem hereditären Ovarialkarzinom sind vor allem Mutationen bei Genen in der DNA-Reparatur häufig. Hierzu zählen z. B. *BRCA1* und *BRCA2* (*breast cancer 1, 2*) sowie die „DNA mismatch repair“-(*MMR*)-Gene *MSH1* (*mutS homolog 1*) und *PMS1/2* (*postmeiotic segregation increased 1/2*). Die Entstehung des Ovarialkarzinoms wurde außerdem mit dem Li-Fraumeni-Syndrom über eine *P53*-Mutation (*tumor protein P53*) in Keimzellen in Verbindung gebracht. Neben wenigen epidemiologischen Risikofaktoren und Karzinogenen ist die Reproduktionshistorie der Frau ein besonders starker Prädiktor für die Entstehung von Eierstockkrebs [16]. Pearce *et al.* dokumentierte hierzu, dass die Verwendung einer Östrogen-Ersatztherapie über fünf Jahre, das Risiko an Eierstockkrebs zu erkranken um 22 % und bei einer Östrogen-Progestin-Kombinationsersatztherapie um 10 % steigert [17]. Die

regelmäßige Einnahme von Kontrazeptiva, eine erhöhte Parität und die Entfernung der Eierstöcke (Oophorektomie) bzw. der Gebärmutter (Hysterektomie) wirken hingegen präventiv [18, 19].

1.2.2. Klassifikation und „Staging“

Eierstocktumoren sind auf zellulärer sowie molekularer Ebene sehr heterogen. Neunzig Prozent der primären Eierstocktumoren sind epithelial (Ovarialkarzinom) und entwickeln sich hauptsächlich aus dem Oberflächenepithel des Eierstocks, der Inklusionszysten, der Eileiter, der Bauchhöhle oder von Ablagerungen aus endometrioidem Gewebe [20]. Die restlichen nicht-epithelialen 10 % der Eierstockkrebsarten entstehen durch Mutationen in Stroma-, Granulosa- oder Keimzellen [21]. Des Weiteren werden die Ovarialkarzinome anhand des Entstehungsortes im weiblichen Reproduktionstrakt und den Derivaten des Müllerischen Systems, in verschiedene histologische Subtypen klassifiziert. Diese Histologien werden als muzinös, endometriod, klarzellig, gemischt, undifferenziert oder nach „Brenner“ (Brenner-Histologie) bezeichnet. Dabei weisen insgesamt 75 % aller Ovarialkarzinome eine seröse Histologie auf [22]. In den letzten Jahren wurde auf der Grundlage des Tumordifferenzierungsgrades, der Invasivität und der molekularen Entstehungsgeschichte eine weitere Unterteilung der Ovarialkarzinome vorgenommen (Abbildung 1.2.):

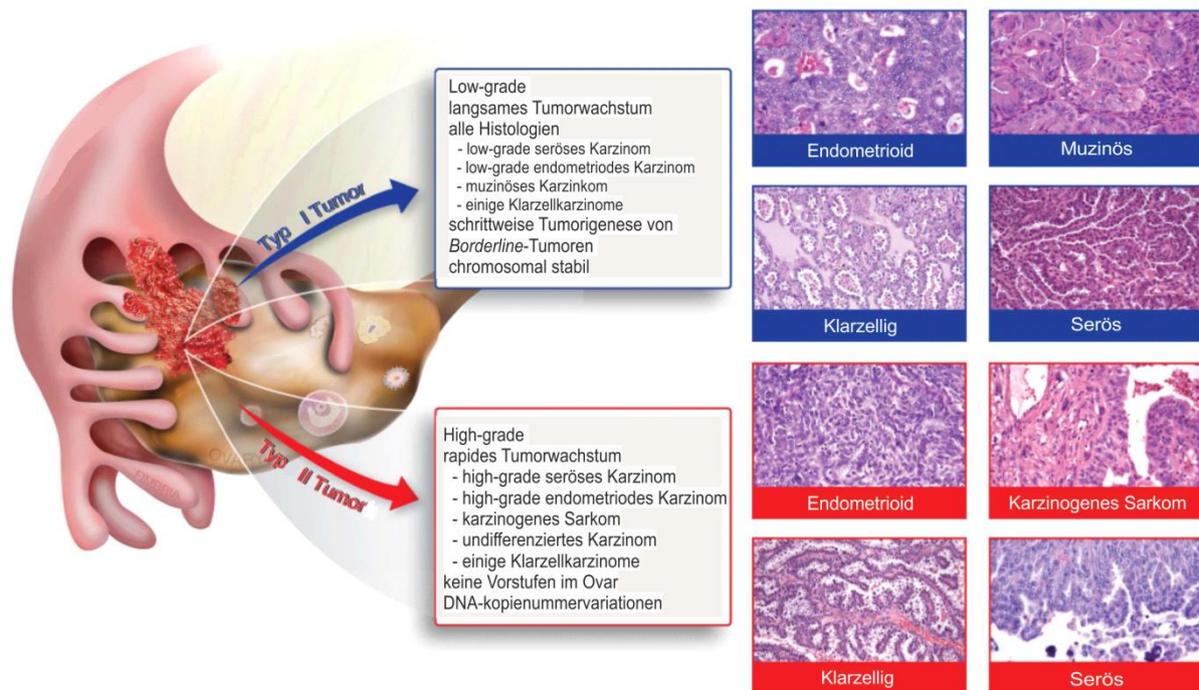


Abbildung 1.2. Histologische Klassifikation des Ovarialkarzinoms. Neben der histologischen Einteilung nach dem Ursprungsgewebe im Ovar werden die epithelialen Ovarialtumore zusätzlich anhand ihrer Entstehungsgeschichte, der Invasivität und des genetischen Profils unterschieden: Typ I und Typ II Ovarialkarzinome. Abbildung verändert nach Jones *et al.* [23].

- Typ I oder „*Low-Grade*“-Ovarialkarzinome: Schrittweise Entwicklung aus Vorgängerknoten („*Borderline*“-Tumoren) mit einem definierten Histologietyp und einem stabilen genetischen Profil. Dabei treten Mutationen von *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), *PI3KCA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit α*), *ERBB2* (*v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*) und selten von *P53* auf. Sie sind zumeist auf die Ovarien beschränkt.
- Typ II oder „*High-Grade*“-Ovarialkarzinome: Gehen direkt aus benignen Ovarialgewebe hervor und weisen *P53*-Mutationen (*P53*-Signaturen), sowie *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationen, einen Verlust der Heterozygotie (*LOH*, *Loss of heterozygosity*) der Chromosomen 7 und 9 und ein rapides Tumorwachstum auf [24].

Gut-differenzierte Ovarialtumoren haben im Allgemeinen eine bessere Prognose aufgrund ihrer diploiden Chromosomensätze und geringerer Veränderungen der DNA-Kopien [25].

1.2.3. Entstehung und molekulare Ursache

Der Ursprung ovarialer Neoplasien ist bis heute unbekannt [26]. Es wird allgemein angenommen, dass Ovulationen, folliculäre Rupturen, Eizellentlassungen, Zytokinexpositionen und die Disposition mit reaktiven Sauerstoffradikalen zur Akkumulation von DNA-Brüchen (DNA, *desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure) und Mutationen führen. Dies kann schließlich zu der Transformation von gesunden Ovariepithelzellen führen [27]. Zellen aus dem Oberflächenepithel des Ovars sind im Allgemeinen ruhend („*quiescent*“), jedoch nach dem Prozess der Ovulation für eventuelle Geweberupturen durch den Eisprung proliferativ aktiv. Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen oder die Überexpressionen von Onkogenen können hierbei die Transformation gesunder Zellen einleiten und schließlich zum Ovarialkarzinom führen.

Tumorsuppressorgene

Das Hauptcharakteristikum ovarialer Tumoren ist die Mutation des Tumorsuppressorgens *P53*. Patientinnen weisen dabei zu 50 – 60 % in fortgeschrittenen Stadien und zu 15 % in den frühen Stadien I-II eine *P53*-Mutation im Tumorgewebe auf [28, 29]. Typ II Ovarialkarzinome beinhalten sogar bis zu 96 % der Fälle eine *P53*-Mutation [30, 31]. *MDM2*, eine E3-Ubiquitin-Ligase, welche für den proteasomalen Abbau von *P53* zuständig ist, ist zusätzlich zu einem Drittel in allen ovarialen Neoplasien überexprimiert. Der Verlust der Heterozygotie, der DNA-Methylierung und die transkriptionale Herunterregulation von *ARH1* (*low density lipoprotein receptor adaptor protein 1*), einem Homolog der Onkogene *RAS* und *RAP* mit proapoptotischer

Funktion, wurde ebenfalls als ursächlich für die Entstehung des Ovarialkarzinoms beschrieben [32].

Onkogene

Auch diverse Onkogene spielen eine wichtige Rolle im Ovarialkarzinom [33]. Hierbei ist insbesondere die Überexpression von HER-2 (ERBB2), einem Mitglied der transmembranen Tyrosinkinase der HER-Familie, zu erwähnen. HER-2 ist in 12 - 15 % der ovariellen Neoplasien überexprimiert und korreliert mit einer schlechten Prognose [34]. Im Gegensatz dazu korreliert ein Verlust von *EGFR*, ebenfalls ein Mitglied der HER-Familie, zu 30 % der Fälle mit einer guten Prognose [35]. Des Weiteren sind *RAS*-Mutationen besonders häufig in muzinösen und in „Borderline“-Ovarialtumoren [36]. Der Transkriptionsfaktor MYC ist ebenfalls bis zu 33 % der Fälle überexprimiert [37]. Als besonders dominierend gelten Abnormalitäten (70 %) der PI3K-AKT-Signaltransduktion (AKT, *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*). *Orsulic et al.* zeigten mit einem transgenen Mausmodell für ovariale Neoplasien, dass eine *P53*-Mutation mit der Aktivierung von jeweils zwei der Onkogene MYC (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*), *KRAS* oder *AKT* ausreichte, um Eierstocktumoren orthotop, intraperitoneal und subkutan zu induzieren [38].

Autokrine Faktoren

Autokrine Faktoren wie der Epidermale Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*), TGF- α/β (TGF- α/β) (*transforming growth factor, α , β*), TNF- α (*tumor necrosis factor α*), IL-1, 6, 8 (*interleukin 1, 6, 8*), M-CSF (*colony stimulating factor 1 (macrophage)*) und LPA können ovariale Epithelzellen unterschiedlich beeinflussen und transformieren. So ist der Verlust des wachstumshemmenden Faktors *TGFB1* (TGF- β) ein häufiges Ereignis in ovariellen Neoplasien [39]. Ambivalente Funktion beinhaltet auch das Zytokin TNF- α , welches die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen inhibieren, verändern oder fördern kann [40, 41]. Die IL-6 Überexpression stimuliert autokrin die IL-6-Rezeptorvermittelte JAK2-STAT3-Signaltransduktionsachse (*Janus kinase 2, signal transducer and activator of transcription 3*). Das kann zu der Inhibition des programmierten Zelltodes (Apoptose) und der Angiogeneseinduktion im Ovarialkarzinom führen [42]. Außerdem ist in mehr als 50 % der diagnostizierten Ovarialkarzinome eine durch Zytokine (IL-1, TNF- α) und anderen Wachstumsfaktoren (EGF) vermittelte konstitutiv aktivierte NF- κ B-Signaltransduktion (*nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells*) zu detektieren [43, 44].

Weitere zelluläre Prozesse

Eine erhöhte Proliferation von Ovarialkarzinomzellen ist vor allem auf die Hochregulation der Cycline D1, E1, E2F1 und der cyclin-abhängigen Kinase (CDK) CDK2 sowie der

Herunterregulation der CDK-Inhibitoren P16 (CDKN2A, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), P21 (CDKN1A, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) und P27 (CDKN1B, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) zurückzuführen [45]. Des Weiteren ist die Expression des apoptoseinduzierenden Rezeptors CD95 (FAS, *Fas cell surface death receptor*) zu 85 % auf den Inklusionszysten, zu 35 % in „Borderline“-Tumoren, aber nur noch zu 4 % in invasiven ovarialen Tumoren wiederzufinden [46]. Überexpressionen der antiapoptotischen Gene BCL2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*), BCLX (*BCL2-like 1*) und BIRC5 (*baculoviral IAP repeat containing 5*) sind ebenfalls in mehr als 70 % der invasiven Ovarialkarzinome nachweisbar.

Metastasierung

Wie bei anderen epithelialen Tumoren kann die Metastasierung hämatologisch über das lymphatische System und den Nierenhilus stattfinden. Das häufigste Metastasierungsereignis findet jedoch über die Oberfläche des Peritoneums statt. Dabei verteilen sich die Tumorzellen nach dem Durchbruch der Gewebekapsel der Ovarien durch die Bauchraumflüssigkeit in das Becken und setzen sich schließlich am Bauchfell (Peritoneum) fest. Dies führt zu einem intestinalen Verschluss und zu einer Ansammlung von Tumorzellen und Immunzellen in der Bauchraumflüssigkeit (Aszites) [47]. Signaltransduktionskaskaden wie RAS-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PI3K-AKT-p70S6K (*RPS6KB1, ribosomal protein S6 kinase, 70 kDa, polypeptide 1*) sowie STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) werden durch die Faktoren VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*), EGF, Heregulin, HGF (*hepatocyte growth factor*), BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*), TNF- α und LPA aktiviert. Dies führt zu einer erhöhten Motilität und Invasivität der Tumorzellen [48]. Die direkte Bindung von Integrinen zur extrazellulären Matrix kann dabei zu der Aktivierung der SRC-Familie (*v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*) und schließlich zu einer MMP14-vermittelten (*matrix metalloproteinase 14*) Kollageninvasion der Tumorzelle führen. Dies sind die ersten Schritte der Metastasierung [49, 50]. Eingewanderte Fibroblasten, Lymphozyten und andere Entzündungszellen im Tumorstroma können dabei die Metastasierung durch die Ausschüttung von Zytokinen fördern [51].

1.2.4. Therapie des Ovarialkarzinoms

Für Patientinnen, die mit einem frühen Stadium des Ovarialkarzinoms diagnostiziert wurden, ist ein chirurgischer Eingriff mit anschließender Einstufung des Tumorgades indiziert. Der chirurgische Eingriff kann zum einen die vollständige Entnahme des Tumorgewebes beim „Staging“-Verfahren und zum anderen die abdominale Hysterektomie bzw. die unilaterale bzw. bilaterale Salpingo-Oophorektomie bedeuten. Die Standardtherapie bei Patientinnen mit einem

Ovarialkarzinom im fortgeschrittenen Stadium besteht aus der vollständigen chirurgischen Entnahme des Tumorgewebes und der anschließenden Chemotherapie [14].

In den vergangenen 20 Jahren erwies sich hierbei die Chemotherapie aus Platinkomplexen in der Monotherapie oder in Kombination mit Doxorubicin, Cyclophosphamid und anderen zytotoxischen Substanzen als eine der effektivsten Therapien für Patientinnen mit epithelialen Ovarialkarzinomen [52]. Nach jahrelanger Anwendung von Cisplatin steht nun das Carboplatin mit einer geringeren Nephrotoxizität, Otoxizität, peripheren Neurotoxizität sowie emetogenen Aktivität für die klinische Anwendung im Vordergrund [53, 54].

1.3. Platinkomplexe

Nach der zufälligen Entdeckung der zytostatischen Wirkung der Platinkomplexe in den 1960er Jahren durch B. Rosenberg in *E. coli*-Bakterien, erfolgte 1974 die erste klinische Studie zur Behandlung von Prostatakarzinomen mit großem Erfolg [55, 56]. Bis heute gehören die Platinkomplexe zu den wichtigsten Chemotherapeutika für die Behandlung von Tumoren des Kopf- und Halsbereiches, sowie von Hodenkrebs, Lungenkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Darmkrebs einschließlich Eierstockkrebs [57]. Verschiedenste Platinkomplexe wurden seither synthetisiert, wobei Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum(II)), Carboplatin (*cis*-diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylat)platinum(II)) und Oxaliplatin Anwendung in der Klinik finden. Cisplatin und sein Analog Carboplatin sind Platin-II-Komplexe, die zwei Ammoniumgruppen in der *cis*-Position vorweisen (Abbildung 1.3.). Anstatt zwei labiler Chloridliganden, wie bei Cisplatin, besitzt Carboplatin zusätzlich zu den Ammoniumgruppen einen Cyclobutanring. Oxaliplatin enthält ebenfalls ein zentrales Platinatom das mit einem 1,2-Diaminocyclohexyl-Liganden und einem Oxalation komplexiert ist [58, 59].

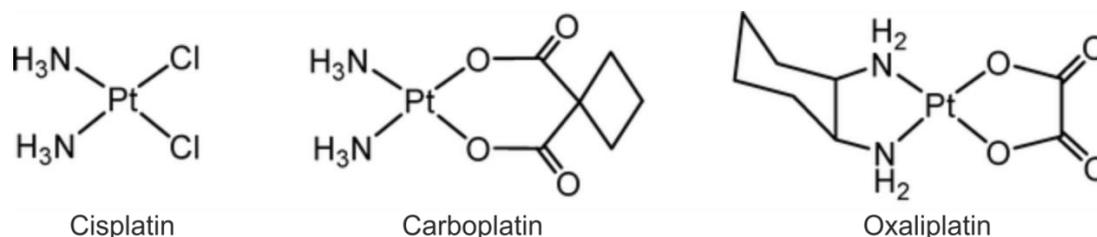


Abbildung 1.3. Platinbasierte Strukturen als antineoplastische Substanzen in der Chemotherapie für das Ovarialkarzinom: Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin. Abbildung übernommen von Cepeda *et al.*, 2007 [60].

1.3.1. Platinvermittelte Zytotoxizität

Platinkomplexe sind wasserlöslich und werden intravenös appliziert. Nach dem Eintritt über den Kupfer-Influx-Transporter CTR1 (SLC31A1, *solute carrier family 31 (copper transporter)*),

member 1) in das Zytoplasma von Zellen, entfalten Platinkomplexe ihre zytostatische Wirksamkeit anhand der spontanen Substitution der Chlorid- oder Oxalationen mit einem oder zwei Wassermolekülen [61, 62]. Die resultierenden mono- oder bihydratisierten Platinkomplexe sind hochreaktiv und können mit verschiedenen zellulären Substraten wie reduziertem Glutathion, Methionin, Metallothioneinen und Proteinen interagieren [63]. Die Folge ist oxidativer Stress und die Einleitung der Apoptose. Neben diesem zellulären Modul entfalten Cisplatin und Carboplatin ihre zytotoxischen Eigenschaften hauptsächlich durch die nukleophile Bindung an die N7-Position der Purine der DNA (Abbildung 1.4.). Es entstehen Protein-DNA-Komplexe sowie DNA-DNA-Inter- und Intrastrangaddukte [64]. Die Platin-DNA-Addukte führen zu sterischen Instabilitäten und DNA-Brüchen. Es folgen die zellulären Prozesse eines Replikationsarrestes, der Transkriptionshemmung, der DNA-Reparatur oder der Apoptose. Carboplatin geht dabei die gleichen DNA-Platin-Bindungen wie Cisplatin ein, zeigt jedoch ein anderes toxikologisches Profil in gesunden Geweben [65]. Interessanterweise binden trotz der hohen Toxizität der Platin-DNA-Addukte nur ca. 1 % der hydratisierten Platinkomplexe tatsächlich an die DNA [66].

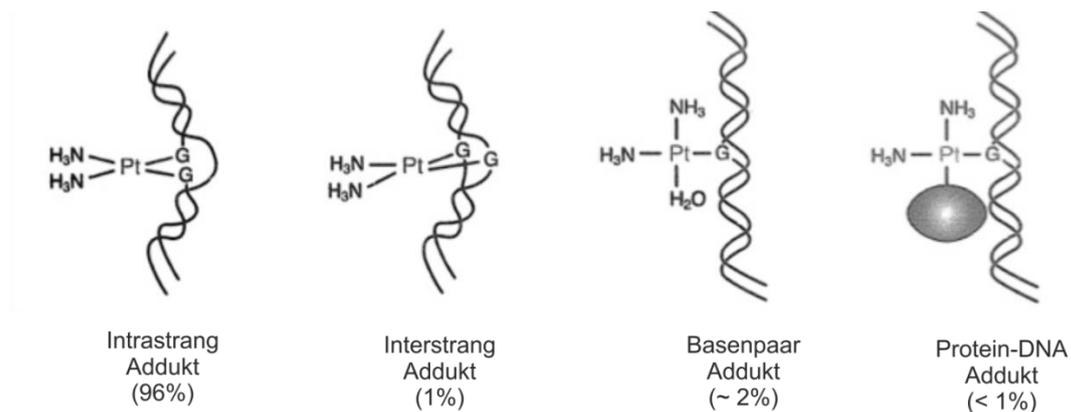


Abbildung 1.4. Bindung von Cisplatin an die DNA. Die Chloridionen im Cisplatinmolekül bilden über eine Hydroxylverbindung an der N7-Position der DNA verschiedene DNA-Platin-Addukte [67].

Im Allgemeinen sind zwei verschiedene Strategien der Zelle nach Platinexposition bekannt: (1) Die Reparatur der DNA-Platin-Addukte bei einem transienten Arrest in der S-Phase bzw. bei G2/M (S: DNA-Synthese, G2: Restriktionspunkt, M: Mitose) oder wenn die Schädigung zu groß ist, (2) die Einleitung der Apoptose. Im Folgenden werden einige molekulare Ereignisse, die an der platinvermittelten Zytotoxizität beteiligt sind, kurz beschrieben:

Zellzykluskontrolle und die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden

Einer der Hauptmechanismen der platinvermittelten Zytotoxizität ist die Signalweiterleitung der DNA-Schädigung (DDR, *DNA damage response*) über die ATM-ATR-Signaltransduktionsachsen (ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATR, RAD3-related protein) [59]. An die durch

Platinkomplexe verursachten DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) werden „Sensoren“ und „Mediatoren“ in einen großen, heterogenen Proteinkomplex (*Foci*) rekrutiert. In diesen *Foci* werden nachgeschaltete Faktoren wie Histone oder andere Proteine durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung u. a.) für die DNA-Reparatur, den Zellzyklusarrest oder der Einleitung der Apoptose vorbereitet [68, 69]. So werden auch die Homodimere der ATM-Kinase durch Autophosphorylierung oder durch eine KAT5- (*K(lysine) acetyltransferase 5*)-vermittelte Acetylierung aktiviert und an die DNA-Läsionen rekrutiert [70]. Dort phosphoryliert ATM unterschiedliche Substrate wie z. B. das Histon H2A.X (*H2A histone family, member X*) und die nachgeschaltete *Checkpointkinase* CHEK2 [71]. CHEK2 diffundiert aus den *Foci* in andere Bereiche des Nukleus um dort Effektoren des Zellzyklusarrestes wie P53, CDC25 (*cell division cycle 25C*) und MDMX (*MDMX oncogene, E3 ubiquitin protein ligase*), BRCA1, FOXM1 (*forkhead box M1*) und E2F1 (*E2F transcription factor 1*) zu phosphorylieren [72-76]. Phosphoryliertes CDC25 bindet z. B. an 14-3-3, das daraufhin von CDC2 (*CDK1, cyclin-dependent kinase 1*) abgeleitet und CDC2 in das Zytoplasma freigibt. Phosphoryliertes CDC2 induziert schlussendlich einen G2-Arrest [77-80]. Abhängig vom Ausmaß der DNA-Schädigung kann die ATM-ATR-vermittelte P53-Phosphorylierung auch zur Degradierung von FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*) führen. BCLXL wird daraufhin inaktiviert und der programmierte Zelltod wird eingeleitet [81, 82].

Signalwege der DNA-Reparatur

DNA-Schädigungen können während des Zellzyklusarrestes repariert werden. Der Prozess der Entfernung der Platinaddukte wird vorrangig durch das System des „*Nucleotid excision repair*“ (NER) durchgeführt und umfasst mehrere Schritte. Die Faktoren XPA und XPD (*xeroderma pigmentosum, complementation group*) werden nach der Erkennung der DNA-Läsion rekrutiert und entwinden in einem Komplex mit TFIIH die DNA [83]. Anschließend schneiden die strukturspezifischen Endonukleasen XPF-ERCC1 (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*) und XPG ein 24-32 bp großes DNA-Platin-Stück heraus [84]. Schließlich erfolgt die Resynthese und Duplikation des herausgeschnittenen DNA-Stranges. Eine vollständige P53- und BRCA1-Expression ist dabei für das NER-System unabdingbar. Das „*Mismatch repair*“- (MMR)-System, das einzelne Basenfehlpaarungen austauscht, ist nicht direkt mit der Zytotoxizität von Cisplatin verbunden, aktiviert jedoch wichtige Signalmediatoren für die Apoptose wie z. B. p73 (*tumor protein p73*), P53 und c-Abl (*c-abl oncogene 1*) [85, 86].

Apoptose

Es wird allgemein angenommen, dass eine unzureichende Reparaturfähigkeit schlussendlich zu einer Apoptose oder Nekrose in der Tumorzelle nach Platintherapie führt. Nekrose ist ein

Prozess, der den Zelltod nach Zellschädigung wie z. B. bei mechanischen Verletzungen, nach Kontakt mit Toxinen oder in der Hypoxie auslöst. Exzessive Behandlungen mit Platinkomplexen können eine Nekrose z. B. durch eine Hyperaktivierung der poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) induzieren und damit den nachfolgenden Abbau von NADP⁺ und ATP (Nicotinamidadenindinukleotid, Adenosintriphosphat) fördern [87]. Die Apoptose kann entweder durch den intrinsisch mitochondrial-vermittelten Signalweg oder extrinsisch durch membranständige Rezeptoren (z. B. FAS) hervorgerufen werden [88]. Platinbasierte Therapeutika induzieren hauptsächlich den intrinsischen Caspase-abhängigen Apoptose-Signalweg. Dieser involviert die Aktivierung proapoptotischer Proteine der BCL2-Familie (z. B. BAX) und die Cytochrom-c-Entlassung aus Mitochondrien [89]. Des Weiteren ist das Tumorsuppressorgen P53 einer der Hauptmediatoren in der Vermittlung der Platinzytotoxizität, indem es entweder einen Zellzyklusarrest induziert oder die Apoptose durch Aktivierung von Caspasen einleitet [90]. Nach DNA-Brüchen steigert P53 als Transkriptionsfaktor z. B. die Transkription verschiedener Gene, die einen Zellzyklusarrest hervorrufen können. Dazu gehören u. a. *CDKN1A* (P21), *MDM2* und *GADD45* (*growth arrest and DNA-damage-inducible*) [91]. Ovarialkarzinomzellen mit einem P53-Wildtyp sind sensitiver gegenüber der Platintherapie als P53-mutierte Tumorzellen [92, 93]. Deregulationen von P53 und andere Faktoren als Grundlage für die Entwicklung einer Chemotherapieresistenz werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

1.3.2. Resistenz gegenüber der Platintherapie

Trotz des verbesserten Ansprechens, der Erhöhung des medianen Überlebens und des erhöhten Auftretens von Remissionen in der platinbasierten Kombinationstherapie sind die Langzeitprognosen gering. Die geringen Überlebensraten in den fortgeschrittenen Stadien (Kapitel 1.2.) sind, neben dem Fehlen geeigneter diagnostischer Mittel zur frühzeitigen Detektion des Ovarialkarzinoms, vor allem auch auf die Entwicklung einer Chemotherapieresistenz zurückzuführen.

Die Platinresistenz im Ovarialkarzinom wird seit 2004 nach dem Beschluss der *Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference* (GCIG OCC 2004) anhand der zeitlichen Wiederkehr der Krebserkrankung (Rezidiv) nach der Ersttherapie (*first-line chemotherapy*) definiert. Patientinnen, die erst nach 6 Monaten und dem Abschluss der Standardchemotherapie an einem Rezidiv erkranken, werden als platinresistent eingestuft. Ein Rezidiv innerhalb dieser 6 Monate wird als platinresistent bezeichnet. [94-96].

Sobald eine Platinresistenz festgestellt wird, werden andere Therapeutika verabreicht, die einen anderen Wirkmechanismus als Platinkomplexe aufweisen. Diese sind u. a. Substanzen, die den

Abbau (Paclitaxel und Docetaxel) oder die Bildung von Mikrotubuli (Vinorelbin) hemmen. Auch Topoisomeraseinhibitoren wie Topotecan und Etoposid, sowie andere DNA-Interkalantien wie Doxorubicin und das Cytosinanalogen Gemcitabin werden in der weiterführenden Therapie verabreicht. Allerdings sprechen nur 20 % der Patientinnen mit einem platinresistenten Ovarialkarzinom auf diese „nicht-kreuzresistenten“ Substanzen tatsächlich an [27].

1.3.3. Molekulare Ursachen der Platinresistenz

Bevor, während und nach der Herausbildung der Platin-DNA-Addukte kann die Zytotoxizität der Platinkomplexe reduziert und die Herausbildung der Resistenz gefördert werden (Abbildung 1.5.). Nach Galluzzi *et al.* werden Resistenzmechanismen gegenüber platinbasierten Substanzen in 4 Kategorien eingeteilt [64]: (1) *Prä-Target-Resistenz*, (2) *On-Target-Resistenz* (3) *Post-Target-Resistenz* und (4) *Off-Target-Resistenz*. Das Zielmolekül (*Target*) der Platinkomplexe ist in diesem Fall die DNA. Aufgrund der ähnlichen (nicht identischen) zytotoxischen Wirksamkeiten werden die Resistenzmechanismen von Carboplatin und Cisplatin zusammengefasst und nach dem „Galluzzi-Schema“ (modifiziert) kurz beschrieben:

Prä-Target-Resistenz

*Prä-Target-Resistenz*mechanismen betreffen hauptsächlich eine reduzierte Aufnahme, einen erhöhten Efflux und eine erhöhte Inaktivierung der Platinkomplexe:

- Die Platinakkumulation im Tumorgewebe kann durch einen niedrigen Blutdruck und einen basischen pH im Extrazellularraum minimiert werden [97]. Auch die irreversible Bindung von Cisplatin an Plasmaproteine reduziert die Ansprechbarkeit gegenüber der Chemotherapie [98, 99].
- Proteine im Extrazellularraum wie z. B. Fibronectin, Typ IV Kollagen, Laminin und GGT (*extracellular γ -glutamyltransferase*) binden und inaktivieren Cisplatin [100].
- Eine Herunterregulation des Kupfertransporters CTR1 [101, 102], eine erhöhte Aktivität der ABC-ATPasen ATP7A/ATP7B (*ATPase, Cu⁺⁺ transporting, α polypeptide*) und MRP2 (*ABCC2, ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2*) induzieren eine verminderte Akkumulation von Platinkomplexen in der Tumorzelle [103, 104]. So wird z. B. der Kupfertransporter CTR1 nach Cisplatinexposition internalisiert und reduziert damit eine weitere Cisplatinakkumulation in der Tumorzelle [105].
- Erhöhte Sphingomyelin- und Cholesterolkonzentrationen in der Zellmembran sowie eine defekte Endozytose und Mikrotubuliorganisation können weitere Ursachen in der Platinresistenz sein [106-108].
- Nach dem Eintritt in die Zelle bindet Cisplatin vermehrt an zytoplasmatische Nukleophile wie z. B. GSH (*Glutathion*), Methionin und Metallothionein (Schwefel-

beinhaltende Proteine) oder an Cysteinseitenketten von Proteinen und induziert deren Inaktivierung. Tumorzellen mit einer Inaktivierung der GSH, γ -GCS (*γ -glutamylcysteine synthetase*) oder dem GST-Level (*Glutathione-S-Transferase*) weisen eine erhöhte Cisplatinresistenz auf [109].

- Ein erhöhter, intrazellulärer pH, verursacht durch eine vermehrte Glukose- oder Laktosekonzentration, kann eine weitere Ursache der *Prä-Target*-Resistenz sein [110].

On-Target-Resistenz

Die *On-Target*-Resistenz umfasst die Reparatur und Entfernung der Platinaddukte in der DNA:

- Eine ERCC1-vermittelte Entfernung der Platin-DNA-Addukte korreliert mit der Entwicklung einer Cisplatinresistenz und mit einer schlechten Prognose in verschiedenen Tumorindikationen, inklusive dem Ovarialkarzinom [111, 112].
- Eine verminderte Aktivität der MMR-Proteine MLH1 und MLH2 und somit eine Toleranz gegenüber Pt-(Platin)-DNA ist ein weiterer Indikator für die Herausbildung von Resistenz [113, 114].
- Die DNA-Polymerase POLH (*polymerase (DNA directed), eta*) ermöglicht die sogenannte Transläsionssynthese (DNA-Resynthese trotz Platinaddukte). Eine Hochregulation von POLH korreliert z. B. mit einem reduzierten Überleben von cisplatintherapierten NSCLC- (*Non-Small Cell Lung Cancer*)-Patienten [115].
- Die strukturellen Untereinheiten REV3/REV7 der Polymerase ζ (zeta) spielen ebenfalls eine zentrale Rolle in der Transläsionssynthese [116].
- Ein bekanntes Beispiel der Platinresistenz ist die erhöhte Aktivität der Komponenten der Homologen Rekombination (HR), wie BRCA1 und BRCA2 [117]. So zeigten Sakai *et al.*, dass BRCA1/2-defiziente Tumoren vermehrt auf die Platintherapie ansprechen [118].
- Topoisomerase II und andere Homologe Rekombinationsmechanismen erhöhen die Reparatur der platinvermittelten DNA-Brüche [119], wobei „*end-joining*“-Reparatur die Platineffektivität verstärken kann [120].
- Cisplatin kann außerdem an mitochondriale DNA und an den spannungsabhängigen Anion-Austauscher VDAC (*voltage-dependent anion channel*) binden [121]. VDAC wird durch Bindung von Cisplatin blockiert. Die Entlassung von Cytochrom c in das Zytoplasma findet nicht mehr statt.

Post-Target-Resistenz

Die Herausbildung der *Post-Target*-Resistenz ist u. a. auf die Deregulation proapoptotischer Signalwege und der Signaltransduktion der zellulären Antwort auf DNA-Schäden zurückzuführen:

- Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom, die eine *P53*-Mutation aufweisen, zeigen ein geringeres Ansprechen gegenüber der Platintherapie [122].
- Eine verminderte Aktivierung von p38-MAPK- α und der Kinase c-Jun führt zu einer unzureichenden Aktivierung der FAS/FASL-vermittelten Apoptose [123, 124].
- BAX/BAK-Defizienzen und Hochregulationen der antiapoptotischen Proteine der BCL2-Familie wie BCL2 selbst, BCLXL und MCL1 (*myeloid cell leukemia sequence 1*) wurden vielfach in Hals- und Nackenkrebs, Eierstockkrebs und des kleinzelligen Lungenkrebs in Verbindung mit einer platinbasierten Resistenz gebracht [64].

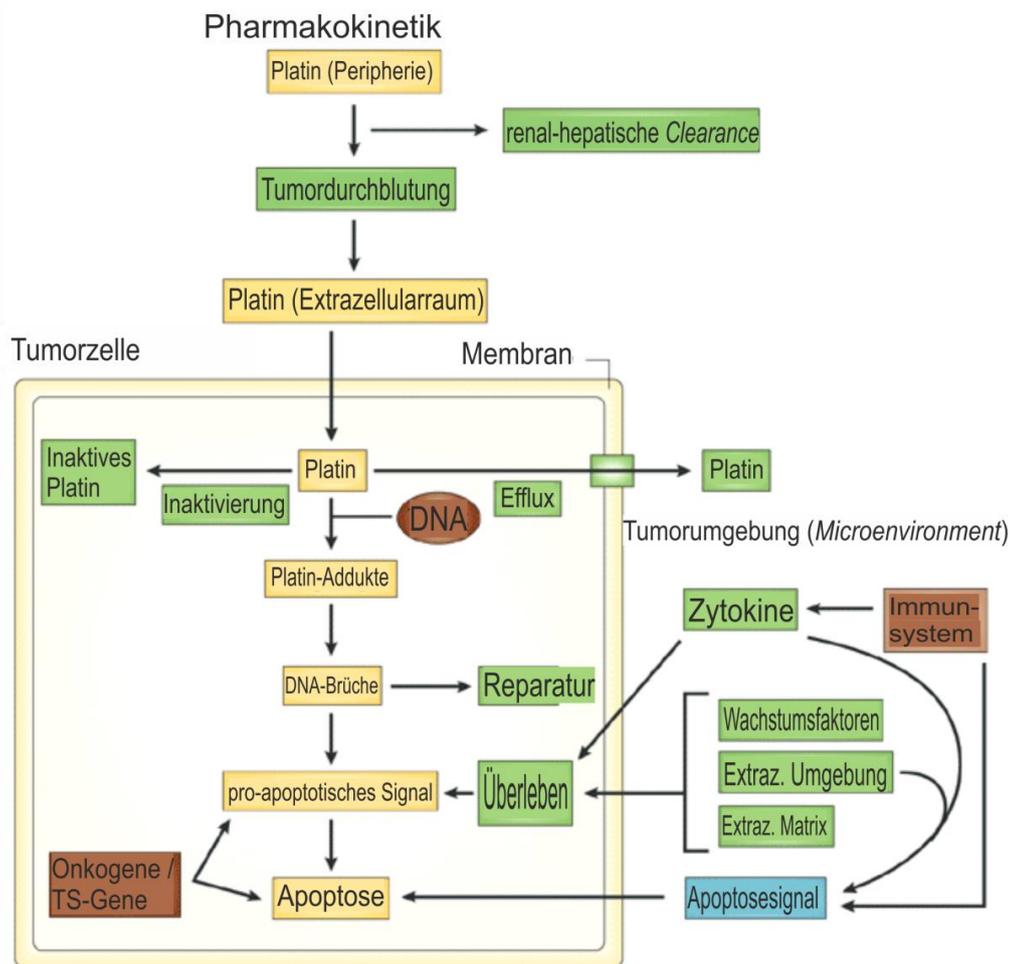


Abbildung 1.5. Schematische Abbildung der platinvermittelten Zytotoxizität und der potentiellen Resistenzmechanismen inner- und außerhalb der Tumorzelle. TS = Tumorsuppressorgene, Extraz. = Extrazellulär. Abbildung übersetzt und verändert nach R. Agarwal und S. B. Kaye, 2003 [125].

- Die erhöhte PI3K-AKT-Signaltransduktion und die damit verbundene Hochregulation des Caspase-Inhibitors BIRC5 (*Survivin*) ist in vielen cisplatinresistenten Tumordindikationen beschrieben [126]. Eine AKT-vermittelte Überaktivierung der

Apoptoseinhibitoren XIAP und IAP-2 (BIRC2, *baculoviral IAP repeat containing 2*) korreliert mit der Entwicklung der Cisplatinresistenz [127].

- Eine reduzierte ATM-ATR-Signaltransduktion und verringerte Expression der *Checkpoint*-Kinase CHEK1 in platinresistenten Ovarialkarzinomzellen ist ebenfalls dokumentiert [128].
- Caspasen (cysteinyln-aspartate specific protease) sind Proteasen die entweder früh (Initiatorcaspasen) oder spät (Exekutivcaspasen) in der Apoptose Proteine am Aspartat schneiden und somit deren Abbau einleiten. Modifikationen der Initiator- und Exekutivcaspasen wie Caspase-9, -8 und Caspase-3, -6 und -7 wurden von Janson *et al.* in der erworbenen Resistenz gegenüber Cisplatin *in vitro* gezeigt [129].

Off-target-Resistenz

Auch sogenannte *Off-target*-Effekte, die nicht direkt mit Cisplatin oder anderen platinbasierten Substanzen in Verbindung gebracht werden, können die platinvermittelte Zytotoxizität reduzieren.

- Das Protoonkogen ERBB2 (*HER-2*) ist in Ovarialkarzinomen überexprimiert [130] und induziert in einem AKT1-abhängigen Mechanismus eine P21-Phosphorylierung [131]. Dies verhindert die nukleare Transaktivierung von P21-abhängigen Genen und führt somit zu einer erhöhten Proliferation.
- Eine erhöhte Expression von COX-2, EGFR und β -Catenin korreliert ebenfalls mit einer erhöhten Chemotherapieresistenz im Ovarialkarzinom [132, 133].
- Eine SKP2- (*S-phase-kinase-associated-protein-2*)-Überexpression reduziert die Expression von P27, Cyclin E, sowie P21 und erhöht damit die Anzahl der Zellen in der S-Phase [134].
- Molekulare Chaperone, wie z. B. das Hitzeschockprotein 27 (HSPB1, *heat shock 27 kDa protein 1*), vermindern das Ansprechen von Tumorzellen gegenüber der Platintherapie meist über indirekte Mechanismen [135].
- Cisplatin induziert die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an die DNA und induziert damit die Transkription antiapoptotischer Faktoren [136, 137]. Zytokinvermittelte NF- κ B-Aktivierung kann ebenfalls zu der Aktivierung antiapoptotischer Faktoren und der Entwicklung der Chemotherapieresistenz führen [138, 139].

1.4. PI3K-AKT im Ovarialkarzinom

Wie bereits im Kapitel 1.2.3 beschrieben, ist neben der *P53*-Mutation, die PI3K-AKT-Signaltransduktion eine der am häufigsten deregulierten Signaltransduktionskaskaden im

Ovarialkarzinom. Amplifikationen oder Mutationen des Gens, welches für die katalytische Untereinheit p110 α der PI3-Kinase (PI3K) kodiert (*PI3KCA*), induziert eine vermehrte PIP2-Bereitstellung und führt damit zu einer konstitutiven AKT-Aktivierung. Die Folge ist dauerhaftes Zellwachstum und die Grundlage einer malignen Transformation [140]. Genamplifikationen, die für eine veränderte PI3K-AKT-Signaltransduktion verantwortlich sind, entfallen zu 20 % auf das *PI3KCA*-Gen und zu 15-20 % auf die drei *AKT*-Isoformen. Zu 5 % ist die veränderte Aktivität auf *PTEN*-Deletionen zurückzuführen. Eine verstärkte Signaltransduktion des PI3K-AKT-Signalweges, kann auch auf eine verstärkte Aktivierung der vorgeschalteten Rezeptortyrosinkinasen (ERBB2, EGFR, IG1R) oder der RAS-MEK-ERK-Signaltransduktion zurückgeführt werden [141]. Des Weiteren dient das phosphorylierte AKT-Level als ein negativer prognostischer Marker bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom [142].

1.4.1. PI3K-AKT-Signaltransduktion

Die PI3K-AKT-Signalkaskade (Abbildung 1.6.) transduziert:

- (A) die Bindung von Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF, Heregulin an die extrazelluläre Domäne von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) wie IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*), EGFR, HER2 und PDGFRB (*platelet-derived growth factor receptor, β polypeptide*).
- (B) Signale von Nachbarrezeptoren wie Met.
- (C) die RAS-vermittelte RAF-MEK-ERK-Signalweiterleitung in das Zellinnere.

Nach Aktivierung (Autophosphorylierung) einer Rezeptortyrosinkinase z. B. durch EGF bindet die regulatorische Untereinheit p85 der Kinase PI3K über die SH2-Domäne (*Src-homology 2*) an die intrazellulären Phosphotyrosinreste der Rezeptortyrosinkinase. Dies induziert eine Konformationsänderung der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 α , die daraufhin zu der Innenseite der Zellmembran diffundiert. Das p110- α -Substrat PIP2 wird zu PIP3 (Phosphatidylinositol-bis/tris-bisphosphat), einem *second messenger*, phosphoryliert. PIP3 bindet an die PH (*Pleckstrin homology*)-Domäne der Serin-Threonin-Kinase AKT, die ebenfalls an die Innenseite der Zellmembran transloziert wird [143, 144]. Dies führt zu der Konformationsänderung von AKT und der Exposition der Aminosäurereste T308 und S473. Diese Aminosäurereste können nun durch PDK-1 (*pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1*) oder mTORC2 (mTOR, *mechanistic target of rapamycin complex 2*) phosphoryliert werden. Phosphoryliertes AKT selbst kann schließlich mTORC1 (*mTOR complex 1*) über die multiple Phosphorylierung von TSC2 (*tuberous sclerosis 2*) im TSC1-(*tuberous sclerosis 1*)-TSC2-Komplex aktivieren. Die Phosphorylierung von mTSC2 inhibiert die GTPase-Aktivität von RHEB-(*Ras homolog enriched in brain*)-GTP. RHEB-GTP akkumuliert daraufhin und erlaubt eine weitere Aktivierung von mTORC1. mTORC1 ist schließlich in der Lage, 4E-BP1 (*eukaryotic translation*

initiation factor 4E binding protein 1) und das hydrophobe Motiv der S6-Kinase zu phosphorylieren. Als Schlüsselproteine regulieren 4E-BP1 und die S6-Kinase die Proteinsynthese. Andere Zielmoleküle der aktiven AKT-Kinase sind Faktoren wie MDM2, NF- κ B, CREB, XIAP, BCL2 und Survivin, die vor allem in den zellulären Prozessen des Überlebens und des Metabolismus involviert sind [145]. Über die Phosphorylierung von GSK3- β (*glycogen synthase kinase 3 β*) und der nachfolgenden Inhibition des proteosomalen Abbaus von Cyclin D1, sowie der Phosphorylierung der Zellzyklusinhibitoren P21 und P27, verhindert AKT außerdem einen vorzeitigen Zellzyklusarrest [146].

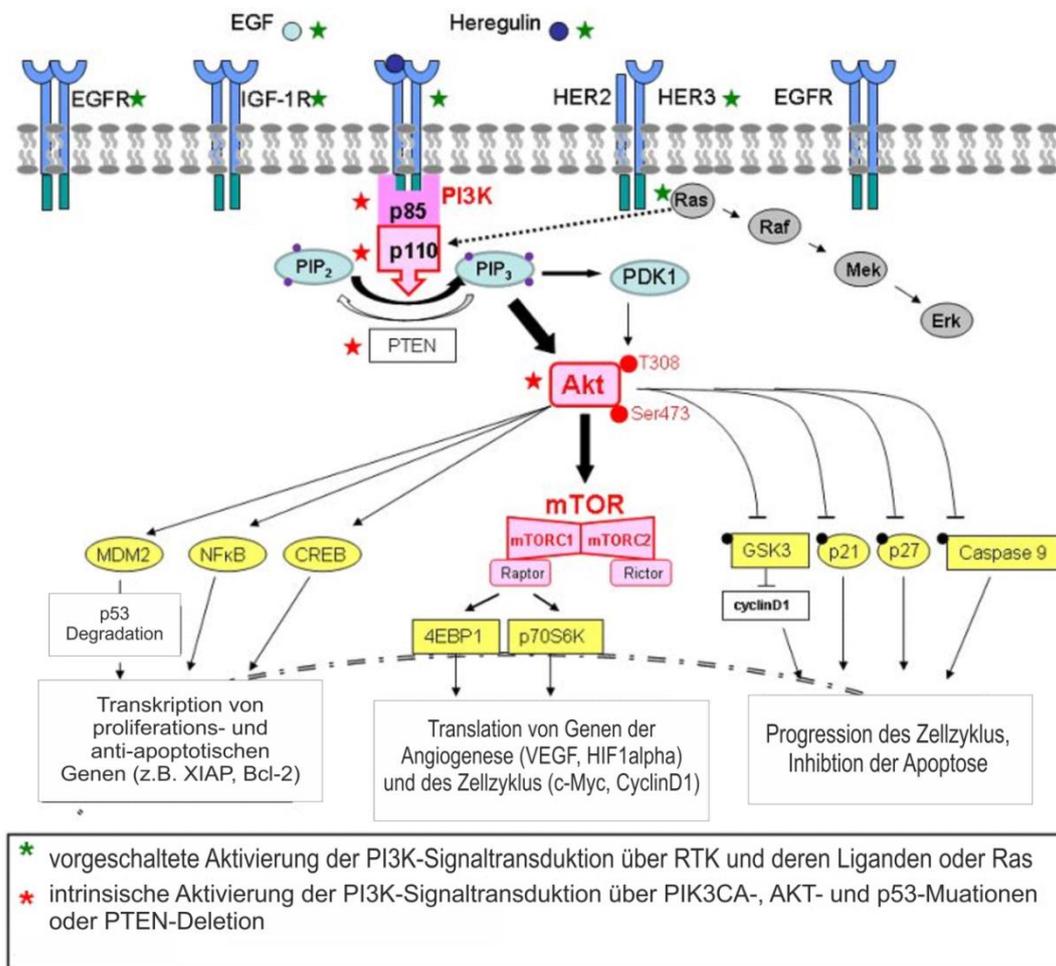


Abbildung 1.6. Schematische Abbildung der PI3K-AKT-Signaltransduktion im Ovarialkarzinom. Abbildung verändert nach Leary *et al.*, 2013 [147].

1.4.1. AKT und Platinresistenz

Im Ovarialkarzinom inhibiert eine verstärkte AKT-Aktivierung die P53-vermittelte Apoptose und induziert somit eine Resistenz gegenüber der Chemotherapie [148]. Außerdem inhibiert AKT den proapoptischen BCL2-Faktor BAD (*BCL2-associated agonist of cell death*) mittels Phosphorylierung an Ser136. Dies führt zu einer geringeren Bindung von BCLXL an BAD und

reduziert damit die Entlassung weiterer mitochondrialer proapoptotischer Faktoren [149]. Neben der Inhibition von Caspase-9, erhöht AKT außerdem die Bindung von FOXO-1 (*forkhead transcription factor 1*) an 14-3-3 mittels Phosphorylierung an Thr32 und Ser196 [149]. Dies führt zu einem zytoplasmatischen Abbau von FOXO-1 und somit zu einer geringeren Expression von FOXO-1-Zielgenen wie z. B. bei den BCL2-Familienmitgliedern BIM (*BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)*) und FAS [150]. Des Weiteren führt eine AKT-abhängige Phosphorylierung und Aktivierung von IKK- α und die darauffolgende Degradation von IKB (*nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, α*) zu einer verstärkten NF- κ B-Signaltransduktion [145, 151]. Als besonders wichtig gilt der oben genannte Einfluss von AKT auf die Zellzyklusregulation: Die AKT-vermittelte Phosphorylierung und Inhibition von P21 sowie die Herunterregulation von P27 führen zum Übergang des Zellzyklus an G1 und G2/M [152, 153]. Außerdem kann AKT durch die Phosphorylierung von MDM2 die P53-Stabilisierung nach erfolgter Chemotherapie inhibieren [154].

1.4.2. Zielgerichtete AKT-Inhibition

Die intrinsische Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweges kann Eierstockkrebs in Mäusen induzieren, wobei dessen Inhibition wiederum zu einem verzögerten Tumorwachstum führt. Dies spricht für eine geeignete Grundlage für die Entwicklung zielgerichteter Therapien gegen Komponenten in diesem Signalweg [155]. Allosterische, ATP-kompetitive, peptidbasierende und lipidbasierende AKT-Inhibitoren wurden bisher entwickelt und befinden sich in den frühen klinischen Phasen. Perifosine beispielsweise (Keryx Biopharmaceuticals, Inc.), ein Alkylphospholipid, inhibiert die Translokation von AKT zur Zellmembran und zeigt eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums in verschiedenen soliden Tumorindikationen im Menschen [156, 157]. Eine Aktivität der Kombinationstherapie von Perifosine und Docetaxel in Patientinnen mit einem rezidivierenden Ovarialkarzinom konnte ebenfalls dokumentiert werden [158]. MK-2206 (Merck & Co. Inc.), ein allosterischer AKT-Inhibitor, befindet sich bereits in der klinischen Phase II bei Patientinnen mit resistenten Ovarialkarzinomen. Da das PI3K-AKT-Signalnetzwerk komplex ist und verschiedene Rückkopplungsmechanismen (*Feedbackloops*) die primäre Inhibition eines einzelnen Zielmoleküls wie z. B. AKT umgehen können, ist eine Kombinationstherapie mit Zytostatika oder anderen targetierten Therapien sinnvoll. Hierbei ist beispielsweise eine klinische Phase I Studie mit Ridaforlimus, einem makrozyklischen Lacton, der ähnlich zu Rapamycin mTOR hemmt, in Kombination mit dem AKT Inhibitor MK2206 im Ovarialkarzinom geplant (NCT01295632).

1.5. Die TGF- β -Superfamilie im Ovarialkarzinom

Im Allgemeinen regulieren die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie die zellulären Prozesse der Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Wundheilung [159]. Die ursprüngliche Bezeichnung der TGF- β -Superfamilie geht auf den Faktor TGF- β zurück, der erstmals im Jahre 1982 in normalen Nierenepithelzellen der Ratte als phänotypisch transformierender Faktor identifiziert wurde [160]. In den darauffolgenden Jahren stellte sich jedoch heraus, dass die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie vor allem der Transformation von epithelialen Zellen durch Proliferationsinhibition entgegenwirken [161-164]. So wirkt z. B. TGF- β der Proliferationssteigerung in Zellen des gesunden, ovariellen Oberflächenepithels (OSE, *ovarian surface epithel*) nach ovulationsbedingter Ruptur und den nachfolgenden Reparaturmechanismen entgegen [165, 166].

Dennoch ist die Funktion von TGF- β in der Tumorprogression je nach Zelltyp sehr unterschiedlich. In frühen Stadien des Ovarialkarzinoms ist z. B. vorrangig eine Inhibition der TGF- β -Signaltransduktion in Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom zu detektieren. In späten Stadien korreliert jedoch eine erhöhte TGF- β -Expression mit der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) und der Metastasierung, sowie mit einer schlechten Prognose [167, 168].

1.5.1. TGF- β -Signaltransduktion

Zu den Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie gehören TGF- β 1, 2 und 3, ACTIVIN, NODAL, *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *growth and differentiation factors* (GDFs) und *anti-Müllerian Hormone* (AMH). TGF- β -Faktoren bilden über kovalente Disulfidbrücken Homo- und Heterodimere und initiieren die Signaltransduktion durch die Bindung an verschiedene Typ I und II Serin- und Threonin-Rezeptortyrosinkinasen [169]. Die Ligand-Rezeptorkomplexbildung ermöglicht schließlich die Phosphorylierung der glycin- und serinreichen Region der Typ I Rezeptors durch die konstitutiv aktive Rezeptortyrosinkinase Typ II [170, 171]. Nach der Phosphorylierung erfolgt die kanonische TGF- β -Signalweiterleitung in das Zellinnere durch die sogenannten R-SMAD-Proteine (*receptor-regulated small and mad = mother against Decapentaplegic*), dem membrangebundenen Kofaktor SARA (*SMAD anchor for receptor activation*) und dem Adaptermolekül DAB2 (*SMAD anchor for receptor activation*). Nach Bindung des R-SMAD an ein „Mediator“-SMAD (z. B. SMAD4) wandert der Komplex in den Zellkern und induziert oder reprimiert die Expression verschiedener Zielgene. Welche Zielgene transkribiert werden, hängt stark vom Zelltyp und den gegebenen physiologischen Bedingungen ab. Proapoptische Signale werden hierbei vor allem durch die TGF- β -vermittelte Repression des Onkogens c-MYC und der nachfolgenden Transkriptionsaktivierung der Zellzyklusinhibitoren p15, P21 und P27 vermittelt [172, 173]. Im metastasierenden Ovarialkarzinom wurde außerdem

die Herunterregulation des E-Cadherins und die Steigerung der Metalloproteinasesekretion als Schlüsselereignisse identifiziert [174, 175]. Eine nicht-kanonische TGF- β -Signaltransduktion kann außerdem über die Aktivierung der AKT-, NF- κ B- und Wnt (*Wingless type*)/ β -Catenin-Signalwege nach Rezeptorbindung stattfinden [159].

1.5.2. GDF15 - ein heterogenes Mitglied der TGF- β -Superfamilie

Die erste Namensgebung erhielt GDF15 (*Growth differentiation factor*) im Jahre 1997 von Bootcov *et al.*, als dieser eine Hochregulation eines TGF- β -ähnlichen Faktors in aktivierten Makrophagen nach IL-1- β und IL-6, TNF- α sowie M-CSF-Exposition entdeckte. Da dieser Faktor in der Lage war, in der Entzündungsreaktion die Makrophagenaktivierung zu inhibieren, wurde er als *macrophage inhibitory cytokine-1* (MIC-1) bezeichnet [176, 177]. Anschließend entdeckten mehrere Gruppen diesen Faktor in unterschiedlichen Geweben und zellulären Prozessen mehr oder weniger gleichzeitig. Somit ist GDF15 unter den folgenden Synonymen in der Literatur ebenfalls zitiert: *prostate-derived factor* (PDF), *placental TGF- β* (PTGF- β), *placental bone morphogenetic protein* (PLAB), NAG-1 (*non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1*). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Faktor unter dem Synonym GDF15 gehandhabt.

1.5.3. GDF15 - Funktion und Expression im Gewebe

Als sezerniertes Protein spielt GDF15 eine Schlüsselrolle in der Embryonalentwicklung und in der Antwort auf Stresssignale [178]. So ist das Expressionslevel von GDF15 in ruhenden Zellen niedrig, wird jedoch nach Entzündungsreaktionen, akuten Gewebeverletzungen und bei einem niedrigen Sauerstoffgehalt (Hypoxie und Anoxie) hochreguliert [179-183]. GDF15 $-/-$ Nullmäuse sind überlebensfähig und fertil, zeigen jedoch ein signifikant geringeres Körpergewicht sowie eine spätere Dysfunktion des Bewegungsapparates durch den Verlust von Motoneuronen im Kopf und Rückenmarkbereich [184]. Neben dem Einfluss von GDF15 in der Embryonalentwicklung ist ein erhöhtes GDF15-Level ebenfalls im adulten Organismus bei Bluthochdruck und ischämischen Herzerkrankungen, Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz zu detektieren [185, 186].

Auch in Tumoren verschiedener Indikationen ist GDF15 hochreguliert. Erhöhte GDF15-Level sind z. B. in Pankreas-, Lungen-, Prostata-, Brust-, Darm-, Hautkrebs und in epithelialen Ovarialtumoren zu detektieren. Des Weiteren konnten ähnlich hohe GDF15-Level im zugehörigen Serum der Tumorpatienten und in der Cerebrospinalflüssigkeit festgestellt werden. Eine P53-abhängige oder P53-unabhängige Erhöhung des GDF15-Levels nach Exposition mit *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) wie Genistein, Retinoiden, Resveratrol, und Chemotherapeutika wie Etoposide und Doxorubicin in verschiedenen Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* ist ebenfalls beschrieben [187-189]. Die erhöhte Expression bzw. Sekretion korreliert mit

einer schlechten Prognose und einem geringeren Überleben der Patienten verschiedener Krebsindikationen und kann daher als prognostischer Marker fungieren [190-194].

Im Einklang zu den Erkenntnissen über die anderen Mitglieder der TGF- β -Familie besitzt GDF15 pleiotrope Funktionen in den Früh- und Spätstadien der Tumorigenese. Wobei GDF15 abhängig vom Zelltyp als pro- oder antiapoptotischer Faktor fungieren kann. Die genaue Funktion von GDF15 bleibt jedoch unklar: So unterbindet beispielsweise die ektopische Überexpression von GDF15 in Nacktmäusen die Entwicklung von Tumoren aus LN-Z308 Glioblastom-Zelllinien. Ein shRNA-vermittelte *Knockdown* von GDF15 kann aber auch das tumorigene Potential von Melanomzelllinien *in vivo* inhibieren [180].

1.5.4. GDF15 - genetische Struktur und Signaltransduktion

Humanes GDF15 ist auf dem Chromosom 19 mit 2746 bp kodiert und beinhaltet zwei Exone und ein Intron (Abbildung 1.7.) [195]. Wie andere TGF- β -Familienmitglieder wird GDF15 als Vorläuferprotein synthetisiert. Dieses Vorläuferprotein besteht aus einem 29-Aminosäuren-(AS)-langen Signalpeptid, einem 167-AS-langen Propeptid und einem 112-AS-langen „reifen“ Carboxylende [196].

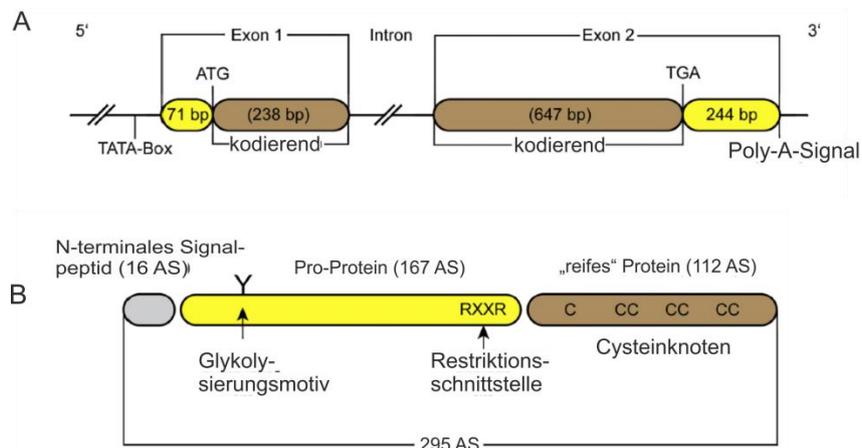


Abbildung 1.7. (A) Genaufbau und (B) Proteinstruktur von GDF15. Abbildung verändert nach Unsicker *et al.*, 2013 [197].

Nach der proteolytischen Entfernung des N-terminalen hydrophoben Signalpeptids findet die Dimerisierung über eine Disulfidbrückenbildung im Endoplasmatischen Retikulum statt. Anschließend wird GDF15 an der furinähnlichen RRAR Restriktionsschnittstelle mittels Proproteinkonvertase geschnitten und das „reife“, funktionale GDF15 in den Extrazellularraum sezerniert [176, 177]. Die sieben Cysteinreste im reifen GDF15-Protein formen einen sogenannten Cysteinknoten, der bei allen TGF- β -Familienmitgliedern hochkonserviert ist [198, 199].

Das unprozessierte Proprotein wird ebenfalls in den Extrazellularraum sezerniert, bleibt jedoch an Komponenten der extrazellulären Matrix gebunden. Es wird angenommen, dass dieses

gebundene Proprotein als Speicher dient und bei akuten Entzündungsreaktionen direkt, durch die ebenfalls an der Extrazellulärmatrix gebundenen Proproteinkonvertasen, geschnitten und in den Extrazellularraum entlassen wird [200, 201]. Obwohl ein spezifischer GDF15-TGF- β -Rezeptor bisher noch nicht identifiziert wurde, zeigen einige Studien eine Kolo-kalisation von GDF15 mit Typ I und Typ II TGF- β -Rezeptoren in MCF-7-Zellen [202]. Des Weiteren belegten Tan *et al.*, dass rekombinantes GDF15 über die Aktivierung von *TGFB*-responsiven Promotorelementen zu einer Proliferationsinhibition verschiedener Tumorzelllinien mit einer intakten TGF- β -Signaltransduktion beiträgt [203]. Somit ist eine GDF15-vermittelte TGF- β -vermittelte SMAD-Aktivierung wahrscheinlich (Abbildung 1.8.) [204].

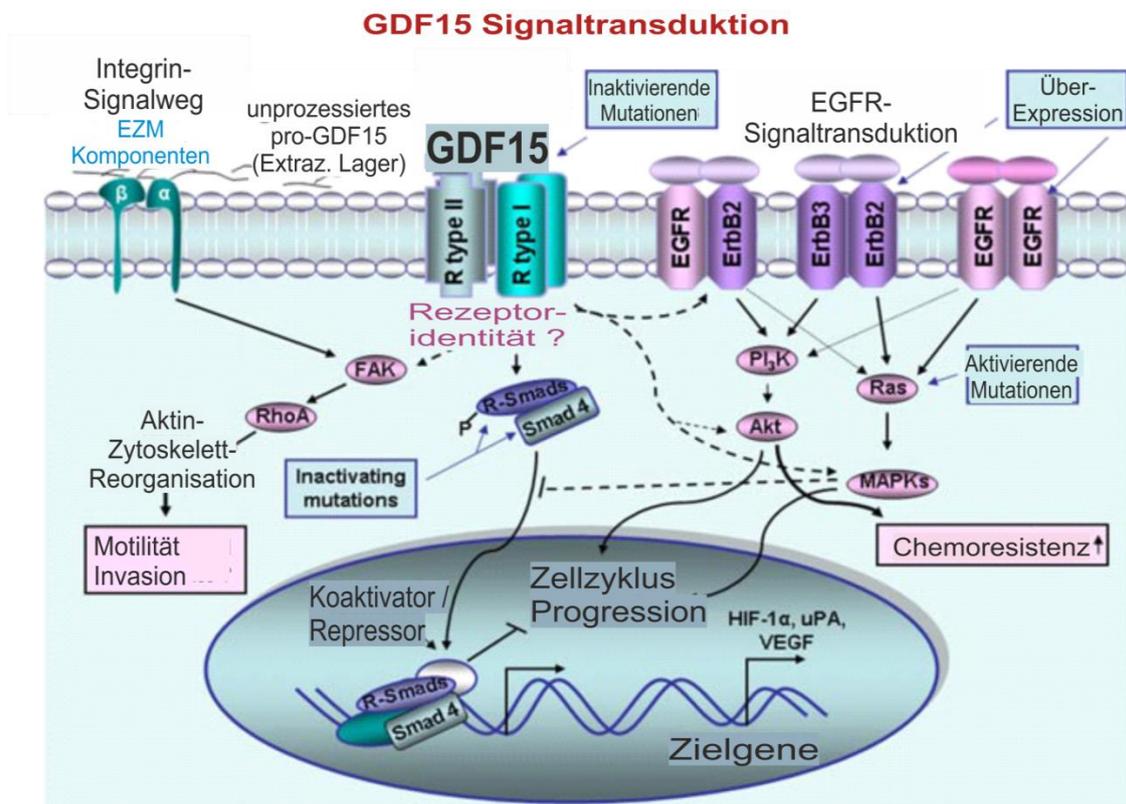


Abbildung 1.8. „Mögliche“ GDF15-vermittelte Signaltransduktion in der Tumorzelle als sezerniertes Zytokin. Abbildung verändert nach Mimeault *et al.*, 2010 [205].

Des Weiteren wird angenommen, dass GDF15 nach DNA-Schädigung und anderen Stresssignalen als nachgeschalteter Faktor (*downstream*) der P53/P21-Achse in der Apoptose und im Zellzyklusarrest fungiert [206]. Die GDF15-Promotorsequenz ist von *Mus musculus* bis *Homo sapiens* hochkonserviert und beinhaltet neben P53-Transaktivierungssequenzen und einer TATA-box auch Bindestellen für SP1 (*Sp1 transcription factor*) und AP1/2 (*jun proto-oncogene 1,2*) [195, 207]. In Analogie zu anderen TGF- β -Familienmitgliedern kann GDF15 als sezerniertes Zytokin außerdem die RAS-MAPK- und den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg stimulieren [208, 209].

1.5.5. GDF15 im Ovarialkarzinom

Die erste funktionale Studie zu der potentiellen Funktion von GDF15 im Ovarialkarzinom wurde von Kim *et al.* im Jahr 2005 in SKOV3-Zellen (humane Ovarialkarzinomzellen) *in vitro* durchgeführt. Hierbei konnte die NSAID-vermittelte Inhibition des Zellwachstums durch einen siRNA-Herunterregulation von GDF15 aufgehoben werden. Daraus leiteten Kim *et al.* eine proapoptotische Funktion für GDF15 in der NSAID-Behandlung ab [210]. Fünf Jahre später untersuchten Staff *et al.* die Expression von GDF15 in primären Ovarialkarzinomgeweben sowie in präoperativen Serumlevel bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom. Dabei war die GDF15-Serumkonzentration in den Patientinnen mit einem invasiven Ovarialkarzinom im Vergleich zu den Patientinnen mit einem „Borderline“-Tumor oder benignen Ovarialzysten signifikant erhöht. Außerdem korrelierte die Plasma-Konzentration nach FIGO-Korrektur indirekt proportional mit dem Überleben und demonstrierte somit einen neuen unabhängigen prognostischen Marker für Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom [211]. Ähnlich zu Staff *et al.* zeigten auch Bock *et al.* eine zytoplasmatische Expression für GDF15 in 97 % von ovarialen Tumoren [212].

1.5.6. GDF15 und Chemotherapieresistenz

Eine GDF15-Überexpression korreliert mit der Entwicklung der Chemotherapieresistenz in malignen Geweben der Lunge, des Darms und der Prostata. Klinische Daten zum Hormonrefraktären Prostatakarzinom zeigen außerdem, dass ein erhöhtes GDF15-Serumlevel mit einer verstärkten Tumorprogression und einem geringeren Überleben nach Docetaxelbehandlung korreliert [213]. Auch einige *in-vitro*-Studien belegen die geringere Ansprechbarkeit verschiedener Tumorzelllinien gegenüber der Chemotherapie in Korrelation mit einem erhöhten GDF15-Level. So zeigten Whiteside und Kollegen, dass eine erhöhte GDF15-RNA-Expression in NCI-H226- und NCI-H2170-Lungenkarzinomzelllinien mit der Entwicklung der Resistenz gegenüber der Cisplatinchemotherapie korreliert [214]. Eine erhöhte GDF15-Expression in Verbindung mit der Entwicklung einer Chemotherapieresistenz ist jedoch nur wenig untersucht. Einige *in-vitro*-Studien weisen auf einen AKT-abhängigen Mechanismus hin. Campbell zeigte hierzu, dass eine AKT-vermittelte ER-Aktivierung bei Abwesenheit von Östrogen eine erhöhte GDF15-Expression induziert und die Entwicklung einer Chemotherapieresistenz gegenüber der Tamoxifenbehandlung in Mammakarzinomen fördert [215]. Auch die GDF15-Überexpression in Kolonkarzinomzelllinien kann über einen PI3K-AKT-abhängigen Mechanismus die Chemotherapieresistenz gegenüber Oxaliplatin-, 5-Fluorouracil- und SN38-Exposition erhöhen [216].

1.6. Immuntherapien und targetierte Therapien

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, ist die Wirksamkeit der Chemotherapie in fortgeschrittenen Stadien oder Rezidiven des Ovarialkarzinoms in den Frühstadien (I-II) gering. Auch die Entwicklung neuer, verbesserter Chemotherapiereagenzien war bislang unbefriedigend. Immuntherapien mit Zytokinen wie IFN-(Interferon)- α , IFN- γ , TNF- α , IL-2 sind dagegen sehr vielversprechend [217-219]. In einer Phase-II-Studie konnte bei 53 operierten, standardtherapierten Patientinnen die zusätzliche Therapie von IFN- α ein Ansprechen von insgesamt 40 % und ein absolutes Ansprechen („*complete response*“) von 25 % zeigen. Bevacizumab, ein humaner anti-VEGF-A-Antikörper, blockiert die Interaktion zwischen VEGF und dem VEGF-Rezeptor (VEGFR) und hat eine hohe Aktivität in platin sensitiven sowie eine moderate Aktivität in platinresistenten Patientinnen mit einer Ansprechbarkeit von 16 - 22 % [220, 221]. Auch mit der Anwendung der AKT-Inhibitoren Perifosin und MK-2206 in der Klinik konnte bereits eine Ansprechbarkeit in Patientinnen mit einem platinresistenten Ovarialkarzinom demonstriert werden (Kapitel 1.4.2.). Andere zielgerichtete Therapien mit Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sorafinib oder Histondeacetylaseinhibitoren wie Vorinostat in Patientinnen mit einem serösen „*high-grade*“-Ovarialkarzinom induzierten im Durchschnitt nur eine geringe Ansprechbarkeit (10 %) und eine Verlängerung des Überlebens unter 6 Monaten [222, 223]. Hormontherapien mittels Aromatasehemmer oder Östrogenrezeptorantagonisten, wie z. B. Tamoxifen, zeigen ebenfalls nur eine geringfügiges Ansprechen von insgesamt 20 % in Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom auf [224, 225].

Hiermit wird deutlich, dass bisher, trotz vieler neuer zielgerichteter Therapiemöglichkeiten, kein Durchbruch für die Behandlung chemotherapieresistenter Ovarialkarzinome stattgefunden hat. Somit sind Substanzen die gezielt der Platinresistenz entgegenwirken, unbedingt erforderlich.

1.7. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, potentiell neue Zielmoleküle als Basis für eine zielgerichtete Therapie im chemotherapieresistenten Ovarialkarzinom zu identifizieren. Dazu sollten die humane Ovarialkarzinomzelllinie A2780 und deren cisplatinresistente Tochterzelllinie A2780cis nach der Carboplatintherapie *in vitro* und *in vivo* zunächst vergleichend charakterisiert werden. Neben der *in vitro* Evaluierung stand vor allem die Genexpressionsanalyse mittels *Microarray* in subkutanen A2780- und A2780cis-Tumoren *ex vivo* im Fokus. Hierbei sollten differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, die sowohl in der intrinsischen als auch in der erworbenen Chemotherapieresistenz eine Rolle spielen könnten. Mit der Überprüfung der Expression dieser Faktoren auf RNA- sowie Proteinebene, sollte schließlich ein potentieller, resistenzabgeleiteter Faktor für die weitere Analyse selektiert werden. Um den kausalen Zusammenhang zwischen Platinresistenz und dem selektierten Faktor zu analysieren, sollte ein siRNA- und shRNA-vermittelte Herunterregulation in A2780cis-Zellen *in vitro* und *in vivo* Aufschluss geben. Dazu war vor allem die Aufklärung der molekularen Funktion des selektierten Faktors in Hinblick auf bekannte resistenzvermittelnde Signalwege von Bedeutung. Abschließend sollte überprüft werden, ob dieser Faktor bei zielgerichteter Herunterregulation *in vitro* und *in vivo* zu einer möglichen Resensitivierung gegenüber der Chemotherapie und zu einer Reduktion des Tumorwachstums führen kann. Dies könnte die Grundlage für einen potentiellen neuen Therapieansatz für Patientinnen mit einem chemotherapieresistenten Ovarialkarzinom sein.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.1.) werden die in dieser Arbeit verwendeten Geräte alphabetisch mit den zugehörigen Herstellerangaben aufgeführt.

Tabelle 2.1. Geräte

Geräte	Hersteller
7500 Fast <i>Real-Time PCR</i> System	Applied Biosystems
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
CO ₂ -Brutschrank HERAcell® 150i	Thermo Scientific
Countess® automated cell counter	Invitrogen, Life Technologies
Dampfgarer FS 20	Braun
Eindeckautomat Microm CTM 6	Thermo Scientific
FACS Calibur™ Flow Cytometer	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Heraeus® Multifuge® 3 Plus	Thermo Scientific
HM 560 CryoStar Cryostat	Thermo Scientific
Hybridisierungs-ofen (<i>Microarray</i>)	Agilent Technologies
iBlot® Transfer Stack, PVDF, mini	Invitrogen, Life Technologies
Lichtmikroskop Primo Star	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Little Dipper® Processor	SciGene
Microm HM 355 S	Thermo Scientific
Microplate Reader Sunrise™	Tecan
MIRAX MIDI	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000	Bio-Rad
Multilabel Reader Victor 3™	PerkinElmer
Multipette® Plus	Eppendorf
NanoDrop® 2000/2000c UV/VIS-Spektrometer	Thermo Scientific
Odyssey® Infrared Imaging System	Li-Cor Biosciences
Pipetten Research® (variabel) 1- 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf
Pipettierroboter EpMotion® 5075 TMX	Eppendorf
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph

Precellys® 24 Homogenisator	Peqlab
PTC-200 Thermocycler	MJ Research
QIAcube® (12 samples)	Qiagen
Retsch® TissueLyser II 400	Qiagen
Schieblehre	Mitutoyo
SECTOR PR® 100 reader	Meso Scale Discovery
Thermomixer® Comfort	Eppendorf
TRobot Thermocycler	Biometra
VICTOR™ X Multilabel Plate Reader	PerkinElmer
Vortexer, reax top	Heidolph
Waage Sartorius BP 2100 OCE	Sartorius AG
xCELL SureLock™ mini-, Midi-Cell Electrophoresis System	Invitrogen, Life Technologies
xCELLigence RTCA DP Instrument	Roche Diagnostics
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.2.) werden die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien alphabetisch mit zugehörigen den Herstellerangaben aufgeführt.

Tabelle 2.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
15 ml, 50 ml Zentrifugenröhrchen, steril	Corning, BD Biosciences
10 %, 4-12 % Bis-Tris Gele	NuPAGE, Life Technologies
5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Falcon, BD Biosciences
6-, 12-, 24-Well Cell Culture Microplates, polystyrene, clear	Corning, BD Biosciences
8er Reihe 0,2 ml PCR Gefäße	Eppendorf
96-Wellplatten, opaque bottom (weiß, schwarz)	Corning, BD Biosciences
ABI PRISM™ 384-Well Clear Optical Reaction Plate	Applied Biosystems
CL-XPosure Film	Thermo Scientific
Codan Tuberkulin 1 ml Spritze	B. Braun Melsungen
Combitips® plus Biopur 0,2 ml; 0,5 ml; 2,5 ml; 5 ml	Eppendorf
Countess™ cell counting chamber slide	Invitrogen, Life Technologies
Deckgläschen	Menzel-Glaser
epT.I.P.S.® Dualfilter Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
Etiketten, "Cryo-Babies"	Sigma-Aldrich
Fettstift, , XT001-PP, RevF608	BioGenex
FluoroBlok™ 24-MultiWell Insert System	BD Falcon, BD Biosciences
Gel-loading tips, 1 - 200 µL	Corning, BD Biosciences

Handschuhe S	Kimberly-Clark
HistoMold Einbettförmchen	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Human HT-12v3 Bead Sentrix® Bead Chip	Illumina
iBlot® Transfer Stack, nitrocellulose	Invitrogen, Life Technologies
iBlot® Transfer Stack, PVDF	Invitrogen, Life Technologies
Li-He Röhrchen	Sarstedt
MicroWell™ 96-Well Microplates	Nunc™
Nunc™ Biobanking and Cell Culture Cryogenic Tubes	Fisher Scientific
Objektträger, SuperFrost®Plus	Thermo Scientific
Optical adhesive covers	Applied Biosystems
Pasteurpipetten, "Pasteur Capillary Pipettes 230 mm"	WU Mainz
Pipettenspitzen 10 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen Matrix® 30 µl; 125 µl; 1250 µl	Thermo Scientific
Pipettenspitzen, steril mit Filter, Matrix® 30 µl; 125 µl; 1250 µl	Thermo Scientific
Precellys 24® Keramikperlen 1,4 mm, 0,5 ml	Precellys 24
QIAshredder Röhrchen (50)	Qiagen
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf
Reservoir Matrix® 25 ml; 100 ml	Matrix, Thermo Scientific
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
Sealing Tape, clear	Nunc, Thermo Scientific
Stainless Steel Beads, 5 mm (200)	Qiagen
Sterican® Kanüle Gr.12, 20	B. Braun Melsungen
SuperFrost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser
xCELLigence E-Plate 16	Roche Diagnostics
Zellkulturflaschen 25 cm ² ; 75 cm ² ; 125 cm ² ; 300 cm ²	Corning, BD Biosciences
Zellkulturschalen, easy-grip 60 x 15 mm	Corning, BD Biosciences
Zellschaber, „Cell lifter“	Corning, BD Biosciences

2.1.3. Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.3.) werden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungen alphabetisch mit den zugehörigen Herstellerangaben aufgeführt.

Tabelle 2.3. Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Chemikalie / Reagenz / Lösung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
2-Methylbutan	Sigma-Aldrich
BAY 1001931, AKT-Inhibitor	Bayer Pharma AG
Biotin Blocking System	Dako

BLOT-QuickBlocker™ Reagent; 175 gm	Millipore
Carboplatin	Sigma-Aldrich
Cisplatin	Sigma-Aldrich
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Diaminobenzidin (DAB+ Substrate, Chromogen System)	Dako
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
Eosin Y disodium salt	Sigma-Aldrich
Ethanol, absolut ≥99.8 % (GC)	Sigma-Aldrich
Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium	Sigma-Aldrich
gepuffertes Formalin 4 % m/v	Q Path, Labonord
Glutaraldehydlösung, 25 % in H ₂ O	Sigma-Aldrich
H ₂ O ₂ 35 Gew.- % in H ₂ O	Sigma-Aldrich
Hematoxylin solution according to Mayer	Sigma-Aldrich
Hexadimethrine bromide (Polybrene)	Sigma-Aldrich
HiPerFect® Transfection Reagent	Qiagen
Hoechst 33342	MolecularProbes®, Life Technologies
Isopropanol, 5l	Fisher Scientific
Kristallviolett, Lösung	Sigma-Aldrich
Methanol	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard	Invitrogen, Life Technologies
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 x)	Invitrogen, Life Technologies
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10 x)	Life Technologies
Odyssey® Protein Molecular Weight Marker	Li-Cor
Paclitaxel 5mg	Sigma-Aldrich
Paraffinwachs	Sigma-Aldrich
Peroxidase Blocking Reagent (<i>ready-to-use</i>)	Dako
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Thermo Scientific
PhosSTOP Tablette	Roche
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Protein Block Serum-free (<i>ready-to-use</i>)	Dako
Puromycin dihydrochloride	Sigma-Aldrich
ReBlot™ Plus Strong Antibody Stripping Solution (10 x)	Millipore
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	Applied Biosystems
Target Retrieval Solution (10 x) pH 6, pH 9	Dako
Tissue Freezing medium	Leica, Jung

Titriplex® III (Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat)	Millipore
Triton™ X-100	Sigma Aldrich
Trypan Blue Stain (0.4 %)	Invitrogen, Life Technologies
Tween®20	Sigma Aldrich
UltraPure™ 10 % SDS Solution	Invitrogen, Life Technologies
Xylol	Sigma-Aldrich

2.1.4. Fertigsysteme (*Kits*)

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.4.) werden die in dieser Arbeit verwendeten *Kits* alphabetisch mit den zugehörigen Herstellerangaben aufgeführt. Die *Kits* wurden exakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Etwaige Abweichungen werden im Kapitel 2.2. beschrieben.

Tabelle 2.4. Fertigsysteme (*Kits*)

<i>Kit</i>	Hersteller
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	Promega
ARK™ (Animal Research <i>Kit</i>) Peroxidase	Dako
Caspase-Glo® 3/7	Promega
CellTiter-Glo® Lu minescent Cell Viability	Promega
Cellular Senescence Assay <i>Kit</i>	Chemicon international
Human Phosphokinase Antibody Array <i>Kit</i> (ARY003)	R & D Systems
Human HT-12v3 Expression Bead Chip Array <i>Kit</i>	Illumina
Illumina® TotalPrep™-96 RNA Amplification <i>Kit</i>	Ambion, Life Technologies
In situ cell death detection <i>Kit</i> POD (TUNEL Assay)	Roche
Pierce™ BCA Protein Assay <i>Kit</i>	Thermo Scientific
Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay <i>Kit</i>	Life Technologies
RNAse free DNase I set	Qiagen
RNeasy Plus mini <i>Kit</i>	Qiagen
SuperScript® III First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Life Technologies
ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix	Invitrogen, Life Technologies

2.1.5. ELISA und *Multiplex-Assays*

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.5) werden die in dieser Arbeit verwendeten ELISA und *Multiplex-Assays* alphabetisch mit den zugehörigen Herstellerangaben aufgeführt. Die ELISA bzw. *Multiplex-Assays* wurden exakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Etwaige Abweichungen werden im Kapitel 2.2. beschrieben.

Tabelle 2.5. ELISA und Multiplex-Assays

ELISA / Multiplex-Assay	Hersteller
Akt Signaling Panel II Whole Cell Lysate Kit	Meso Scale Discovery
Apoptosis Whole Cell Lysate Kit	Meso Scale Discovery
Cytokine Array	Meso Scale Discovery
HIV-p24-Antigen ELISA	PerkinElmer
Human GDF-15 Quantikine® ELISA Kit	R & D Systems
Human IL-6 Quantikine® ELISA Kit	R & D Systems
Human P4HA2 ELISA Kit	Uscn, Life Science Inc.
Human TNF- α Quantikine® HS ELISA Kit	R & D Systems
Phospho (473) / total Akt Assay Whole Cell Lysate Kit	Meso Scale Discovery

2.1.6. Medien und Zusätze für die Zellkultur

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.6) werden die in dieser Arbeit verwendeten Medien und Zusätze für die Zellkultur alphabetisch mit den zugehörigen Herstellerangaben aufgeführt. Das Fötale Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS) wurde bei jeder neuen Charge auf Kontaminationen von Viren und Bakterien getestet.

Tabelle 2.6. Medien und Zusätze für die Zellkultur

Medium / Mediumzusatz	Hersteller
Dulbecco's PBS-Lösung (DPBS) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG
Fötale Bovines Serum (<i>Fetal calf serum</i> , FBS)	Biochrom AG
Mynox® Gold	minerva Biolabs
Opti-MEM® I Reduced Serum Media	Life Technologies
RPMI1640 mit stabilem Glutamin mit 2,0 g/l NaHCO ₃	Biochrom AG
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG

2.1.7. Zelllinien

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.7.) werden die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Zusätze für die Zellkultur mit den zugehörigen Herkunftsorten alphabetisch aufgelistet. Alle Zelllinien wurden mit Hilfe des DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) authentifiziert und monatlich auf Mykoplasmenkontamination getestet.

Tabelle 2.7. Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	Authentifizierung
A2780 [226]	Humane Ovarialkarzinomzelllinie, adhären, epithelial; Cisplatin- und Adriamycin-sensitiv	ECACC	DMSZ authentifiziert
A2780cis [226]	Humane Ovarialkarzinomzelllinie, adhären, epithelial; Cisplatin- und Adriamycin-, Melphalan-, und Bestrahlungssensitiv	ECACC	DMSZ authentifiziert
ES-2 [25]	Humane Zelllinie abgeleitet von einem Klarzelligen Ovarialkarzinom, fibroblastisch, adhären	ATCC	DMSZ authentifiziert
MCF-7 [25]	Humane Zelllinie abgeleitet von einem metastasierenden Mammakarzinom, epithelial, adhären	DSMZ	DMSZ authentifiziert
NCI-ADR-RES [227]	Ursprung unbekannt, höchstwahrscheinlich abgeleitet von OVCAR-8 (Humanes Ovarialkarzinom, epithelial, adhären), Adriamycin-resistent	ATCC	DMSZ authentifiziert
OVCAR-3 [39]	Humane Zelllinie abgeleitet von einem ovariellen Adenokarzinom, epithelial, adhären	NCI-60	DMSZ authentifiziert
PA-1 [40]	Humane Zelllinie abgeleitet von einem kaukasischen Ovarialteratokarzinom, epithelial, adhären	ECACC	DMSZ authentifiziert
SKOV-3 [41]	Humane Zelllinie abgeleitet von einem ovariellen Adenokarzinom, Aszites, epithelial, adhären	ATCC	DMSZ authentifiziert

2.1.8. Patientenabgeleitetes Gewebe

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.8.) werden die in dieser Arbeit verwendeten patientenabgeleiteten Gewebe (primäres Gewebe) aufgelistet. Die Entnahme und Einstufung der Malignität des Gewebes (*Grading*) sowie die Feststellung der klinischen Sensitivität gegenüber

der Standardtherapie - bestehend aus Carboplatin und Taxol - wurde jeweils durch Dritte an der Universität Kiel / Gynäkologische Onkologie durchgeführt.

Tabelle 2.8. Patientenabgeleitetes Gewebe

Bezeichnung / Anzahl	Beschreibung	Klinische Sensitivität Carboplatin / Taxol
A (n = 1)	gesundes Ovargewebe	-
B (n = 2)	Primäres Ovarialkarzinomgewebe, FIGO Stage III C	sensitiv
C (n = 3)	Primäres Ovarialkarzinomgewebe, FIGO Stage III C	intermediär
D (n = 6)	Primäres Ovarialkarzinomgewebe, FIGO Stage III C	resistent

2.1.9. Antikörper

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.9.) werden die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper mit den zugehörigen Herstellerangaben sowie anwendungsbezogenen Details aufgeführt. Alle aufgelisteten Primärantikörper weisen eine humane Reaktivität aus. Die Sekundärantikörper sind gegen verschiedene Spezies gerichtet.

Tabelle 2.9. Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller	Isotyp	Verdünnung	Applikation
<i>Primärantikörper</i>					
AKT	11E7	Cell Signaling	<i>Rabbit</i>	1:1000	WB
p-AKT (Ser473)	D9E	Cell Signaling	<i>Rabbit</i>	1:2000	WB
DRAM1		abcam	<i>Rabbit</i>	1:1000	WB, IF
SULF2	2B4	Novus Biological	<i>Mouse</i>	1: 1000	WB, IF
LMNA	131C3	abcam	<i>Mouse</i>	1: 1000	WB
Cyclin D1	M-20	Santa Cruz	<i>Rabbit</i>	1:200	WB
P16 INK4A		Cell Signaling	<i>Rabbit</i>	1:1000	WB
P21 Waf1/Cip1	12D1	Cell Signaling	<i>Rabbit</i>	1:1000	WB

PCNA	PC10	Cell Signaling	Mouse	1:2000	WB
p-P53 (Ser15)	poly	Cell Signaling	Rabbit	1:1000	WB
P53	7F5	Cell Signaling	Rabbit	1:1000	WB
β-actin	AC-74	SIGMA-Aldrich	Mouse	1:2000	WB
CD45	poly	abcam	Rabbit	1:500	IHC-Kryo
GAPDH	14C10	Cell Signaling	Rabbit	1:1333	WB
Ki-67	MIB-1	Dako	Mouse	1:100	IHC-Kryo
P27 Kip1		Cell Signaling	Rabbit	1:1000	WB
Ki-67	SP6	abcam	Rabbit	1:100	IHC-P
BCL2	50E3	Cell Signaling	Rabbit	1:1000	WB
Cleaved Caspase-3	Asp175	Cell Signaling	Rabbit	1:200	IHC-P

Sekundärantikörper

Labelled Polymer-HRP (HRP, horseradish peroxidase)		EnVision™ Dako	Rabbit	Ready-to-use	IHC-P
Fluorescein, Goat Anti- Mouse	IgG (H + L)	Life Technologies	Goat	1:1000	IF
Fluorescein, Goat Anti- Rabbit	IgG (H + L)	Life Technologies	Goat	1:1000	IF
AlexaFlour 680nm, Goat Anti-Mouse	IgG (H + L)	Life Technologies	Goat	1:1000	WB
AlexaFluor 680nm, Goat Anti-Rabbit	IgG (H + L)	Life Technologies	Goat	1:1000	WB

*IHC-Kryo = Immunhistochemie (IHC) auf Kryoschnitten, IHC-P = IHC auf Paraffinschnitten, IF = Immunfluoreszenz, WB = Westernblot

2.1.10. Puffer und andere Lösungen

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.10.) werden die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen alphabetisch mit den zugehörigen Herstellerangaben aufgelistet.

Tabelle 2.10. Puffer und andere Lösungen

Puffer / Lösung	Hersteller
5 x siRNA Universal Buffer	Dharmacon
Antibody diluent, ready-to-use	Dako

GIBCO® Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS 1 x)	Biochrom
Matrigel® Basement Membrane 10ml	BD Biosciences
NaCl 0,9 %	Fresenius Kabi AG
Normal Goat serum	Dako
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20 x)	Life Technologies
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20 x)	Life Technologies
steriles Wasser, AMPUWA®	Fresenius Kabi AG
Tris Buffered Saline (TBS 10 x)	Sigma-Aldrich

2.1.11. Mausmodell

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.11.) werden das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell mit dem zugehörigen Züchter und der Tierstammbezeichnung aufgeführt.

Tabelle 2.11. Mausmodell

Spezies	Bezeichnung	Tierstamm	Herkunft
<i>Mus musculus</i>	Fox Chase SCID®	CB17/Icr- <i>Prkdc^{SCID}/IcrCrl</i>	Charles River Sulzfeld

2.1.12. TaqMan®-Assays

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.12.) werden die in dieser Arbeit verwendeten TaqMan®-Assays alphabetisch aufgelistet. Alle Assays wurden anhand der höchsten Validierungsstufe (m1) von der Firma Applied Biosystems ausgewählt. Die zugehörigen Sequenzen können unter Angabe der Assaynummer von der Herstellerseite entnommen werden.

Tabelle 2.12. TaqMan®-Assays

Bezeichnung	Assay Nummer	Hersteller
Cyclophilin A	4326316E	Applied Biosystems
DRAM1	Hs01014914_m1	Applied Biosystems
GDF15	Hs00171132_m1	Applied Biosystems
LMNA	Hs00153462_m1	Applied Biosystems
P4HA2	Hs00989996_m1	Applied Biosystems
SULF2	Hs01016476_m1	Applied Biosystems

2.1.13. siRNA (*small interfering RNA*)

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.13.) werden die in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Nukleotide anhand ihrer jeweiligen Zielgene alphabetisch aufgelistet. Die zugehörigen Sequenzen können unter Angabe der Referenz auf den Herstellerseiten entnommen werden.

Tabelle 2.13. siRNA

Zielgen	Bezeichnung	Referenz / Bestellnummer	Hersteller
GDF15	siGENOME Set of 4 Upgrade siRNA, 2 nmol	D-019875-01	Thermo Scientific, Dharmacon
		D-019875-02	
		D-019875-03	
		D-019875-04	
non-target	siGENOME Non-Targeting, 5 nmol	D-001210-02	Thermo Scientific, Dharmacon
PLK1	siGENOME Set of 4 Upgrade siRNA, 2 nmol	D-003290-05	Thermo Scientific, Dharmacon
		D-003290-06	
		D-003290-07	

2.1.14. Lentivirale Konstrukte

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.14.) werden die in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Konstrukte (*MISSION® shRNA transduction particles*) mit dem zugehörigen Leervektor (pLKO.1-puro, Lentiviraler Vektor ohne shRNA-Konstrukt) aufgelistet. Die zugehörigen Sequenzen können unter Angabe der Referenz auf den Herstellerseiten entnommen werden.

Tabelle 2.14. shRNA-Vektoren / Viren

Zielgen	Referenz / Bestellnummer	Hersteller	Bezeichnung	Virustiter TU/ml
GDF15	TRCN0000058388	SIGMA	A2780cis-shGDF15-1	1,10E+07
GDF15	TRCN0000058389	SIGMA	A2780cis-shGDF15-2	1,20E+07
GDF15	TRCN0000058390	SIGMA	A2780cis-shGDF15-3	1,10E+07
GDF15	TRCN0000058391	SIGMA	A2780cis-shGDF15-4	1,10E+07
GDF15	TRCN0000058392	SIGMA	A2780cis-shGDF15-5	1,90E+07
-	SHC001, pLKO.1-puro	SIGMA	A2780cis-shTRC1	1,91E+07

2.1.15. Sonstiges

Andere Labormaterialien die den vorangegangenen Kategorien nicht untergeordnet werden können, sind im Folgenden (Tabelle 2.15.) alphabetisch aufgelistet.

Tabelle 2.15. Sonstiges

Bezeichnung	Hersteller
Bechergläser 50, 100, 200 ml	Duran
Feuchtkammer	Bayer Pharma AG Werkstatt
Glasflaschen 100, 200, 500, 1000, 2000 ml	Duran
Isopropanolbehälter für Kryogefäße zum Einfrieren	Fisher Scientific, Nalgene
Pinzetten, Scheren, Skalpellhalter	Aesculap
RNaseZap	Ambion
Stickstoffbehälter, Dewar-Gefäß	Karlsruher Glastechnisches Werk
Stickstofftank	Airliquid

2.1.16. Software

In der folgenden Tabelle (Tabelle 2.16.) werden die in dieser Arbeit verwendeten Softwaresysteme alphabetisch aufgelistet.

Tabelle 2.1.16. Software

Software	Anbieter	Verwendungszweck
GraphPad Prism 6	GraphPad	Erstellung von Graphiken und Statistiken
Adobe Illustrator CS5	Adobe	Erstellung von Graphiken
Axiovision Rel.4.6.3	Zeiss	Fluoreszenzmikroskopie- und Photographie
CorelDRAW X5	Corel	Erstellung von Graphiken
Genedata Analyst™	Genedata	Genexpressionsanalyse
GeneData MedScanReader	Ariadne Genomics	Literatursuche
Image Studio Software (IS)	Li-Cor Biosciences	Quantifizierung von Western Blots
ImageJ	Java, National Institute of Health (NIH)	Quantifizierung histologischer Färbungen
Pathway Studio 9.0	Ariadne Genomics	Pathwayanalyse

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Isolation, Konzentrationsbestimmung und Qualitätsüberprüfung von RNA

Für die RNA-Isolierung aus Tumoren wurde das Gewebe mittels Skalpell zügig auf Trockeneis zerkleinert und anschließend direkt in 4 °C gekühlte 1 ml-Röhrchen mit Keramikkügelchen (Precellys 24) und 500 µl vorgelegtem RLT-Plus-Puffer (Qiagen) (+ 2-Mercaptoethanol) überführt. Anschließend wurden die zerkleinerten Gewebestücke bei 5000 rpm für 20 min im *Precellys 24*-Rotor (Peqlab) homogenisiert und nach 2-minütigen Abkühlen auf Eis mittels Tischzentrifuge kurz herunterzentrifugiert. Zur Isolierung der RNA aus Tumorzellen in Kultur wurde zunächst das gefrorene Zellpellet im 1,5-ml-Reaktionsgefäß durch Zugabe von 4 °C kaltem 350 µl RLT-Plus Puffer unter ständigem Mixen homogenisiert und lysiert. Das Entfernen der DNA aus den Tumor- und Zellysaten erfolgte mittels Zentrifugation durch eine *gDNA-Eliminator*-Säule (Qiagen). Der aufgereinigte Durchfluss wurde nun nach dem Protokoll vom Hersteller des *RNeasy Plus Kits* (Qiagen) manuell oder maschinell im *Qiacube* weiterprozessiert. Abschließend erfolgte die Eluierung der RNA in RNase-freiem Wasser und die Konzentrationsbestimmung bei 260 nm am Nanodrop 2000/2000c UV/VIS-Spektrometer mit 1 µl Probenvolumen. Zur Überprüfung der Kontamination auf DNA und Proteine wurde zudem das Verhältnis 260nm/280 nm notiert. Bei einem Verhältnis außerhalb von 260 nm/280 nm = 1,8 - 2,2 wurden die RNA-Proben verworfen. Des Weiteren konnte mithilfe des Bioanalyser2000 (Agilent) eine zusätzliche RNA-Degradationen bestimmt und die Proben für weiterführende *Microarray*-Experimente anhand der RNA-Integritätszahl (RIN) von 8-10 ausgewählt werden.

2.2.1.2. cDNA-Synthese

Zur Herstellung von cDNA (*complementary DNA*, komplementäre DNA) aus RNA wurde das *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit* (Invitrogen, Life Technologies) verwendet. Dazu wurden nach Angabe des *Kit*-Herstellers 500 - 1000 ng RNA in cDNA transkribiert. Hierfür wurden die in der Tabelle 2.17a. aufgeführten Komponenten des *Kits* zusammen pipettiert und für die RNA-Primer-Anlagerung für 5 min bei 65 °C im *Thermocycler* inkubiert:

Tabelle 2.17a. cDNA-Synthese Schritt 1

Komponente	Volumen
RNA (bis zu 1 µg)	n µl
Random Hexamer Primer (50 ng/µl)	1 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
dest. H ₂ O	bis zu 10µl
Summe	10 µl

Anschließend erfolgte die Zugabe der reversen Transkriptase mit den zugehörigen Kofaktoren und anderen Komponenten (Tabelle 2.17b.) zum RNA-Primer-Mix:

Tabelle 2.17b. cDNA-Synthese Schritt 2

Komponente	Volumen
10 x RT Puffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl
SuperScript III RT (200 U/µl)	1 µl
Summe	10 µl

Die Reaktion erfolgte dann für 10 min bei 25 °C, gefolgt von 50 min bei 50 °C und 5 min bei 85 °C im *Thermocycler*. Um abschließend die noch restliche RNA zu eliminieren, wurde 1 µl RNase H pro Ansatz für 20 min bei 37 °C inkubiert. Bis zur Anwendung wurde die gewonnene cDNA bei 20 °C gelagert.

2.2.1.3. Semiquantitative *Real-Time PCR* (*qRT-PCR*)

Die semiquantitative *Real-Time PCR* wurde mithilfe von *TaqMan*®-Assays in 384-Vertiefungsplatten (*Wellplattes*) durchgeführt. Pro Vertiefung (*Well*) wurden folgende Komponenten in Triplikaten zusammenpipettiert (Tabelle 2.18.)

Tabelle 2.18. semiquantitative *Real-Time PCR*

Komponente	Volumen
cDNA (10-20 ng)	n µl
dest. H ₂ O	bis zu 4,5 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	5 µl
TaqMan Sonde	0,5 µl
Summe	10 µl

Nach dem Abdecken der Platte mit einem Plastikadhäsivfilm erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei 10 000 rpm und die Messung der *Real-time-PCR*-Produkte am *Real-Time PCR Cycler* (Applied Biosystems). Die Ermittlung einer differentiellen Genexpression erfolgte dabei auf der Basis der sogenannten $\Delta\Delta Ct$ -Methode. Daten mit einer Standardabweichung von $\geq 0,5$ Zyklen wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Normalisierung der Daten erfolgte über die Verrechnung jeweils der Ct-Werte von Cyclophilin und der zugehörigen biologischen Kontrolle (z. B. chemotherapiesensitive Zelllinie, genauere Angaben siehe Kapitel 3).

2.2.1.4. *Illumina Whole Genome Bead Chip Array (HT-12v3)*

Die Gewinnung von cRNA aus Tumorsysaten und dessen Hybridisierung auf einem humanen *Illumina Whole Genome Bead Chip Array (HT-12v3, Sentrix)* (*Microarray*) wurde innerhalb des Unternehmens der Bayer Pharma AG durchgeführt. Im Folgenden eine kurze Zusammenfassung der einzelnen Schritte bis einschließlich der Datenübertragung in die Software *Genedata Analyst Expressionist* (Software zur Auswertung der differentiellen RNA-Expression): Nach der erfolgreichen Qualitätskontrolle der RNA (Kapitel 2.2.1.1.) erfolgte die reverse Transkription auf der *Biometra-T-Robot* Plattform von ≤ 500 ng RNA zu cDNA und anschließend zu biotinmarkierter cRNA mittels *Illumina Total Prep-96 RNA Amplification Kit* nach dem Protokoll des Herstellers. Für die optimale Reinheit der RNA-Probe wurde ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt mit *Magnetbeads* (Agencourt RNAClean) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der cRNA mit *RiboGreen* ebenfalls nach Instruktionen des Herstellers. Nach der wiederholten cRNA-Qualitätsüberprüfung mit dem *Agilent Bioanalyzer 2100* wurde die cRNA-Hybridisierung auf *Illumina Sentrix Arrays (HT-12v3)* durchgeführt. Dabei werden die cRNA-Proben vorsichtig in die 6 - 12 Slots der Hybridisierungskammern pipettiert und im 58 °C vorgeheizten Hybridisierungsöfen für 16 h bei 85 °C inkubiert. Anschließend werden die *Illumina Sentrix Arrays* mehrmals gewaschen und mithilfe der *LittleDipper*-Plattform gefärbt. Die Anzahl der biotinmarkierten RNA-Moleküle an die 29-mer gekoppelten *Beads* ergeben die Intensität des Signals, das mithilfe des *Bead-Array-Readers* gemessen wird. Der *Human HT-12v3 Expression Bead Chip Array Kit* beinhaltet die Hybridisierung von $> 47\ 000$ *probe sets (29mer Oligonukleotide)*. Der gesamte Datensatz der Genexpressionsrohdaten kann der *Homepage* von *ArrayExpress* entnommen werden (E-MTAB-1858).

2.2.1.5. siRNA-vermittelte RNA-Herunterregulation

Für die siRNA-vermittelte Herunterregulation der GDF15-RNA (*RNA-Knockdown*) wurden im Rahmen dieser Arbeit jeweils vier verschiedene siRNA-Nukleotide (*siGenome*, Dharmacon) mit jeweils unterschiedlicher Sequenzabfolge in A2780 und A2780cis-Zellen transfiziert. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte 7500 A2780- bzw. A2780cis-Zellen pro *Well* in 200 μ l

RPMI1640/10 % FBS ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde 150 µl Zellkulturmedium gegen 100 µl frisches 0,1 %-FBS-haltiges Routinemedium ausgetauscht und das Transfektionsreagenz (*HiPerFect Transfection Reagent*, Qiagen) mit der siRNA in serumfreiem Medium (*Opti-MEM® I Reduced Serum Media*, Life Technologies) vermischt und 5 - 10 min bei RT inkubiert. Insgesamt 50 µl von dem Transfektionsreagenz-siRNA-Gemisch wurden anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft und nach kurzem Schwenken für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das transfektionsreagenzhaltige Medium gegen frisches RPMI1640/10 % FBS ausgetauscht und die transfizierten Zellen je nach Bedarf für weitere 24 h, 48 h und 72 h kultiviert. Zur Ermittlung der *Knockdowneffizienz* wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 100 µl 4 °C kaltem DPBS gewaschen und die Zellen direkt in 100 µl RLT-Puffer lysiert (RNA-Isolation) oder mit der Pipettenspitze und 100 µl 4 °C gekühlten 1 x DPBS abgeschabt (Protein-Isolation). Die lysierten bzw. abgeschabten Zellen wurden, wie nach Kapitel 2.2.1.1. und Kapitel 2.2.4.1. beschrieben, weiterprozessiert und schließlich bei -20 °C oder -80 °C gelagert. Für die Kombination aus siRNA-*Knockdown* und Carboplatintherapie *in vitro* wurden A2780- und A2780cis-Zellen 24 h nach siRNA-Transfektion mit 10 µM Carboplatin behandelt und für weitere 24 h, 48 h oder 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Neben der Analyse der RNA- sowie Proteinexpression erfolgte die Messung der Proliferation nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h mittels Zugabe von *CellTiter®-Glo* (100 µl/Well) und die Messung der Lumineszenz am Luminometer (PerkinElmer).

2.2.1.6. shRNA-vermittelte RNA-Herunterregulation

Für die Generierung einer konstitutiven shRNA-vermittelten Herunterregulation der GDF15-RNA in A2780cis-Zellen wurde die Methode der lentiviralen Transduktion gewählt. Dazu wurden die lentiviralen Partikel TRC1-shGDF15-1 bis -5 direkt als fertige Viren (Tabelle 2.14.) gekauft und verwendet. Die lentiviralen shRNA-Kontrollkonstrukte (shTRC1) wurden hingegen zunächst als pLKO.1-puro-Plasmid in die Verpackungszelllinie HEK293FT mittels *HiPerFect Transfection Reagent* (Qiagen) transfiziert und als fertigen Viren im Überstand gewonnen. Dazu wurden 3 µg der lentiviralen shRNA-Kontroll-Plasmid-cDNA und 9 µl *Packaging Mix* (ViraPower) vorsichtig miteinander vermischt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf HEK293FT gegeben. Nach der Inkubation ÜN bei 37 °C, 5 % CO₂ und einem Medienwechsel am nächsten Tag wurde der virusbeinhaltende Mediumüberstand in einem Abstand von 24 h bis zu 72 h nach Transfektion gesammelt und bei 4 °C gelagert. Die Viren konnten dann durch 2 h Zentrifugation bei 50 000 – 55 000 g und 4 °C gewonnen und für die Bestimmung des Virustiters und der nachfolgenden Transduktion in A2780cis Zellen in HBSS Puffer aliquotiert werden.

2.2.1.7. shRNA-Transduktion und puromycinvermittelte Selektion

Für die Transduktion lentiviraler shRNA-Konstrukte wurden A2780cis-Zellen in 12-Wellplatten mit 400 000 pro Well im Routinemedium ohne Cisplatinzusatz ausgesät und über Nacht (ÜN) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, die Viren in einer Konzentration von MOI (*multiplicity of infection*) = 7 vorsichtig auf die Zellen getropft und anschließend für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel (6 x) zu frischem RPMI1640/10 % FBS, die ÜN-Kultivierung und am nächsten Tag ein wiederholter Mediumwechsel (6 x). Die positiv shTRC1- bzw. shGDF15-transduzierten A2780cis-Zellen konnten nun in 1 µg/µl Puromycin-haltigen Medium selektioniert werden. Die shGDF15-A2780cis-Zellen wurden schließlich sobald die nichttransduzierten A2780cis-Zellen unter Puromycinbehandlung von 1 µg/ml abgestorben waren, in 10 % DMSO/FBS eingefroren und für spätere Analysen im Stickstofftank gelagert oder direkt für den Koloniebildungsassay (Kapitel 2.2.2.7.) ausgesät. Die Puromycinkonzentration von 1 µg/ml wurde dabei auf der Grundlage einer vorangegangenen Zytotoxizitätsstudie in nichttransduzierten A2780cis-Zellen ermittelt. Hierbei wurden 90000 A2780cis-Zellen pro Well in einer 12-Wellplatte ausgesät und nach 24 h Wachstum bei 37 °C und 5 % CO₂ mit jeweils 500 µl 0,25 – 10 µg/µl Puromycin für 5 - 6 Tage inkubiert. Die Zytotoxizität wurde täglich anhand des Anteils abgestorbener Zellen per Mikroskopie begutachtet.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Auftauen von Zellen, Routinekultivierung, Einfrieren von Zellen

Zur Etablierung der Routinekultur wurden 1 ml kryokonservierte Zellen in 10 % DMSO/FBS in 37 °C vorgewärmtem Wasserbad zügig aufgetaut, vorsichtig in 10 ml Routinemedium (Tabelle 2.7.) aufgenommen und 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Mediumüberstandes mit einer sterilen Pasteurpipette wurde das Zellpellet anschließend in 13 ml Routinemedium resuspendiert und in 75 cm² Zellkulturflaschen überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 5 % CO₂ und 37 °C in einem sterilen Inkubator bis zu einer maximalen Konfluenz von 70 - 80 %. Für die Umsetzung in neue 75-cm²-Zellkulturflaschen wurden die Zellen mit 10 ml 1 x DPBS gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin/EDTA für 3 - 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 7,5 ml Medium abgestoppt und das Zell-Medium-Gemisch in 50 ml-Röhrchen überführt. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm und der Resuspendierung des Zellpellets in 10 ml Medium konnte nun 1 ml der Zellsuspension (1:10) in eine weitere 75-cm²-Zellkulturflasche mit bereits 12 ml vorlegten Medium vermischt und bei 37 °C weiterkultiviert werden. Diese Abfolge wurde maximal für 12 - 15 Passagen

wiederholt. Für die dauerhafte Kryokonservierung wurden die Zelllinien wie oben beschrieben mit DPBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst, 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Anschließend erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets in 10 ml 10 % DMSO/FBS und die Aliquotierung von 1 ml Zellsuspension (1×10^6 Zellen/ml) in 2-ml-Kryogefäßen. Für einen schonenden Einfrierprozess wurden die Kryogefäße zunächst 2 - 3 Tage in gesonderte Behältnisse mit Isopropanol bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und dann in Tanks mit flüssigem Stickstoff für die Langzeitlagerung überführt.

2.2.2.2. Zelltiterbestimmung

Für die Bestimmung der optimalen Zelldichte pro *Well* in 96-*Wellplatten* (Zelltiterbestimmung) wurden die Zellen analog zu der Routinekultur in 70 % - 80 % Konfluenz in 75-cm²-Zellkulturflaschen mit 10 ml 1 x DPBS gewaschen, 5 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ in 2,5 ml Trypsin/EDTA abgelöst, in 7,5 ml Routinemedium aufgenommen und 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach der Resuspendierung der Zellen in 10 ml Routinemedium wurden 10 μl Zellsuspension und 10 μl TrypanBlau (Life Technologies) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt und 10 μl vorsichtig in eine Neubauer-Zählkammer (Life Technologies) pipettiert. Mithilfe der automatisierten Zellzählung anhand des *Countess™ automated cell counter* (Life Technologies) konnte die Zellzahl bestimmt werden. Anschließend wurden in einer Verdünnungsreihe 500 bis 5000 Zellen pro *Well* in 96-*Wellplatten* in 100 μl ausgesät und für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Mit der Zugabe von 100 μl *CellTiter®-Glo Viability Reagent* (Promega), 2 min Schütteln bei 450 rpm, 10 min Inkubation bei RT im Dunkeln wurde nun die Zellviabilität (ATP-Generierung) durch Lumineszenz am Luminometer (Perkin Elmer) bestimmt. Die optimale Zellanzahl pro *Well* für die jeweiligen Inkubationszeiten wurde anhand der linearen Wachstumsphase ausgewählt.

2.2.2.3. IC₅₀-Bestimmung und Kombinationsassay

Für die Bestimmung der Konzentration einer Substanz bei der 50 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert werden (IC₅₀, *inhibitory concentration at 50 %*), wurde im Rahmen dieser Arbeit das *CellTiter®-Glo Viability Reagent* (Promega) verwendet. Dazu wurden 90 μl Zellen anhand ihrer optimalen Zellzahl (Kapitel 2.2.2.2.) in 96-*Wellplatten* (opaque white, Corning) ausgesät und 24 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 kultiviert. Zu der Bestimmung des IC₅₀-Wertes in der Monotherapie werden die Zellen am nächsten Tag mit einer Konzentrationsreihe von 100 μM bis 1,37 μM für Carboplatin und BAY 1001931 in Medium/0,1 % DMSO in einem Volumen von 10 μl behandelt. Als Kontrolle diente 0,1 % DMSO. Zum Zeitpunkt der Behandlung (t 0h) und nach 72 h Inkubation der Substanz bei $37\text{ }^\circ\text{C}$, erfolgte schließlich die Zugabe von 100 μl *CellTiter®-Glo*, 2 min Schütteln bei RT sowie 10 min Inkubation im Dunkeln und die Messung der

Chemilumineszenz am Luminometer. Die Kalkulation des IC₅₀-Wertes erfolgte mithilfe der Gleichung:

$$\text{Aktivität (Wachstumsinhibition \%)} = 100 - ((\text{Probe} - t\ 0h) / (\text{DMSO} - t\ 0h)) * 100$$

Um die Wirksamkeit zweier Substanzen in einem Assay zu analysieren (Kombinationsassay) wurden A2780- und A2780cis-Zellen (800 Zellen/Well) in 384-Wellplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 24 h Zelladhäsion erfolgte schließlich die Zugabe der Substanz 1 (D1) und der Substanz 2 (D2) jeweils in einer absteigenden Konzentrationsreihe beginnend mit 30 µM bei BAY 1001931 bzw. 300 µM bei Carboplatin mit dem Pipettierroboter EpMotion5075. Hierbei wurden die Substanzen in einem 10 µl Volumen und Mischungsverhältnis von 0,8 D1 zu 0,2 D2; 0,6 D1 zu 0,4 D2; 0,4 D1 zu 0,6 D2; 0,2 D1 zu 0,8 D2 und 0,1 D1 zu 0,9 D2 bzw. nur D1 oder D2 auf 20 µl Zellen gegeben. In Anlehnung an die Monotherapie erfolgte auch hier die Messung Zellviabilität zum Zeitpunkt der Substanzgabe (T 0h) nach 24 h oder nach 72 h der Substanzinkubation mit dem CellTiterGlo®-Chemiluminescent Viability Reagent (30 µl/Well). In welchem Umfang die getesteten Substanzen synergistisch, additiv oder antagonistisch in einem zellulären System wirken, wurde mithilfe des Kombinationsindex evaluiert. Die Berechnung des Kombinationsindex erfolgte nach der Methode von Chou und Talalay [228] durch die Errechnung eines relativen IC₅₀-Wertes der einzelnen Mischungsverhältnisse mithilfe der oben angegebenen Aktivitätsgleichung und der nachfolgenden Gewichtung mit dem IC₅₀-Wert zu der Monotherapie (Tabelle 2.19).

Tabelle 2.19. Kombinationsindex

Kombinationsindex	Effekt
< 0,35	Starke Synergie
0,35 - 0,6	Synergie
0,6 - 0,8	Schwache Synergie
0,8 - 1,2	Additiver Effekt
> 1,2	Antagonismus

2.2.2.4. xCELLigence™-Assay

Für die Bestimmung der Proliferation in Echtzeit (*Real-Time*) wurde der xCELLigence-Assay (Roche Diagnostics) angewandt. Durch Veränderungen des elektrischen Widerstandes anhand der Bindung der adhärenen Zellen an die Plattenoberfläche kann die Viabilität, die Morphologie, Zellanzahl sowie der Grad der Zelladhärenz in einem Abstand von 15 min für einen beliebigen Zeitraum bei 37 °C und 5 % CO₂ gemessen und als sogenannter Zellindex wiedergegeben werden. Zur Äquilibration wurden zunächst 50 µl Medium pro Well in eine 96-Well-xCELLigence-Platte pipettiert. In Anlehnung an Kapitel 2.2.2.3. erfolgte die Zugabe der

Zellsuspension anhand der optimalen Zelldichte (50 $\mu\text{l}/\text{Well}$) und die Inkubation für 24 h. Am nächsten Tag wurde schließlich 50 μl Substanz / *Well* in einer absteigenden Konzentrationsreihe beginnend mit 300 μM Carboplatin zugegeben. Nach dem Erreichen des Wachstumsplateaus unbehandelter Zellen (max. 220 h) wurde der *xCELLigence-Assay* beendet und der Zellindex ab dem Zeitpunkt der Substanzgabe als T 0 h zur Analyse verwendet.

2.2.2.5. Migrationsassay

Zur Bestimmung des Migrationsverhaltens von A2780 und A2780cis Zellen *in vitro*, wurde ein *Transwell-Assay* mit 8 μm Poren (Corning) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 24 h vor Aussaat mit RPMI1640/0,5 % FBS (Magermedium) allein oder zusätzlich mit 50 μM Carboplatin in RPMI1640/0,5 % FBS versetzt. Außerdem wurde das obere Kompartiment des *Transwells (Insert)* 2 x mit DPBS gewaschen und ebenfalls bei 37 °C im Inkubator über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden 2 x 10⁵ Zellen in das obere Kompartiment des *Transwells* in 250 μl RPMI1640/10 % FBS oder in RPMI1640/0,5 % FBS in Triplikaten in 24-*TransWellplatten* ausgesät. Anschließend erfolgte die Zugabe von 750 μl RPMI1640/10 % FBS oder RPMI1640/0,5 % FBS durch eine kleine Öffnung (*Slot*) in die unteren *Transwells*. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die *Inserts* der 24-*TransWellplatten* vorsichtig in eine neue 24-*Wellplatte* mit vorgelegtem 4 μM Calcein/PBS überführt (1 ml/*Well*) und bei 37 °C für 1 h im Dunkeln inkubiert. Die resultierende Fluoreszenz wurde schließlich am Fluoreszenzreader bei 495_{ex}/515_{em}nm gemessen.

2.2.2.6. FACS - Propidiumiodid

Durch die stöchiometrische Quantifizierung des Propidiumiodidgehaltes in der DNA ist es möglich die verschiedenen Phasen des Zellzyklus mit einem Chromosomensatz < 1 (Apoptose), > 2 - 4n (G0, G1, G2/M) und > 4 (Polyploidie) zu bestimmen. Dazu wurden 1,8 x 10⁵ Zellen in 2,5 ml/*Well* in 6-*Wellplatten* ausgesät und ÜN für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit 0,5 ml Volumen (1:5) Carboplatin pro *Well* (IC₅₀ Konzentrationen A2780) und die weitere Inkubation für 72 h. Der Mediumüberstand sowie der 1,5 ml 1 x DPBS -/- „Waschüberstand“ wurden in ein 5-ml-FACS-Röhrchen gesammelt und die Zellen mittels 300 μl Trypsin/EDTA 5 min bei 37 °C abgelöst. Schließlich wurde die Reaktion mit dem im FACS-Röhrchen gesammelten Medium abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension wieder im FACS-Röhrchen überführt und 3 - 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig absaugt wurde, begann die Permeabilisierung und Fixierung des Zellpellets mit 1 ml 70 % Ethanol. Wichtig ist hier eine ausreichende Homogenisierung des Zellpellets, um etwaige „Zellklumpen“ zu vermeiden. Anschließend wurden die fixierten Zellen für mindestens 24 h bei -20 °C gelagert. Für die Färbung mit Propidiumiodid wurden nun die

Zellpellets langsam bei RT wieder aufgetaut, mit 2,5 ml DPBS^{-/-} aufgefüllt und 5 - 10 min bei 1200 rpm bei RT zentrifugiert. Der Ethanol-wässrige Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 200 µl 1 x DPBS^{-/-} unter *whirlen* aufgenommen. Da Propidiumiodid nicht nur in der DNA, sondern auch in der RNA interkaliert, wurden die Zellen zusätzlich mit 10 µl RNase A (5 % in PBS, SIGMA) behandelt. Schließlich erfolgte die Zugabe von 200 µl Propidiumiodid (100 µg/ml, SIGMA). Nach der 2 h - 48 h Inkubation bei 4 °C wurde die ETOH-fixierte, Propidiumiodid-gefärbte Zellfraktion am *FACS-Calibur Flow Cytometer* (BD Biosciences) mittels Durchflusszytometrie gemessen. Für die Bestimmung der Anzahl der Chromosomensätze am *FACS-Calibur* wurde der FL2-A-Kanal auf 200 für n = 1 Chromosomensatz (haploid, G1/G0) und die gezählten Ereignisse (*events*) auf ein Maximum von 10 000 Zellen gesetzt. Bei einem n = 2, diploiden Chromosomensatz (G2/M) liegen die Zellen bei FL2-A = 400 vor. Zwischen 200 und 400 befinden sich die Zellen in S-phase ($1 < n < 2$). Für subG1- bzw. apoptotische Zellen gilt $n < 200$; und für polyploide Zellen gilt $n > 400$.

2.2.2.7. Koloniebildungsassay

Nach der erfolgreichen Gewinnung der shGDF15-1-5-transduzierten A2780cis-Zellen durch Puromycinselektion (Kapitel 2.2.1.6.) wurden 500 oder 5000 der shGDF15-A2780cis-Zellen pro *Well* jeweils mit 300 000 untransduzierten A2780cis-Zellen (*Feederzellen*) in einer 6-*Wellplatte* ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Eine Fortführung der Puromycinselektion mit 1 µg/ml Puromycin erfolgte schließlich nach 3 Tagen der Aussaat. Fünf, zehn, zwölf, 14, und 24 Tage nach der Aussaat wurden die Zellen mit 200 µl pro 2 ml Medium pro *Well* einer 11-prozentigen Glutaraldehydlösung für 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurde das glutaraldehydhaltige Medium verworfen, die Zellen gründlich unter langsam fließend Leitungswasser gewaschen und die Zellen über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Färbung der Zellkolonien mittels Kristallviolettlösung (Sigma) für 30 min bei 300 - 400 rpm auf dem Schüttler und der anschließenden Entfernung überschüssiger Färbelösung unter langsam fließend Leitungswasser. Nach der Trocknung über Nacht, konnten lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkolonien für die qualitative Beurteilung der shRNA-vermittelten RNA-Herunterregulation angefertigt werden. Für die Quantifizierung der Zellkolonien wurde das Kristallviolett mittels 1 ml 10 % Essigsäure pro *Well* für 30 min auf dem Schüttler bei 300 - 400 rpm gelöst und photometrisch bei 595 nm bestimmt.

2.2.3. In vivo Methoden

Alle Tierexperimente wurden entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen der deutschen Tierschutzgesetze sowie den Richtlinien der Bayer Pharma AG durchgeführt.

2.2.3.1. Tumorzellinokulation in SCID-Mäuse

Für die Analyse des Tumorwachstums *in vivo* wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen A2780- und A2780cis-Zellen subkutan in die rechte Flanke von unbehandelten, weiblichen, immundefizienten *Fox-Chase-SCID*-Mäusen (*Severe Combined Immunodeficiency*) (Stamm C.B-17/Icr, 8-10 Wo alt) inokuliert. Dazu wurden die Zellen zunächst in Anlehnung an die Routinekultur auf ca. $4 \times 300 \text{ cm}^2$ Zellkulturflaschen expandiert. Nach dem Waschen mit 1 x DPBS und dem Ablösen der Zellen nach 5 min Inkubation mit Trypsin/EDTA sowie der Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 min, wurde die Zellanzahl auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden die Zellen nochmals für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 4°C -gekühltem 100 % Matrigel (BD Biosciences) resuspendiert. Nun wurden pro Tier 100 μl ($0,5 \times 10^6$) das Zell-Matrigel-Gemisch subkutan mit einer 0,9 mm Kanüle (Gr. 20) und einer 1 ml Spritze in die rechte Flanke (zuvor rasiert) der Maus injiziert. An den darauffolgenden 1 - 4 Tagen wurde durch Palpieren der injizierten Zellmasse und der Größenmessung (Länge x Breite, mm^2) mit einer Schieblehre die Etablierung eines Tumors und das Körpergewicht mittels Waage bestimmt. Sobald eine feste Tumorzellmasse palpieren konnte, wurde die Substanzapplikation gestartet (Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.3.). Für alle Tierversuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, galt: 1) Tiere, die einen Gewichtsverlust von mehr 10 % erleiden, erhielten keine weitere Substanzapplikation und die Tiere, die 20 % Gewichtsverlust erlitten, wurden euthanasiert; 2) Tiere, die einen Tumor mit einer Tumorfläche $\geq 150 \text{ mm}^2$ aufzeigten, wurden ebenfalls euthanasiert.

2.2.3.2. Kurzzeittherapie mit Carboplatin

Unbehandelten weiblichen *Fox-Chase-SCID*-Mäusen wurden $0,5 \times 10^6$ A2780- und A2780cis-Zellen in 100 % Matrigel subkutan in die rechte Flanke inokuliert. Dreimal wöchentlich wurden die Tiere gewogen und die Fläche der subkutanen Tumoren mithilfe der Schieblehre ermittelt. Ab einer Tumorfläche von 50 mm^2 wurden die Tiere anhand ihrer Tumorfläche und ihres Körpergewichtes gleichmäßig in Gruppen ($n = 10$ Tiere pro Gruppe) randomisiert und die Behandlung begonnen. Diese beinhaltete die intravenöse (i. v.) Applikation von NaCl 0,9 % (Kontrollgruppe) oder Carboplatin 75 mg/kg Körpergewicht in 0,9 % NaCl für insgesamt 2 Tage in Folge (Q2Dx1) in einem Abstand von jeweils 24 h. Die Injektion der Substanz erfolgte dabei in die Schwanzvene des Tieres in einem Volumen von 100 μl pro Tier. Weitere 24 h nach der letzten Injektion wurden die Tiere durch Dekapitierung getötet und das Blut aus der Halsvene in Lithium-Heparin (Li-He) Plasma-Röhrchen gesammelt. Gleichzeitig wurde der subkutane Tumor vorsichtig von Haut und Bindegewebe freipräpariert, das Tumorgewicht notiert und halbiert. Eine Tumorthälfte wurde zügig in Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und die

andere Tumorthälfte zu der späteren histologischen Aufarbeitung in *Jung*-Einbettmedium eingebettet, und langsam in trockenisgekühltem Isopentan gefroren. Bis zu der Weiterverarbeitung wurden das stickstoffgefrorene sowie das in *Jung*-Einbettmedium eingebettete Tumorgewebe bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Des Weiteren wurden 30 min nach der Blutentnahme die Li-He-Röhrchen für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der farblose Überstand (Plasma) vorsichtig in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für die nachfolgenden Analysen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3.3. Langzeittherapie (I) mit Carboplatin

In Anlehnung an die Kurzzeittherapie mit Carboplatin *in vivo* (Kapitel 2.2.3.2.) wurden 0.5×10^6 A2780- und A2780cis-Zellen in 100 % Matrigel subkutan in die rechte Flanke von unbehandelten, weiblichen *Fox-Chase-SCID*-Mäusen inokuliert. Ab einer Tumorfläche von 20 mm^2 wurden die Tiere randomisiert ($n = 10$ Tiere pro Gruppe) und die Substanzapplikation mit jeweils 0,9 % NaCl oder Carboplatin 50 mg/kg in NaCl 0,9 % intravenös in die Schwanzvene begonnen. Die Behandlung fand alle 4 Tage (Q4Dx1) statt. Für die Plasmagewinnung wurden parallel alle 3 - 4 Tage 50 - 100 μl Blut retrobulbär entnommen, in 0,5 ml Röhrchen überführt und nach 30 min Inkubation bei RT für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde schließlich in ein weiteres 0,5 ml Röhrchen überführt und bis zu einer weiteren Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Sobald die Tumoren der Kontrollgruppe (NaCl 0,9 %) eine Tumorfläche von $\geq 150\text{ mm}^2$ erreichten, wurde der Versuch inklusive aller Behandlungsgruppen nach tierschutzrechtlicher Gesetzgebung beendet und die Tiere durch Dekapitierung getötet. In Anlehnung an die Kurzzeittherapie, wurde das Blut nach der Dekapitierung am Ende des Experimentes in Li-He-Röhrchen gesammelt, zentrifugiert und das gewonnene Plasma bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die entnommenen subkutanen Tumoren ($n = 5$) wurden halbiert und jeweils eine Tumorthälfte in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die andere Hälfte in *Jung*-Einbettmedium eingebettet. Bis zu der weiteren Verwendung wurden die schockgefrorenen und eingebetteten Tumoren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Außerdem wurden hier zusätzlich fünf der restlichen Tumoren ($n = 5$) halbiert, die eine Hälfte routinemäßig in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die andere Hälfte in 4 %-gepuffertes Formalin (Q-Path) überführt. Die Weiterprozessierung der Formalin-fixierten Tumoren ist im Kapitel 2.2.5.2. beschrieben.

2.2.3.4. Langzeittherapie (II) mit Carboplatin

Unbehandelten, weiblichen *Fox-Chase-SCID*-Mäusen wurden 0.5×10^6 A2780-Zellen sowie WT-(Wildtyp)-A2780cis-, shGDF15-A2780cis- und shTRC1-A2780cis-Zellen in 100 % Matrigel in die rechte Flanke inokuliert. Die Tiere wurden dreimal wöchentlich gewogen und die Fläche der subkutanen Tumoren mithilfe der Schiebelehre ermittelt. Ab einer Tumorfläche von 20 mm^2

wurden die Tiere randomisiert (n = 8 - 10 Tiere pro Gruppe) und entweder mit 0,9 % NaCl i. v. oder Carboplatin 50 mg/kg in NaCl 0.9 % i. v. alle 4 Tage (Q4Dx1) behandelt. Für die Plasmagewinnung wurden parallel alle 3 - 4 Tage 50 - 100 µl Blut retrobulbär entnommen und das gewonnene Plasma bei -20 °C gelagert. Sobald ein Tumor eine Tumorfläche von $\geq 150 \text{ mm}^2$ erreichte, wurde das Tier nach tierschutzrechtlichen Bedingungen getötet und der Tumor entnommen. Das Blut wurde auch hier durch Dekapitierung aus der Halsvene entnommen, das Blutplasma wie bereits im Kapitel 2.2.3.2. beschrieben in Li-He-Röhrchen gewonnen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.4. Biochemische Methoden

2.2.4.1. Herstellung von Zelllysaten und Gewinnung des Mediumüberstandes

Für die Gewinnung von Zelllysaten und dem zugehörigen Mediumüberstand wurden Zellen in Petrischalen (10 cm Durchmesser) oder 6- bis 24-Wellplatten in ihrer optimalen Zelldichte ausgesät und je nach Behandlungsschema mit der Substanz nach 24 h Adhäsion für 72 h behandelt. Nach einer Inkubation von 72 h der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen schließlich 4 h vor der Ablösung mit Magermedium (RPMI1640/0,5 % FBS) (10 ml) versetzt. Anschließend wurden die Petrischalen auf Eis gelagert und der komplette Mediumüberstand und ein 1 x DPBS-Waschgang (1 ml) (4 °C gekühlt) in einem 50 ml Röhrchen gesammelt, 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert, in 1,5 ml Reaktionsröhrchen aliquotiert und bei -20 °C bis zu der BCA-Proteinbestimmung (Kapitel 2.2.4.3.) gelagert. Für die Gewinnung von Zelllysaten wurden die Zellen im zweiten Waschgang mit 4 °C kaltem 1 x DPBS mit einem Zellschaber (Corning) abgeschabt bzw. in Abhängigkeit der Größe des Kultivierungsgefäßes mit der Pipettenspitze vorsichtig abgekratzt und in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 1200 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet entweder bei -20 °C gelagert oder direkt in Lysepuffer (Tabelle 2.20.) lysiert.

Tabelle 2.20. Komponenten Proteinlysepuffer

Komponente	Volumen
Tris-Lysepuffer (R60TX-2)	10 ml
PhosSTOP Tablette	1
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette	1
SDS 10 %	100 µl
PMSF (0.5 M in 100 % DMSO)	40 µl

Dazu werden 300 - 500 µl Lysepuffer auf das zuvor leicht gelockerte Zellpellet gegeben und auf Eis mit mehrmaligem Vermischen (*Vortexen*) für 30 min homogenisiert. Schließlich erfolgte eine 10- minütige Zentrifugation bei 4 °C und 13200 rpm. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.4.2. Gewinnung von Tumorlysaten

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus Tumoren wurde auf Trockeneis mit einer gekühlten Pinzette von einem -80 °C gefrorenem Tumor zügig ein ca. 3 mm x 3 mm (~ 30 mg) großes Gewebestück abgetrennt, zerkleinert und in 2 ml Reaktionsgefäße mit 500 µl vorgelegtem 4 °C Lysepuffer (Tabelle 2.20.) überführt. Nach dem Hinzufügen einer 4 °C gekühlten Metallkugel (3 mm Durchmesser, Qiagen) wird das Gewebe-Puffer-Gemisch im *TissueLyser* (Qiagen) für 3 min bei 300 rpm homogenisiert. In Anlehnung an die Gewinnung von Zelllysaten (Kapitel 2.2.4.1.) wird das Tumorhomogenisat anschließend für 30 min auf Eis unter regelmäßigen „Whirlen“ (*vortex*) lysiert, 10 min bei 13200 rpm 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.4.3. BCA-Proteinbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration aus Tumor- und Zelllysaten kam der BCA- (Bicinchoninsäure)-Proteinassay (Thermo Scientific) zum Einsatz. Dazu wurden 2 mg/ml BSA (*Kit*) in einer Konzentrationsreihe von 400 – 25 µg/ml in destilliertem (dest.) H₂O verdünnt und jeweils als 50 µl Duplikat in eine 96-*Wellplatte* pipettiert. Zusätzlich wurden 2,5 µl Proteinlysate in bereits vorgelegtes 50 µl dest. H₂O in die 96-*Wellplatte* pipettiert. Als Nullwert diente dest. Wasser. Zum Ausgleich werden der BSA-Konzentrationsreihe und dem Nullwert zusätzlich noch 2,5 µl Lysepuffer hinzugefügt. Zur kalorimetrischen Bestimmung werden nun die vorgelegten BSA-Proben sowie die zu analysierenden Proteinlysate mit 200 µl/*Well* BCA versetzt, anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert und der blau-violette Farbumschlag bei 562 nm im UV/VIS-Spektrometer (Perkin Elmer) gemessen. Anhand der Eichgerade der BSA-Konzentrationsreihe können die Proteinkonzentrationen der unbekannt Proteinlysate bestimmt werden.

2.2.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und „Westernblotting“

Um die qualitative und semiquantitative Expression von Proteinen aus Proteinlysaten (Herstellung Zell- und Tumorlysate, Kapitel 2.2.4.1 und 2.2.4.2.) zu ermitteln, wurde eine denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) mit anschließendem *Western-Blotting* auf Nitrozellulose oder PVDF-Membranen durchgeführt. Dazu wurden die

Proteinlysate in Abhängigkeit der Geltaschengröße in einer Proteinkonzentration von 25 - 50 ng pro Geltasche eingestellt und mit 4 x SDS-Probenpuffer (Invitrogen) und Dithiothreitol (DTT, Invitrogen) in einem Probenvolumen von 15-35 µl pro Geltasche versetzt. Anschließend erfolgte die Denaturierung und Linearisierung der Proteine bei 70 °C für 10 min. Nach zweiminütigem Abkühlen auf Eis werden die Proben sorgfältig mit speziellen Gelpipettenspitzen (Sigma Aldrich) in die Geltaschen pipettiert. Das dafür verwendete NuPAGE® Novex® Bis-Tris [Bis (2-hydroxyethyl) imino-tris (hydroxymethyl) methane-HCl] „Pre-Cast“ Gel (Life Technologies) ist ein fertiges (*ready-to-use*), denaturierendes Gel (1 - 1,5 mm, 10 %, 10 bis 26 Geltaschen) inklusive Sammel- und Trenngel, das in der Gelelektrophoresekammer (Life Technologies) wahlweise mit MOPS- oder MES-Puffer Proteine unterschiedlicher Größe auftrennen kann. Nach dem Auftragen der Proben und des Proteinmarkers (*Odyssey* 10 - 250 kDa oder Novex Pre-Sharp 3,5 - 260 kDa) wurden die Proteine mittels 160 - 200 V und 45 - 60 min Laufzeit anhand ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran. Dazu wurde das Gel nach dem „Sandwich-Prinzip“ mit in VE-Wasser getränktem Filterpapier, der Nitrozellulose- oder PVDF-Membran und der zugehörigen Kathode und Anode (jeweils *ready-to-use*, Invitrogen) im iBlot® (Invitrogen) angeordnet. Das „Blotting“-Verfahren dauerte 7 min nach Anleitung. Zur Überprüfung der erfolgreichen Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulose- oder PVDF-Membran kam die Ponceau-S-Rot-Färbung (Sigma) zum Einsatz. Hierzu wurde die Membran kurz in TBST 0,1 % getränkt, anschließend für 5 min in Ponceau-S-Rot auf dem Schüttler inkubiert und die Membranen ggf. an den nun sichtbaren Proteinbanden getrennt. Durch 3 x 5 min waschen in TBST 0,1 % wurde die Ponceau-S-Färbung entfernt und die Membran für 1 h bei RT auf dem Schüttler mit 5 % Milchpulver/TBST 0,1 % blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers (Kapitel 2.1.9.) in 5 % Milchpulver/TBST 0,1 % ÜN bei 4 °C. Nach einem Waschgang von 3 x 10 min bei RT mit TBST 0,1 % am nächsten Tag, erfolgte die 45-minütige Inkubation des fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörpers (*anti-Rabbit-* oder *anti-Mouse-AlexaFlour680*, Invitrogen) bei RT im Dunkeln auf dem Schüttler. Nach der Entfernung des überschüssigen Antikörpers durch 3 x 10 min Waschen mit TBST 0,1 % wurde die Proteinexpression mittels *Odyssey Infrared Imager* (Li-Cor Biosciences) visualisiert und ggf. als Schwarz-Weiß-Applikation zu GAPDH quantifiziert (Li-Cor Image Software). Zur Detektion mehrerer Antikörper auf einer Membran wurden die zuvor inkubierten Antikörper durch sogenanntes *Strippen* entfernt. Dazu wurden die Membranen 10 min in *Re-Blot-Solution* (Millipore) bei RT auf dem Schüttler inkubiert, anschließend 3 x 10 min in TBST 0,1 % gewaschen und nach der oben beschriebenen Prozedur wiederholt mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert. Für eine spätere Wiederverwendung wurden die Membranen in TBST 0,1 % oder trocken bei 4 °C gelagert.

2.2.4.5. Proteom Profiler Array

Zur simultanen Detektion von 47 phosphorylierten Zielproteinen wurde der *Proteom Profiler Antibody Array* (R & D Systems) exakt nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Membranen Part A und Part B zunächst in *Arraybuffer 1* für 1 h bei RT blockiert. Parallel wurden Tumorlysate nach Kapitel 2.2.4.2. in *Lysisbuffer 6 (Kit)* homogenisiert und die Proteinkonzentration mittels BCA-Methode (Kapitel 2.2.4.3.) bestimmt. Anschließend wurden 1 ml 300 µg pro *Array* Tumorlysate auf Membran A und B ÜN bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach 3 x 10 min waschen in 1 x Waschpuffer (*Kit*) am nächsten Tag, wurden die Membranen A und B jeweils mit dem Antikörpergemisch A und B in *Arraybuffer 2/3* separat für 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Entfernung überflüssigen Antikörpers erfolgte ebenfalls durch 3 x 10 min Waschen in 1 x Waschpuffer, gefolgt von einer Inkubation mit Streptavidin-HRP (*Kit*) in *Arraybuffer 2/3* für 30 min bei RT. Nach einem weiteren Waschgang (3 x 10 min in 1 x Waschpuffer) erfolgte schließlich die Detektion der Proteinexpression durch das einminütige Inkubieren der Membranen mit dem ECL Reagenz (1:1, Thermo Scientific) und der anschließenden Filmentwicklung von 30 s - 10 min. Zur ECL-Detektion in „Echtzeit“ kam die *Molecular Imager Versadoc Station* (Biorad) zum Einsatz, bei dem für 2 h in 5 min Abstand automatisierte Aufnahmen von der Membran stattfanden. Abschließend erfolgte die Quantifizierung durch die Bestimmung der Farbeintensität pro Pixel.

2.2.4.6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

GDF15-, IL-6- und TNF-α-ELISA

Für die quantitative Bestimmung der GDF15-, IL-6- und TNF-α Proteinexpression in Tumor- bzw. Zellysaten kamen der Standard-ELISA oder der hochsensitive (*high sensitive*) ELISA exakt nach Herstellerangaben von R & D Systems zum Einsatz. Im Folgenden werden die wesentlichen Schritte für den GDF15-ELISA (Standard-ELISA) als Beispiel detaillierter beschrieben: Zu Beginn wurden 50 µl 0,5 µg/ml Proteinlysate, 8 µg/ml Plasma oder GDF15-Proteinstandardreihe von 1500 - 23,4 pg/ml und 100 µl *Assay Diluent* RD1-90 für 2 h bei RT bei 450 rpm auf einer 96-*Wellplatte* mit immobilisierten spezifischen GDF15-Antikörpern inkubiert. Nach 4 x 400 µl Waschen mit dem 1 x Waschpuffer, 1 h Inkubation mit dem GDF15-Konjugat bei RT und einem weiteren Waschgang 4 x 400 µl mit 1 x Waschpuffer, fand die Substratinkubation (200 µl/*Well*) im Dunkeln für 30 min statt. Bei der anschließenden Stoppreaktion mit 2N H₂SO₄ (*Kit*) erfolgte ein Farbumschlag von gelb nach blau, dieser dann bei 450 nm (Referenzfilter: 540 nm) gemessen werden konnte. Für den hochsensitiven IL-6-ELISA (R & D Systems) wurden ebenfalls in einer 96-*Wellplatte* ca. 0,5 µg/ml Tumorlysate für 2 h in Puffer RD1-75 inkubiert, 6 x 400 µl gewaschen und für 2 h mit 200 µl/*Well* IL-6-Konjugat inkubiert. Nach dem 4 x 600 µl waschen in

1 x Waschpuffer, erfolgte die Substratinkubation für 1 h und ein weiterer Waschgang mit 4 x 600 µl in 1 x Waschpuffer. Für die Verstärkung des Signals wurde zusätzlich eine Amplifizierungslösung (50µl/Well) für 30 min inkubiert, um dann nach 30 min Inkubation bei 490 nm (Referenzfilter: 650 nm) gemessen werden zu können. Exakt nach dem Protokoll zu IL-6 wurde auch der hochsensitive TNF-α Assay durchgeführt, mit dem Unterschied dass ca. 1 µg/ml Tumorlysate und der Puffer RD-1F verwendet wurde.

P4HA2-ELISA

Für den quantitativen Nachweis der P4HA2-Proteinexpression in Tumor- bzw. Zelllysaten wurden 100 µl 0,5 µg/ml Protein, Lysepuffer (Blank) oder Standardkonzentrationsreihe von 40 - 0,196 ng/ml rekombinanten P4HA2 in 96-Wellplatten für 1 h bei 37 °C inkubiert, 3 x 350 µl mit 1 x Waschpuffer gewaschen und mit 100 µl Detection Reagent B für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen mit 3 x 350 µl 1 x Waschpuffer wurden 90 µl der Substratlösung für 25 min bei RT inkubiert und ein Farbumschlag mittels 50 µl Stopplösung von blau nach gelb bei 450 nm (Referenzfilter: 540 nm) gemessen.

HIV-p24-Antigen ELISA

Um den Virustiter der gekauften lentiviralen TRC1-shGDF15-Konstrukte und der eigens hergestellten lentiviralen TRC1-Kontroll-Konstrukte zu überprüfen, wurde ein HIV-p24-Antigen ELISA (Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Folgenden soll noch einmal kurz der Ablauf skizziert werden: 200 µl Viren-Medium-Mix werden mit Positiv- und Negativkontrolle für 2 h bei 37 °C inkubiert, 6 x 300 µl mit dem Waschpuffer (*Kit*) gewaschen und anschließend mit 100 µl Detektor Antikörper (*Kit*) für 1 h bei 37 °C weiterinkubiert. Nach dem Waschen (6 x 300 µl) und 30 min Inkubation mit 100 µl OPD Substratlösung wird die Reaktion mit 4N Schwefelsäure abgestoppt und das gelbliche Farbprodukt bei 490 nm (Referenzfilter: 600 nm) gemessen. Der Virustiter der einzelnen lentiviralen Konstrukte ist jeweils der Tabelle 2.14. zu entnehmen.

2.2.4.7. Meso Scale Discovery (MSD) Assay

Ein quantitativer Nachweis der Expression von phospho-AKT (pAKT) zu dem gesamten AKT-Protein oder von Effektoren des AKT- und Apoptose-Signalweges (p53, phospho-p53, *cleaved* Caspase-3) in Tumor- und Zelllysaten im Multiplexverfahren wurde mithilfe des *MSD-Assays* durchgeführt. Dazu wurden die Tumorlysate oder Zelllysate frisch nach Kapitel 3.4.1 bzw. Kapitel 3.4.2. im Standardlysepuffer hergestellt. Nach der Blockierung der 96-MSD-Wellplatte für 1 h in 3 %-Blockierungspuffer A bei 400 rpm, erfolgte die ÜN-Inkubation bei 4 °C mit 80 µg Proteinlysate oder Plasma in einem Volumen von 25 µl/Well bei 450 rpm. Nach der Zugabe von 4

x 150 µl/Well 1 x MSD-Waschpuffer am nächsten Tag, erfolgte die Inkubation des SULFO-Tag-Antikörpergemisches (Konzentration variierend mit dem *Kit*) bei RT für 1 h bei 450 rpm. Nach wiederholtem Waschen mit 4 x 150 µl/Well 1 x MSD Waschpuffer und 150 µl *Readbuffer*/Well fand die Messung des Elektrochemischen Signals mittels *MSD-Reader* statt. Die Aktivierung eines Proteins (phosphoryliertes Protein) in Relation zum nicht-phosphorylierten Gesamtprotein (total) wurde wie folgt errechnet:

$$\% \text{ Phosphoprotein} = [(2 \times \text{Phosphosignal}) / (\text{Phosphosignal} + \text{Gesamtssignal})] \times 100$$

2.2.5. Histologische Methoden

2.2.5.1. Herstellung von Gefrierschnitten

Wie bereits im Kapitel 2.2.3.2 – 4. beschrieben wurden die subkutanen Tumoren von *SCID*-Mäusen entnommen, zügig in *Jung*-Einbettmedium eingebettet, sowie in mit Trockeneis vorgekühltem Isopentan (ca. -20 °C) gefroren, und bis zur weiteren Anwendung bei -80 °C gelagert. Für die anschließende Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die eingebetteten Tumoren im Kryostaten (*HM 560 CryoStar Cryostat*, Thermo Scientific) bei -20 °C äquilibriert, auf eine vorgekühlte Metallplatte eingespannt und in 5 µm-Schnitten seriell als Duplikate auf Objektträger (*SuperFrost® Plus*, Thermo Scientific) vorsichtig aufgezogen. Nach der Trocknung bei RT von 30 min bis 1 h wurden die Schnitte ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.5.2. Herstellung von Paraffinschnitten

Für die Einbettung von Tumorgewebe in Paraffin wurden die frisch entnommen Tumoren zunächst in gepufferten 4 % PFA (Paraformaldehyd) für ca. 48 h – 72 h (in Abhängigkeit der Tumorgroße) fixiert, anschließend unter fließend VE-Wasser für 30 min gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 70 % über 80 %, 3 x 96 % sowie in 1 x Isopropanol bei RT jeweils für 1 h dehydriert. Nach einem weiteren Dehydrierungsschritt in Isopropanol und 3 x in Xylol bei 40 °C im Vakuum, für jeweils 1 - 1,5 h, erfolgte die Einbettung in Paraffin (2 x 1 h) ebenfalls bei 40 °C im Vakuum. Schließlich wurden die paraffinierten Tumoren auf die dafür vorgesehen Paraffinkassetten aufgebracht. Nach dem Abkühlen und Aushärten der Paraffinblöcke bei RT wurden 3 µm-Paraffinschnitte mittels Mikrotom (*Microm HM355S*, Thermo Scientific) angefertigt und bis zur Anwendung mindestens für 48 h bei RT getrocknet.

2.2.5.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H & E)

Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie DNA an, wobei Eosin acidophile Strukturen - wie das Zytoplasma oder extrazelluläre Kollagene - anfärbt. Eine H & E-Färbung wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl auf Gefrierschnitten als auch auf Paraffinschnitten durchgeführt. Gefrierschnitte wurden zunächst 20 min bei RT mit gepufferten 4 % PFA fixiert, 3 x 2 min mit TBST 0,05 % gewaschen und für 45 s in Hämalun (nach Mayer) getaucht. Die Bläuung erfolgte schließlich für 10 min unter fließendem Leitungswasser. Nach kurzem Spülen in 60 % Ethanol wurden die Schnitte für ca. 1 min in 0,4-prozentiger Eosinlösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils 2 min in 60 %, 70 %, 80 %, 96 % Ethanol sowie 2 x 2 min Isopropanol und 3 x 5 min Xylol dehydriert. Für die Lagerung wurden die Schnitte am Eindeckelautomaten (Thermo Scientific) in Eindeckmedium mit einem Deckgläschen (Menzel) versehen und ÜN bei RT getrocknet.

2.2.5.4. Immunhistochemische (IHC) Färbungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Gefrier- als auch Paraffinschnitte für den immunhistochemischen Nachweis bestimmter Antigene auf Tumorschnitten verwendet. Da Gefrier- und Paraffinschnitte eine andersartige Fixierung und Antigenpräsentation aufweisen, wurden die Schnitte zuvor unterschiedlich auf die Färbungen vorbereitet:

- (1) Die 5- μ m-Gefrierschnitte wurden 20 - 30 min bei RT getrocknet und 20 min in gepufferten 4 % PFA bei RT fixiert.
- (2) Die 3- μ m-Paraffinschnitte wurden in 3 x 5 min Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe beginnend mit 2 x 5 min Isopropanol inkubiert und 1 x 5 min jeweils 96 %, 80 %, 70 % und 60 % Ethanol schrittweise in wässriges Milieu überführt. Die Demaskierung des Antigens erfolgte mithilfe der *Target Retrieval Solution* (pH 6, Dako) für 40 - 45 min in einem Dampfkochtopf bei 95 - 97 °C und anschließendem Abkühlen für weitere 30 - 40 min.

Nach einem Waschgang von 3 x 2 min in TBST 0,1 % wurden nun die Paraffin- und Gefrierschnitte mit einem Fettstift umkreist und die endogene Peroxidaseaktivität mit 3 % H₂O₂/Methanol oder Peroxidase-Block (Dako, *Ready-to-use*) (70 - 100 μ l pro Schnitt) für 10 min bei RT blockiert. Im Anschluss konnte hier wahlweise ein zusätzlicher Avidin- bzw. Biotin-Block für jeweils 10 min mit einem 3 x 2 min TBST 0,1 % Waschgang eingefügt werden. Zur Reduzierung möglicher unspezifischer Färbungen von Immunglobulinen und anderen gewebeständigen Proteinen wurden die Schnitte für 10 min mit dem Proteinblock (*ready-to-use*, Dako) bei RT inkubiert. Ohne weiteren Waschgang erfolgte anschließend die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper (Kapitel 2.1.9.) oder dem zugehörigen Isotypen

(Immunglobulin des Primärantikörpers) entweder ÜN oder für maximal 1 h bei RT in einer Feuchtkammer. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Primärantikörper wie folgt eingesetzt:

- (1) Ki-67: Der Proliferationsmarker Ki-67 ermöglicht eine qualitative sowie quantitative Beurteilung der Proliferation z. B. eines Tumors. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl 5- μ m-Gefrierschnitte (Kurzzeittherapie) als auch 3- μ m-Paraffinschnitte (Langzeittherapie) mittels Ki-67-Nachweis angefärbt. Gefrierschnitte wurden mit einem zuvor biotinyliertem (ARK-Kit, Dako) monoklonalen anti-humanen Ki-67-Primärantikörper (murin) (1:100) (MIB-1, Dako) ÜN bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Als Negativkontrolle diente 0,8 μ g/ml Mausserum. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-konjugiertes Streptavidin (ARK-Kit, Dako) für 30 min bei RT inkubiert. Paraffinschnitte wurden mit einem monoklonalen Kaninchen-(Rabbit)-Ki-67 anti-humanen Primärantikörper (1:100) (SP6, abcam) ÜN bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Als Negativkontrolle diente 0,5 μ g/ml Kaninchenserum. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-konjugiertes anti-Kaninchen-Polymer für 30 min bei RT inkubiert.
- (2) Cleaved Caspase-3: Die proteolytische Prozessierung des Pro-Zymogens in die geschnittene Form der Caspase-3 (*Cleaved Caspase-3*) ist die Voraussetzung für die ordnungsgemäße Aktivierung des Enzyms und ein wichtiger Induktor der Apoptose. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *Cleaved-Caspase-3*-Nachweis auf 3- μ m-Paraffinschnitten durchgeführt. Paraffinschnitte wurden mit einem polyklonalen *Rabbit-Cleaved Caspase-3* anti-humanen Primärantikörper (1:200) (Asp175, Cell Signaling) ÜN bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Als Negativkontrolle diente 0,5 μ g/ml Kaninchenserum. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-konjugiertes anti-Kaninchen-Polymer für 30 min bei RT inkubiert.
- (3) CD45: CD45 ist ein membranständiger Rezeptor mit einer endogenen Tyrosin-Phosphatase-Aktivität und ermöglicht als Pan-Leukozytenmarker einen immunhistologischen Nachweis von Leukozyten inklusive Makrophagen jedoch aber nicht von neutrophilen Granulozyten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der CD45-Nachweis anhand von 5- μ m-Gefrierschnitten durchgeführt. Gefrierschnitte wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-CD45-anti-humanen Primärantikörper (1:150) (abcam) 1 h bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Als Negativkontrolle diente 0,5 μ g/ml Kaninchenserum. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-konjugiertes anti-Kaninchen-Polymer für 30 min bei RT inkubiert.

Überschüssiger, nicht gebundener Sekundärantikörper wurde schließlich durch 3 x 2 min Waschen in TBST 0,01 % entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Diaminobenzidin (DAB) (1:50 in DAB *diluent*, Dako) und die ständige mikroskopische Kontrolle von 0 – 10 min bis

zu der Umsetzung zu einem bräunlichen Präzipitat. Die Reaktion wurde mit destilliertem Wasser abgestoppt und die Schnitte in Hämalaun nach Mayer (*ready-to-use*, Sigma) für 45 s gegengefärbt. Analog zur H & E-Färbung (Kapitel 2.2.5.3.) erfolgte die Bläuung der Schnitte für 10 min unter fließend Leitungswasser. Zur Langzeitlagerung wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils 2 min 60 %, 70 %, 80 %, 96 %, 2 x 2 min Isopropanol und 3 x 5 min Xylol dehydriert und schließlich in Xylol und am Eindeckelautomaten mit einem Deckgläschen versehen und ÜN getrocknet.

2.2.5.5. TUNEL-(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Assay

Zur Bestimmung der DNA-Degradierung in Tumoren durch den TUNEL-Nachweis wurden Gefrierschnitte zunächst 20 – 30 min bei RT äquilibriert um anschließend in 4 % PFA/PBS (100 µl pro Schnitt) bei RT fixiert. Nach einem 30-minütigen Waschgang in 1 x PBST 0,01 % wurden die Schnitte mit 0,3 % H₂O₂/Methanol blockiert, wiederum 3 x 2 min in TBST 0,01 % gewaschen und für 2 min in 4 °C-gekühltem 0,1 % TritonX-100/0,1 % Na-Acetat permeabilisiert. Nach wiederholtem Waschen für 3 x 2 min in TBST 0,01 % erfolgte die Inkubation der Schnitte im Dunkeln für 60 min bei 37 °C mit dem TUNEL-Mix (70µl pro Schnitt). Zur Funktionsüberprüfung des TdT-(Desoxyribonukleotidyltransferase)-Enzyms (Positivkontrolle) wurden zusätzlich vor der Zugabe des TUNEL-Mix Gefrierschnitte mit DNase I (3 kU) für 10 min bei RT inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde der TUNEL-Mix anstatt des Enzym-Mix (*Kit*) mit 1 x PBS versetzt. Nach der TUNEL-Mix-Inkubation und einer kurzen Überprüfung der erfolgten Färbung am Fluoreszenzmikroskop wurden die Schnitte für 3 x 2 min in TBST 0,1 % gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (POD converter, *ready-to-use*) für 30 min bei 37 °C. Überflüssige Peroxidaseanteile wurden anschließend durch 3 x 2 min TBST 0,1 % entfernt und die Schnitte analog zu der immunhistologischen Färbung (Kapitel 2.2.5.4.) mittels DAB-Substratzugabe und in Hämalaun nach Mayer gefärbt sowie in einer aufsteigender Alkoholreihe (s.o.) dehydriert und eingedeckelt.

2.2.5.6. Dokumentation und Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen

Für die Dokumentation und semiquantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen auf Tumorschnitten sowie der TUNEL-Assay-gefärbten Schnitte wurden Objektträger bei 2-, 5-, 10-, 20-, sowie 40-facher Vergrößerung mittels Mirax-Scanner (Carl Zeiss) eingescannt und jeweils als TIFF-, JPEG-oder BMP-Format abgespeichert. Für die semiquantitative Analyse der Färbungen wurden zusätzlich 10 x 40-fache Vergrößerungen angefertigt und mittels ImageJ-

Software (Applikation: *ImmunoRatio*) die DAB-Färbung (immunhistologisch gefärbtes Zielmolekül) zu Hämatoxin-gefärbten Bereichen prozentual berechnet.

2.2.6. Bioinformatische Methoden

2.2.6.1. Genedata Analyst 7.6.

Für die Analyse der im *Illumina Whole Genome Bead Chip Arrays HT-12v3* (Kapitel 2.2.1.4.) gewonnen Rohdaten und der nachfolgenden Bestimmung der differentiellen Genexpression wurden die primären Fluoreszenzdaten vom *Bead Array Reader* in die Genedata Analyst 7.6. Software geladen. Anschließend erfolgte eine lineare Normalisierung mit der *Central Tendency Normalization* (*Target Value* = 1,0). Mithilfe dieser Normalisierungsmethode werden alle Rohdaten durch das arithmetische Mittel dividiert, welches sich aus dem gesamten Mittelwert aller Rohdaten durch die Anzahl der hybridisierten Proben errechnet. Für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurden die Rohdaten der einzelnen Tumoren den zugehörigen Gruppen (5 x NaCl 0.9 % behandelte A2780-Tumoren, 5 x 50 mg/kg Carboplatin (Q2Dx1) behandelte A2780-Tumoren, 5 x NaCl 0.9 % behandelte A2780cis-Tumoren, 5 x 50 mg/kg Carboplatin (Q2Dx1) behandelte A2780cis Tumoren) zugeordnet und je nach Fokus mit unterschiedlichen statistischen Methoden analysiert. Diese sind jeweils im Ergebniskapitel aufgeführt bzw. methodisch im Kapitel 2.2.7. näher beschrieben.

2.2.6.2. Pathway enrichment analysis

Für die Ermittlung möglicher signifikant deregulierter Signalwege in carboplatinkurzzeittherapierten A2780- sowie A2780cis-Tumoren wurden die Genexpressionsdaten mittels *Pathway enrichment analysis* im *PathwayStudio®9-Software* analysiert. Die *Pathway enrichment analysis* ermöglicht die Identifizierung von signifikant häufig vorkommenden Genen eines bestimmten Signalweges in einer Genpopulation wie z. B. bei Genexpressionsdaten. Die Vergleichsdaten stammen dabei von der Datenbank *Gene Ontology* (GO) und werden mittels *PathwayStudio®9-Software* im Vergleich mit dem *Jaccard-Distance-Koeffizienten* und einem *p*-Wert statistisch evaluiert.

2.2.7. Statistische Methoden

2.2.7.1. Lineares Modell

Das Lineare Modell (*Linear Model Analysis*) wurde speziell zur Identifizierung potentiell „neuer“ resistenzvermittelnder Faktoren in A2780- und A2780cis-Tumoren angewandt. Nach der

Theorie, dass platinresistenzvermittelnde Faktoren bereits bei initialer Carboplatintherapie in kurzzeittherapierten A2780-Tumoren hochreguliert werden und gleichzeitig eine basale Erhöhung der Genexpression in den vehikeltherapierten A2780cis-Tumoren aufweisen, wurde der Einfluss von zwei verschiedenen Faktoren berücksichtigt: a) Carboplatineffekt in den A2780- und A2780cis-Tumoren b) Platinresistenz von A2780cis-Tumoren im Vergleich zu A2780-Tumoren. Abbildung 2.1. stellt die Hypothese zu der Identifizierung potentieller Faktoren der Platinresistenz schematisch dar. Als statistisch signifikant wurden die in der linearen Modell-Analyse ermittelten differentiell exprimierten Gene mit einem p -Wert $< 0,001$ und einer Falschpositivrate (*false discovery rate*, $FDR < 0,1$) anerkannt und für weitere Analysen verwendet.

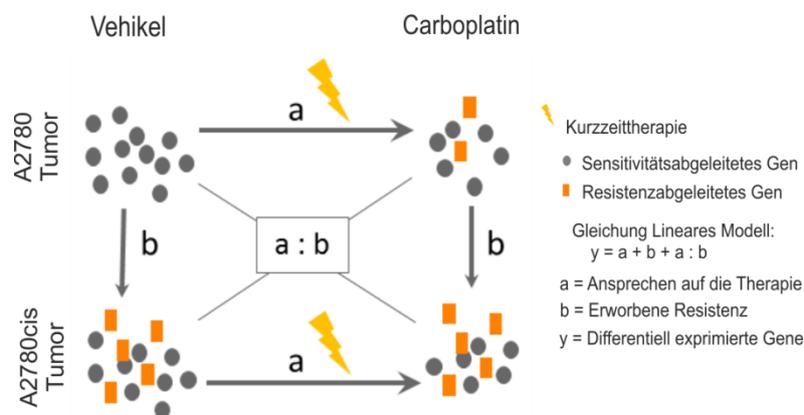


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung der Variablen des Linearen Modells zur Berechnung potentieller resistenzabgeleiteter Gene.

2.2.7.2. Modifizierung der Kaplan-Meier-Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Daten der Carboplatinlangzeittherapie (Kapitel 2.2.3.4.) mithilfe einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve statistisch evaluiert. Dabei wurde eine Tumorfläche von $\leq 150 \text{ mm}^2$ als ein Überlebensereignis (= "1") gekennzeichnet. Sobald die Tumorfläche $\geq 150 \text{ mm}^2$ erreichte (Beendigung des Experimentes), wurde ein sogenanntes Todesereignis (= "0") festgesetzt. Diese Analyse konnte mithilfe der *GraphPad Prism 6 Software* durchgeführt werden.

2.2.7.3. t-Test

Bei einem direkten Vergleich zweier normalverteilter Datensätze wurde ein *unpaired* parametrischer *t*-Test durchgeführt. Daten die als statistisch signifikant gelten, werden mit einem Stern (*) für $p < 0,05$; mit (**) $p < 0,01$; mit (***) $p < 0,001$ und mit (****) $p < 0,0001$

gekennzeichnet. Die Analyse wurde mittels *GraphPad Prism 6 Software* durchgeführt und die Standardabweichung in den jeweiligen Graphen dargestellt.

2.2.7.4. N-Way-ANOVA (Analysis of Variance)

Für einen statistischen Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde im Rahmen dieser Arbeit die sogenannte *One-way-* oder *Two-way-ANOVA* verwendet. Bei einer statistischen Signifikanz von einem p -Wert $< 0,05$ wurden verschiedene nachgeschaltete Analysen (sog. *post-hoc-tests*) zu der Evaluierung der Signifikanz im Einzelgruppenvergleich herangezogen.

Die Beurteilung der Signifikanz bezüglich des Tumorwachstums oder des Tumorgewichtes verschiedener *in-vivo*-Experimente (Kapitel 3.3.), wurde ebenfalls mittels *One-Way-* oder *Two-Way-ANOVA (N-Way-ANOVA)* durchgeführt. Der resultierende p -Wert wurde durch die Anzahl der zu vergleichenden Gruppen dividiert (p -Wert-Adjustierung). Bei einem anschließendem *post-hoc-test* wurden dann die p -Werte der Einzelgruppenvergleiche jeweils mit dem adjustiertem p -Wert verglichen und als signifikant dargestellt, wenn $p_{\text{post-hoc}} < p_{\text{adj}}$. Bei den *post-hoc-tests* handelte es sich u. a. um die *Bonferroni*-Methode (Vergleich aller Gruppen zueinander) oder den *Dunnnett*-Test (Vergleich aller Gruppen zu einer Kontrollgruppe). Die Darstellung der Signifikanz wurde wie im vorangegangenen Abschnitt Kapitel 2.2.7.3. vorgenommen. Zusätzlich wurde für einen Gruppenvergleich bzgl. der differentiellen Genexpression im gesamten Datensatz des *Illumina Whole Genome Bead Chip Arrays HT-12v3* (Kapitel 2.2.1.4.) neben dem Linearen Modell als solches, auch die *N-Way-ANOVA* ohne weiteren *post-hoc-test* eingesetzt. Hierbei wurden Gene analysiert, die in einem *Gene-Ontology*-Term (pro- und antiapoptotisch; Seneszenz; *DNA Damage response* (DDR); NF- κ B) zusammengefasst sind (Kapitel 3.3.1. - 3.3.3.).

3. Ergebnisse

3.1. Effekte der Carboplatintherapie in humanen Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und A2780cis *in vitro*

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, resistenzvermittelnde Faktoren im platinresistenten Ovarialkarzinom zu identifizieren, und diese als Basis für eine potentielle zielgerichtete Therapie zu evaluieren. Zur Identifizierung und Charakterisierung solcher resistenzvermittelnder Faktoren wurden die humane Ovarialkarzinomzelllinie A2780 und dessen cisplatinresistente Variante A2780cis als repräsentatives Modell der Platinresistenz ausgewählt und analysiert. Die Herstellung der cisplatinresistenten Variante von A2780 erfolgte bereits im Jahre 1987 durch Behrens *et al.* mittels dauerhafter Exposition von A2780 mit Cisplatin *in vitro* und der anschließenden Weiterkultivierung der gewonnenen cisplatinresistenten Zellen als Tochterzelllinie A2780cis [226]. Da jedoch Cisplatin durch das Cisplatinderivat Carboplatin aufgrund geringerer nephrotoxischer Wirkungen im klinischen Alltag weitgehend ersetzt wurde, soll im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich auf die Resistenzbildung der A2780cis-Zellen in der Carboplatintherapie eingegangen werden. Um zunächst eine Kreuzresistenz der A2780cis-Zellen gegenüber Carboplatin festzustellen, wurden verschiedene *in-vitro*-Analysen in A2780cis und in A2780 durchgeführt. Die Resultate werden im Einzelnen in den drei folgenden Unterkapiteln 3.1.1., 3.1.2. und 3.1.3. wiedergegeben.

3.1.1. A2780cis-Zellen sind kreuzresistent gegenüber der Carboplatintherapie

Da Carboplatin als Cisplatinderivat eine ähnliche Wirkungsweise wie Cisplatin aufweist, ist eine Kreuzresistenz der cisplatinresistenten A2780cis-Zellen gegenüber der Carboplatintherapie anzunehmen (Kapitel 1.3.). Um dies zu überprüfen, wurde eine IC₅₀-Bestimmung mittels *CellTiter®-Glo-Assay* durchgeführt (Kapitel 2.2.2.3.). Hierbei wurden A2780 und A2780cis-Zellen für 72 h mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Carboplatin behandelt. Auf der Grundlage der metabolischen Aktivität (ATP-Produktion) der Zellen, wurde nach 72 h die Konzentration an Carboplatin bestimmt, bei der 50 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert werden (IC₅₀-Konzentration). Die A2780cis-Zellen wiesen dabei eine IC₅₀-Konzentration von $1,15 \times 10^{-4}$ M Carboplatin auf. Diese war bei der parentalen Zelllinie mit $3,76 \times 10^{-6}$ M Carboplatin rund 31-fach niedriger. Des Weiteren war bei den A2780cis-Zellen kein sigmoidaler Kurvenverlauf (keine Sättigung) zu verzeichnen. Somit ist die Bestimmung des IC₅₀-Wertes in

A2780cis-Zellen nur als Annäherungswert zu betrachten. Außerdem zeigten A2780cis-Zellen bei niedrigeren Carboplatinkonzentrationen eine insgesamt 25,3 % geringere metabolische Aktivität als A2780-Zellen auf (Abbildung 3.1.). Zusammenfassend ist somit festzustellen, dass die A2780cis-Zellen eine geringere Sensitivität gegenüber der Carboplatintherapie aufweisen.

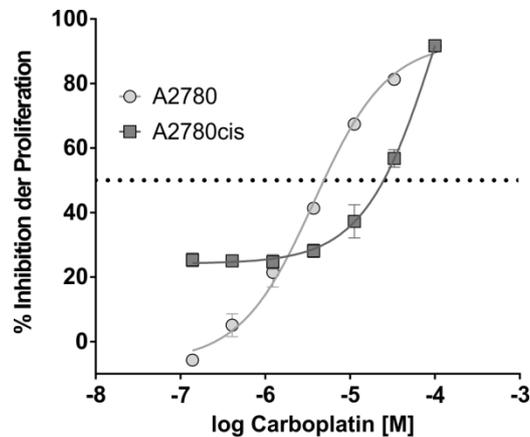


Abbildung 3.1. Dosis-Wirkungskurven von Carboplatin in A2780 und A2780cis *in vitro*. Dargestellt ist die Inhibition der Zellproliferation in Prozent im Vergleich zu der DMSO-behandelten Kontrolle nach 72 h Inkubation mit Carboplatin in einer Konzentration zwischen 0,1 μ M und 100 μ M.

3.1.2. Verminderter Zellzyklusarrest in A2780cis nach Carboplatintherapie

Da Carboplatin nach dem Eintritt in die Zelle und der Formierung der Platin-DNA-Addukte zu einem Zellzyklusarrest führen kann (Kapitel 1.3.), sollte als nächstes die Zellteilungsrate und der Zellzyklus von A2780 und A2780cis mit und ohne Carboplatintherapie analysiert werden. Dazu wurde in Echtzeit die Zellteilungsrate von A2780 und A2780cis-Zellen mithilfe eines *xCELLigence*TM-Assays über einen Zeitraum von 220 h ermittelt (Kapitel 2.2.2.4.). Die parentale Zelllinie A2780 zeigte dabei in der exponentiellen Wachstumsphase von 66 h bis 131 h mit 27,5 h eine um 4,5-h höhere Zellteilungsrate im Vergleich zu A2780cis. Bei der Zugabe von DMSO (0,1 % Endkonzentration) konnte kein wesentlicher Unterschied in der Zellteilungsrate im Vergleich zum Normalmedium detektiert werden (Abbildung 3.2.).

Um festzustellen, ob die geringere Zellteilungsrate und Sensitivität gegenüber der Carboplatintherapie in A2780cis auf einen modifizierten Zellzyklus zurückzuführen ist, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodidfärbung durchgeführt (Kapitel 2.2.2.6.). Dazu wurden A2780- und A2780cis-Zellen jeweils mit 8,5 μ M und 66 μ M Carboplatin für 72 h behandelt und anschließend mit Propidiumiodid gefärbt. Die Anzahl der vorliegenden Chromosomensätze wurde schließlich mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) bestimmt (Abbildung 3.3.). A2780-Zellen wiesen nach einer 72-stündigen Therapie mit 8,5 μ M Carboplatin 34 % mehr Zellen im G2/M-

Zellzyklusarrest als im Vergleich zu A2780cis-Zellen auf. Die Behandlung mit 66 μM Carboplatin verstärkte diese Verschiebung bei 51 % der A2780-Zellen und 40 % der A2780cis-Zellen in Richtung G2/M. Auffällig war, dass unter Behandlung mit 66 μM Carboplatin in beiden Zelllinien ein Zellzyklusarrest erzeugt werden konnte, aber nur 4,63 % der A2780-Zellen und 4,05 % der A2780cis-Zellen in die Apoptose eintraten. Des Weiteren war zu beobachten, dass unter DMSO-Behandlung nur 2,6 % mehr A2780-Zellen in der Synthese-(S)-Phase im Vergleich zu den A2780cis-Zellen vorlagen. Zusammenfassend ist also festzustellen, dass A2780cis-Zellen im Vergleich zu A2780-Zellen eine geringere Induktion eines G2/M-Arrestes und damit eine erhöhte Mitose unter der Carboplatintherapie aufweisen.

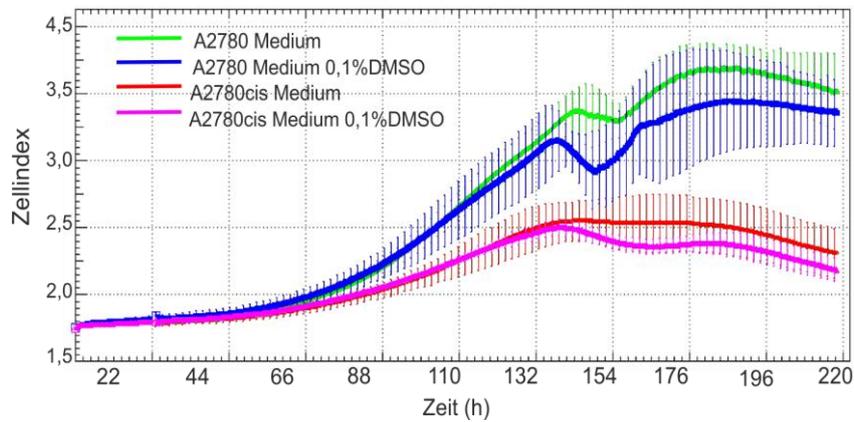


Abbildung 3.2. Graphische Darstellung der Veränderung des Zellindex von A2780- und A2780cis-Zellen im Routinemedium RPMI1640/10 % FBS mit oder ohne 0,1 % DMSO in einem Zeitraum von 0 h bis 220 h.

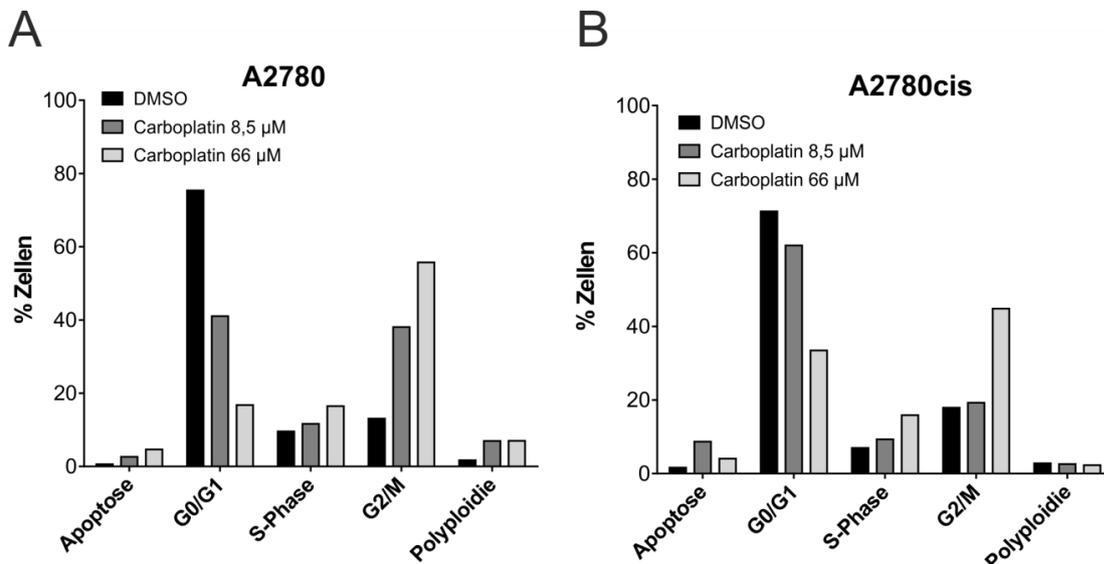


Abbildung 3.3. Zellzyklusanalyse von A2780 und A2780cis nach 72 h Inkubation mit 8,5 μM oder 66 μM Carboplatin mittels FACS von propidiumiodidgefärbter DNA. Bei einem Chromosomensatz ($n = 1$) befinden sich Zellen in der Phase zwischen G0/G1 (1. Restriktionspunkt, Einleitung eines neuen Zellzyklus) und bei $n = 2$ in der Phase G2/M (2. Restriktionspunkt, Mitose). Zwischen G0/G1 und G2/M erfolgt die Replikation (S-Phase). Als apoptotische Zellen werden Chromosomensätze < 1 definiert.

3.1.3. Erhöhte Migration von A2780cis in einem FBS-Gradienten nach Carboplatintherapie

Wurden A2780 und A2780cis unter Normbedingungen kultiviert, so waren zunächst eine kreisförmige Zellform bei A2780 und eine fibroblastische Zellmorphologie bei A2780cis zu beobachten. Außerdem konzentrierten sich A2780-Zellen kolonieartig, wobei A2780cis-Zellen überwiegend regelmäßig und einzeln über den Plattenboden verteilt waren (Abbildung 3.4a.).

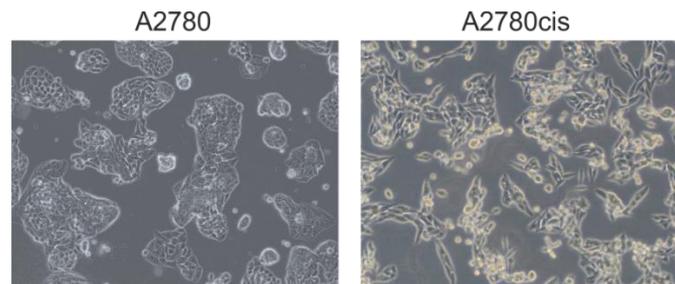


Abbildung 3.4a. Mikroskopische Aufnahme (100 x) im Phasenkontrast von A2780- und A2780cis-Zellen in Kultur unter Normbedingungen.

Da ein fibroblastischer Phänotyp bezüglich der resistenten Zelllinie auf ein erhöhtes Migrationspotential hindeuten kann, wurde das Migrationsverhalten von A2780 und A2780cis in einem FBS-Gradienten mit und ohne Carboplatinpräinkubation mittels *Transwell-Assay* (Migrationsassay) untersucht. Für die Herstellung eines FBS-Gradienten wurde das obere *Transwell* mit 0,5 % FBS und das untere *Transwell* mit 10 % FBS beschichtet. Um zusätzlich eine mögliche Zufallsmigration der Zellen zu überprüfen, wurden beide Kompartimente jeweils mit derselben FBS-Konzentration beschichtet (entweder 0,5 % oder 10 %). Die Migration wurde 24 h nach Aussaat im oberen *Transwell*, anhand der *Calcein*-markierten Zellen an der Unterseite der 8- μ m-Porenmembran durch Fluoreszenzmessung bestimmt (Kapitel 2.2.2.5.).

Bei einer austarierten FBS-Konzentration (beide Kompartimente des *Transwells* mit 10 % FBS beschichtet) war nach 24 h eine 7,6-fach höhere Anzahl an (zufalls)-migrierten A2780-Zellen als an A2780cis-Zellen (Abbildung 3.4b.) zu beobachten. Die höhere Migration der A2780-Zellen spiegelte sich auch im FBS-Gradienten wieder: So migrierten 45 % mehr A2780-Zellen entlang eines FBS-Gradienten im Vergleich zu der austarierten FBS-Konzentration (10 %/10 % FBS). Im Gegensatz dazu, wiesen die A2780cis-Zellen in einem FBS-Gradienten nur eine 17 % höhere Migration als in einer austarierten FBS-Konzentration auf. Bei einer Präinkubation mit 50 μ M Carboplatin über Nacht (24 h) und einem anschließendem *Transwell-Assay* verringerte sich die Migration der A2780-Zellen um 25 % im Vergleich zu unbehandelten A2780-Zellen. Bei A2780cis migrierten nach der Carboplatinpräinkubation 8 % mehr Zellen entlang eines FBS-Gradienten. Demzufolge ist festzustellen, dass resistente A2780cis Zellen einen fibroblastischen

Phänotyp aufweisen, dieser jedoch erst unter Carboplatinbehandlung mit einem erhöhten migratorischen Potential korreliert.

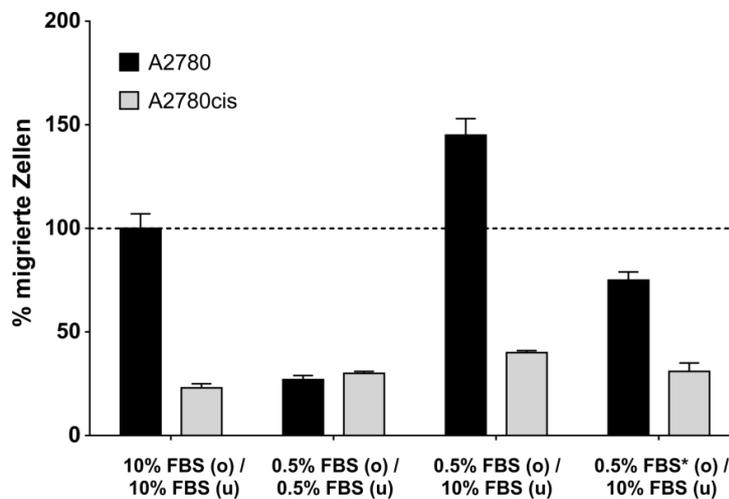


Abbildung 3.4b. Transwell-Assay von A2780 und A2780cis in einem FBS-Gradienten (0.5 %/10 %) mit und ohne Carboplatinpräinkubation. Der Vergleich bezieht sich auf die A2780-Migration in einer austarierten FBS-Konzentration (10 %/10 %). Pro Ansatz wurden n = 3 Transwells analysiert. o = oberes Transwell, u = unteres Transwell, * mit Carboplatinpräinkubation für 24 h.

Die vorangegangenen *in-vitro*-Analysen zeigten, dass die Kreuzresistenz von A2780cis-Zellen gegenüber der Carboplatintherapie möglicherweise auf einen verzögerten Zellzyklusarrest und ein verändertes Migrationsverhalten zurückzuführen ist. Da ein dreidimensionales Tumorwachstum von etablierten Zelllinien *in vivo* die Genexpression und Morphologie eines primären, humanen Tumors genauer als *in vitro* widerspiegelt, sollte nun die Identifizierung potentiell resistenzabgeleiteter Faktoren auf der Grundlage xenogener Tumoren stattfinden. Die Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln wiedergegeben.

3.2. Effekte der Carboplatinkurzzeittherapie in subkutanen A2780- und A2780cis-Tumoren *in vivo*

3.2.1. Langsameres Tumorwachstum von A2780cis in SCID-Mäusen

Faktoren, die während der initialen Chemotherapie in einem chemotherapiesensitiven Modell (z. B. A2780) bereits differentiell reguliert werden, können bei dauerhafter Therapie eine entscheidende Rolle in einer möglichen Resistenzbildung (z. B. A2780cis) spielen. Für die Identifizierung solcher initial regulierter Faktoren und anderer potentieller Resistenzfaktoren in der Carboplatintherapie, wurden A2780- und A2780cis-Zellen subkutan in SCID-Mäuse eingebracht und ab einer Tumorfläche von 50 mm² für zwei Tage mit Carboplatin (75 mg/kg)

„kurzzeittherapiert“. Die Tumoren wurden 24 h nach der letzten Injektion entnommen und für histologische Analysen in Einfriermedium eingebettet oder für weitere RNA- und Proteinanalysen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Bis zu der vordefinierten Tumorfläche von 50 mm² konnte für die A2780-Tumoren mit 10 Tagen nach Tumorzellinokulation ein weitaus schnelleres Tumorwachstum im Vergleich zu A2780cis-Tumoren mit ca. 16 Tagen festgestellt werden (Abbildung 3.5.). Eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums durch die Carboplatinkurzzeittherapie war in beiden Tumorarten jedoch nicht zu beobachten.

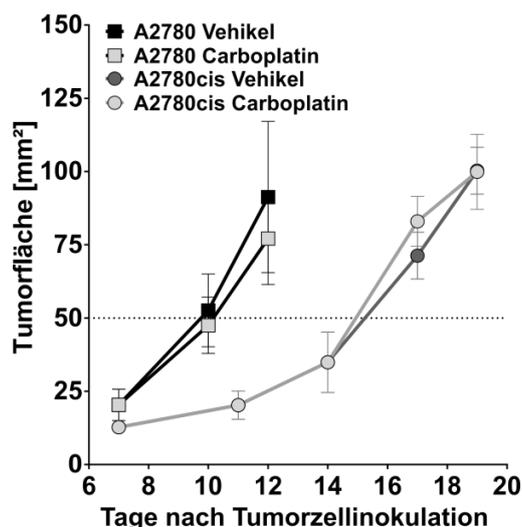


Abbildung 3.5. Subkutanes Tumorwachstum von A2780 und A2780cis unter der Carboplatinkurzzeittherapie in SCID-Mäusen. Ab einer Tumorfläche von 50 mm² wurden die Tumoren randomisiert und für zwei Tage i. v. mit 75 mg/kg Carboplatin oder dem Vehikel NaCl 0,9 % kurzzeitbehandelt (n = 10 pro Gruppe).

3.2.2. Geringere Apoptoseinduktion in subkutanen A2780cis-Tumoren nach Carboplatintherapie

Ein verlangsamtes Tumorwachstum von A2780cis (Kapitel 3.2.1.) kann zum einen aus einer reduzierten Proliferationsrate und zum anderen aus einer erhöhten Apoptoserate resultieren. Um dies zu überprüfen, sollte als nächstes die Proteinexpression des Proliferationsantigens Ki-67 und die DNA-Degradation mittels TUNEL-Analyse in den vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren auf histologischer Ebene untersucht werden. Für die allgemeine Beurteilung der Veränderung der Gewebestruktur nach Carboplatinkurzzeittherapie, wurde außerdem eine H & E-Färbung der Tumoren durchgeführt (Kapitel 2.2.5.3.). Hierbei konnte mittels qualitativ-mikroskopischer Beurteilung festgestellt werden, dass A2780-Tumoren im Grundzustand einen höheren Anteil an Nekrosen und Interzellulärsubstanz als A2780cis-Tumoren aufwiesen (Abbildung 3.6.). Unter

Carboplatintherapie war eine weitere Erhöhung des Nekroseanteils mit einer starken Auflockerung des Gewebes und Flüssigkeitsansammlung in den A2780-Tumoren zu beobachten.

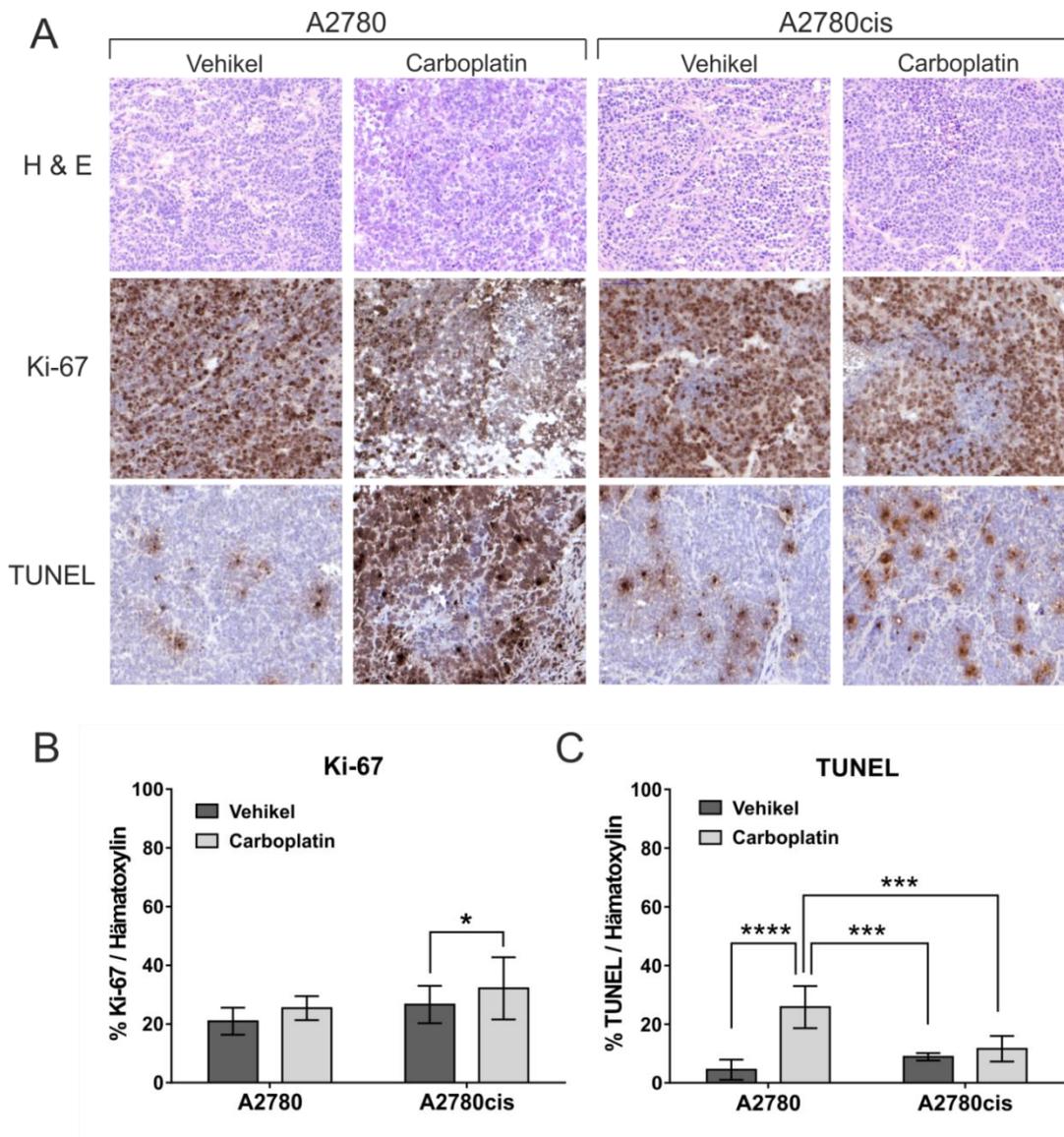


Abbildung 3.6. (A) 5 µm Kryoschnitte der kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren jeweils mit dem histologischen Nachweis der Tumorstruktur (H & E), der Proliferation (Ki-67) und der DNA-Degradation (TUNEL). (B + C) Quantifizierung der Ki-67- bzw. TUNEL-positiven Zellen in kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren im Verhältnis zu der Hämatoxylinhintergrundfärbung von insgesamt zehn mikroskopisch 40-fach vergrößerten Tumorbereichen (n = 3 Tumoren) mithilfe der ImageJ-Analysesoftware.

Die kompakte, undifferenzierte Gewebestruktur der A2780cis-Tumoren wies hingegen keine großen Veränderungen nach der Carboplatintherapie auf. Die geringere gewebestrukturale Veränderung und die damit wahrscheinlich geringere Wirkung von Carboplatin in A2780cis-Tumoren, konnte mithilfe der TUNEL-Analyse (Kapitel 2.2.5.5.) unterstützt werden: Mittels ImageJ-basierter Quantifizierung war in den carboplatintherapierten A2780cis-Tumoren nur eine 1,3-fache Erhöhung der TUNEL-positiv-

gefärbten Bereiche im Vergleich zu der Vehikeltherapie zu detektieren. Im Basalzustand (Vehikeltherapie) der A2780cis-Tumoren war außerdem ein 2,0-fach höherer Anteil an TUNEL-positiv-gefärbten Bereichen als in A2780-Tumoren zu beobachten. In den A2780-Tumoren konnte hingegen eine signifikante ($p < 0,001$) Erhöhung der TUNEL-positiven Bereiche um das 5,7-fache nach Carboplatinkurzzeittherapie im Vergleich zu der Vehikelbehandlung nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu, war keine signifikante Veränderung der Anzahl an Ki-67-positiven Zellen in den A2780-Tumoren nach Carboplatintherapie im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren festzustellen. Bei den A2780cis-Tumoren resultierte die Carboplatinkurzzeittherapie sogar in einer geringfügigen Erhöhung ($p < 0,05$) der Anzahl an Ki-67-positiven Zellen im Vergleich zu der Vehikeltherapie.

Im Allgemeinen ist festzuhalten, dass A2780cis-Tumoren nach erfolgter Carboplatintherapie aufgrund der geringeren Apoptoseinduktion *in vivo* ebenfalls als kreuzresistent eingestuft werden können.

3.2.3. Verminderte Infiltration von Immunzellen in A2780cis-Tumoren

Ein erhöhtes Level an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder IL-6 im Blutplasma von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom ist eine mögliche Ursache für ein geringeres Ansprechen gegenüber der Platintherapie [41, 42]. Um die Infiltration von Immunzellen bzw. die Expression von tumorabgeleiteten Zytokinen in A2780- und A2780cis-Tumoren unter Carboplatinkurzzeittherapie zu analysieren, wurde die Anzahl der pan-CD45-positiven Zellen sowie die IL-6- und TNF- α -Expression (Kapitel 2.2.4.6.) in den zugehörigen Tumorlysaten untersucht. Dabei zeigten die A2780-Tumoren unter Vehikeltherapie eine 1,7-fach höhere ($p < 0,05$) TNF- α -Expression und eine 3,6-fach höhere IL-6-Expression als die A2780cis-Tumoren. Die Carboplatinkurzzeitbehandlung der A2780-Tumoren verursachte eine 1,7-fache ($p < 0,05$) und eine 3,4-fache (nicht signifikant) Herunterregulation der TNF- α - und der IL-6 Expression im Vergleich zu der Vehikelbehandlung. Im Gegensatz dazu, konnte in den A2780cis-Tumoren tendenziell eine leichte Zunahme der IL-6- bzw. der TNF- α -Expression um jeweils das 1,5-fache und um das 1,2-fache festgestellt werden (Abbildung 3.7.).

Die verstärkte Zytokinausschüttung im Basalzustand der A2780-Tumoren ging zusätzlich einher mit einer erhöhten Anzahl an CD45-positiven Zellen. Die A2780cis-Tumoren zeigten hingegen eine geringere Anzahl an CD45-positiven Zellen im Basalzustand.

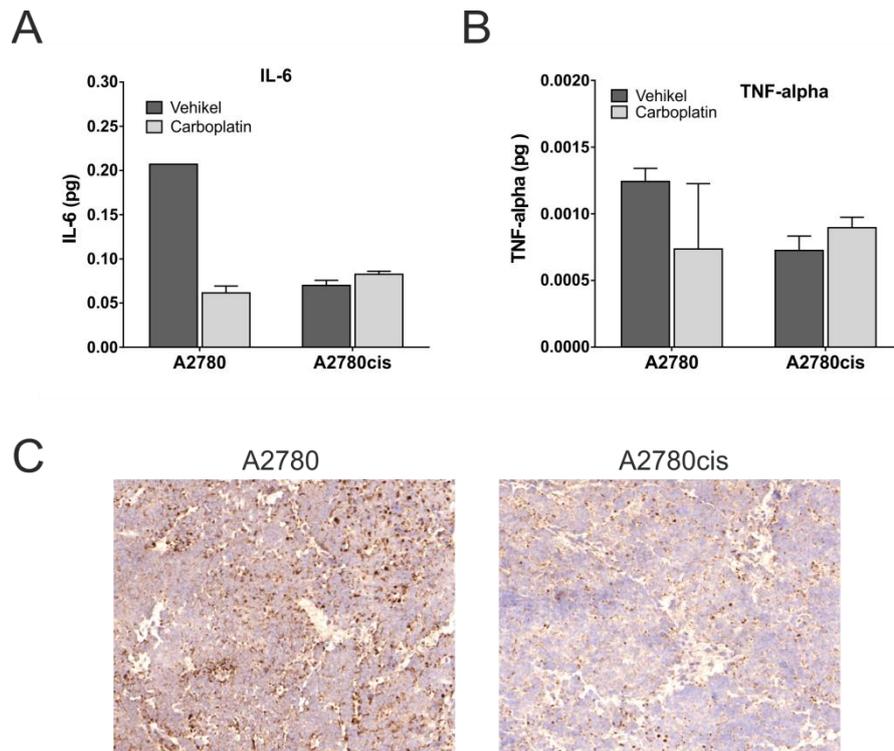


Abbildung 3.7. (A) IL-6-Expression in kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren. (B) TNF- α -Expression in kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren. (C) Repräsentative Färbung eines immunhistologischen Nachweises von CD45 auf 5 μ m Gefrierschnitten von vehikelbehandelten, kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren (n = 3 Tumoren).

3.2.4. P21-vermittelter Zellzyklusarrest in A2780-Tumoren nach Carboplatintherapie

Da A2780cis-Zellen einen verzögerten G2/M-Zellzyklusarrest nach Carboplatintherapie *in vitro* aufwiesen (Kapitel 3.1.2.), sollte als Nächstes der Frage nachgegangen werden, ob ein geringerer Anteil degradiertes DNA in A2780cis-Tumoren *in vivo*, ebenfalls auf einen modifizierten Zellzyklus zurückzuführen ist. Für die Beantwortung dieser Frage, wurde die Proteinexpression ausgewählter Inhibitoren und Überlebensfaktoren im Zellzyklus mittels *Westernblot* untersucht. Im Vergleich zu der Vehikeltherapie konnte in den A2780-Tumoren unter Carboplatintherapie eine starke Hochregulation der Proteinexpression des Zellzyklusinhibitors P21 detektiert werden (Abbildung 3.8.). In den vehikel- und carboplatinbehandelten A2780cis-Tumoren wurde hingegen keine P21-Expression detektiert. Die Proteinexpression von Cyclin D1, ein positiver Regulator der Tumorprogression, war im Basalzustand der A2780- und A2780cis-Tumoren in etwa gleich hoch. Wurden die beiden Tumorvarianten hingegen mit Carboplatin therapiert, so zeigte sich eine starke Herunterregulation von Cyclin D1 in den A2780-Tumoren, jedoch nicht in den A2780cis-Tumoren. Das basal erhöhte Tumorstadium von A2780-Tumoren im Vergleich zu den A2780cis-Tumoren, könnte außerdem durch ein höheres Expressionslevel des

antiapoptotischen Faktors BCL2 erklärt werden. Unter Carboplatintherapie wurde dieses erhöhte BCL2-Proteinlevel in den A2780-Tumoren jedoch wieder reduziert. Die A2780cis-Tumoren zeigten hingegen keine Veränderung des BCL2-Levels nach Carboplatintherapie. Weitere Faktoren die in carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren untersucht wurden, waren gesamtes („total“) und phosphoryliertes p42/p44-MAPK-Protein (MAPK = „Mitogen activated protein kinases 1 and 3“) sowie das gesamte und das geschnittene PARP-Protein (PARP = „Poly ADP ribose polymerase“). Diese Faktoren zeigten in den A2780- und A2780cis-Tumoren jedoch keine Veränderung der Proteinexpression unter Vehikel- und Carboplatintherapie.

Ein geringerer Anteil an degradiertem DNA in den A2780cis-Tumoren ist also wahrscheinlich auf einen verminderten P21-vermittelten Zellzyklusarrest zurückzuführen.

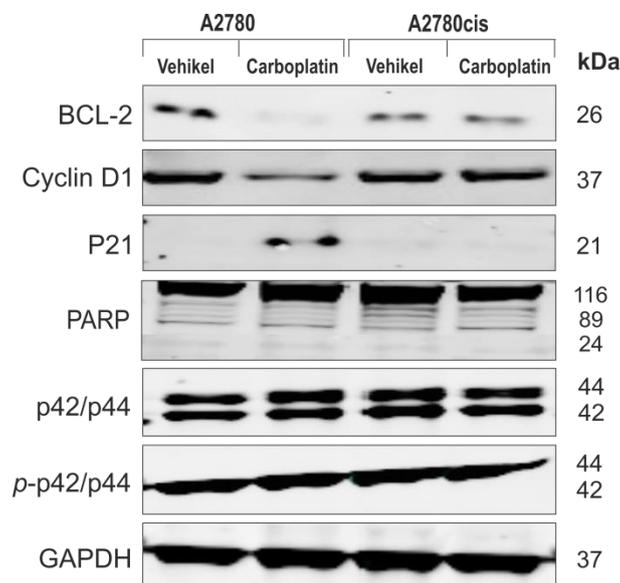


Abbildung 3.8. Nachweis der Proteinexpression von BCL2, Cyclin D1, P21, PARP, p42/p44 und phospho-p42/p44 und GAPDH in kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren.

3.2.5. Erhöhte AKT-Phosphorylierung in A2780cis-Tumoren nach Carboplatintherapie

Um der Ursache eines verringerten p21-vermittelten Zellzyklusarrestes in den A2780cis-Tumoren unter Carboplatinkurzzeittherapie weiter nachzugehen, wurde ein sogenannter *Proteom Profiler Array* (Kapitel 2.2.4.5.) durchgeführt. Mithilfe dieses *Proteinarrays* konnte das Phosphoproteinlevel von insgesamt 47 Proteinen mit unterschiedlichen zellulären Funktionen (Zellzyklus, Überleben, Apoptose etc.) in vehikel- bzw. carboplatinbehandelten A2780- und A2780cis-Tumoren analysiert werden. Als signifikant dereguliert und potentiell resistenzabgeleitet galt ein 2-fach höheres Phosphoproteinlevel in den carboplatinbehandelten

A2780-Tumoren und in den vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren.

Hierbei konnte im Basalzustand der A2780cis-Tumoren (Vehikeltherapie) ein 2-fach höheres Level an phosphoryliertem AKT, P27 und p38-MAPK- α als in den vehikeltherapierten A2780-Tumoren detektiert werden (Abbildung 3.9.). Unter Carboplatintherapie wurde das Level von phospho-AKT, phospho-P27 und phospho-p38-MAPK- α in den A2780cis-Tumoren leicht herunterreguliert, verblieb aber jeweils auf einem 1,4-fach, 1,2-fach und 1,1-fach höheren Level als in den vehikelbehandelten A2780-Tumoren. Im Gegensatz dazu zeigten die A2780-Tumoren unter der Carboplatintherapie eine 52 %ige Herunterregulation der Phospho-AKT-Level. Bezüglich der Phospho-P27- und phospho-p38- α -Level war in den A2780-Tumoren hingegen eine 1,1-fache und 1,8-fache Erhöhung unter Carboplatintherapie zu beobachten.

Des Weiteren konnte bei CHEK2, einem zentralen Mediator in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung, unter Carboplatinkurzzeittherapie eine Hochregulation des Phosphoproteinlevels in beiden Tumorarten beobachtet werden. Die carboplatininduzierte Hochregulation von phospho-CHEK2 fiel jedoch in den A2780cis-Tumoren 38% niedriger als in den A2780-Tumoren aus. Des Weiteren wiesen A2780-Tumoren unter der Carboplatinkurzzeittherapie eine starke Hochregulation bezüglich aller Phosphorylierungsstellen von P53 (S15, S392, S46) im Vergleich zu der Vehikeltherapie auf. Diese carboplatininduzierte Hochregulation der phospho-P53-Level war in den A2780cis-Tumoren allerdings nicht zu beobachten.

Um die vorläufigen Ergebnisse des *Phosphoprotein-Arrays* zu bestätigen, wurde zusätzlich die Proteinexpression von Gesamt-AKT, phospho-AKT und phospho-P53 (S15) in den kurzzeitbehandelten A2780- und A2780cis-Tumoren mittels *Westernblot* überprüft. Alle untersuchten Gruppen wiesen dabei zunächst ein vergleichbar ähnlich hohes Level an AKT-Gesamtprotein auf. In Anlehnung an den *Proteom Profiler Array* war unter Vehikeltherapie außerdem eine stark erhöhte AKT-Phosphorylierung in den A2780cis-Tumoren im Vergleich zu den A2780-Tumoren zu detektieren. Diese erhöhte AKT-Phosphorylierung in den A2780cis-Tumoren zeigte keine Veränderung unter Carboplatintherapie. Im Gegensatz dazu war in den carboplatintherapierten A2780-Tumoren eine Abnahme des phospho-AKT-Levels zu beobachten. Dies korrelierte mit einer Erhöhung der P53-Phosphorylierung. Eine Erhöhung der P53-Phosphorylierung konnte zwar auch in den carboplatintherapierten A2780cis-Tumoren nachgewiesen werden, diese fiel jedoch weitaus schwächer als in carboplatinbehandelten A2780-Tumoren aus. Daraus resultiert, dass A2780cis-Tumoren unter Carboplatintherapie einen geringeren P53-vermittelten Zellzyklusarrest und eine erhöhte AKT-vermittelte Überlebenssignaltransduktion aufweisen.

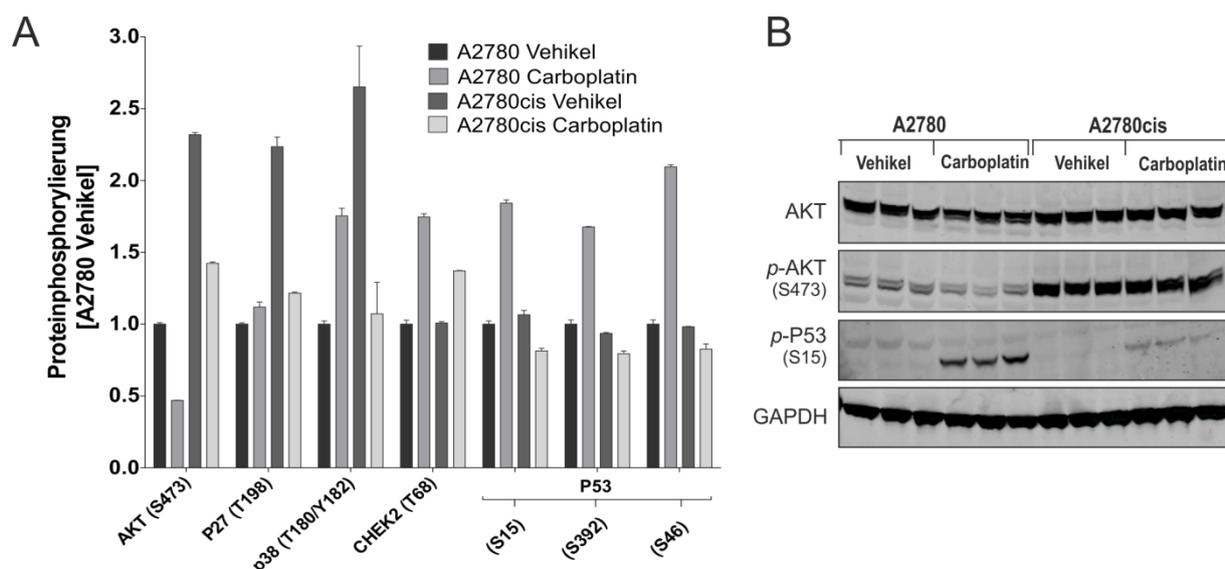


Abbildung 3.9. (A) Phosphoproteinlevel von selektierten Proteinen aus einem *Proteinarray* (*Proteom Profiler Array*). Dargestellt sind Proteine, die eine mehr als 2-fache Hochregulation des Phosphoproteinlevels in der Carboplatintherapie bei A2780-Tumoren und bei vehikeltherapierten A2780cis-Tumoren aufwiesen (B) *Westernblot* Analyse von Gesamt-AKT sowie phospho-AKT (S473) und phospho-P53 (S15) in kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren (n=3).

3.3. Evaluierung resistenzabgeleiteter Faktoren in A2780 und A2780cis *in vivo*

Nach der Feststellung der Kreuzresistenz der A2780cis-Zellen *in vitro* und einer möglichen Ursache dieser Kreuzresistenz auf Proteinebene *in vivo*, sollte nun ein umfangreiches genomisches Bild der Platinzytotoxizität / Platinresistenz in diesen Modellen erstellt werden. Dies sollte schließlich die Basis für die Identifizierung und Evaluierung potentiell neuer resistenzvermittelnder Faktoren sein.

Dazu wurde jeweils RNA aus fünf der vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren isoliert und auf *Whole genome bead chip Arrays* (HT-12v3) (*Microarray*) hybridisiert (Kapitel 2.2.1.4.). Anschließend wurden für die vergleichende Genexpressionsanalyse folgende Signalwege, die in der Platinresistenz eine Rolle spielen können, untersucht: (1) die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden (2) die zelluläre Seneszenz und (3) die Apoptose. Die Resultate werden in den folgenden Kapiteln wiedergegeben.

3.3.1. Expressionsanalyse carboplatininduzierter Gene in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden

Einer der zentralen Mechanismen in der platinvermittelten Zytotoxizität ist die Signalweiterleitung der zellulären Antwort auf DNA-Schäden (*DNA Damage Response*). Nach

Formation der DNA-Platin-Addukte führt die Aktivierung der ATM-Kinase (Sensor der DNA-Schädigung) über eine weitere Aktivierung von CHEK1/CHEK2 zu einem P53-vermittelten Zellzyklusarrest [59]. Die Konsequenz ist die Reparatur der DNA-Platin-Addukte oder bei schwerwiegender DNA-Schädigung, die Induktion der Apoptose. Um den Prozess der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung in den kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren zu analysieren, wurden die Hauptmediatoren dieses Signalweges hinsichtlich ihrer differentiellen Genexpression mittels *N-Way*-ANOVA ($p < 0,05$) analysiert.

Hierbei konnte zunächst im Basalzustand (Vehikeltherapie) der A2780cis-Tumoren eine 1,4-fach niedrigere ATM-RNA-Expression als in den vehikeltherapierten A2780-Tumoren detektiert werden (Abbildung 3.10.). Dies war außerdem mit einer 1,4-fachen sowie 4,2-fachen RNA-Herunterregulation der nachgeschalteten ATM-Effektoren CHEK1 und CHEK2 verbunden. Des Weiteren war in den A2780cis-Tumoren unter Vehikeltherapie eine 2,5-fach niedrigere P53-RNA-Expression und eine 2,0-fach und 2,7-fache RNA-Herunterregulation der cyclinabhängigen Kinase CDC2- und der cyclinabhängigen Phosphatase CDC25C im Vergleich zu den A2780-Tumoren zu detektieren. Eine differentielle Genexpression hinsichtlich des P53-Inhibitors MDM2 war in den A2780cis-Tumoren im Vergleich zu A2780-Tumoren jedoch nicht festzustellen. Die reduzierte Aktivierung der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung im Basalzustand der A2780cis-Tumoren wurde unter Carboplatintherapie in drei von fünf Tumoren zum Teil wieder aufgehoben. Im Gegensatz dazu zeigten die A2780-Tumoren unter Carboplatintherapie nur eine bis zu 1,4-fache RNA-Herunterregulation von ATM, CHEK1, CHEK2, CDC25C und CDC2 im Vergleich zu den vehikeltherapierten A2780-Tumoren. Bezüglich P53 und MDM2 war in den A2780-Tumoren unter Carboplatintherapie eine 1,2-fach und 1,7-fach höhere RNA-Expression als in den vehikeltherapierten Tumoren zu detektieren.

Des Weiteren sollte in diesem Zusammenhang der NF- κ B-Komplex als Gegenspieler und Überlebensfaktor in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung untersucht werden [229]. So war in den A2780cis-Tumoren unter Vehikeltherapie ein 2-fach, 2,6-fach und 1,2-fach höheres RNA-Level bezüglich der NF- κ B-Untereinheiten RELA, RELB und RELC als in den vehikeltherapierten A2780-Tumoren festzustellen. Auch die anderen NF- κ B-Untereinheiten NF- κ B1 und NF- κ B2 zeigten ein 1,6-fach und 1,9-fach höheres RNA-Level im Vergleich zu den vehikeltherapierten A2780-Tumoren. Unter Carboplatintherapie wiesen drei der fünf analysierten A2780cis-Tumoren eine leichte Herunterregulation der NF- κ B1-, NF- κ B2- sowie RELA-, RELB-, RELC-RNA-Expressionslevel auf. Diese verblieben jedoch im Vergleich zu den carboplatintherapierten A2780-Tumoren weiterhin auf einem erhöhten RNA-Expressionslevel. Im Gegensatz dazu konnte - außer bei RELC - in den A2780-Tumoren unter Carboplatintherapie eine leichte Hochregulation der RNA-Expression aller NF- κ B-Untereinheiten (1,2- bis 1,4-fach) im Vergleich zu der Vehikeltherapie festgestellt werden.

Somit ist abschließend festzuhalten, dass A2780cis-Tumoren im Basalzustand und unter Carboplatintherapie eine reduzierte Aktivierung der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung und eine erhöhte NF- κ B-abhängige Signaltransduktion aufweisen.

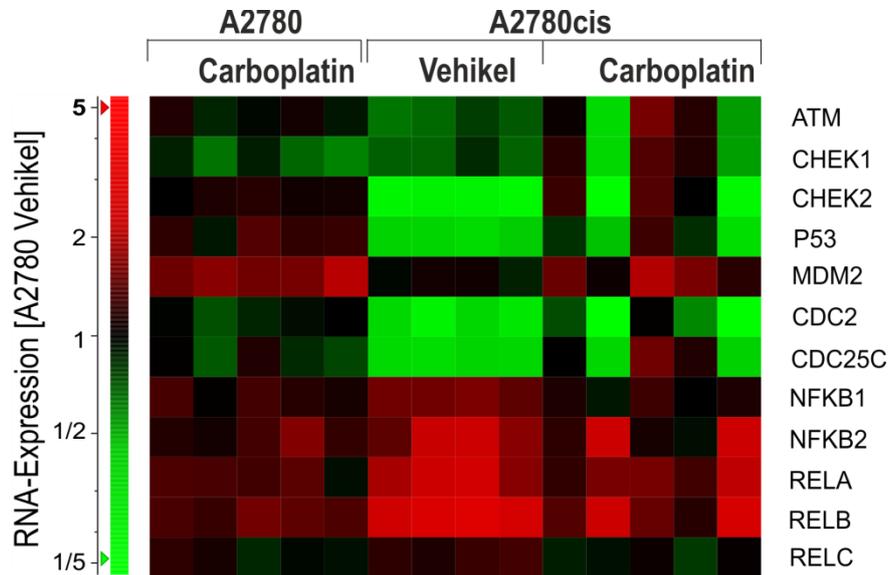


Abbildung 3.10. Humaner *Whole genome bead chip Array* (HT-12v3) von vehikel- und carboplatintherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren (n = 5 pro Gruppe). *Heatmap* Darstellung von differentiell exprimierten Genen ($p < 0.01$) zur zellulären Antwort auf DNA-Schädigung und des NF- κ B-Komplexes in carboplatintherapierten A2780-Tumoren sowie vehikel- als auch carboplatintherapierten A2780cis-Tumoren im Vergleich zu vehikeltherapierten A2780-Tumoren. Rote Felder bedeuten eine RNA-Hochregulation und grüne Felder eine Herunterregulation der RNA-Expression im Vergleich zu vehikeltherapierten A2780-Tumoren.

3.3.2. Expressionsanalyse carboplatininduzierter Gene im Prozess der Seneszenz

Platinverursachte DNA-Schäden können in gesunden Zellen als auch in Tumorzellen einen irreversiblen Zellzyklusarrest über den Prozess der Seneszenz hervorrufen. Bei Fehlregulation kann dieser tumorsuppressive Mechanismus jedoch in einer erhöhten Platinresistenz münden [230]. Für die Analyse einer möglichen Seneszenz in A2780 bzw. A2780cis-Tumoren wurden insgesamt 35 Gene ausgewählt, die unter den *Gene Ontology*-(GO)-Termini der replikativen Seneszenz (GO:0090399) und der zellulären Seneszenz (GO:0090398) zusammengefasst sind (Filter: *Homo sapiens*). Anhand der Daten des *Whole genome Bead Chip Arrays* konnte mittels *N-Way-ANOVA* für insgesamt 16 der 35 Gene eine differentielle Genexpression mit $p < 0,05$ und $FDR < 0,17$ (FDR , *False Discovery Rate*, „falsch-positive Rate“) in vehikel- und carboplatintherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren festgestellt werden. Werden diese 16 Gene auf der Basis einer 2-fach höheren Genexpression in den carboplatinbehandelten A2780-Tumoren und vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren im Vergleich zu vehikelbehandelten

A2780-Tumoren weiterselektiert, so konnten insgesamt sechs seneszenzabgeleitete Gene identifiziert werden (Abbildung 3.11.).

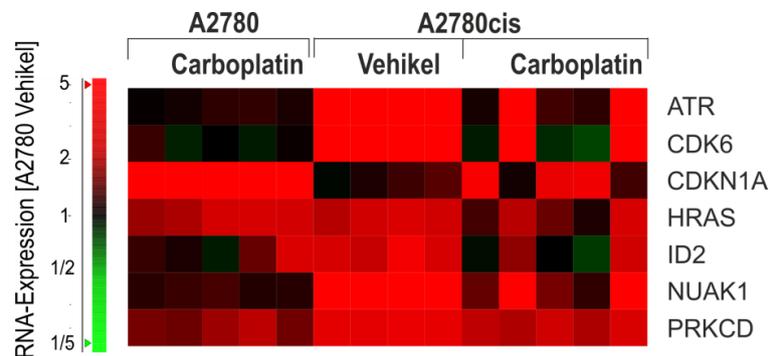


Abbildung 3.11. Humaner *Illumina Whole Genome Bead Chip Array* (HT-12v3) von vehikel- und carboplatintherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren (n = 5 pro Gruppe). *Heatmap*-Darstellung von differentiell exprimierten Genen ($p < 0.01$) in der Signaltransduktion der Seneszenz in carboplatintherapierten A2780-Tumoren sowie vehikel- als auch carboplatintherapierten A2780cis-Tumoren im Vergleich zu vehikeltherapierten A2780-Tumoren. Rote Felder bedeuten eine RNA-Hochregulation und grüne Felder eine Herunterregulation der RNA-Expression im Vergleich zu vehikeltherapierten A2780-Tumoren.

Hierbei handelte es sich um ATR, CDK6, CDKN1A, HRAS, ID2, NUAK1 und PRKCD. Vehikelbehandelte A2780cis-Tumoren wiesen bezüglich ATR-, CDK6, und NUAK1 eine besonders starke Hochregulation der RNA-Expression um jeweils das 6,7-fache, 8,2-fache und 7,2-fache im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren auf. Unter Carboplatintherapie wurde diese erhöhte RNA-Expression jedoch wieder auf das 2,7-fache, 2,0-fache bzw. das 3,2-fache im Vergleich zu den vehikeltherapierten A2780-Tumoren herunterreguliert. Unterstützend zu den Daten der P21-Proteinexpression (Kapitel 3.2.4.) konnte in den carboplatinbehandelten A2780-Tumoren außerdem eine 17,8-fache Erhöhung der RNA-Expression des P21-kodierenden Gens CDKN1A im Vergleich zu der Vehikeltherapie detektiert werden. Die carboplatinbehandelten A2780cis-Tumoren zeigten hingegen nur eine 2,4-fache Erhöhung der CDKN1A-RNA-Expression im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren. Somit ist festzustellen, dass eine tendenziell verstärkte seneszenzinduzierende Signaltransduktion im Basalzustand der A2780cis-Tumoren vorliegt, die jedoch unter Carboplatintherapie weitestgehend wieder aufgehoben wird.

3.3.3. Expressionsanalyse carboplatininduzierter Gene im Prozess der Apoptose

Neben einem fehlerhaften Zellzyklusarrest in der Seneszenz, kann außerdem eine nicht vorhandene bzw. fehlerhafte Induktion der Apoptose zu einer Resistenz gegenüber der

Platintherapie führen (Kapitel 1.3.) [64]. Für die Überprüfung einer möglichen Deregulation der Apoptoseinduktion in A2780cis wurde die differentielle Genexpression von proapoptotischen Genen in kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren anhand der Daten des *Whole Genome Bead Chip Arrays* analysiert. Hierbei wurden Gene (Filter: *Homo sapiens*) selektiert und analysiert, die dem GO-Begriff „Induktion der Apoptose“ (GO:0006917) zugeordnet sind.

Die Null-Hypothese, dass A2780- und A2780cis-Tumoren in ihrer differentiellen Genexpression übereinstimmen, konnte bei 23 von insgesamt 185 proapoptotischen Genen des GO-Terms GO:0006917 ($p < 0,001$) zunächst abgelehnt werden. Diese 23 Gene zeigten in den A2780cis-Tumoren eine starke Herunterregulation in der Vehikel- und Carboplatintherapie im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren (Abbildung 3.12.).

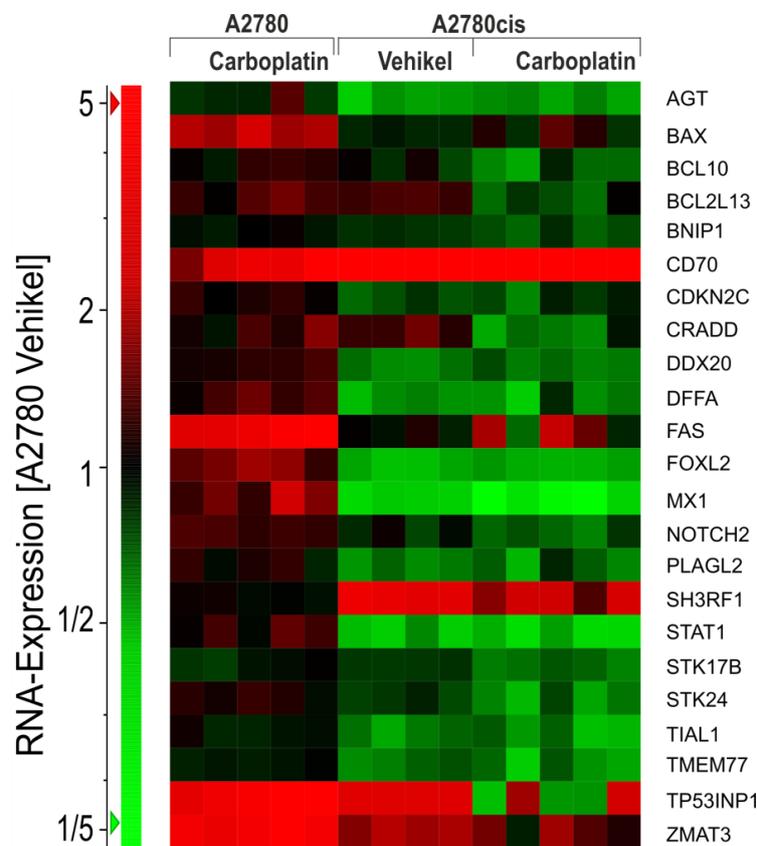


Abbildung 3.12. Humaner *Illumina Whole Genome Bead Chip Array* (HT-12v3) von vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren (n = 5 pro Gruppe). *Heatmap*-Darstellung von differentiell exprimierten Genen ($p < 0,01$) in der Induktion der Apoptose in carboplatintherapierten A2780-Tumoren sowie vehikel- als auch carboplatintherapierten A2780cis-Tumoren im Vergleich zu vehikeltherapierten A2780-Tumoren. Rote Felder bedeuten eine RNA-Hochregulation und grüne Felder eine Herunterregulation der RNA-Expression im Vergleich zu vehikeltherapierten A2780-Tumoren.

Im Gegensatz dazu wiesen A2780-Tumoren eine leicht bis starke Hochregulation der proapoptotischen Gene unter der Carboplatintherapie auf. In diesem Zusammenhang wurde vor allem eine erhöhte RNA-Expression des FAS-Gens (3,8-fach) in carboplatintherapierten A2780-

Tumoren im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren festgestellt. Die A2780cis-Tumoren beinhalteten hingegen unter der Carboplatintherapie nur eine leichte Hochregulation der FAS-RNA-Expression (1,2-fach) im Vergleich zu den vehikeltherapierten A2780cis-Tumoren. Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die A2780cis-Tumoren im Vergleich zu den A2780-Tumoren eine reduzierte Apoptoseinduktion unter Vehikel- und Carboplatintherapie aufweisen. Ausnahmen bildeten in dieser Analyse die RNA-Expressionsdaten der proapoptotischen Gene CD70, P53INP3, ZMAT3, SH3RF1 und P53INP1. Diese Gene zeigten jeweils eine 39,5-fach, 3,0-fach, 1,9-fach und 3,3-fach höhere RNA-Expression in den vehikeltherapierten A2780cis-Tumoren als in den vehikeltherapierten A2780-Tumoren. Unter Carboplatintherapie wurde diese basal erhöhte Expression der proapoptotischen Gene in den A2780cis-Tumoren jedoch zum Teil wieder aufgehoben.

3.3.4. Identifizierung potentiell „neuer“ resistenzvermittelnder Faktoren

Auf der Grundlage der zuvor ermittelten differentiellen Genexpression von Genen in verschiedenen Signalwegen der Platinzytotoxizität (Kapitel 3.3.1. - 3.3.3.), sollten nun potentiell „neue“ Resistenzfaktoren in den kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren identifiziert werden. Hierbei wurde – wie bereits im Kapitel 3.2.1. angedeutet - die Hypothese aufgestellt, dass Faktoren, die zu einer erworbenen Resistenz in A2780cis-Tumoren führen, bereits initial durch die Carboplatintherapie in sensitiven Tumoren differentiell exprimiert werden. Für die Analyse der erworbenen Resistenz und der initialen Antwort auf die Carboplatintherapie kam die statistische Methode des linearen Modells zur Anwendung (Kapitel 2.2.7.1). Anhand dieser statischen Methode ist es möglich, die Interaktion zweier unabhängiger experimenteller Einflussfaktoren zu berechnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion folgender experimenteller Einflussfaktoren analysiert:

1) *Erworbene Resistenz:*

Vergleich der Genexpression vehikeltherapierter A2780-Tumoren mit vehikeltherapierten A2780cis-Tumoren

2) *Initiale Antwort auf die Carboplatintherapie (intrinsische Resistenz):*

Vergleich der Genexpression von Vehikel- und Carboplatintherapie in A2780- und A2780cis-Tumoren

Somit werden Gene identifiziert, die sowohl initial in der Carboplatintherapie als auch in der erworbenen Resistenz differentiell exprimiert werden. Mithilfe des linearen Modells konnten insgesamt 74 Gene identifiziert werden ($p < 0,001$, $FDR < 0,1$), die in den vehikeltherapierten A2780cis-Tumoren und in den carboplatintherapierten A2780-Tumoren im Vergleich zu den vehikeltherapierten A2780-Tumoren differentiell exprimiert sind. Für eine weitere Analyse der 74 differentiell exprimierten Gene wurde eine sogenannte *Pathway enrichment analysis*

durchgeführt (Kapitel 2.2.6.2.). In Anlehnung an Kapitel 3.3.3. konnte festgestellt werden, dass die im linearen Modell identifizierten Gene hauptsächlich im Prozess der Apoptose involviert sind (definiert nach dem GO-Begriff GO:0006915).

Um die spätere Überprüfung eines potentiell neuen „Resistenzfaktors“ unter diesen 74 differentiell exprimierten Genen zu ermöglichen (*Knockdown*-Studien), wurden Gene selektiert, die unter Carboplatintherapie (intrinsische Resistenz) eine mehr als 2-fach höhere RNA-Expression in den A2780-Tumoren und eine mehr als 2-fach höhere RNA-Expression in den vehikeltherapierten A2780cis-Tumoren (erworbene Resistenz) aufweisen. Insgesamt konnten fünf der 74 differentiell exprimierten Gene selektiert werden: GDF15 (*growth differentiation factor 15*), SULF2 (*sulfatase 2*), P4HA2 (*prolyl 4-hydroxylase, α polypeptide II*), DRAM1 (*DNA-damage regulated autophagy modulator 1*) und LMNA (*lamin A/C*) (Abbildung 3.13.).

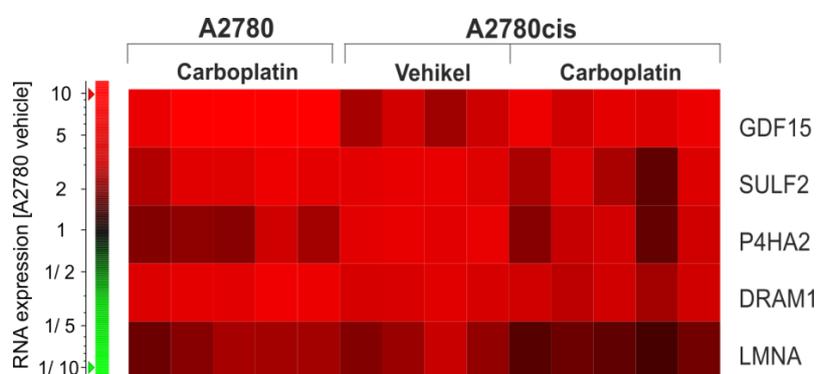


Abbildung 3.13. Differentielle RNA-Expression potentiell neuer resistenzabgeleiteter Gene die mithilfe des Humanen *Illumina Whole Genome Bead Chip Arrays* (HT-v3) und des linearen Modells identifiziert wurden ($p < 0.001$) und mehr als 2-fach in carboplatintherapierten A2780-Tumoren und in vehikeltherapierten A2780cis-Tumoren im Vergleich zu vehikeltherapierten A2780-Tumoren hochreguliert sind. Rote Felder bedeuten eine RNA-Hochregulation und grüne Felder eine Herunterregulation der RNA-Expression im Vergleich zu vehikeltherapierten A2780-Tumoren.

3.3.5. Evaluierung potentiell „neuer“ resistenzvermittelnder Faktoren

Um die im Microarray identifizierten potentiell resistenzabgeleiteten Gene hinsichtlich ihrer Expression in den A2780- und A2780cis *in vitro* und *in vivo* zu validieren, wurde die RNA-Expression mittels quantitativen *Real-Time PCR* und die Proteinexpression mittels *Westernblot*- oder ELISA-Methode überprüft. Die Resultate sind in den folgenden Kapiteln wiedergegeben.

3.3.5.1. Lamin A/C

Lamin A/C ist ein integrales Protein der Zellkernmembran und spielt eine wichtige Rolle in der geordneten Polarisierung der Zellstrukturen während der Mitose [231]. Aufgrund der Vorselektierung der im *Microarray* identifizierten resistenzabgeleiteten Gene (Kapitel 3.3.4.),

konnte erwartungsgemäß in den A2780-Tumoren unter Carboplatintherapie eine mehr als 2-fache RNA-Hochregulation (6,1-fach) von LMNA im Vergleich zu den vehikeltherapierten A2780-Tumoren mittels qRT-PCR festgestellt werden (Abbildung 3.14.).

Des Weiteren war in den vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren ein 2,0-fach höheres LMNA-RNA-Level im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren zu beobachten. Bezüglich der Proteinexpression, war in den A2780-Tumoren im *Westernblot* jedoch nur eine geringfügige Hochregulation der LMNA-Expression nach Carboplatintherapie im Vergleich zu den vehikeltherapierten A2780-Tumoren zu detektieren. In den A2780cis-Tumoren blieb die LMNA-Proteinexpression unter Vehikel- und Carboplatintherapie sogar unverändert.

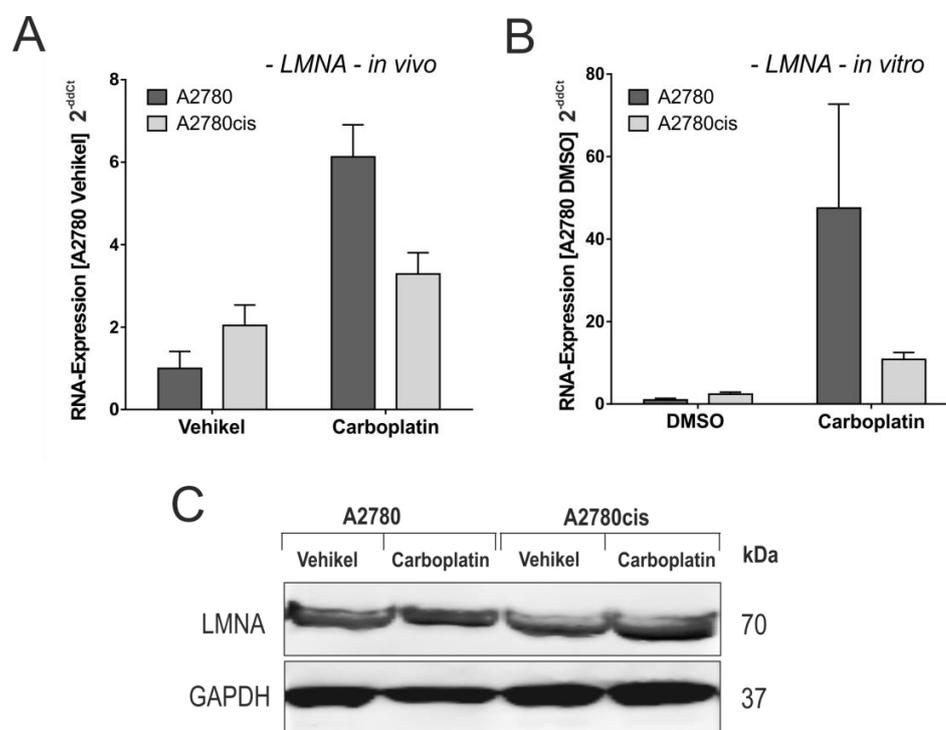


Abbildung 3.14. RNA und Proteinexpression von LMNA in A2780 und A2780cis. (A) RNA-Expression von LMNA in vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren normalisiert zu vehikeltherapierten A2780-Tumoren (n = 5 pro Gruppe). (B) LMNA-RNA-Expression in A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h Inkubation mit DMSO oder Carboplatin *in vitro*. (C) *Westernblot* von LMNA in vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren (Tumoren n = 3, „gepoolt“).

Für die Analyse der LMNA-Expression *in vitro*, wurden die A2780 und A2780cis-Zellen mit 3,76 μM Carboplatin (IC_{50} -Konzentration in A2780) behandelt und die LMNA-RNA-Expression nach 72 h Inkubation mittels qRT-PCR überprüft. Bezüglich der A2780-Zellen konnte im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle eine 47,5-fache Hochregulation der LMNA-RNA-Expression unter Carboplatintherapie beobachtet werden. Des Weiteren zeigten DMSO-behandelte A2780cis-Zellen eine 2,3-fache LMNA-RNA-Hochregulation im Vergleich zu den DMSO-

behandelten A2780 Zellen. In Anlehnung an die *in-vivo*-Daten konnte in A2780cis unter Carboplatintherapie nur eine geringfügige Hochregulation der LMNA-RNA-Expression (4,7-fach) im Vergleich zu den DMSO-behandelten A2780-Zellen festgestellt werden.

3.3.5.2. Prolyl-4-hydroxylase, alpha polypeptide II

Prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II ist ein Enzym welches u. a. in der Modifikation des Zytoskeletts involviert ist [232]. In Anlehnung an die *Microarray*-Daten und der anschließenden Selektierung der Gene, konnte mittels qRT-PCR eine 3,3-fach höhere P4HA2-RNA-Expression in den A2780-Tumoren unter Carboplatintherapie im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren identifiziert werden (Abbildung 3.15.). Werden nun die vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren betrachtet, so zeichnete sich eine etwas geringere Hochregulation (1,5-fach) der P4HA2-RNA-Expression im Vergleich zum *Microarray* ab. Dieses niedrigere RNA-Level wurde unter Carboplatintherapie ebenfalls nur geringfügig (1,9-fach) im Vergleich zu vehikelbehandelten A2780-Tumoren angehoben.

Die P4HA2-Proteinexpression wurde schließlich mithilfe eines P4HA2-ELISA untersucht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den carboplatin- und vehikelbehandelten A2780- und A2780cis-Tumoren war allerdings nicht zu identifizieren.

Wurde außerdem die P4HA2-RNA-Expression in A2780 nach 72 h Carboplatinbehandlung *in vitro* überprüft, so stellte sich eine carboplatininduzierte Herunterregulation (1,8-fach) der P4HA2-RNA im Vergleich zu der DMSO-Behandlung heraus. Auch die A2780cis-Zellen wiesen unter der Carboplatintherapie eine 1,8-fach niedrigere P4HA2-RNA-Expression als die DMSO-behandelten A2780-Zellen auf.

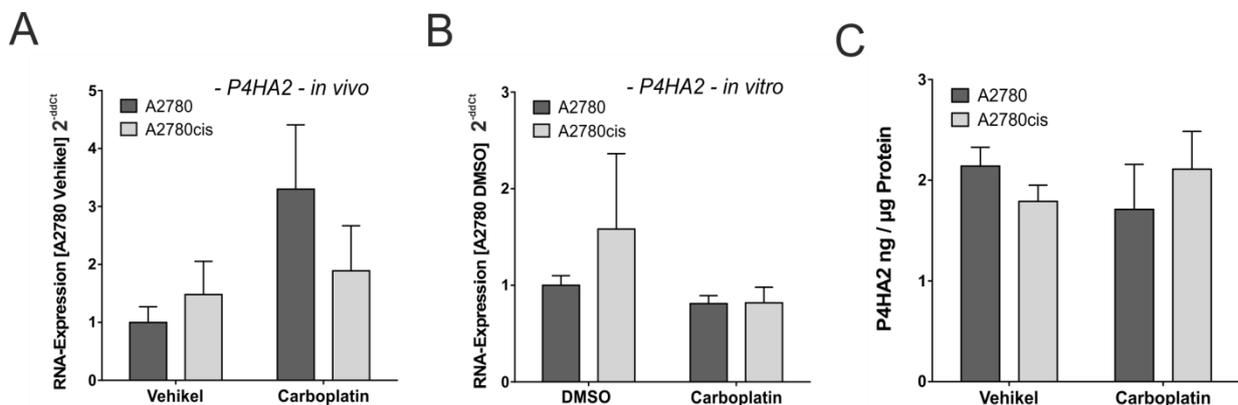


Abbildung 3.15. RNA und Proteinexpression von P4HA2 in A2780 und A2780cis. (A) RNA-Expression von P4HA2 in vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren normalisiert zu vehikelbehandelten A2780-Tumoren (n = 5 pro Gruppe). (B) P4HA2-RNA-Expression in A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h Inkubation mit DMSO oder Carboplatin *in vitro*. (C) P4HA2-ELISA von vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren (Tumoren n = 3, „gepoolt“).

3.3.5.3. DNA-damage regulated autophagy modulator 1

DNA-damage regulated autophagy modulator 1 ist ein lysosomales Membranprotein, welches unter Wachstumsmangel den tumorsuppressiven Mechanismus der Autophagie auslösen kann [233]. In Tumorzellen kann dieser Prozess jedoch für ein verlängertes Überleben unter der Platintherapie „umfunktioniert“ werden. In Anlehnung an die *Microarray*-Daten konnte in den A2780-Tumoren unter Carboplatintherapie zunächst eine 7,8-fache und in den vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren eine 2,4-fache höhere DRAM1-RNA-Expression im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren gemessen werden (Abbildung 3.16).

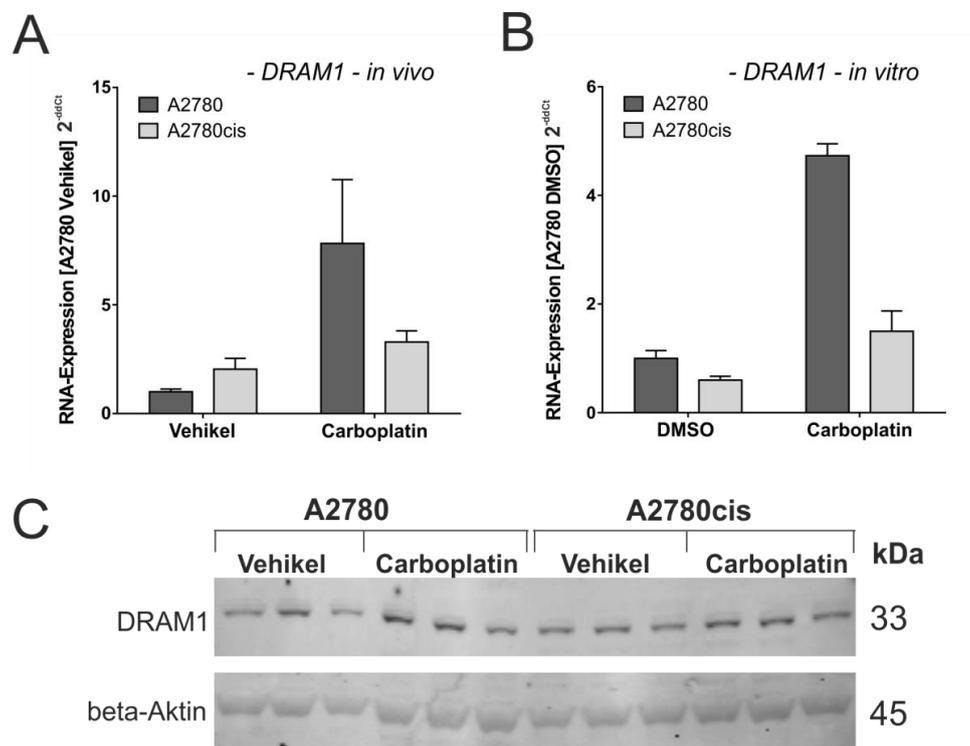


Abbildung 3.16. RNA und Proteinexpression von DRAM1 in A2780 und A2780cis. (A) RNA-Expression von DRAM1 in vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren normalisiert zu vehikelbehandelten A2780-Tumoren (n = 5 pro Gruppe). (B) DRAM1-RNA-Expression in A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h Inkubation mit DMSO oder Carboplatin *in vitro*. (C) *Westernblot* von DRAM1 in vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren (Tumoren n = 3).

Auch die carboplatininduzierte Hochregulation der DRAM1-RNA in A2780cis-Tumoren war im Vergleich zu vehikelbehandelten A2780-Tumoren erwartungsgemäß minimal (3,3-fach). Die Überprüfung der DRAM1-Proteinexpression mittels *Westernblot*-Analyse konnte jedoch keinen Unterschied zwischen vehikel- oder carboplatintherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren detektieren.

Eine Überprüfung der DRAM1-RNA-Expression in A2780 *in vitro* zeigte außerdem eine 4,7-fach höhere Expression der DRAM1-RNA im Vergleich zu der DMSO-Behandlung auf. Im Gegensatz

dazu war in den A2780cis-Zellen im Vergleich zu der DMSO-Behandlung der A2780-Zellen nur eine 0,4-fache Herunterunterregulation der DRAM1-RNA-Expression festzustellen.

3.3.5.4. Sulfatase 2

Sulfatase 2 ist ein in den Extrazellularraum sezerniertes Enzym, welches unter anderem im Prozess der Mitose, Migration und Invasion von Zellen involviert ist [234]. Die zuvor ermittelte differentielle SULF2-RNA-Expression im *Microarray* konnte mithilfe der qRT-PCR bestätigt werden (Abbildung 3.17.). A2780-Tumoren zeigten dabei unter der Carboplatintherapie eine stark erhöhte SULF2-RNA-Expression (47,7-fach) gegenüber der Vehikelbehandlung. Außerdem war in den A2780cis-Tumoren im Basalzustand (Vehikeltherapie) im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren eine 34,9-fache Erhöhung der RNA-Expression festzustellen. Diese wird jedoch unter der Carboplatintherapie auf das 15,5-fache der vehikelbehandelten A2780-Tumoren reduziert.

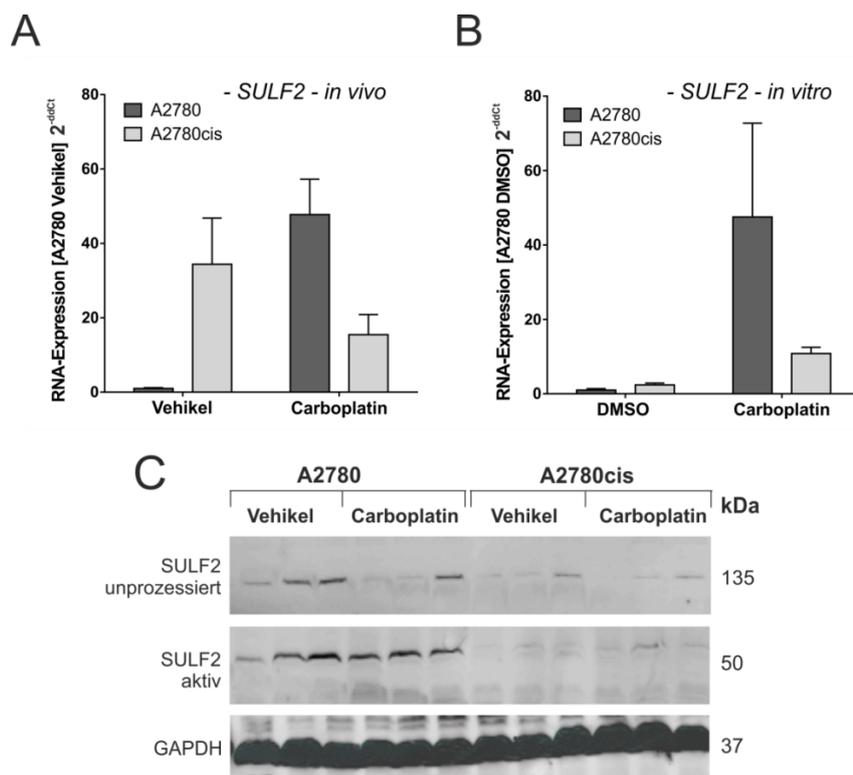


Abbildung 3.17. RNA und Proteinexpression von SULF2 in A2780 und A2780cis. (A) RNA-Expression von SULF2 in vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren normalisiert zu vehikeltherapierten A2780-Tumoren (n = 5 pro Gruppe). (B) SULF2-RNA-Expression in A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h Inkubation mit DMSO oder Carboplatin *in vitro*. (C) *Westernblot* von SULF2 in vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren (Tumoren n = 3).

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen RNA-Daten, konnte auf Proteinebene in den vehikel- und carboplatinbehandelten A2780cis-Tumoren eine starke Herunterregulation des aktiven SULF2-Enzyms (50 kDa) im Vergleich zu den vehikel- sowie carboplatintherapierten A2780-Tumoren festgestellt werden. Dies spiegelte sich tendenziell auch auf der Ebene des unprozessierten Enzyms SULF2 (125 kDa) wieder. Hierbei wurde eine schwache Proteinexpression des unprozessierten Enzyms in den vehikel- als auch carboplatinbehandelten A2780-Tumoren detektiert, jedoch nicht in den vehikel- bzw. carboplatinbehandelten A2780cis-Tumoren.

Die Analyse der SULF2-RNA-Expression *in vitro* zeigte in den A2780-Zellen, in Anlehnung an die *Microarray*- sowie qRT-PCR-Daten, eine stark erhöhte (47,5-fach) SULF2-RNA-Expression unter Carboplatintherapie. Diese starke Hochregulation konnte in den DMSO-behandelten A2780cis (2,3-fach) im Vergleich zu DMSO-behandelten A2780-Zellen jedoch nicht beobachtet werden.

3.3.5.5. Growth differentiation factor 15

Zur Evaluierung der im *Microarray* identifizierten Regulation von GDF15 *in vivo*, wurde ebenfalls die RNA-Expression mittels qRT-PCR und die Proteinexpression mittels GDF15-ELISA bestimmt. Hierbei wurde neben der Ermittlung der GDF15-Expression in den Tumoren selbst, auch das GDF15-Proteinlevel im Blutplasma ermittelt.

Die qRT-PCR der A2780-Tumoren zeigte eine starke GDF15-RNA-Hochregulation (25,6-fach) unter Carboplatintherapie im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren. Außerdem war in den A2780cis-Tumoren ein 2,7-fach höheres RNA-Level als in den A2780-Tumoren zu detektieren. Stellte man hingegen die Carboplatintherapie und die Vehikelbehandlung in den A2780cis-Tumoren gegenüber, so konnte unter Carboplatintherapie nur eine schwache GDF15-RNA-Hochregulation (1,3-fach) detektiert werden (Abbildung 3.18.).

Die im *Microarray* sowie in der qRT-PCR ermittelte carboplatininduzierte Erhöhung der GDF15-Expression, konnte auch auf der Ebene der Proteinexpression in den kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren sowie im zugehörigen Blutplasma bestätigt werden. So war in den vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren eine 5,4-fache höhere GDF15-Proteinexpression im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren festzustellen. Zeigten A2780cis-Tumoren nur eine schwache GDF15-Hochregulation (2,7-fach) unter Carboplatintherapie, so konnte in den A2780-Tumoren im Vergleich zu der Vehikelbehandlung eine rund 20-fach höhere GDF15-Proteinexpression festgestellt werden. Im Blutplasma der vehikelbehandelten A2780-tragenden Tiere war eine GDF15-Konzentration von 0,21 pg/ml pro mm² Tumorfläche messbar, die in A2780cis-tragenden Tieren 4,6-fach höher ausfiel (0,97 pg/ml pro mm² Tumorfläche). Die niedrige GDF15-Konzentration im Plasma der A2780-tragenden Tiere wurde jedoch unter Carboplatintherapie auf 2,84 pg/ml pro mm² Tumorfläche stark angehoben (13,7-fach). In den

Tieren mit subkutanen A2780cis-Tumoren stieg die GDF15-Plasma-Konzentration trotz des höheren Basalspiegels nur auf 2,2 pg/ml pro mm² Tumorphäche an (2,2-fach).

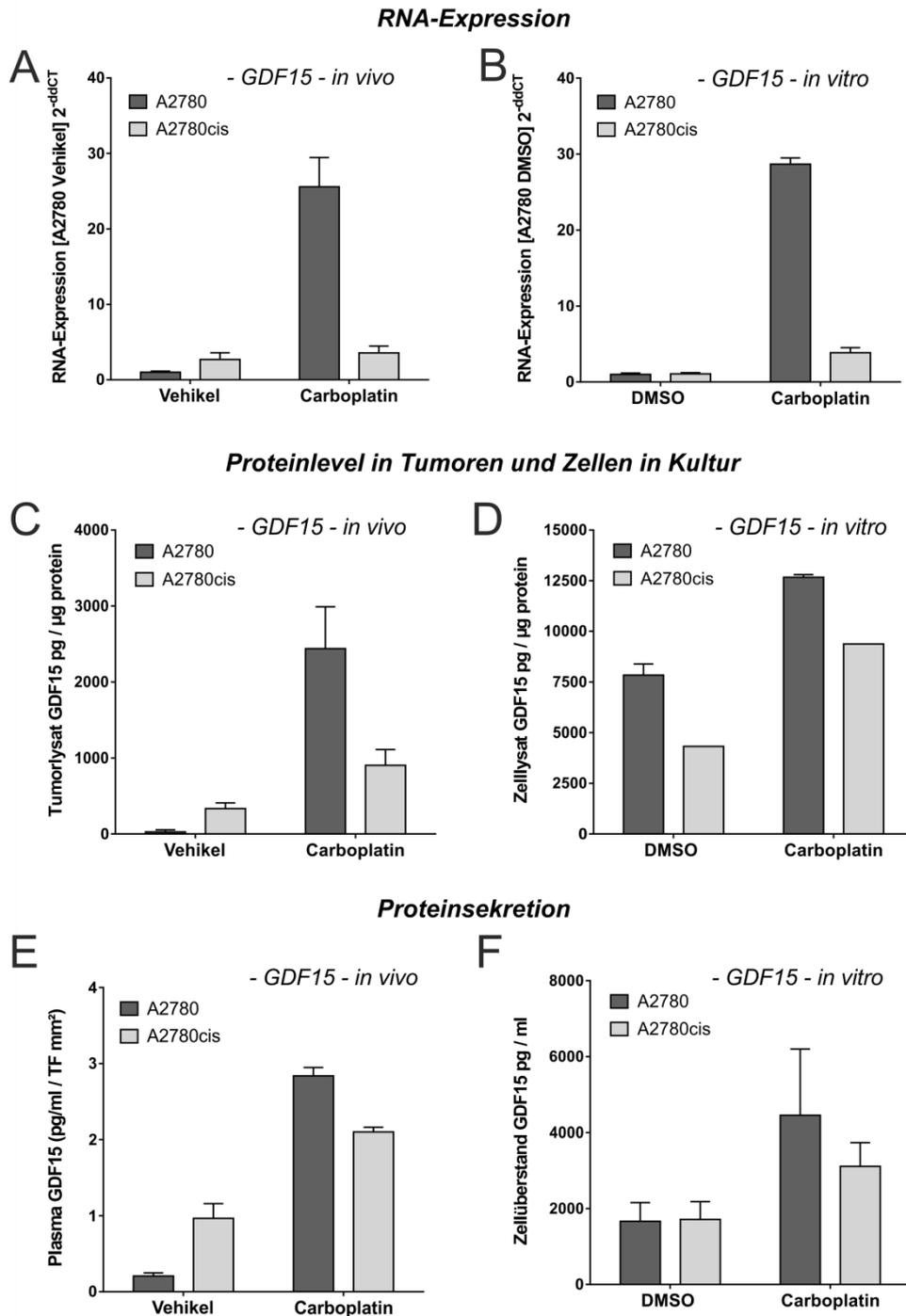


Abbildung 3.18. RNA und Proteinexpression von GDF15 in A2780 und A2780cis *in vitro* und *in vivo*. (A) RNA-Expression von GDF15 in vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren normalisiert zu vehikeltherapierten A2780-Tumoren (n = 5 pro Gruppe). (B) RNA-Expression von GDF15 in A2780 und A2780cis-Zellen nach 72 h Inkubation mit DMSO oder Carboplatin *in vitro*. (C) GDF15-Proteinexpression von vehikel- und carboplatinkurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren. (D) GDF15-Proteinexpression in A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h Inkubation mit DMSO oder Carboplatin *in vitro*. (E) GDF15-Level im Plasma von A2780- und A2780cis-tumortragenden *SCID*-Mäusen nach Vehikel- und Carboplatinkurzzeittherapie. (F) GDF15-Level im Mediumüberstand von A2780- und A2780cis-Zellen nach 72 h Therapie mittels DMSO oder Carboplatin *in vitro*.

Für die Analyse der GDF15-RNA-Expression und GDF15-Proteinsekretion *in vitro* wurden jeweils A2780- und A2780cis-Zellen für 72 h mit DMSO oder mit Carboplatin (IC₅₀-Konzentration in A2780) therapiert. Die GDF15-RNA-Expression wurde mittels qRT-PCR und die GDF15-Proteinkonzentration mittels GDF15-ELISA bestimmt. Wie auch *in vivo*, konnte im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle unter Carboplatintherapie mittels qRT-PCR eine starke GDF15-RNA-Hochregulation in den A2780-Zellen (28,7-fach), jedoch nicht in den A2780cis-Zellen (3,8-fach) festgestellt werden. Unterstützend dazu, wiesen A2780-Zellen unter der Carboplatintherapie eine 1,6-fach höhere GDF15-Proteinexpression und eine 2,3-fach höhere GDF15-Sekretion in das Zellkulturmedium als jeweils die DMSO-behandelten A2780-Zellen auf. Die carboplatinbehandelten A2780cis-Zellen zeigten hingegen eine 2,1-fach erhöhte, carboplatininduzierte GDF15-Proteinexpression, wobei die GDF15-Sekretion (1,7-fach) in das Zellkulturmedium im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen etwas geringer ausfiel. Im Gegensatz zu den *in vivo* Daten konnte zwischen den DMSO-behandelten A2780-Zellen und A2780cis-Zellen keine differentielle RNA- und Protein-Expression festgestellt werden.

3.3.5.6. Zusammenfassung der differentiellen Expression potentiell resistenzabgeleiteter Gene

Zusammenfassend konnte die differentielle Genexpression der fünf selektierten potentiell resistenzabgeleiteten Gene im Humanen *Illumina Whole Genome Bead Chip Array* (HT-12v3) anhand der qRT-PCR validiert werden. Nachfolgende Analysen der Proteinexpression der untersuchten Faktoren zeigten jedoch zum Teil nicht mit der RNA übereinstimmende Regulationen. Dies ist eventuell auf verschiedene posttranskriptionale und prosttranslationalen Mechanismen zurückzuführen (Kapitel 4.5.). Als besonders interessanter Faktor zeigte GDF15 hingegen eine starke Übereinstimmung der *Microarray*, qRT-PCR und Proteindaten. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion von GDF15 als potentieller Faktor und Marker in der Platinresistenz weiter untersucht.

3.4. Basal erhöhte RNA- und Proteinexpression von GDF15 in A2780cis-Tumoren unter Carboplatinlangzeittherapie

Nach der Feststellung eines 1.) basal erhöhten Levels an GDF15 in der platinresistenten Zelllinie A2780cis *in vivo* und dessen 2.) nur geringen carboplatininduzierten Hochregulation in der Kurzzeittherapie im Vergleich zu A2780, sollte als nächstes die GDF15-Regulation unter Carboplatinlangzeittherapie überprüft werden. Dazu wurden A2780- und A2780cis-Zellen subkutan in *SCID*-Mäuse inokuliert und die Tiere ab einer Tumorgröße von 20 mm² bis 150 mm² alle vier Tage intravenös mit NaCl 0,9 % (Vehikel) oder 50 mg/kg Carboplatin in NaCl 0,9 %

behandelt. Für die Bestimmung des GDF15-Levels im Blutplasma während der Tumorprogression, wurde den tumortragenden Mäusen retrobulbär Blut in definierten Abständen entnommen und mittels ELISA bestimmt (Abbildung 3.19.)

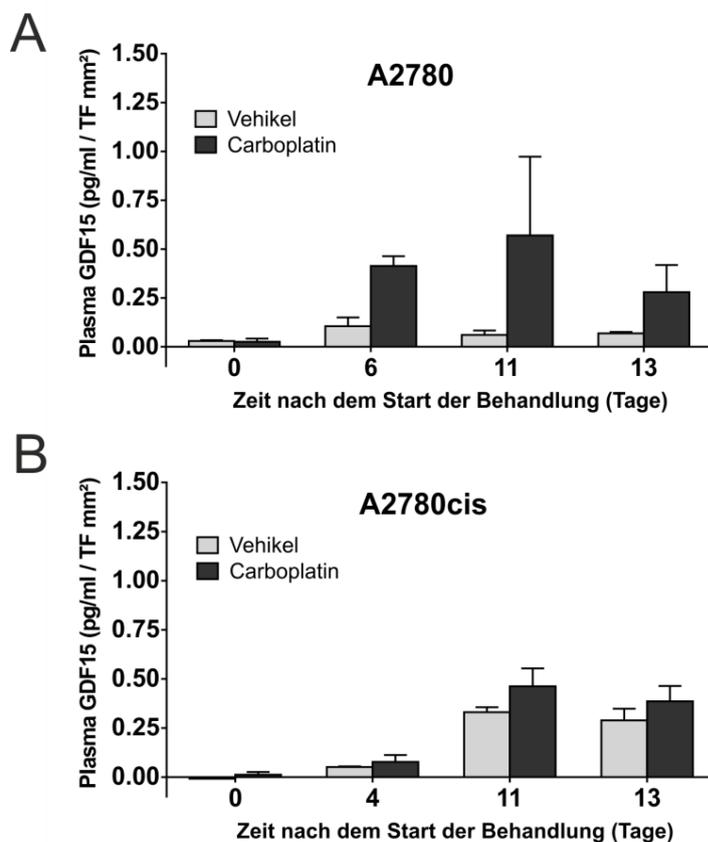


Abbildung 3.19. GDF15-Sekretion in das Blutplasma von A2780 und A2780cis-tumortragenden SCID-Mäusen in der Carboplatinlangzeittherapie (50 mg/kg Q4D) (A) GDF15-Plasma-Level von vehikel- und carboplatintherapierten A2780-tragenden SCID-Mäusen zu Beginn (0 Tage) und nach 6, 11 und 13 Tagen der Carboplatintherapie. (B) GDF15-Plasma-Level von vehikel- und carboplatintherapierten A2780cis-tragenden SCID-Mäusen zu Beginn (0 Tage) und nach 4, 11 und 13 Tagen der Carboplatintherapie.

Entgegen der Erwartung konnte am Tag 0 der Behandlung kein GDF15 im Blutplasma von A2780cis-tragenden Tieren detektiert werden, wohingegen A2780-tragende Tiere bereits eine minimale GDF15-Ausschüttung mit 0,029 pg/ml pro mm² Tumorfläche aufwiesen. Nach 4 Tagen der Vehikeltherapie stieg die GDF15-Plasma-Konzentration der A2780cis-tragenden Tiere mit 0,051 pg/ml GDF15 pro mm² Tumorfläche jedoch auf ein ähnliches GDF15-Niveau wie das der A2780-tragenden Tieren nach 6 Tagen Tumorwachstum an (0,078 pg/ml GDF15 pro mm²). Dieses war jedoch weiterhin 1,5-fach niedriger als das GDF15-Plasma-Level der vehikelbehandelten A2780-tragenden Tiere. Bei einem fortgeschrittenem Tumorwachstum ab Tag 11 kehrte sich dieses Verhältnis um: Hierbei zeigten die vehikelbehandelten A2780cis-tragenden Tiere höhere GDF15-Plasmakonzentrationen mit Werten von 0,262 bis 0,330 pg/ml GDF15 pro mm² Tumorfläche im Blutplasma als vehikelbehandelte A2780-tragende Tiere. Die

vehikelbehandelten A2780-tragenden Tiere erreichten die höchste GDF15-Konzentration bereits am Tag 6 der Vehikeltherapie (0,105 pg/ml pro mm² Tumorfläche). Anschließend sanken die GDF15-Level im Blutplasma der A2780-tragenden Tiere auf ein stabiles Niveau mit 0,06 (Tag 11) bis 0,068 pg/ml (Tag 13) GDF15 pro mm² Tumorfläche.

In Anlehnung an die Kurzzeittherapie wiesen A2780-tragende Tiere unter Carboplatintherapie im Vergleich zu vehikelbehandelten A2780-tragenden Tieren außerdem eine starke Hochregulation der GDF15-Plasma-Konzentration von Tag 0 auf Tag 6 (3,9-fach) und Tag 11 (9,5-fach) der Therapie auf. Am Tag 13 der Carboplatintherapie fiel die GDF15-Konzentration ab, wies jedoch weiterhin eine 4,1-fache carboplatininduzierte Hochregulation im Vergleich zu den vehikeltherapierten A2780-tragenden Tieren auf. Dagegen konnte in A2780cis-tragenden Tieren nur eine konstant niedrige Hochregulation (1,2 bis 1,6-fach) der GDF15-Konzentrationen im Blutplasma detektiert werden. Somit ist festzuhalten, dass im Laufe der Tumorprogression ein höheres Basallevel an GDF15 in den A2780cis-tragenden Tieren zu detektieren war und dieses unter Carboplatintherapie kaum verändert wurde.

3.5. Charakterisierung von GDF15 in malignen Ovarialzelllinien und primären Ovarialkarzinomgeweben

Um auszuschließen, dass die beobachtete GDF15-Regulation ein zelltypspezifischer Effekt der A2780- und A2780cis-Zellen ist, wurde die GDF15-Sekretion auch in anderen malignen Ovarialzelllinien analysiert. Zusätzlich sollte die Prädiktivität eines basal erhöhten GDF15-Levels anhand primär patientenabgeleiteter Tumorgewebe aus Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom untersucht werden.

3.5.1. Carboplatininduzierte GDF15-Proteinexpression und Sekretion in PA-1-Zelllinien *in vitro*

Nach der Charakterisierung der differentiellen GDF15-Expression in den A2780- und A2780cis-Zellen *in vitro* und *in vivo*, sollte nun die GDF15-Regulation in anderen malignen Ovarialkarzinomzellen analysiert werden.

Dazu wurde die differentielle RNA- und Proteinexpression von GDF15 in der klarzelligen Ovarialkarzinomzelllinie ES-2, in der nicht-epithelialen Ovarzelllinie PA-1 (Teratom) und in der malignen multiresistenten Ovarialzelllinie NCI-ADR-RES unter Carboplatintherapie *in vitro* analysiert (Abbildung 3.20.). Hierfür wurde zunächst eine IC₅₀-Bestimmung von Carboplatin in den PA-1, ES-2 und NCI-ADR-RES-Zellen durchgeführt. Die IC₅₀-Werte lagen für PA-1 bei 2,7 x 10⁻⁶ M und für ES-2 bei 1,6 x 10⁻⁵ M Carboplatin. NCI-ADR-RES kann aufgrund des hohen IC₅₀-Wertes von 6 x 10⁻⁴ M Carboplatin als carboplatin-insensitiv eingestuft werden. Anschließend

erfolgte die Analyse der Proteinexpression und Sekretion von GDF15 in diesen drei Zelllinien nach 72 h Therapie mit jeweils der zuvor ermittelten IC_{50} -Konzentration von Carboplatin.

Nach der Carboplatintherapie konnte in PA-1-Zellen eine hohe GDF15-Proteinexpression (3140,6 pg/ml) detektiert werden, wobei DMSO-behandelte Zellen nur eine sehr geringe GDF15-Proteinexpression aufwiesen. Bezüglich der GDF15-Sekretion konnte eine ähnliche carboplatininduzierte Hochregulation des Proteinlevels festgestellt werden: So war im Zellkulturmedium von carboplatinbehandelten PA-1-Zellen (4745,6 pg/ml GDF15) eine 5,9-fach höhere GDF15-Konzentration als in den DMSO-behandelten PA-1-Zellen (809,9 pg/ml) festzustellen. In den ES-2- und NCI-ADR-RES-Zellen konnte hingegen weder im Zellysate noch im Zellüberstand nach DMSO- oder Carboplatinbehandlung eine messbare GDF15-Konzentration *in vitro* detektiert werden. Fazit ist somit, dass nicht alle malignen Ovarialzelllinien, die auf Carboplatin ansprechen, eine GDF15-Expression aufweisen. Falls jedoch eine GDF15-Sekretion im Basalzustand detektierbar ist, so kann eine carboplatinabhängige GDF15-Hochregulation beobachtet werden.

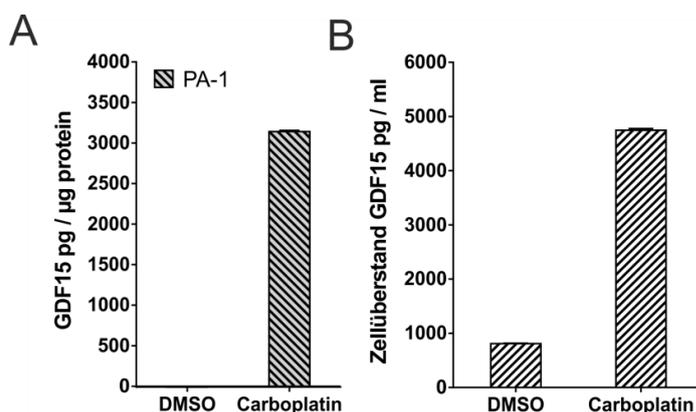


Abbildung 3.20. GDF15 in PA-1-Zellen nach 72 h DMSO bzw. Carboplatinbehandlung *in vitro* (A) GDF15-Proteinexpression in PA-1-Zellen (B) GDF15-Level (Sekretion) im Zellkulturüberstand der PA-1-Zellen.

3.5.2. Erhöhte GDF15-Proteinexpression in primären Ovarialkarzinomgeweben

Da in den A2780cis-Tumoren ab einer bestimmten Tumorgröße eine konstant höhere GDF15-Expression als in den A2780-Tumoren festgestellt wurde, sollte als nächstes überprüft werden, ob generell ein höheres GDF15-Level vor der Chemotherapie prädiktiv für die Entwicklung einer Platinresistenz in Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom ist. Dazu wurde die GDF15-Expression in unbehandelten, primären Ovarialkarzinomgeweben (FIGO IIIC, serös) analysiert. Dieses primäre Ovarialkarzinomgewebe wurde während der chirurgischen Tumorentnahme (zytoreduktive Therapie) entnommen und je nach Sensitivität der Patientinnen gegenüber der nachfolgenden Chemotherapie aus Carboplatin und Paclitaxel retrospektiv als sensitiv, resistent oder intermediär klassifiziert (Kapitel 2.1.8). Für den Vergleich der GDF15-Expression diente

gesundes Ovargewebe. Die GDF15-Konzentration in diesen primären Geweben wurde mithilfe des GDF15-ELISA (Kapitel 2.2.4.6.) bestimmt.

Zunächst konnte im gesunden Ovargewebe keine GDF15-Proteinexpression nachgewiesen werden (Abbildung 3.21.). Außerdem zeigte das als sensitiv klassifizierte Tumorgewebe im Mittel das höchste GDF15-Level mit 397,2 pg/ml GDF15, gefolgt von dem als intermediär eingestuften Tumorgewebe mit 82,7 pg/ml GDF15. Die als resistent eingestuften Tumoren zeigten keine messbare GDF15-Konzentration. Da nur wenig Tumormaterial zur Verfügung stand und die Proteinexpression insgesamt sehr heterogen ausfiel, sind die Werte jedoch nur als Tendenzen einzuordnen.

Somit lässt sich feststellen, dass die analysierten Ovarialkarzinomgewebe im fortgeschrittenem Stadium (IIIC) im Durchschnitt zwar eine erhöhte GDF15-Expression aufweisen, die jedoch nicht als prädiktiv hinsichtlich des Ansprechens auf Chemotherapie einzustufen ist.

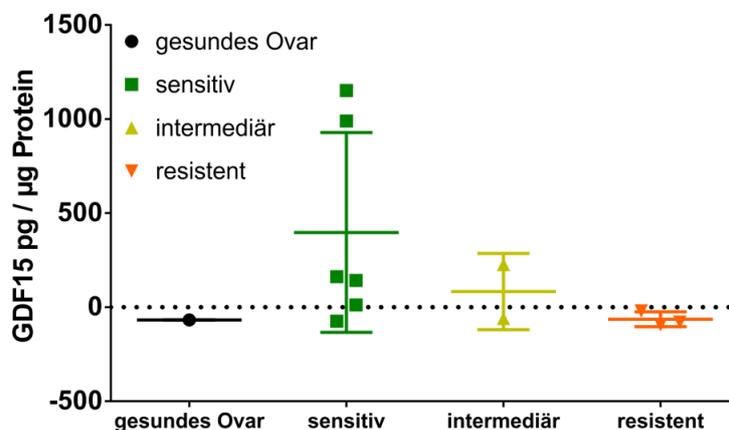


Abbildung 3.21. Proteinexpression von GDF15 in primären Ovarialkarzinomgeweben (OvCa) retrospektiv klassifiziert nach dem Ansprechen der Patientinnen auf die Carboplatintherapie in Kombination mit Paclitaxel.

Ovar n = 1; sensitives OvCa n = 6; intermediäres OvCa n = 2; resistentes OvCa n = 3.

3.6. Funktionelle Charakterisierung von GDF15 in A2780cis *in vitro*

Die vorangegangenen Analysen zeigten, dass es sich bei GDF15 um einen carboplatininduzierten Faktor handelt und eine erhöhte GDF15-Expression mit dem platinresistenten Phänotyp A2780cis korreliert. Um einen kausalen Zusammenhang zwischen einer erhöhten GDF15-Expression und der Platinresistenz der A2780cis-Zellen zu überprüfen, wurde eine siRNA-vermittelte Herunterregulation (*Knockdown*) von GDF15 *in vitro* und ein shRNA-vermittelter GDF15-*Knockdown in vitro* und *in vivo* durchgeführt. Im folgenden Kapitel 3.6.1. wird zunächst der Einfluss des siRNA-GDF15-*Knockdowns* auf die Genexpression der im linearen Modell identifizierten Gene (DRAM1, SULF2) beschrieben. Die Resultate zum shRNA-vermittelten GDF15-*Knockdown* werden im Kapitel 3.8. wiedergegeben.

3.6.1. Einfluss der siRNA-vermittelten GDF15-RNA-Herunterregulation auf die Expression von SULF1 und DRAM1

Für die siRNA-vermittelte Herunterregulation (*Knockdown*) der GDF15-RNA in A2780 und A2780cis-Zellen wurden vier verschiedene siRNAs mit jeweils unterschiedlichen komplementären Sequenzen zu der GDF15-RNA mittels HiPerFect in A2780- und A2780cis-Zellen transfiziert (Kapitel 2.2.1.5.). 24 h nach der Transfektion wurde die GDF15-RNA-Expression in beiden Zelllinien überprüft. Als Negativkontrolle diente in diesem Zusammenhang eine siRNA ohne eukaryotische Ziel-RNA (*non-target* siRNA, Kontroll-siRNA) (Abbildung 3.22.).

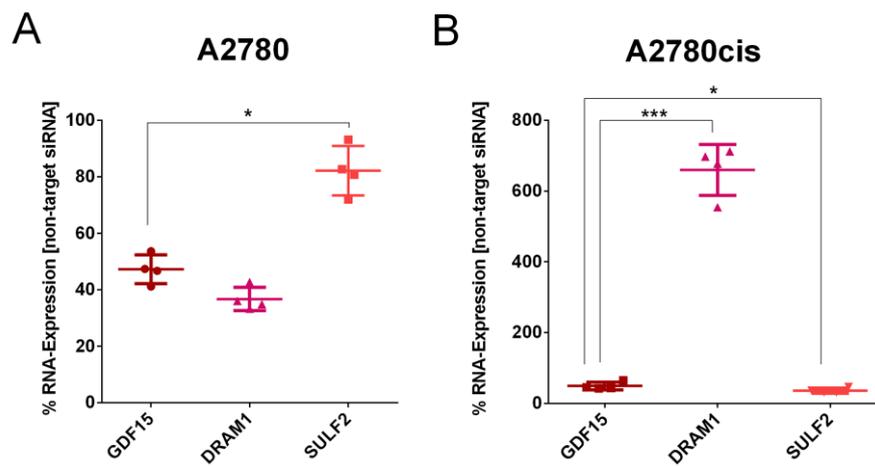


Abbildung 3.22. siRNA-vermittelter *Knockdown* von GDF15 in A2780 und A2780cis *in vitro*. (A) RNA-Expression von GDF15, DRAM1 und SULF2 nach 24 h GDF15-*Knockdown* in A2780-Zellen. (B) RNA-Expression von GDF15, DRAM1 und SULF2 nach 24 h GDF15-*Knockdown* in A2780cis-Zellen.

Im Allgemeinen konnte in den A2780- und A2780cis-Zellen nur eine geringe Effektivität des siRNA-*Knockdowns* erreicht werden: Die Transfektion jeweils der vier verschiedenen siRNA-Sequenzen erzeugte eine durchschnittliche GDF15-RNA-Herunterregulation von 52,8 % in A2780-Zellen und von 51,1 % in A2780cis-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-transduzierten Zellen. Wurde dennoch die SULF2-Expression nach 24 h GDF15-*Knockdown* untersucht, so stellte sich eine 17,8-prozentige Herunterregulation der SULF2-RNA in den A2780-Zellen im Vergleich zu der Kontroll-siRNA heraus. Dieser Effekt war in den A2780cis-Zellen mit einer SULF2-RNA-Herunterregulation von 63,7 % (im Vergleich zu der Kontroll-siRNA) sogar weitaus stärker. Bezüglich der DRAM1-RNA-Expression war nach der siRNA-vermittelten GDF15-Herunterregulation eine gegensätzliche Regulation in den untersuchten Zelllinien zu beobachten. So zeigten A2780-Zellen nach 24 h GDF15-*Knockdown* eine 63,3-prozentige Herunterregulation der DRAM-RNA im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-transfizierten A2780-Zellen. In den A2780cis-Zellen war unter dem GDF15-*Knockdown* hingegen

eine starke DRAM1-RNA-Hochregulation (6,6-fach) im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-transfizierten A2780cis-Zellen zu beobachten.

Als nächstes wurde eine mögliche Veränderung der A2780- und A2780cis-Zellproliferation 24 h nach der Transfektion mittels *CellTiter®-Glo* untersucht. Eine signifikante Veränderung der Zellproliferation unter GDF15-*Knockdown* konnte in beiden Zelllinien jedoch nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren sollte überprüft werden, ob ein siRNA-vermittelter GDF15-*Knockdown* in A2780cis zu einer Resensitivierung gegenüber Carboplatin führt. Dazu wurden parallel die vier verschiedenen siGDF15-RNA-Nukleotide in A2780cis sowie in A2780-Zellen transfiziert und mit 10 μ M Carboplatin behandelt. In mehreren unabhängigen Experimenten konnte jedoch nach 24 h unter der Carboplatintherapie in A2780cis kein ausreichender GDF15-*Knockdown* aufrechterhalten werden (Daten nicht gezeigt). Da Carboplatin zu einer GDF15-Hochregulation auf RNA-Ebene in A2780cis Zellen führt (Kapitel 3.3.5), ist der siGDF15-*Knockdown* eventuell - induziert durch die Chemotherapie - einer negativen Rückkopplung unterworfen (Kapitel 4.5.). Um dieser möglichen negativen Rückkopplung entgegenzuwirken, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein konstitutiver shRNA-vermittelter *Knockdown* von GDF15 in A2780cis durchgeführt (Kapitel 3.6.2.).

3.6.2. Etablierung stabiler shGDF15-A2780cis-Zelllinien

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, sollte eine mögliche Resensitivierung der A2780cis-Zellen gegenüber der Carboplatintherapie nach einem shRNA-vermittelten GDF15-*Knockdown* überprüft werden. Dazu wurden A2780cis-Zellen mit fünf verschiedenen lentiviralen pLKO-1-shGDF15-Konstrukten transduziert (shGDF15-1 bis shGDF15-5) und die shGDF15-positiven A2780cis-Zellen mittels Puromycin (Kapitel 2.2.1.7.) selektiert. Als Kontrolle diente ein leerer pLKO-1-Vektor (shTRC1, shRNA-Kontrolle). Sobald die nicht-transduzierten A2780cis-Zellen unter der Puromycinbehandlung abgestorben waren, wurde nach jeder Passage der fünf selektierten shGDF15-A2780cis-Zelllinien die GDF15-Expression mittels qRT-PCR überprüft.

Ab Passage 4 der shGDF15-transduzierten A2780cis-Zellen konnte eine Herunterregulation der RNA-Expression von durchschnittlich 70 % im Vergleich zu shRNA-Kontroll-transduzierten A2780cis-Zellen erreicht werden (Abbildung 3.23.). Dies spiegelte sich auch auf der Ebene der Proteinexpression in A2780cis-Zellen und in der GDF15-Sekretion in das umliegende Zellkulturmedium der A2780cis-Zellen wieder. In den shGDF15-transduzierten A2780cis-Zellen konnte im Durchschnitt eine 3-fach bzw. 2,8-fach niedrigere GDF15-Konzentration (328,6 pg/ml GDF15 pro μ g Protein) als in den Kontroll-shRNA- bzw. (978,9 pg/ml GDF15 pro μ g Protein) bzw. untransduzierten (911,6 pg/ml GDF15 pro μ g Protein) A2780cis-Zellen detektiert werden. Im Zellüberstand in den shGDF15-transduzierten A2780cis-Zellen war im Durchschnitt eine

2,4-fache bzw. 1,7-fache Herunterregulation des GDF15-Levels (190,8 pg/ml) im Vergleich zu shRNA-Kontroll-transduzierten (462,4 pg/ml) bzw. untransduzierten (336,6 pg/ml) A2780cis-Zellen zu detektieren. Da die shGDF15-2-A2780cis-Zelllinie den stärksten GDF15-*Knockdown* (84 %) auf RNA-Ebene und auf Proteinebene im Vergleich zu den Kontroll-shRNA-transduzierten A2780cis-Zellen aufwies, wurde diese Zelllinie für weitere Analysen verwendet. Die GDF15-Proteinexpression in der shGDF15-2-A2780cis-Zelllinie war verglichen mit den untransduzierten und Kontroll-shRNA-transduzierten A2780cis-Zellen 6,9-fach bzw. 7,4-fach niedriger. Dies korrelierte mit einer 9,5-fach bzw. 6,8-fach geringeren GDF15-Sekretion in das umliegende Zellkulturmedium von shGDF15-2-A2780cis-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-shRNA- bzw. untransduzierten A2780cis-Zellen.

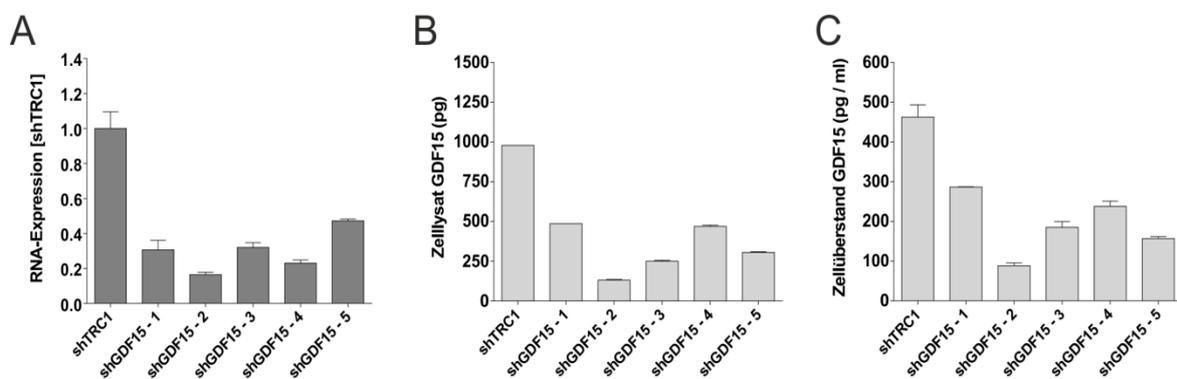


Abbildung 3.23. Stabiler shRNA-vermittelter *Knockdown* von GDF15 in A2780cis-Zellen *in vitro*. (A) RNA-Expression von GDF15 in A2780cis-Zellen nach shTRC1- und shGDF15-(1-5)-Transduktion (B) Proteinexpression von GDF15 in A2780cis-Zellen nach shTRC1- und shGDF15 (1-5)-Transduktion.(C) GDF15-Proteinlevel im Zellkulturüberstand von A2780cis nach shTRC1- und shGDF15 (1-5)-Transduktion.

3.6.3. Analyse der Kolonisierungseigenschaften von shGDF15-A2780cis-Zellen *in vitro*

Um zunächst makroskopisch einen Überblick über die Auswirkungen der GDF15-RNA-Herunterregulation in A2780cis-Zellen zu erhalten, wurde ein Zellkoloniebildungsassay durchgeführt. Dabei wurden A2780cis-Zellen mit den jeweils fünf verschiedenen shGDF15-Konstrukten transduziert und anschließend mit untransduzierten A2780cis-Zellen („Feederzellen“) in einer geringen Zelldichte (Kapitel 2.2.2.7.) ausgesät. Sobald die untransduzierten A2780cis-Zellen durch die Puromycinselektion abgestorben waren, erfolgte die Fixierung und Kristallviolettffärbung der kolonieartig wachsenden puromycinresistenten shGDF15-transduzierten A2780cis-Zellen nach 5, 10, 14 und 18 Tagen der Transduktion. Die Quantifizierung der Kristallviolettffärbung ergab eine minimal (nicht signifikant) erhöhte Anzahl an shGDF15-1-5-A2780cis-Zellkolonien im Vergleich zu den Kontroll-shRNA-transduzierten

A2780cis-Zellen (Abbildung 3.24.) nach 14 und 18 Tagen. Wurde jedoch die Morphologie der Zellkolonien von shGDF15-1 bis shGDF15-5-transduzierten A2780cis-Zellen betrachtet, so zeigte sich ein größerer Zellkoloniedurchmesser als bei den Kontroll-shRNA-transduzierten A2780cis-Zellen. Des Weiteren wiesen die shGDF15-transduzierten A2780cis-Zellkolonien im Vergleich zu den Kontroll-shRNA-transduzierten A2780cis-Zellkolonien einen größeren Abstand zwischen den einzelnen Kolonien auf.

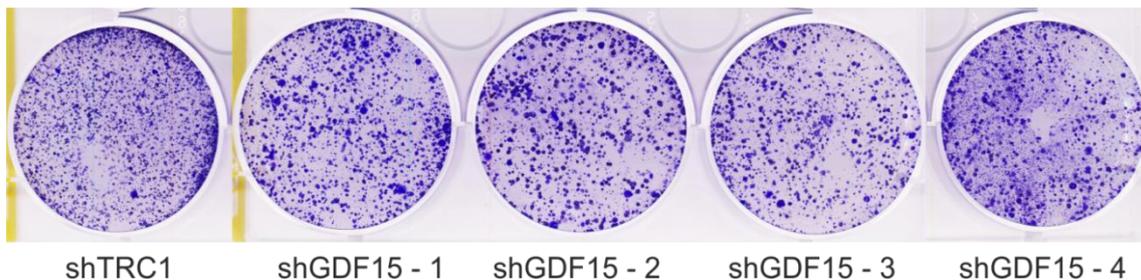


Abbildung 3.24. Repräsentative Darstellung des Zellkoloniebildungsassays von Kontroll-shRNA- und shGDF15-(1-5)-transduzierten A2780cis-Zellen 14 Tage nach der Transduktion.

3.6.4. Erhöhte Migration von shGDF15-A2780cis-Zellen in einem FBS-Gradienten

Da eine Veränderung der Kolonisierungseigenschaften auf eine veränderte Migration hindeutet, wurde das Migrationsverhalten der shGDF15-A2780cis-Zellen in einem FBS-Gradienten analysiert. Dazu wurden die shGDF15-A2780cis-Zellen, Kontroll-shRNA-transduzierte und untransduzierte A2780cis-Zellen über Nacht in einem 0,5 % FBS-haltigen Medium mit oder ohne Carboplatin vorinkubiert und anschließend in einem *Transwell-Assay* ausgesät (Kapitel 2.2.2.5.). Der *Transwell-Assay* wurde dabei wie im Kapitel 3.1.3. beschrieben, durchgeführt. Bei einer austarierten FBS-Konzentration von 0,5 % in den oberen und unteren *Transwells* konnte kein signifikanter Unterschied in der sogenannten "Zufallsmigration" von shGDF15-, shTRC1- oder untransduzierten A2780cis-Zellen festgestellt werden (Abbildung 3.25.). Dies war in der austarierten FBS-Konzentration von 10 % ebenfalls zu beobachten.

In einem FBS-Gradienten von 0,5 % des oberen *Transwells* und 10 % FBS des unteren *Transwells* konnte eine stark erhöhte Migration der shGDF15-A2780cis-Zellen im Vergleich zu den shRNA-Kontroll-transduzierten bzw. untransduzierten A2780cis-Zellen ermittelt werden. Entgegen der Erwartung, zeigten auch untransduzierte A2780cis-Zellen in einem 0,5%/10%-FBS-Gradienten eine leicht höhere Migration als shRNA-Kontroll-transduzierte A2780cis-Zellen. Werden shGDF15-A2780cis-Zellen vor der Durchführung des Migrationsassays mit Carboplatin in 0,5 %-haltigem Medium für 24 h inkubiert, so konnte auch hier eine höhere Anzahl an migrierten Zellen im Vergleich zu den shRNA-Kontroll-transduzierten bzw. untransduzierten A2780cis-

Zellen detektiert werden. Die erhöhte Anzahl an migrierten shGDF15-Zellen unter Carboplatin-Präinkubation fiel jedoch 15,5 % niedriger als bei unbehandelten shGDF15-Zellen in einem FBS-Gradienten aus.

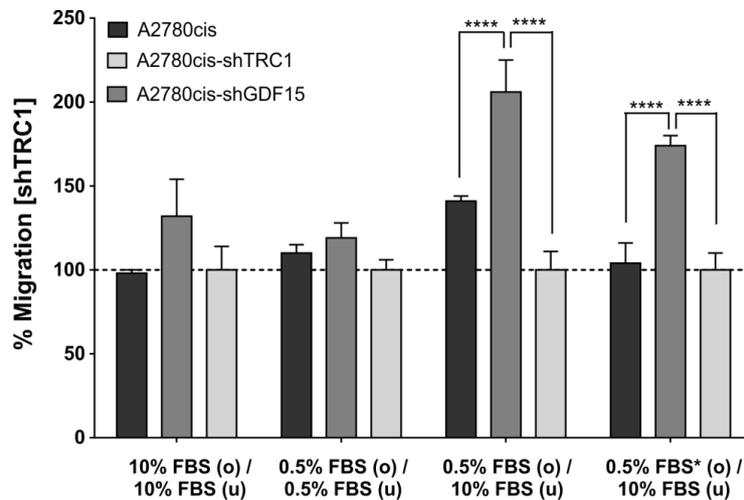


Abbildung 3.25. Migration nach 24 h von untransduzierten A2780cis-Zellen und shTRC1- bzw. shGDF15-A2780cis-Zellen in Vollmedium (10 % FBS/10 % FBS) Magermedium (0,5 % FBS/0,5 % FBS) oder in einem FBS-Gradienten (0,5 % FBS/10 % FBS) mit und ohne Carboplatinvorinkubation. Pro Ansatz wurden n = 3 *Transwells* analysiert. o = oberes *Transwell*, u = unteres *Transwell*, * mit Carboplatinvorinkubation für 24 h.

3.6.5. Analyse der Proliferation von shGDF15-A2780cis-Zellen nach Carboplatintherapie

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob ein shRNA-vermittelter GD15-*Knockdown* eine potentielle Resensitivierung von A2780cis gegenüber der Carboplatintherapie hervorrufen kann. Für die Beantwortung dieses Sachverhaltes wurde eine IC_{50} -Bestimmung von Carboplatin in shGDF15-1-5-A2780cis-Zellen durchgeführt. Die shGDF15-A2780cis-Zellen benötigten im Vergleich zu shTRC1- bzw. untransduzierten A2780cis-Zellen eine tendenziell (jedoch nicht signifikant) geringere Carboplatinkonzentration, um eine Proliferationsinhibition bei 50 % der Zellen nach 72 h Inkubation zu erreichen (Abbildung 3.26.). Der IC_{50} -Wert von Carboplatin in den ausgewählten A2780cis-shGDF15-2 lag dementsprechend bei einem Wert von $8,0 \times 10^{-5}$ M Carboplatin im Vergleich zu $1,1 \times 10^{-4}$ M Carboplatin bei shTRC1-A2780cis-Zellen und $1,0 \times 10^{-4}$ M Carboplatin bei untransduzierten A2780cis-Zellen. Im Durchschnitt war nur ein 1,5-fach verbessertes Ansprechen gegenüber der Carboplatintherapie von allen fünf shGDF15-A2780cis-Zelllinien mit einem Durchschnitts- IC_{50} -Wert von $7,88 \times 10^{-5}$ M zu beobachten.

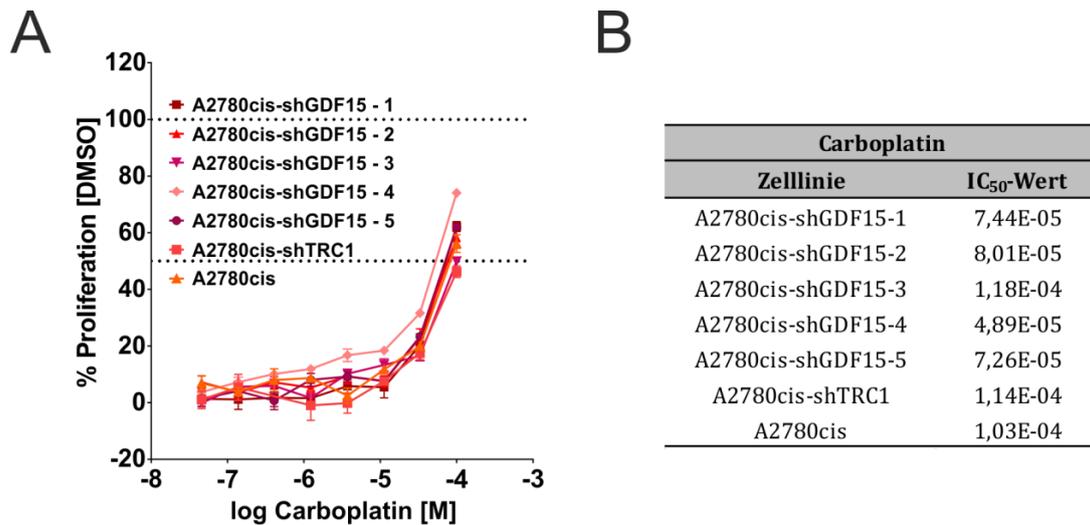


Abbildung 3.26. (A) Proliferation von untransduzierten, shTRC1- und shGDF15-(1-5)-A2780cis-Zellen nach 72 h Carboplatintherapie im Vergleich zu DMSO-therapierten Zellen *in vitro*. (B) IC₅₀-Werte von Carboplatin nach 72 h Inkubation in untransduzierten, shTRC1- und shGDF15-(1-5)-A2780cis-Zellen *in vitro*.

3.7. GDF15-vermittelte AKT-Signaltransduktion

Wie im Kapitel 3.2.5. aufgeführt, war eine stark erhöhte AKT-Phosphorylierung in den A2780cis-Tumoren zu detektieren. Diese erhöhte AKT-Phosphorylierung blieb unter der Carboplatintherapie unverändert. Für die Aufklärung eines möglichen kausalen Zusammenhangs der erhöhten AKT-Phosphorylierung und einem basal erhöhten GDF15-Level in A2780cis, wurde zusätzlich die AKT-Regulation in shGDF15-A2780cis-Zellen und die GDF15-Regulation unter AKT-Inhibition analysiert.

3.7.1. Geringere Expression und Phosphorylierung von AKT in shGDF15-A2780cis-Zellen

Für die Untersuchung einer möglichen GDF15-abhängigen AKT-Phosphorylierung wurden Zelllysate der fünf stabil transduzierten shGDF15-A2780cis-(1-5)-Zelllinien ohne weitere Behandlung hinsichtlich des gesamten bzw. phosphorylierten AKT-Levels mittels *Westernblot* und ELISA analysiert.

In allen fünf stabil shGDF15-transduzierten A2780cis-Zelllinien konnte eine verringerte AKT-Phosphorylierung im Vergleich zu den WT- und shTRC1-A2780cis-Zellen festgestellt werden. In Anlehnung an die geringere AKT-Phosphorylierung *in vivo* (Kapitel 3.2.5.), war in den unbehandelten A2780-Zellen eine 2,3-fach niedrigere AKT-Phosphorylierung (36,5 %) im Verhältnis zum AKT-Gesamtprotein zu detektieren (Abbildung 3.27.).

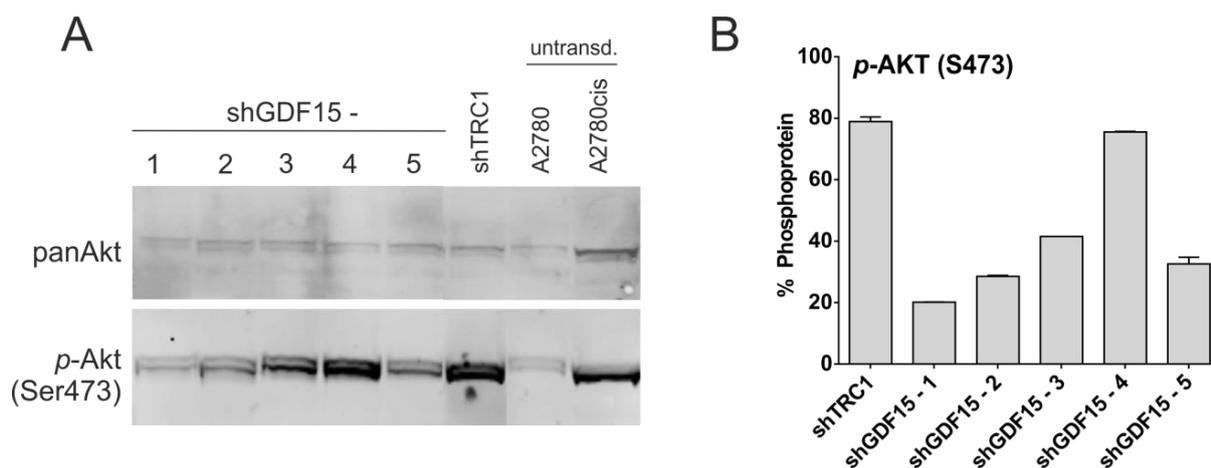


Abbildung 3.27. Proteinexpression von AKT in A2780-Zellen und in WT-, shTRC1- und shGDF15-(1-5)-A2780cis-Zellen *in vitro*. (A) Westernblot von Gesamt-AKT und phospho-AKT (S473) (Abk. untransd. = untransduziert) (B) Quantifizierung des prozentualen Anteils von phospho-AKT zum Gesamt-AKT-Protein in shTRC1- und shGDF15-(1-5)-A2780cis-Zellen mittels *Multiplex-ELISA*.

Die verringerte AKT-Phosphorylierung unter shGDF15-*Knockdown* konnte mittels „total AKT/phospho-AKT“-ELISA weiter untermauert werden. So zeigten vier der fünf stabil shGDF15-transduzierten Zelllinien eine Verringerung der AKT-Phosphorylierung im Vergleich zu den shRNA-Kontroll-transfizierten A2780-Zellen. Im Durchschnitt war in den shGDF15-A2780cis-Zellen eine AKT-Phosphorylierung von 36,7 % im Vergleich zum Gesamt-AKT-Protein festzustellen. Die shTRC1- bzw. untransduzierten A2780cis-Zellen zeigten hingegen eine 2,3-fach höhere AKT-Phosphorylierung (72,4 %) im Vergleich zum AKT-Gesamtprotein.

3.7.2. Analyse der Proliferation von A2780 und A2780cis unter AKT-Inhibition

Nach der Feststellung einer GDF15-abhängigen AKT-Regulation sollte nun auch die GDF15-Expression unter AKT-Inhibition untersucht werden. Dazu wurde zunächst das Proliferationsverhalten von A2780 und A2780cis ohne GDF15-*Knockdown* unter der AKT-Inhibition mittels (pan)AKT-Inhibitor (AKT_{inh}) BAY 1001931 untersucht. Nach Behandlung mit einer aufsteigenden AKT_{inh}-Konzentrationsreihe für 72 h und die anschließende Messung der Proliferationsinhibition mittels *CellTiter®-Glo*, wurde für A2780 eine IC₅₀-Konzentration von 1,1 x 10⁻⁶ M BAY 1001931 festgestellt. Für die A2780cis-Zellen konnte eine IC₅₀-Konzentration von 1,4 x 10⁻⁶ M BAY 1001931 ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). A2780- und A2780cis-Zellen weisen somit, trotz unterschiedlicher Carboplatinsensitivität, eine ähnliche Proliferationsinhibition unter AKT-Inhibition mit BAY 1001931 auf.

Für die Überprüfung einer möglichen Resensitivierung der A2780cis-Zellen gegenüber der Carboplatintherapie mittels AKT-Inhibition wurde der AKT-Inhibitor BAY 1001931 mit

Carboplatin jeweils in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe in einem Kombinationsassay gegeneinander titriert (Abbildung 3.28a.). Die Proliferationsinhibition wurde mittels *Cell-Titer®-Glo* bestimmt und die Effekte der jeweiligen Einzeltherapien im Vergleich zu der AKT- und der Carboplatinkombinationstherapie als Kombinationsindex (KI) (Kapitel 2.2.2.3.) dargestellt.

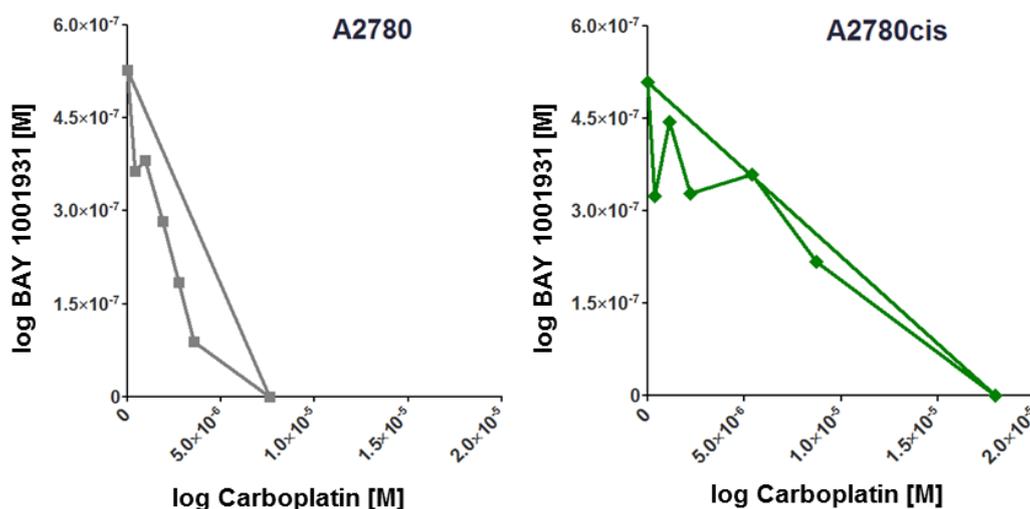


Abbildung 3.28a. Kombinationsassay von BAY 1001931 und Carboplatin in A2780- und A2780cis-Zellen *in vitro*. Die IC_{50} -Werte der verschiedenen Kombinationsverhältnisse von BAY 1001931 und Carboplatin sind als Isobologramm dargestellt.

Es stellte sich heraus, dass alle untersuchten BAY 1001931/Carboplatin-Kombinationen eine schwache Synergie beider Substanzen in A2780-Zellen mit KI-Werten von 0,64 bis 0,85 aufzeigten. In den A2780cis-Zellen hingegen konnte nur ein additiver Effekt beider Substanzen mit KI-Werten von 0,77 bis 1,01 festgestellt werden. Eine Ausnahme stellte die Kombination von Carboplatin und BAY 1001931 in einem Verhältnis von 1:9 dar. Diese Kombination erzeugte in A2780cis-Zellen einen schwach synergistischen Effekt im Vergleich zu der Carboplatin- bzw. BAY 1001931-Monotherapie. In den A2780cis-Zellen konnte also trotz erhöhter AKT-Phosphorylierung nur eine moderate Wirksamkeit der Kombination aus Carboplatin und BAY 1001931 erreicht werden.

Um diesem Ergebnis weiter nachzugehen, wurde eine Carboplatinverdünnungsreihe mit einer fixen BAY 1001931-Konzentration von 10 μ M in A2780 und A2780cis kombiniert. Die Proliferationsinhibition wurde nach 72 h mittels *Cell-Titer®-Glo-Assay* gemessen und die Verschiebung des IC_{50} -Wertes im Vergleich zu der Carboplatinmonotherapie analysiert (Abbildung 3.28b.). Hierbei konnte eine Zusatztherapie von 10 μ M BAY 1001931 in den A2780-Zellen die 50-prozentige Proliferationsinhibition mit Carboplatin ($IC_{50} = 4,67 \times 10^{-4}$ M) auf 76,3 % anheben. Im Gegensatz dazu, war in den A2780cis-Zellen nur eine 5,8 % höhere

Wachstumshemmung in der Kombination mit 10 μM BAY 1001931 im Vergleich zu der Carboplatinmonotherapie (IC_{50} -Wert von $1,61 \times 10^{-4}$ M) zu detektieren. Somit ist festzuhalten, dass eine Kombination von BAY 1001931 und Carboplatin in A2780-Zellen zu einer besseren Wirksamkeit als die jeweiligen Monotherapien führt. In den A2780cis-Zellen konnte jedoch nur ein geringfügig verbesserter Effekt der Kombinationstherapie beobachtet werden.

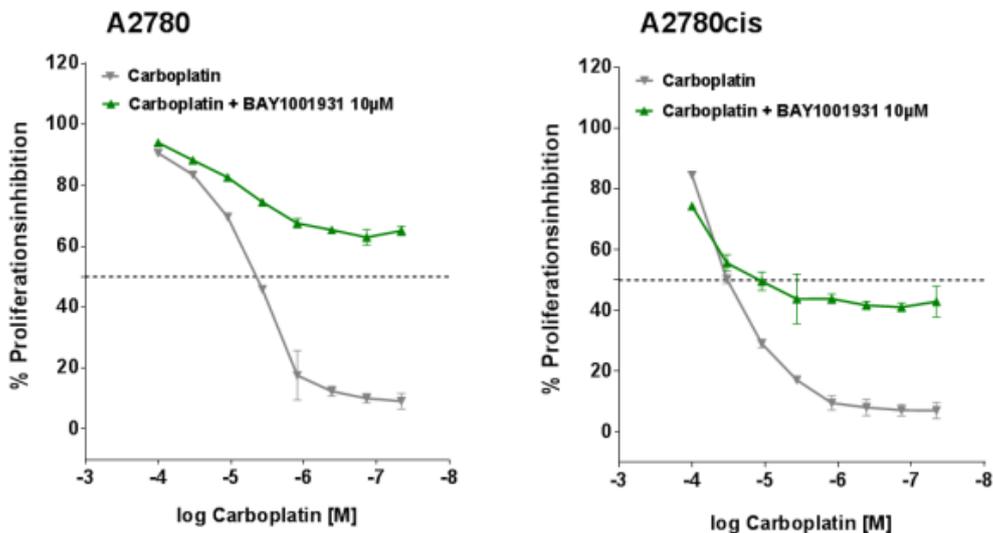


Abbildung 3.28b. Dosis-Wirkungskurve von Carboplatin in Kombination mit 10 μM BAY 1001931 nach 72 h Inkubation in A2780 und A2780cis im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen *in vitro*.

3.7.3. Analyse der Proliferation von shGDF15-Zelllinien unter AKT-Inhibition

Als nächstes sollte überprüft werden, ob eine AKT-Inhibition und eine simultane Herunterregulation von GDF15 durch den shRNA-vermittelten GDF15-*Knockdown* in den A2780cis-Zellen zu einer stärkeren Proliferationsinhibition als bei shRNA-Kontroll-transduzierten A2780cis-Zellen führt. Dazu wurde das Proliferationsverhalten von untransduzierten A2780cis und shTRC1- sowie shGDF15-1-5-Zellen nach AKT-Inhibition durch BAY 1001931 mit oder ohne Carboplatin für 72 h mittels *CellTiter®-Glo* untersucht (Kapitel 2.2.2.3). Die IC_{50} -Werte der Kombinationstherapie mit Carboplatin und BAY 1001931 wurden anhand der Carboplatinverdünnungsreihe berechnet. Für die fünf shGDF15-A2780cis-Zelllinien konnte im Durchschnitt eine 2,7-fach bzw. 3,7-fach höhere Proliferationsinhibition durch die BAY 1001931/Carboplatin-Kombinationstherapie als bei shTRC1- bzw. untransduzierten A2780cis-Zellen erreicht werden (Tabelle 3.1.). So zeigten die shGDF15-1-5-Zellen im Durchschnitt eine IC_{50} -Konzentration von $4,0 \times 10^{-6}$ M Carboplatin verglichen mit $1,1 \times 10^{-5}$ M Carboplatin der shTRC1-Zellen und $1,5 \times 10^{-5}$ M Carboplatin der untransduzierten A2780cis-Zelllinie. Im Gegensatz dazu erreichte die BAY 1001931-Monotherapie keine Verbesserung der

Sensitivität der shGDF15-A2780cis-Zellen im Vergleich zu shTRC1- und untransduzierten A2780cis-Zellen.

Tabelle 3.1. IC₅₀-Konzentrationen der BAY 1001931-Monotherapie und der Kombinationstherapie aus Carboplatin und 10 µM BAY 1001931 in WT- shTRC1- und shGDF15-(1-5)-A2780cis-Zellen *in vitro*.

IC ₅₀ -Konzentration		
A2780cis-	AKTInh [M]	Carboplatin + AKTInh 10µM [M]
untransduziert	3,92E-06	1,48E-05
shTRC1	1,86E-06	1,11E-05
shGDF15-1	1,41E-06	2,64E-06
shGDF15-2	2,80E-06	5,70E-06
shGDF15-3	1,90E-06	3,05E-06
shGDF15-4	1,02E-06	3,25E-06
shGDF15-5	2,50E-06	5,53E-06

3.7.4. Verminderte Expression und Sekretion von GDF15 unter AKT-Inhibition

Nach der Ermittlung der IC₅₀-Konzentration von BAY 1001931 in A2780 und A2780cis sollte nun die GDF15-Regulation während der AKT-Inhibition (mit und ohne Carboplatin) untersucht werden. Dazu wurden A2780 und A2780cis jeweils mit 3,8 µM Carboplatin (IC₅₀-Wert von A2780, Kapitel 3.1.1.), 10µM BAY 1001931 oder mit der Kombination von beiden therapiert. Nach 72 h wurde schließlich die GDF15-Konzentration im Zellkulturüberstand mit dem GDF15-ELISA bestimmt (Abbildung 3.29.).

Erwartungsgemäß war, verglichen mit der DMSO-Kontrolle, in den A2780-Zellen unter Carboplatinbehandlung eine höhere GDF15-Sekretion in das Zellkulturmedium (3,3-fach) als in den A2780cis-Zellen (1,2-fach) festzustellen. Die BAY 1001931-Monotherapie in den A2780-Zellen induzierte hingegen eine 7,8-fache (152 pg/ml GDF15) und in den A2780cis-Zellen eine 1,7-fache (551 pg/ml GDF15) Herunterregulation der GDF15-Sekretion im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle. Trotz unterschiedlicher Regulationen der GDF15-Sekretion unter Carboplatintherapie konnte eine Kombination aus 10 µM BAY 1001931 und 3,8 µM Carboplatin, die carboplatininduzierte GDF15-Sekretion in beiden Zelllinien auf ein ähnliches Niveau herunterregulieren. So wiesen A2780- und A2780cis-Zellen in der Kombinationstherapie jeweils eine 1,7-fach niedrigere GDF15-Konzentration im Zellkulturüberstand als die DMSO-behandelten Zellen auf. Eine erhöhte GDF15-Sekretion von A2780cis-Zellen ist somit durch eine erhöhte AKT-Aktivität/AKT-Phosphorylierung bedingt.

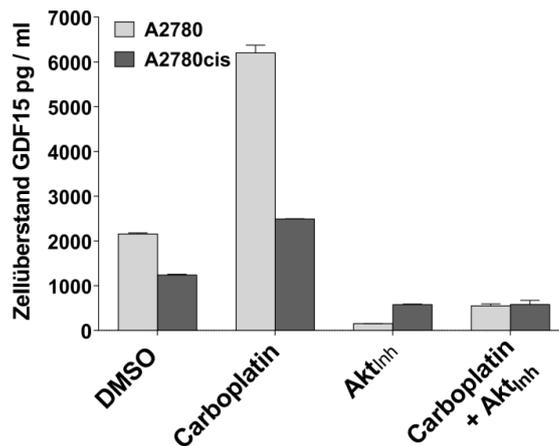


Abbildung 3.29. GDF15-Sekretion nach Inkubation von Carboplatin, 10 μM BAY 1001931 und Carboplatin in Kombination mit 10 μM BAY 1001931 für 72 h in A2780- und A2780cis-Zellen *in vitro*.

3.8. Funktionelle Charakterisierung von GDF15 in A2780cis *in vivo*

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob eine veränderte Zellmorphologie und eine leicht erhöhte Migration der shGDF15-A2780cis-Zellen *in vitro* zu einem veränderten Tumorstadium bzw. zu einer veränderten Tumormorphologie *in vivo* führen können. Für die Beantwortung dieses Sachverhaltes wurden A2780-Zellen, untransduzierte A2780cis-Zellen (WT) und die stabil transduzierten shGDF15-2- sowie shTRC1-(shRNA-Kontroll)-A2780cis-Zelllinien subkutan in *SCID*-Mäuse eingebracht. Anschließend wurden die tumortragenden *SCID*-Mäuse ab einer Tumorgröße von 20 mm² bis 150 mm² vehikel- und carboplatintherapiert (Q4Dx, i. v.) (Kapitel 2.2.3.4.). Bei einer Tumorfläche von $\geq 150 \text{ mm}^2$ wurden die Tumoren jeweils einzeln entnommen und das zugehörige Blutplasma für die Bestimmung der GDF15-Konzentration nach Dekapitierung der Tiere gewonnen.

3.8.1. Evaluierung der Sekretion und Proteinexpression von GDF15 in subkutanen shGDF15-A2780cis-Tumoren

Um ein potentiell verändertes Tumorstadium der shGDF15-2-transduzierten Zellen *in vivo* zu analysieren, wurde zunächst die GDF15-Proteinexpression in den Tumorslysaten der A2780-Tumoren, WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren mittels GDF15-ELISA überprüft. Das zugehörige GDF15-Level im Blutplasma der jeweiligen tumortragenden Tiere wurde ebenfalls mittels GDF15-ELISA untersucht.

In Anlehnung an die Ergebnisse der Carboplatinlangzeittherapie (Kapitel 3.4.) konnte eine 2,1-fach bzw. 2,5-fach höhere GDF15-Proteinexpression in vehikelbehandelten shTRC1- bzw. WT-A2780cis-Tumoren im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren am Ende des Experimentes (Tumoren $\geq 150 \text{ mm}^2$) nachgewiesen werden (Abbildung 3.30.). Diese erhöhte GDF15-Expression spiegelte sich im gleichen Verhältnis im Blutplasma der WT- und shTRC1-

A2780cis-Tumoren wieder. Die subkutanen shGDF15-A2780cis-Tumoren zeigten unter Vehikelbehandlung erwartungsgemäß eine 2,0-fach herunterregulierte GDF15-Proteinexpression im Vergleich zu den shTRC1-A2780cis-Tumoren. Die zugehörigen Plasma-Level der vehikelbehandelten shGDF15-A2780cis-Tumoren zeigten allerdings ein ähnlich hohes GDF15-Level wie die shTRC1- bzw. die WT-A2780cis-Tumoren.

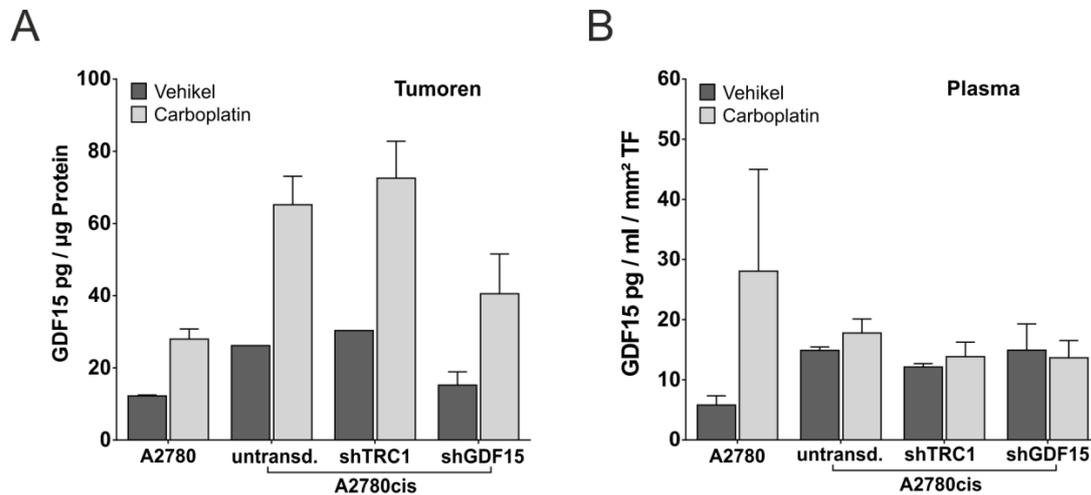


Abbildung 3.30. GDF15 in A2780-Tumoren und WT-, shTRC1- sowie shGDF15-(1-5)-A2780cis-Tumoren unter Vehikel- und Carboplatintherapie. (A) GDF15-Proteinexpression in vehikel- und carboplatinlangzeittherapierten A2780-Tumoren und WT-, shTRC1- sowie shGDF15-(1-5)-A2780cis-Tumoren mit einer Tumorfläche von $\geq 150 \text{ mm}^2$ (B) GDF15-Plasma-Level in A2780- und WT-, shTRC1 und shGDF15-A2780cis-tragenden SCID-Mäusen nach Carboplatinlangzeittherapie bei einer Tumorfläche $\geq 150 \text{ mm}^2$. Abk. untrans. = untransduziert.

Des Weiteren stieg die GDF15-Proteinexpression unter Carboplatintherapie bei allen untersuchten Tumorarten mehr als 2,0-fach im Vergleich zu der Vehikeltherapie an, wobei die effektive GDF15-Sekretion in das Blutplasma unterschiedlich ausfiel. Verglichen mit WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren (beide 1,7-fach) zeigten A2780-tragende Tiere hierbei mit einer 2,3-fachen Hochregulation die höchste GDF15-Sekretion. Erwartungsgemäß, war bei shGDF15-A2780cis-tragenden Tieren nur eine schwache carboplatininduzierte Hochregulation (1,1-fach) des GDF15-Levels im Blutplasma zu beobachten.

3.8.2. Basal erhöhtes Tumorwachstum von shGDF15-A2780cis

Nach der Bestätigung der Herunterregulation der GDF15-Expression in shGDF15-A2780cis-Tumoren, wurde die Wirksamkeit der Carboplatintherapie in den verschiedenen Tumormodellen analysiert. Das Tumorwachstum wurde dabei über die Zeit als Veränderung der Tumorfläche von 20 mm^2 bis $\geq 150 \text{ mm}^2$ ermittelt und jeweils als „Überlebenskurve“ im Kaplan-Meier-Graph dargestellt (Kapitel 2.2.7.2.). Zunächst konnte mittels *N-Way*-ANOVA der „Überlebenskurven“ der vehikelbehandelten A2780-, WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-

Tumoren ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) des Tumorwachstums festgestellt werden (Abbildung 3.31. und Tabelle 3.2.).

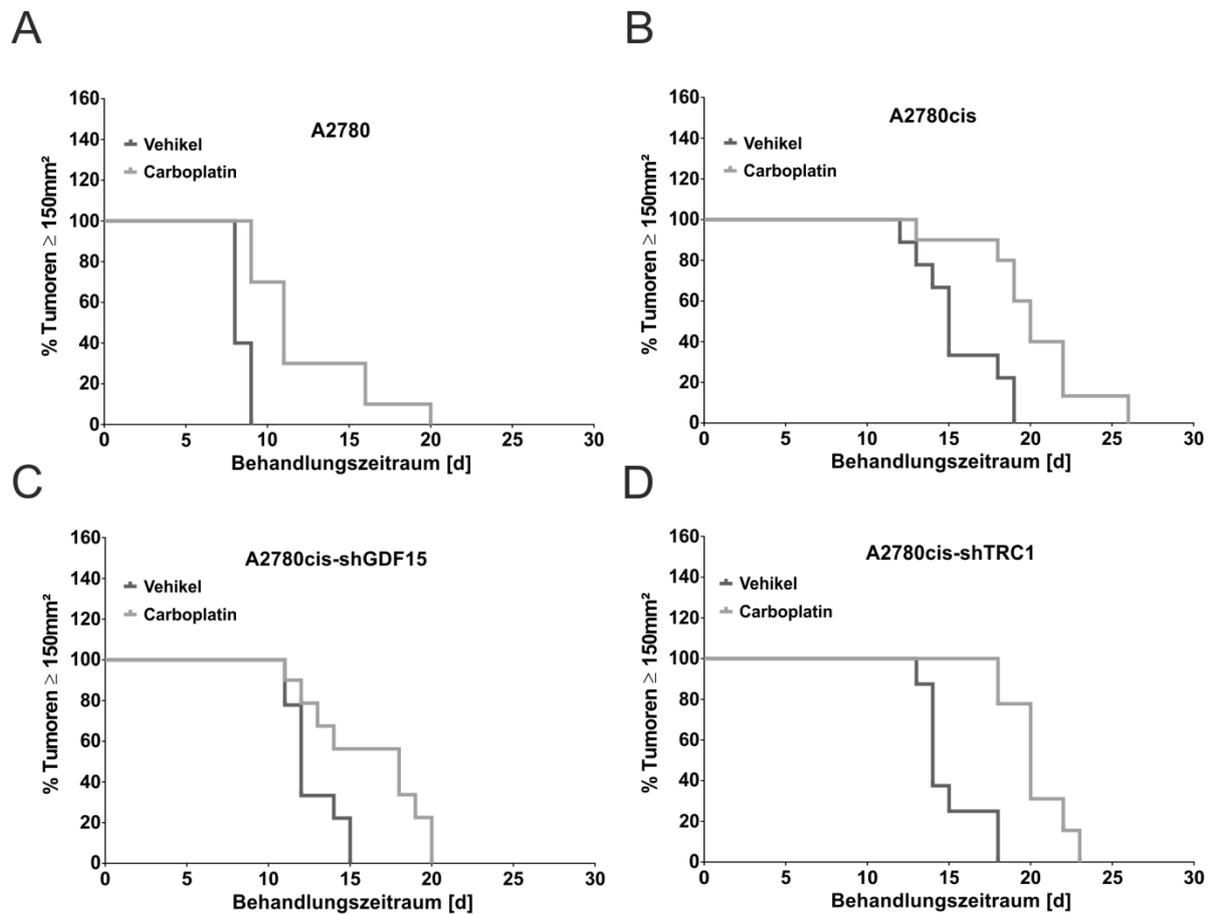


Abbildung 3.31. Modifizierte Kaplan-Meier-Kurven von vehikel- und carboplatinlangzeittherapierten A2780-Tumoren und WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren ($n = 10$ pro Gruppe). Tumore $\leq 150 \text{ mm}^2$ wurden mit „1 = Überleben“ und Tumore $\geq 150 \text{ mm}^2$ mit „0 = Tod“ gewertet.

In Anlehnung an die Kurzzeittherapie (Kapitel 3.2.1.), wuchsen A2780-Tumoren bis zu der vordefinierten Tumorfläche von 150 mm^2 unter der Vehikeltherapie rund 6 Tage bzw. 7 Tage schneller als vehikeltherapierte WT-A2780cis-Tumoren und shTRC1-A2780cis-Tumoren. Eine shRNA-vermittelte Herunterregulation von GDF15 verkürzte hingegen diese leichte Wachstumsverzögerung in den A2780cis-Tumoren. So wuchsen vehikelbehandelte shGDF15-A2780cis-Tumoren im Durchschnitt 2,9 bzw. 3,1 Tage schneller als WT- bzw. shTRC1-Tumoren. Der statistische Vergleich der Veränderung der Tumorfläche unter Carboplatintherapie im Vergleich zu der Vehikelbehandlung mittels *N-Way*-ANOVA ergab jeweils ein signifikantes Ansprechen aller vier Tumormodelle in der Carboplatintherapie ($p < 0,001$). So zeigten A2780-Tumoren nach dem Start der Carboplatintherapie eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums ab Tag 6 und die WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren jeweils ab Tag 11 bzw.

Tag 13. Die shGDF15-Tumoren wiesen ähnlich zu den WT-A2780cis-Tumoren eine signifikante Wachstumsinhibition ab Tag 11 nach dem Start der Carboplatintherapie auf.

Als nächstes wurde die mittlere Wachstumszeit bis zum Erreichen der vordefinierten Tumorfläche von 150 mm² in den jeweiligen Tumormodellen und Therapiegruppen betrachtet. Dabei stellte sich eine erhöhte Inhibition des Tumorwachstums der shGDF15-A2780cis-Tumoren (50 %) im Vergleich zu den WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren (jeweils 33,33 %) unter Carboplatintherapie heraus. Die A2780-Tumoren wiesen erwartungsgemäß eine leicht erhöhte (37,5 %) Carboplatinsensitivität als WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren auf. Am Ende des Experimentes (vehikelbehandelte Tumore $\geq 150 \text{ mm}^2$) konnte für carboplatinbehandelte A2780-Tumoren ein T/C-(*treatment/control*)-Verhältnis von 0,56 ermittelt werden. Für WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis Tumoren wurden hingegen T/C-Werte von 0,76, 0,85 und 0,76 bezüglich der Carboplatintherapie ermittelt.

Tabelle 3.2. T/C-Werte von Carboplatin und Vehikel in A2780-Tumoren und WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren.

T/C-Werte								
Therapie	A2780		A2780cis		A2780cis-shGDF15		A2780cis-shTRC1	
	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW
Vehikel	1,00	0,12	1,00	0,20	1,00	0,22	1,00	0,18
Carboplatin	0,56	0,20	0,76	0,11	0,76	0,23	0,85	0,11

Somit ist zusammenzufassen, dass ein GDF15-*Knockdown* in den A2780cis-Tumoren zu keiner Verringerung des T/C-Verhältnisses, jedoch im Mittel zu einer leichten Wachstumsverzögerung („median survival“) im Vergleich zu WT- und shTRC1-A2780cis-Tumoren führen kann.

3.8.3. Veränderte Morphologie von shGDF15-A2780cis-Tumoren

Da die A2780cis-Zellen infolge eines GDF15-*Knockdowns* eine erhöhte Migration und veränderte Kolonisierungseigenschaft *in vitro* aufwiesen, sollte als nächstes die Morphologie der shGDF15-A2780cis-Tumoren im Vergleich zu A2780-, WT- und shTRC1-A2780cis-Tumoren untersucht werden. Dazu wurden Paraffinschnitte von den vehikel- und carboplatintherapierten A2780-, WT-, shTRC1- sowie shGDF15-A2780cis-Tumoren angefertigt und mittels Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Anschließend wurden zehn Bereiche eines Tumorschnittes (Pro Gruppe n = 2) unter maximal möglicher Objektivvergrößerung am Mikroskop (40 x) auf der Grundlage ihres Differenzierungsgrades (*Grading*) eingestuft. Hierbei wurden morphologische Eigenschaften wie der Anteil an Nekrosen, Blutgefäßen und des Stromaanteils semiquantitativ untersucht. Die

Einstufung der Tumoren erfolgte dabei beginnend mit Grad 1 als minimal, bis zu einem Grad 5 als kritisch bzw. stark (Abbildung 3.23a.).

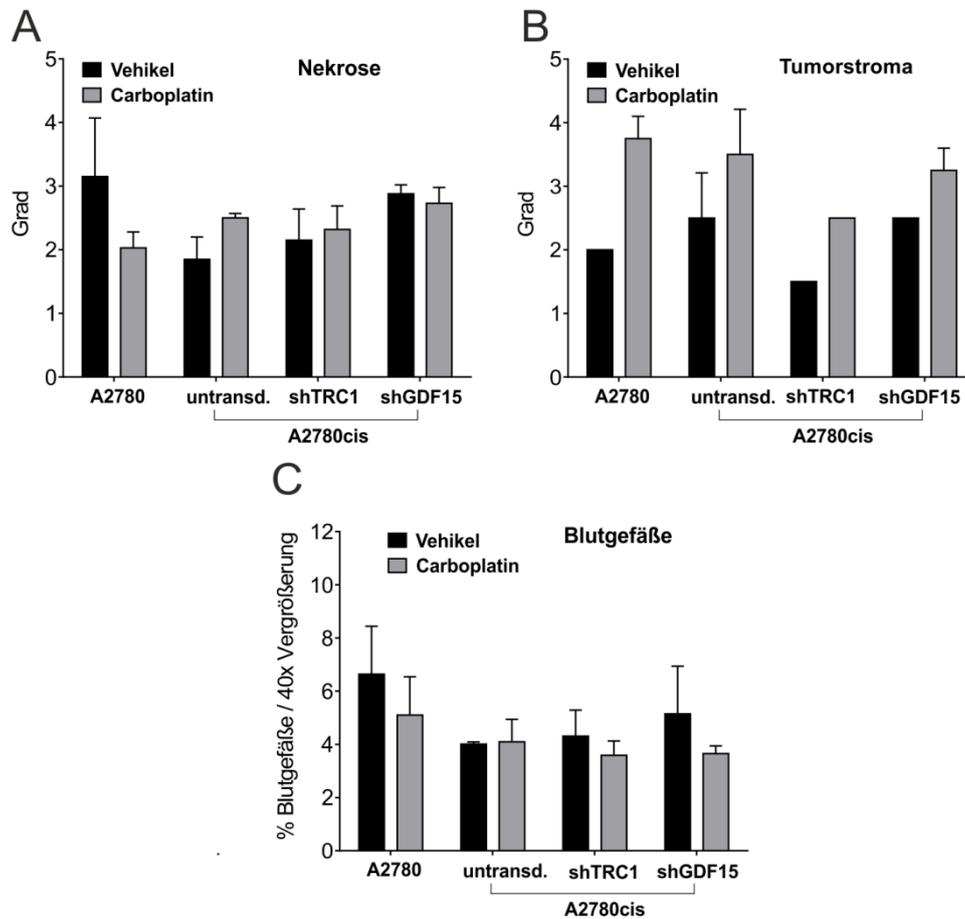


Abbildung 3.32a. Semiquantitative Analyse des Anteils (Grad) an (A) Nekrosen und (B) Tumorstromabereichen und (C) des prozentualen Anteils an Blutgefäßen der H & E-gefärbten vehikel- und carboplatinlangzeittherapierten A2780-Tumoren und WT- shTRC1- shGDF15-A2780cis-Tumoren (n = 2).

Es zeigte sich, dass vehikelbehandelte A2780-Tumoren einen höheren Anteil an nekrotischen Bereichen, Blutgefäßen und einen höheren Stromaanteil als A2780cis-Tumoren aufwiesen. Darüber hinaus war unter Carboplatintherapie eine weitere Zunahme des Stromaanteils in A2780-Tumoren zu detektieren. Unter der Carboplatintherapie nahmen die Blutgefäßanzahl und der Nekroseanteil im Vergleich zu der Vehikeltherapie jedoch ab. Ein Anstieg des Stromaanteils unter Carboplatintherapie konnte auch bei A2780cis-Tumoren beobachtet werden. Des Weiteren war in den A2780cis-Tumoren im Gegensatz zu den A2780-Tumoren unter Carboplatintherapie eine starke Zunahme der Nekrose zu beobachten. Der Blutgefäßanteil änderte sich unter Carboplatintherapie in den A2780cis-Tumoren jedoch nicht. Die Morphologie der shTRC1-Tumoren stimmte bis auf den Anteil des Tumorstromas mit den WT-A2780cis-Tumoren überein. Weiterhin war in den WT-A2780cis-Tumoren ein höherer Stromaanteil als in den shTRC1-A2780cis-Tumoren wiederzufinden. Dieser erhöhte Stromaanteil konnte auch in den vehikeltherapierten shGDF15-A2780cis-Tumoren identifiziert werden. Die Blutgefäßdichte

und der Nekroseanteil waren in den shGDF15-A2780cis-Tumoren jedoch höher als in den vehikeltherapierten shTRC1-Tumoren. Unter Carboplatintherapie veränderte sich der Nekrosenanteil nur minimal und der Blutgefäßanteil nahm in shGDF15-A2780cis-Tumoren sogar im Vergleich zu WT-bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren weiter zu.

Bei der qualitativen Analyse der Tumoren war vor allem die Strukturveränderung der shGDF15-Tumoren im Vergleich zu den WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren auffällig: Hierbei zeigten die shGDF15-Tumoren eine „leberläppchenartige“ bzw. lobuläre Struktur mit einem zentralen Blutgefäß (Abbildung 3.23b.).

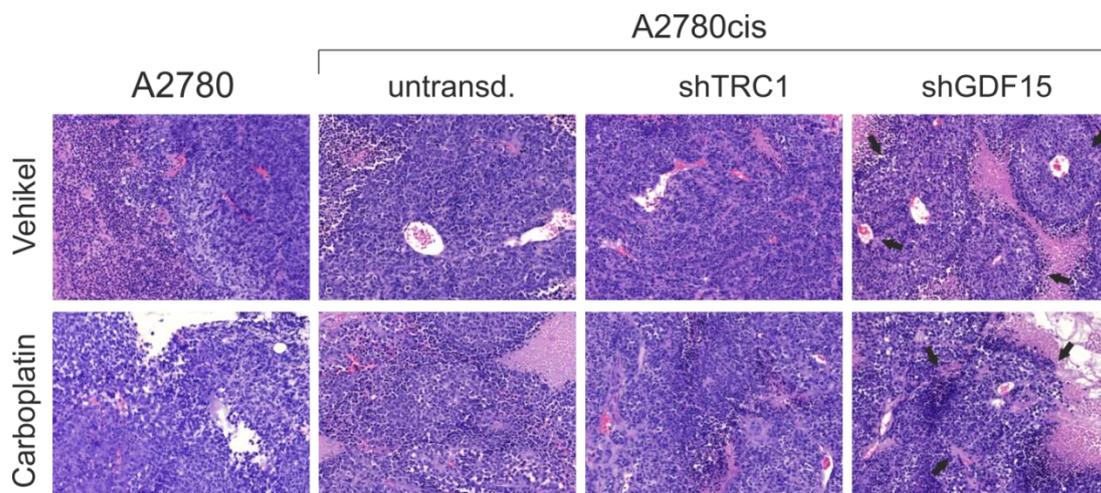


Abbildung 3.32b. Repräsentative H & E-gefärbte Gefrierschnitte von vehikel- und carboplatinlangzeittherapierten A2780-Tumoren und WT- shTRC1- shGDF15-A2780cis-Tumoren. Schwarze Pfeile deuten auf eine „leberläppchenartige“ Struktur mit zentralem Blutgefäß in shGDF15-A2780cis-Tumoren hin (n = 3 Tumoren).

Diese lobulären Strukturen innerhalb des Tumors waren durch nekrotische Bereiche zum Teil voneinander getrennt. Typisch für Xenografttumoren zeigten die epithelialen WT- bzw. shTRC1-Tumoren hingegen eine stark undifferenzierte Tumorstruktur. Somit fand in den shGDF15-Tumoren neben der Zunahme der Blutgefäßdichte sowie des Nekrosenanteils zusätzlich eine Differenzierung bzw. Veränderung der Tumorstruktur im Vergleich zu WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren statt.

3.8.4. Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion in shGDF15-A2780cis-Tumoren nach Carboplatinlangzeittherapie

Nachdem eine Erhöhung des Tumorwachstums und eine morphologische Veränderung der Tumorstruktur in den shGDF15-A2780cis-Tumoren festzustellen war, wurde als nächstes der Anteil von apoptotischen zu proliferativ aktiven Zellen überprüft. Dazu wurden jeweils Paraffinschnitte von A2780-Tumoren und WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren

hinsichtlich der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 und des Apoptosemarkers *Cleaved Caspase-3* untersucht.

Zunächst konnte unterstützend zu einem erhöhten Tumorwachstum von vehikelbehandelten A2780-Tumoren ebenfalls eine höhere Anzahl an Ki-67-positiven Zellen im Vergleich zu vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren detektiert werden (Abbildung 3.33a.).

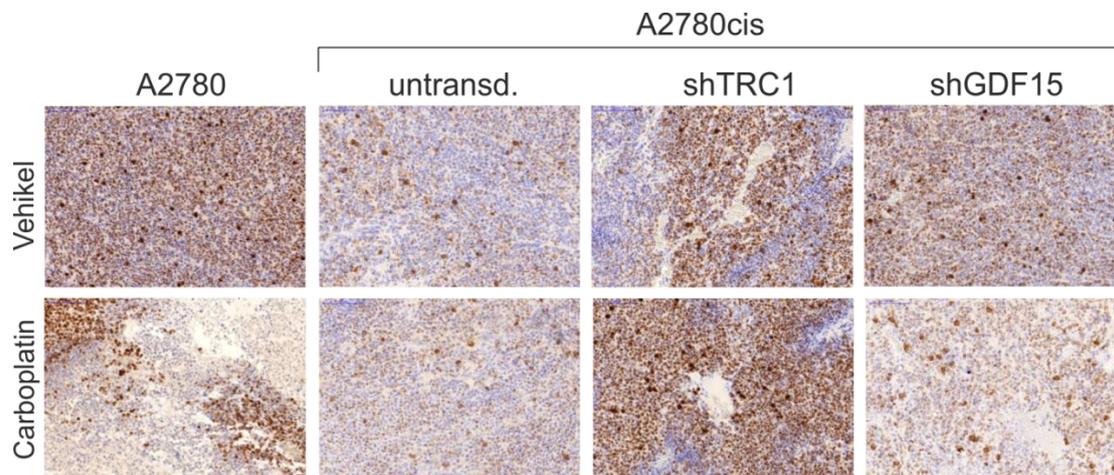


Abbildung 3.33a. Repräsentative Paraffinschnitte des immunhistologischen Nachweises von Ki-67 in vehikel- und carboplatinlangzeittherapierten A2780-Tumoren sowie WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren (n = 3 Tumoren).

Unter Carboplatintherapie wurde die Anzahl der Ki-67-positiven Zellen in A2780-Tumoren jedoch stark reduziert. Im Gegensatz dazu zeigten WT- und shTRC1-A2780cis-Tumoren, ähnlich zur Kurzzeittherapie (Kapitel 3.2.2.), keine Veränderung der Anzahl an Ki-67-positiven Zellen unter Carboplatinlangzeittherapie im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren. In den vehikelbehandelten shTRC1-A2780cis-Tumoren konnte jedoch ein leicht höherer Anteil an Ki-67-positiven Zellen als in den vehikeltherapierten WT-A2780cis-Tumoren festgestellt werden. Wurden nun die shGDF15-A2780cis-Tumoren betrachtet, so zeigte sich, verglichen mit WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren, eine höhere Anzahl an Ki-67-positiven Zellen unter Vehikeltherapie. Diese erhöhte Anzahl der Ki-67-positiven Zellen in vehikelbehandelten shGDF15-A2780cis-Tumoren wurde jedoch wie in den WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren unter Carboplatintherapie nur minimal verringert.

Des Weiteren wurde die Expression von PCNA (*Proliferating cellular nuclear antigen*), ein Marker für Zellen in der S-Phase, mittels *Westernblot* analysiert. Vehikelbehandelte A2780-Tumoren wiesen eine höhere Expression an PCNA im Vergleich zu vehikelbehandelten WT- bzw. shTRC1-Tumoren auf (Abbildung 3.33b.). Die shGDF15-Tumoren zeigten eine ähnlich hohe PCNA-Proteinexpression wie die vehikelbehandelten A2780-Tumoren. Unter Carboplatintherapie verringerte sich die PCNA-Proteinexpression in den A2780-Tumoren nur in

geringem Maße. Die WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren wiesen sogar eine Zunahme der PCNA-Expression nach Carboplatintherapie auf. Die shGDF15-A2780cis-Tumoren verhielten sich wiederum ähnlich zu den carboplatintherapierten A2780-Tumoren: Hier zeigten die shGDF15-A2780cis-Tumoren kaum eine Veränderung der PCNA-Proteinexpression unter Carboplatintherapie im Vergleich zu den vehikelbehandelten shGDF15-A2780cis-Tumoren.

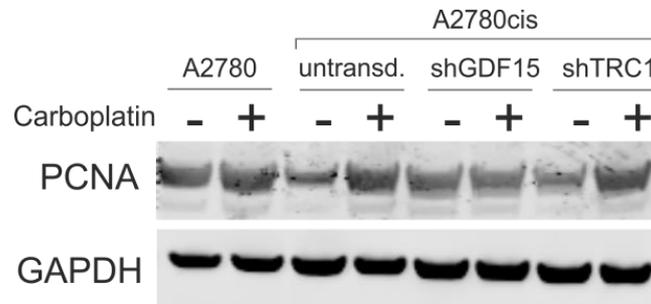


Abbildung 3.33b. Westernblot von PCNA in vehikel- und carboplatinlangzeittherapierten A2780-Tumoren und WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren (n = 3 Tumoren, „gepoolt“)

Bezüglich der *Cleaved Caspase-3*-Färbung konnte grundsätzlich eine geringere Anzahl an *Cleaved Caspase-3*-positiven Zellen in den vehikelbehandelten A2780-Tumoren im Vergleich zu den WT- bzw. shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren detektiert werden (Abbildung 3.33c.).

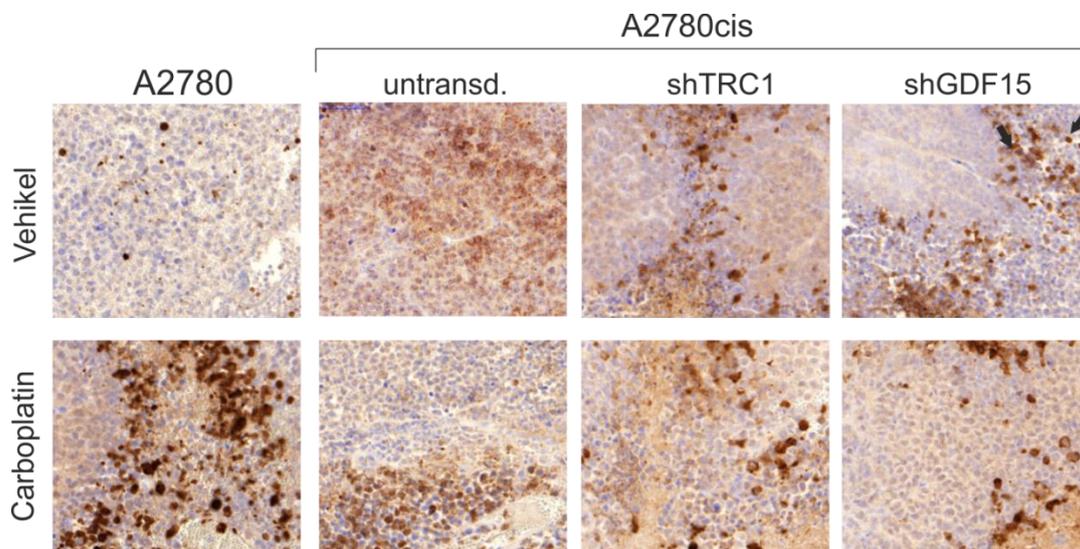


Abbildung 3.33c. Repräsentative Gefrierschnitte des immunhistologischen Nachweises von *Cleaved Caspase-3* in vehikel- und carboplatinlangzeittherapierten A2780-Tumoren und WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren (n = 3 Tumoren).

Unter Carboplatintherapie zeigten die A2780-Tumoren hingegen die höchste Anzahl an *Cleaved Caspase-3*-positiven Zellen im Vergleich zu den drei anderen Tumormodellen. Ähnlich zu der Ki-

67-Färbung, konnte zwischen vehikel- und carboplatintherapierten WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren qualitativ kein Unterschied ermittelt werden. Dies war auch in den shGDF15-A2780cis-Tumoren zu beobachten. So zeigten carboplatintherapierte shGDF15-A2780cis-Tumoren keine Veränderung der Anzahl der *Cleaved-Caspase-3*-positiv-gefärbten Zellen im Vergleich zu der Vehikeltherapie

Um die Ergebnisse der vorangegangenen histologischen Analyse quantitativ zu untermauern, wurde mittels Multiplex-ELISA außerdem der prozentuale Anteil von Gesamt- zu phospho-P53, sowie die Proteinexpression von *Cleaved Caspase-3* quantitativ in den vier Tumormodellen erfasst (Kapitel 2.2.4.7.). Hierbei war in den vehikelbehandelten WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren eine insgesamt höhere *Cleaved-Caspase-3*-Proteinexpression als in den vehikelbehandelten A2780-Tumoren vorzufinden (Abbildung 3.33d.). Diese basal erhöhte Apoptoserate wurde in den WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren unter Carboplatintherapie nur jeweils um das 1,4-, 1,3- und 1,9-fache der Vehikelbehandlung weiter erhöht.

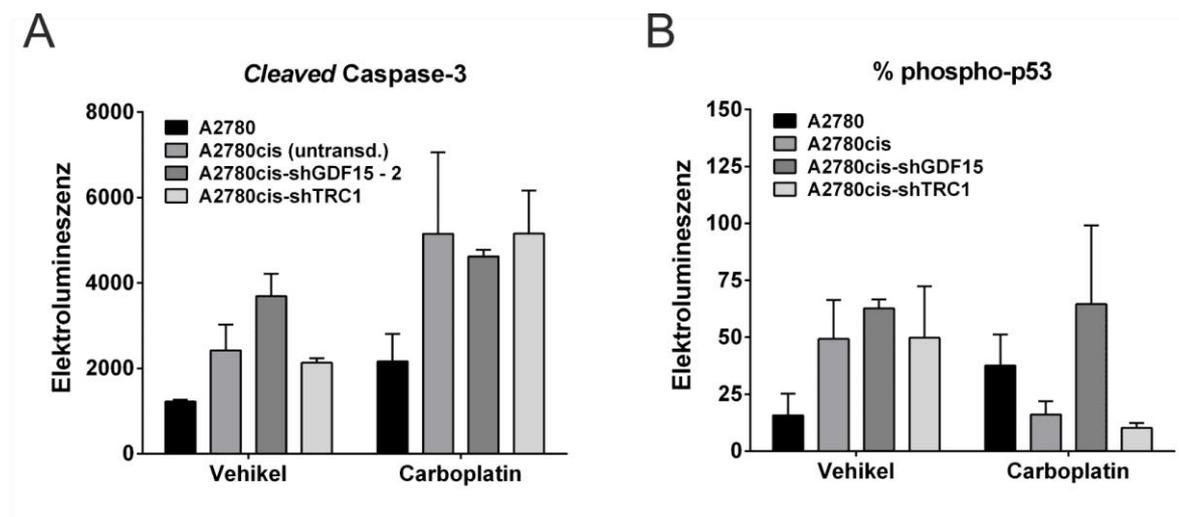


Abbildung 3.33d. Proteinexpression von *Cleaved Caspase-3* und dem prozentualen Anteil von phosphorylierten P53-Anteil zum Gesamt-P53-Protein in vehikel- und carboplatinlangzeittherapierten A2780-Tumoren und WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren (n = 3).

Bezüglich der Überprüfung des prozentualen Anteils an phosphoryliertem P53 zum gesamten P53-Proteinlevel (= P53-Aktivierung), konnte im Gegensatz zu den A2780-Tumoren eine starke Herunterregulation der P53-Aktivierung unter Carboplatintherapie in den WT- und shTRC1-A2780cis-Tumoren festgestellt werden. Dabei wiesen die WT- und shTRC1-A2780cis-Tumoren jeweils eine 3,0- bzw. 2,8-fach niedrigeren prozentualen Anteil von phospho-P53 als jeweils zu den vehikelbehandelten Tumoren auf. In den A2780-Tumoren war unter Carboplatintherapie erwartungsgemäß eine 2,5-fache Hochregulation des prozentualen Anteils von phospho-P53 zum Gesamtproteinanteil von P53 festzustellen. Die shGDF15-A2780cis-Tumoren zeigten

hingegen eine unverändert hohe p53-Phosphorylierung nach Carboplatintherapie. Somit wirkt der shGDF15-*Knockdown* in den A2780cis-Tumoren der Herunterregulation der P53-Aktivität in der Carboplatintherapie entgegen.

3.8.5. Erhöhte Expression von p27 und p16 in shGDF15-A2780cis-Tumoren

Um die shGDF15-vermittelte P53-Stabilisierung in den A2780cis-Tumoren unter der Carboplatintherapie und dessen Einfluss auf den Zellzyklus näher zu analysieren, wurde die Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren P16, P21 und P27 in allen vier Tumormodellen mittels *Westernblot* untersucht (Abbildung 3.34.). Ähnlich zu der Carboplatinkurzzeittherapie, wurde die Proteinexpression von P21 in den A2780-Tumoren unter Carboplatintherapie stark angehoben (3,9-fach). Im Gegensatz dazu, zeigten WT-, shTRC1 und shGDF15-A2780cis-Tumoren keine Erhöhung der P21-Proteinexpression unter Carboplatintherapie.

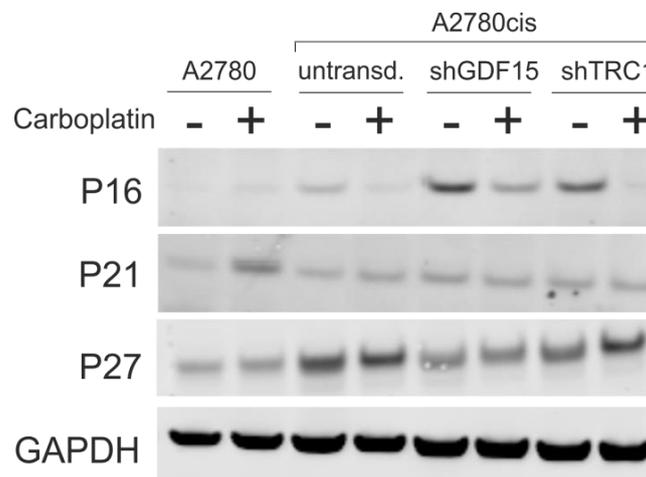


Abbildung 3.34. *Westernblot* von P16, P21, P27 und GAPDH in vehikel- und carboplatinlangzeittherapierten A2780-Tumoren und WT-, shTRC1- und shGDF15-A2780cis-Tumoren (n = 3 Tumoren, „gepoolt“).

Des Weiteren konnte eine stark erhöhte Basalexpression von P27 in den WT- (2,3-fach) und shTRC1-A2780cis-Tumoren (1,6-fach) im Vergleich zu den A2780-Tumoren identifiziert werden. Diese erhöhte P27-Proteinexpression wurde durch den shGDF15-*Knockdown* in A2780cis-Tumoren weitestgehend auf das Expressionslevel der A2780-Tumoren reduziert. Zusätzlich war eine leichte carboplatininduzierte Zunahme der P27-Expression in den WT- (1,5-fach) bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren (1,4-fach) festzustellen. Die A2780- und shGDF15-A2780cis-Tumoren zeigten jedoch keine carboplatininduzierte Erhöhung der P27-Expression. In den vehikelbehandelten shGDF15-A2780cis-Tumoren war zudem eine erhöhte P16-Expression im Vergleich zu den vehikelbehandelten WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren zu detektieren. Allerdings war die basale P16-Expression auch in den vehikelbehandelten shTRC1-A2780cis-

Tumoren im Vergleich zu den vehikelbehandelten WT-A2780cis-Tumoren leicht erhöht. Die Carboplatintherapie reduzierte die P16-Expression in allen drei A2780cis-Tumormodellen, wobei das P16-Expressionslevel in den shGDF15-A2780cis-Tumoren auf einem höheren Level im Vergleich zu den WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren verblieb. In den A2780-Tumoren war sowohl in der Vehikel- als auch in der Carboplatintherapie keine P16-Expression zu detektieren.

Abschließend ist somit festzuhalten, dass eine GDF15-Herunterregulation in A2780cis *in vivo* einerseits zu einer Stabilisierung von P53 und Hochregulation von P16 führt und andererseits eine Herunterregulation von P27 induziert.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Funktionsanalyse potentiell neuer Resistenzvermittelnder Faktoren in der Carboplatintherapie anhand der Ovarialkarzinommodelle A2780 und A2780cis. Dazu wurden A2780 und A2780cis beginnend von der Analyse der Genexpression bis hin zu der Untersuchung der Proteinexpression verschiedener Faktoren in komplexen Signalwegen umfangreich charakterisiert. Hierbei konnte GDF15 als Resistenzvermittelnder Faktor in der Carboplatinresistenz von A2780cis-Zellen durch einen shRNA-vermittelten GDF15-*Knockdown in vitro* und *in vivo* identifiziert werden. Welche funktionale Bedeutung der Resistenzfaktor GDF15 im Kontext der umfangreichen Charakterisierung der Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und A2780cis hat, wird in den folgenden Kapiteln in Hinblick auf die aktuelle Literatur diskutiert.

4.1. A2780cis - ein geeignetes Modell für die Analyse der Carboplatinresistenz

In der Annahme, dass Carboplatin und Cisplatin ähnliche zytotoxische Wirksamkeiten in Tumorzellen aufzeigen [235], wurde eine mögliche Kreuzresistenz gegenüber der Carboplatintherapie anhand der Proliferation, der Migration und dem Zellzyklusarrest in den cisplatinresistenten A2780cis-Zellen unter Carboplatintherapie *in vitro* überprüft. Dabei zeigten die A2780cis-Zellen unter der Carboplatintherapie eine verminderte Proliferationsinhibition, einen verzögerten G2/M-Arrest und ein verstärktes Migrationsverhalten im Vergleich zu den A2780-Zellen *in vitro* (Kapitel 3.1.1. - 3.1.3.). Die Kreuzresistenz gegenüber der Carboplatintherapie in den A2780cis-Zellen konnte somit bestätigt werden. Unterstützend zu diesem Ergebnis, ermittelten Behrens *et al.* bei A2780cis eine 6,8-fach niedrigere Sensitivität der A2780cis-Zellen mit einem IC₅₀-Wert von 46 µM Carboplatin im Vergleich zu den parentalen A2780-Zellen (IC₅₀-Wert = 6,8 µM) nach 72 h Inkubation [226]. Leichte Unterschiede in den IC₅₀-Werten sind vermutlich auf die Expositionsdauer von Cisplatin in der Routinekultur zurückzuführen (Cisplatinzugabe bei jeder Passage versus alle 2-3 Passagen). Auch eine geringere Zellteilungsrate von A2780cis (23 h) im Vergleich zu A2780 (27,5 h) in Normalmedium nach 72 h (Kapitel 3.1.2.) konnte auf der Grundlage der Ergebnisse von Behrens und Kollegen bestätigt werden. In proliferativ aktiven Zellen wird nach der Bindung von Carboplatin an die DNA hauptsächlich ein G2/M-Zellzyklusarrest mit anschließender Apoptose induziert [236]. Eine Herunterregulation der Anzahl der Zellteilungen ist somit eine mögliche

Folge der dauerhaften Exposition von Cisplatin in A2780-Zellen und der Herausbildung der Tochterzelllinie A2780cis in der Routinekultur. Bei einer gleichzeitig niedrigeren Zellteilungsrate findet auch eine langsamere, verzögerte Bindung des Carboplatins an die DNA statt. Die Folge ist ein verzögerter G2/M-Arrest mit einer erhöhten Einleitung der Mitose trotz bestehender Platin-DNA-Addukte. Dies führt schließlich zu der Akkumulation von Mutationen. Diese Mutationen können dann z. B. zu einer Aktivierung von Faktoren des Zellüberlebens (z. B. in der PI3K-AKT-Signaltransduktion) und schließlich zu einer ausgeprägten Resistenz gegenüber der jeweiligen Chemotherapie führen [237].

Des Weiteren kann eine spindelförmige, fibroblastische Zellform auf eine erhöhte Invasivität und einem Zellphänotyp in der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) hindeuten [238]. Um der Frage nachzugehen, ob eine spindelförmige, fibroblastische Zellform der A2780cis-Zellen (Kapitel 3.1.3.) mit einer erhöhten Zellmigration im Zusammenhang steht, wurde ein *Transwell-Assay* in einem FBS-Gradienten mit und ohne Carboplatinpräinkubation durchgeführt. Ein fibroblastischer Phänotyp der A2780cis-Zellen korreliert mit einer erhöhten Migration erst unter der Carboplatintherapie. Die kugelförmig-kolonieartig wachsenden A2780-Zellen hingegen wiesen in einem FBS-Gradienten im Vergleich zu A2780cis eine stark erhöhte Migration auf, die jedoch unter der Carboplatinpräinkubation um 25 % reduziert wurde. Unterstützend dazu lieferten Haslehurst *et al.* ähnliche Ergebnisse: Sie zeigten, dass der fibroblastische Phänotyp der A2780cis-Zellen in enger Korrelation mit dem Prozess der Epithelial-Mesenchymalen Transition und der daraus abgeleiteten differentiellen Genexpression von EMT-Markern wie *Snail* und *Slug* steht [239]. Viele neuere Studien belegen außerdem, dass der Prozess der EMT im Ovarialkarzinom eng mit der Entwicklung der Chemotherapieresistenz verknüpft ist. So erhöhen z. B. mesenchymale Faktoren, wie der Endothelin-Rezeptor Typ A, die Regenerationsfähigkeit und Migration von Ovarialkarzinomzellen nach der Platintherapie [240, 241]. Da eine erhöhte Motilität erst nach der Carboplatintherapie in den A2780cis eintritt, und die basal metabolische Aktivität der A2780cis-Zellen im Vergleich zu den A2780-Zellen relativ niedrig waren (Kapitel 3.1.1.), ist davon auszugehen, dass sich die Zellen unter Normalbedingungen in einer Art „Ruhezustand“ befinden. Dieser Ruhezustand kann dem Phänomen der Tumorstammzelle entsprechen: Tumorstammzellen proliferieren langsamer und zeigen erst bei Gewebeverletzungen oder anderen Stressstimuli eine erhöhte Motilität auf [242]. Andere zelluläre Prozesse, wie die replikative oder zelluläre Seneszenz, eine basal erhöhte Apoptoserate oder der Prozess der sogenannten *Quiescence* (nicht- bis gering-proliferierend aber metabolisch aktiv) können außerdem zu einer verringerten Zellteilungsrate von A2780cis beitragen. Diese Prozesse werden im Folgenden diskutiert.

4.2. Subkutane A2780cis-Tumoren wachsen langsamer

Nach Bestätigung der Kreuzresistenz der cisplatinresistenten A2780cis-Zellen gegenüber der Carboplatintherapie *in vitro*, wurde für die Identifizierung neuer molekularer Resistenzvermittelnder Faktoren das dreidimensionale Tumorwachstum in SCID-Mäusen analysiert. Dazu wurden A2780 und A2780cis-Zellen subkutan in SCID-Mäuse inokuliert und die resultierenden Tumoren für zwei Tage mit Carboplatin intravenös kurzzeittherapiert. Da der Zeitraum relativ kurz gewählt war, war davon auszugehen, dass keine starke Reduktion des Tumorwachstums nach dem Abschluss der Therapie festzustellen ist. Dies konnte auch beobachtet werden: Nur die A2780-abgeleiteten Tumoren wiesen eine leichte Tendenz einer reduzierten Tumorfläche auf.

Wie erwartet, konnte jedoch die Auswirkung der Carboplatinkurzzeittherapie auf histologischer Ebene eindeutig beobachtet werden: So zeigten A2780 eine starke Apoptoseinduktion (TUNEL) nach der Carboplatintherapie, jedoch nicht die A2780cis-Tumoren. Eine Proliferationsinhibition (Ki-67) war in beiden Tumorarten jedoch nicht zu detektieren (Kapitel 3.2.2.). Interessanterweise zeigten die A2780cis-Tumoren hier eine signifikant basal erhöhte Apoptoserate in der Vehikeltherapie. Der Begriff „*basal apoptotic range*“ (basale Apoptoserate) wurde für solche Krebsarten eingeführt, die durch Mutationen in der pro- bzw. antiapoptotischen Maschinerie eine höhere Apoptoserate aufzeigen [243]. Die erhöhte Apoptoserate der A2780cis-Tumoren kann einerseits aus der dauerhaften Cisplatinexposition in der Routinekultur oder aber auch andererseits auf Mutationen antiapoptotischer Proteine wie BCL2 resultieren [244]. Somit scheint die Wachstumshemmung der A2780cis-Zellen *in vitro* und das zugehörige verlangsamte Tumorwachstum *in vivo* nicht nur durch eine geringere Zellteilungsrate sondern auch durch ein erhöhtes Apoptose-Proliferationsverhältnis zurückzuführen sein. Eine geringe Apoptoseinduktion bei gleichbleibend hoher Proliferation in den carboplatintherapierten A2780cis-Tumoren zeigt hingegen die geringe Wirksamkeit der Carboplatintherapie im Vergleich zu den A2780-Tumoren. Der Verlust der Fähigkeit von Zellen nach der Chemotherapie die Apoptose einzuleiten, wird als Apoptoseresistenz bezeichnet, und bildet eines der Hauptmerkmale der Krebsentstehung und der Entwicklung der Chemotherapieresistenz [245, 246].

4.3. Hauptfaktoren in der A2780cis-Chemotherapieresistenz: P53 und AKT

Die Resistenz gegenüber der Induktion der Apoptose kann unter anderem auf eine verminderte proapoptotische oder eine erhöhte antiapoptotische Signaltransduktion zurückzuführen sein. Im Konsens dazu, zeigten A2780cis-Tumoren keine Veränderung der Proteinexpression des antiapoptotischen Gens BCL2 unter der Carboplatinkurzzeittherapie. A2780-Tumoren wiesen

hingegen eine starke Herunterregulation dieser Faktoren nach Carboplatin-Gabe auf. Die Überexpression von BCL2, einem Mitglied der BCL2-Superfamilie, kann durch die Inhibition der Freilassung proapoptotischer Proteine aus dem Mitochondrium, zu einer Chemoresistenz bzw. zu einer Resistenz gegenüber der Induktion der Apoptose führen [247, 248]. Interessanterweise ist die basale Expression von BCL2 in den A2780cis-Tumoren niedriger als in den A2780-Tumoren. Dies könnte somit zu einer basal erhöhten Apoptoserate beitragen (Kapitel 4.2.). Des Weiteren war keine Veränderung der Cyclin D1-Proteinexpression in A2780cis-Tumoren nach Carboplatintherapie festzustellen. Auch Cyclin D1 spielt neben der Inhibition der Apoptose eine Schlüsselrolle in der Tumorzellproliferation durch die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und 6 in G1/M trotz schwerer DNA-Schäden [249]. Außerdem korreliert eine Cyclin D1 Überexpression mit einer schlechten Prognose und einer geringeren Chemotherapiesensitivität in Patientinnen mit einem serösen Ovarialkarzinom [250]. Dies unterstützt die These, dass A2780cis-Zellen u. a. durch einen erhöhten Cyclin D1-vermittelten Eintritt in den nächsten Teilungszyklus bei G1/S und einen verzögerten G2/M-Arrest nach Carboplatintherapie aufweisen.

A2780cis-Tumoren zeichneten sich nach der Carboplatintherapie durch eine abwesende P21-Proteinexpression aus. P21 hat abhängig von seiner posttranslationalen Modifikation (PTM) durch Phosphorylierung (z. B. durch AKT) unterschiedliche Funktionen in der Zelle nach der Exposition mit genotoxischen Substanzen wie Platinkomplexen. So führt beispielsweise eine AKT1-vermittelte P21-Phosphorylierung zu einer Unterbindung der Wanderung von P21 in den Zellkern, um dort einen Zellzyklusarrest hervorzurufen [131]. Ein erhöhtes P21-Level im Nukleus ist hingegen ein Indikator für einen funktionalen Zellzyklusarrest und einer gleichzeitigen Reparatur der DNA-Schäden [251]. Eine absolute Abwesenheit der P21-Expression (ohne PTM) lässt hingegen auf ein Ausbleiben eines Zellzyklusarrestes nach Carboplatininkubation schließen. Dies kann unter anderem auch auf eine abwesende Regulation durch P53 verursacht sein: Eine P53-abhängige P21-Regulation in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung wurde schon früh durch Macleod *et al.* im Jahre 1995 beschrieben [252]. Keine oder nur eine geringe Hochregulation an phosphoryliertem P53 war dementsprechend in den carboplatintherapierten A2780cis-Tumoren zu detektieren. Dies wurde mittels *Proteom Profiler Array* an allen drei Phosphorylierungsstellen (S15, S392, S46) und durch *Westernblot*-Analyse an S15 bestätigt (Kapitel 3.2.5.). Somit ist das Unterbleiben eines Zellzyklusarrestes nach der Carboplatintherapie am wahrscheinlichsten durch eine unzureichende P53- und P21-Aktivierung zu erklären. Das ist nicht überraschend, da viele platinvermittelte Resistenzmechanismen vor allem auf der Fehlregulation der P53-vermittelten Zellzykluskontrolle beruhen [122]. Auch die Anzahl der P53-Mutationen im primären, serösen Ovarialkarzinom (50 - 60 %) sprechen für sich [30]. Eine Sequenzierung der Zelllinien A2780

und A2780cis ermittelte jedoch einen P53-WT in beiden Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Somit scheint die ausbleibende Aktivierung von P53 nach Carboplatinkurzzeittherapie durch andere Faktoren verursacht zu sein.

Die fehlerhafte Aktivierung von P53 zieht verschiedene Signalwege nach sich, die unter anderem eine Hochregulation von Komponenten der Überlebenssignaltransduktion ermöglichen. Ein bekannter Mechanismus ist unter anderem die verstärkte PI3K-AKT-Signaltransduktion. Ein erhöhtes phospho-AKT-Level korreliert mit einer niedrigen P53-Aktivierung und einem chemotherapieresistenten Phänotyp des Ovarialkarzinoms [148]. Dies wurde auch in den resistenten A2780cis-Tumoren im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. So zeigten subkutane A2780cis-Tumoren in der Vehikeltherapie eine höhere AKT-Phosphorylierung an Ser473 als A2780-Tumoren. Außerdem konnte nach erfolgter Carboplatinkurzzeittherapie nur eine geringe Reduktion der AKT-Phosphorylierung an Ser473 in den A2780cis-Tumoren mittels *Proteom Prolifer Array* und *Westernblot*-Analyse detektiert werden. Carboplatinbehandelte A2780-Tumoren wiesen hingegen eine Dephosphorylierung von AKT und eine erhöhte P53-Aktivierung auf.

Neben P53 und P21 kann AKT auch die nukleare Akkumulation des Zellzyklusinhibitors P27 durch dessen Phosphorylierung inhibieren [152]. Im Konsens dazu, beinhalteten vehikelbehandelte A2780cis-Tumoren eine mehr als zweifache Hochregulation des phosphorylierten P27, welches jedoch durch die Carboplatinkurzzeittherapie auf das Niveau der A2780-Tumoren herunterreguliert wurde. Zusätzlich zeigten A2780cis-Tumoren unter der Carboplatinkurzzeittherapie eine verminderte Aktivierung der *Checkpointkinase* CHEK1. AKT kann durch die Phosphorylierung von CHEK1 die Signaltransduktion der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung inhibieren [153]. Die nachfolgende Signaltransduktion zu der DNA-Schädigung bleibt aus und die A2780cis-Tumorzellen unterlaufen erneut die Mitose.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich eine stark erhöhte p38-MAPK- α -Phosphorylierung im Basalzustand der A2780cis-Tumoren festgestellt, welche unter Carboplatinkurzzeittherapie wieder herunterreguliert wurde. Die A2780-Tumoren hingegen zeigten eine leichte Hochregulation von p38-MAPK- α unter Carboplatinkurzzeittherapie. Dies ist auf die Pleiotropie von P38-MAPK- α zurückzuführen [253]: P38-MAPK- α ist beispielsweise in der Lage als proapoptotischer Faktor in Neuronen zu wirken, indem dieser die PI3K-AKT-Signaltransduktion inhibiert [254]. Guo *et al.* zeigten hingegen eine p38-MAPK- α -vermittelte Phosphorylierung von AKT in der Entstehung der Chemoresistenz des Magenkarzinoms [255]. Des Weiteren wurde durch *Westernblot*-Analyse gezeigt, dass A2780- und A2780cis-Tumoren mit oder ohne Carboplatinkurzzeittherapie keine Veränderung in der p42/p44-(ERK1/2)-Proteinexpression aufweisen. Ein niedriges Level von ERK1/2 und eine erhöhte p38-MAPK- α -Phosphorylierung werden mit der Entstehung der Tumordormanz in Verbindung gesetzt [256]. Wir haben in unserem Fall zwar kein niedriges Level von ERK1/2, jedoch ein unverändertes Proteinlevel

dieser Faktoren nach Carboplatintherapie. Somit könnte eine erhöhte p38-MAPK- α -Phosphorylierung im Basalzustand der A2780cis für eine geringe Zellteilungsrate und ein geringeres Tumorwachstum verantwortlich sein.

4.4. A2780cis-Tumoren befinden sich in einem „Ruhezustand“

Nach der Feststellung der Kreuzresistenz der A2780cis-Zellen *in vitro* und einer möglichen Ursache dieser Kreuzresistenz auf Proteinebene *in vivo*, sollte nun ein umfangreiches genomisches Bild der A2780- und A2780cis-Tumoren erstellt werden. Dazu wurde RNA der kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren isoliert, auf humane Genexpressionschips hybridisiert und anschließend eine differentielle Genexpressionsanalyse durchgeführt (Kapitel 3.3.). Das umfangreiche genomische Bild von A2780cis sollte vor allem der Identifizierung neuer resistenzvermittelnder Faktoren dienen. Eine Analyse der differentiellen Genexpression in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung, in der Seneszenz und in der Apoptose nach Carboplatinkurzzeittherapie sollte außerdem Aufschluss auf die zuvor detektierte erhöhte Apoptoserate und die Art des „Ruhezustands“ der A2780cis-Zellen geben.

Wie bereits im Kapitel 1 und 3 erwähnt, ist die Signaltransduktion der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung einer der Hauptsignalwege in der zytotoxischen Wirkungsweise von Platinkomplexen. Platinkomplexe binden nach dem Transport in den Nukleus an die DNA, verursachen dort eine Überdehnung und es kommt zu DNA-Brüchen. Diese DNA-Brüche werden u. a. durch die ATM-Kinase neben einer Vielzahl anderer Proteinen erkannt. Nach der Autophosphorylierung von ATM kommt es zu einer Kaskade an Phosphorylierungen von CHEK1 und CHEK2, CDC25, CDC2 sowie P53 und schließlich zu einem G2/M-Arrest oder der Induktion der Apoptose (Kapitel 1.3.1.) [59, 76, 257].

Die differentielle Genexpressionsanalyse der Komponenten in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung ergab eine starke RNA-Herunterregulation von ATM, CHEK1, CHEK2, CDC25, CDC2 sowie P53 im Basalzustand der A2780cis-Tumoren im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren. Diese Herunterregulation wurde in der Carboplatinkurzzeittherapie z. T. wieder aufgehoben (Kapitel 3.3.1.). Im Gegensatz dazu zeigten die platinsensitiven A2780-Tumoren nur eine leichte Herunterregulation der ATM-Signalkaskade hinsichtlich der CHEK1-RNA-Expression nach der Carboplatinkurzzeittherapie. Mutationen bzw. Herunterregulationen der ATM-Kinase korrelieren mit der Entwicklung einer Chemotherapieresistenz und mit einem geringeren Überleben von Patientinnen mit verschiedenen Tumorindikationen [258, 259]. Auch eine fehlende Aktivierung des ATM-Zielmoleküls, CHEK2, wird in den Zusammenhang mit der Entwicklung der Platinresistenz in Ovarialkarzinomzelllinien gebracht [128]. Im Gegensatz dazu kann eine verstärkte Aktivierung der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung ebenfalls Ursache einer Resistenz gegenüber der Chemotherapie sein [260]. So ist in Abhängigkeit der zellulären

Situation einerseits die Hoch- aber auch die Herunterregulation der ATM-Signaltransduktion verantwortlich für die Entwicklung der Chemotherapieresistenz [261]. Bezüglich der A2780cis-Tumoren scheint die Herunterregulation der ATM-Signaltransduktion ein Überlebensvorteil zu sein, indem der Zellzyklusarrest vor der Carboplatintherapie bei spontan anfallenden DNA-Schädigungen und nach der Carboplatintherapie unterdrückt wird. Die beobachtete Hochregulation der Komponenten der ATM-Signaltransduktion bei drei von fünf Tumoren nach Carboplatintherapie könnte aber auch auf eine verstärkte Reparatur der platininduzierten DNA-Schäden hindeuten und somit ebenfalls ein Überlebensvorteil darstellen. Dies spiegelt sich auch in der differentiellen Genexpression von P53 und seinem Inhibitor MDM2 wieder. So korreliert eine erhöhte MDM2 Expression mit einer niedrigen Aktivierung der ATM-Signalkaskade und umgekehrt. Außerdem ist - wie auf Proteinebene (Kapitel 3.2.5.) - die RNA-Expression von P53 in den carboplatintherapierten A2780cis-Tumoren trotz der erhöhten ATM-Signaltransduktion sehr niedrig. Fazit ist also, dass die fehlende Stabilisierung der Zellzyklusinhibitoren P21 und P53 auch auf eine Deregulation der ATM-Signaltransduktion zurückgeführt werden kann. Die Abwesenheit der ATM-Signaltransduktion in den A2780-Tumoren nach Carboplatintherapie spricht außerdem für eine ATM-unabhängige Sensitivität gegenüber der Carboplatintherapie in diesen Tumoren.

Des Weiteren wurde die Genexpression von NF- κ B, als einer der wichtigen Gegenspieler zur ATM-induzierten Apoptose, analysiert. Nach der Herausbildung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch z. B. Carboplatin kann es über die ATM/IKK-Achse und der ATM-abhängigen Aktivierung des NF- κ B-Regulators NUMO zur Aktivierung von NF- κ B kommen [262]. Auf der anderen Seite ist die IKB- α -abhängige Repression von NF- κ B ein wichtiges Signal um ein Überleben nach schwerer DNA-Schädigung zu verhindern [263]. Andere Signalwege über RAS, EGFR oder HER2 können außerdem eine Aktivierung von NF- κ B unabhängig der ATM-Signaltransduktion induzieren [264]. So ist beispielsweise die PI3K-AKT-abhängige Erhöhung der transkriptionalen Aktivität von NF- κ B ein zentraler Mechanismus in der Herausbildung der Resistenz gegenüber genotoxischen Substanzen [229]. In den A2780cis-Tumoren ist eine verstärkte Genexpression aller NF- κ B-Untereinheiten mit und ohne Carboplatinkurzzeittherapie zu verzeichnen. Interessanterweise verhielt sich die NF- κ B-Expression reziprok zur Aktivierung der ATM-Signaltransduktion. Daraus ist abzuleiten, dass die erhöhte NF- κ B-Signaltransduktion der A2780cis-Tumoren ATM-unabhängig, z. B. durch die PI3K-AKT-Signaltransduktion, reguliert wird. Diese Annahme kann durch die erhöhte AKT-Phosphorylierung in den vehikel- als auch carboplatinkurzzeitbehandelten A2780cis-Tumoren unterstützt werden (Kapitel 3.2.5.) Des Weiteren könnten eine unzureichende NUMO- oder IKB- α -Expression Ursachen für eine verstärkte ATM-unabhängige Genexpression in den A2780cis-Tumoren sein. Eine Untersuchung des Expressionslevels von dem NF- κ B-Inhibitor IKB- α oder von NUMO würde diesbezüglich

Aufschluss geben. Im Vergleich zu den A2780cis-Tumoren ist in den carboplatinbehandelten A2780-Tumoren nur eine geringe bis keine Hochregulation der NF- κ B-Expression zu verzeichnen. Somit wird einem Überlebenssignal durch NF- κ B in den A2780-Tumoren nach der Carboplatintherapie entgegengewirkt.

Bei einer anhaltenden DNA-Schädigung kann neben der Einleitung der Apoptose auch der tumorsuppressive Mechanismus der zellulären Seneszenz eingeleitet werden. Dieser Prozess induziert einen irreversiblen Zellzyklusarrest um einer möglichen Transformation vorzubeugen. Im gesunden Organismus werden die seneszenten Zellen schließlich durch Makrophagen und andere Komponenten des Immunsystems eliminiert [265, 266]. Werden diese Zellen jedoch nicht eliminiert, kann der Status der Seneszenz auch die Basis eines Rezidivs sein, indem beispielsweise P53 – der Hauptmediator der Seneszenz – in den seneszenten Zellen inaktiviert wird [230]. Um eine eventuell verstärkte oder verminderte Induktion der Seneszenz in den A2780cis-Tumoren festzustellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die differentielle Genexpressionanalyse von Seneszenzgenen (Kapitel 3.3.2.) in den kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren durchgeführt. Hierbei konnte auf der Basis des gesamten humanen Genoms bei A2780 und A2780cis eine differentielle Genexpression von insgesamt sieben seneszenzabgeleiteten Genen identifiziert werden. Dabei handelte es sich um die Hochregulation der Gene ATR, CDK6, HRAS, ID2, NUA1 und PRKCD in den vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren, die unter der Carboplatintherapie z. T. wieder herunterreguliert wurden.

Toledo *et al.* zeigten dass ATR – nicht ATM – in einem P53-abhängigen Mechanismus für einen seneszenzinduzierten Zellzyklusarrest essentiell ist [267]. Frühe Studien belegten außerdem, dass die alleinige Zugabe des mutierten Ras-Gens (HRAS^{V12}) den Prozess der sogenannten onkogen-induzierten Seneszenz hervorrufen kann [268]. Auch die anderen identifizierten Komponenten (ID2, NUA1, PRKCD, CDK6) sind in dem Prozess der replikativen Seneszenz involviert [269-271]. Angesichts der geringen Anzahl der differentiellen Genexpression der untersuchten Faktoren ist im Allgemeinen davon auszugehen, dass die zelluläre Seneszenz kein Hauptmediator der Platinresistenz in den A2780cis-Tumoren ist. Dennoch könnte der Prozess der zellulären Seneszenz die geringere metabolische Aktivität und die basal erhöhte Apoptoserate in vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren erklären (Kapitel 3.2.2.). Somit ist die zelluläre Seneszenz in den vehikeltherapierten A2780cis-Tumoren vielmehr als ein tumorsuppressiver Mechanismus zu verstehen. Dies würde zumindest die Herunterregulation dieser Seneszenzgene in den A2780cis-Tumoren unter der Carboplatintherapie erklären. Unterstützend dazu ist die nur geringe carboplatinvermittelte Hochregulation der CDKN1-Genexpression in den A2780cis-Tumoren zu erwähnen. Ektopische Expression von P21 in einem zellulärem System kann einen irreversiblen Zellzyklusarrest und die Induktion der zellulären Seneszenz hervorrufen, auch wenn P21 dem System wieder entzogen wird [272]. Somit spricht

ein abwesender oder geringer P21-vermittelter Zellzyklusarrest auch gegen einen starken Einfluss der zellulären Seneszenz in den A2780cis-Tumoren unter Carboplatintherapie. A2780-Tumoren hingegen weisen eine starke CDKN1A-Genexpression (konsistent mit der P21-Proteinexpression, Kapitel 3.2.4) auf, aber nur eine geringe bis keine Hochregulation der anderen seneszenzinduzierten Gene nach der Carboplatinkurzzeittherapie. Dies spricht eher für einen seneszenzunabhängigen Mechanismus der P21-Aktivierung in den A2780-Tumoren.

Die sensible Balance zwischen Überleben, Zellzyklusarrest und Apoptose nach Platinexposition kann an verschiedenen Stellen gestört werden. Ein Hauptmechanismus der Entstehung der Resistenz gegenüber der Platintherapie ist die Unfähigkeit nach schweren, irreparablen DNA-Schädigungen die Apoptose einzuleiten (Apoptoseresistenz). Letai *et al.* postulierte hierbei, dass nur wenige deregulierte anti- bzw. proapoptotische Gene in Tumoren zu der Entstehung einer Resistenz führen. Die differentielle Genexpressionsanalyse proapoptotischer Gene in den kurzzeittherapierten Tumoren ergab eine stark reduzierte Apoptoseinduktion bei 23 der 128 untersuchten Gene in den A2780cis-Tumoren unter Vehikel- und Carboplatintherapie im Vergleich zu den vehikeltherapierten A2780-Tumoren. Interessanterweise war FAS (Mediator des extrinsischen Apoptosesignalweges) in den A2780-Tumoren nach Carboplatintherapie stark hochreguliert, jedoch nicht in den A2780cis-Tumoren. Dies lässt eine verminderte extrinsische Induktion der Apoptose in den A2780cis-Tumoren nach Carboplatintherapie vermuten. Des Weiteren zeigten beide Tumorvarianten unter der Carboplatintherapie eine stark erhöhte CD70-RNA-Expression. Vor Kurzem zeigten Liu *et al.*, dass eine erhöhte CD70-Expression mit der klinischen Resistenz gegenüber der cisplatinbasierten Therapie und mit einem geringen Überleben bei Patientinnen mit einem fortgeschrittenem Ovarialkarzinom korreliert [273]. Auch P53INP1, welcher auch in vehikeltherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren hochreguliert ist, korreliert z. B. mit der erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs in Patienten mit einem Prostatakarzinom [274]. Da diese Faktoren auch in den A2780-Tumoren hochreguliert sind, könnte dies ein Hinweis auf eine beginnende Resistenz (intrinsische Resistenz) gegenüber der Carboplatintherapie sein.

A2780cis-Tumoren weisen also ein komplexes molekulares Netzwerk an bekannten Resistenzmechanismen gegenüber der Platintherapie auf und sind somit ein geeignetes Modell für die Identifizierung potentiell neuer resistenzvermittelnder Faktoren.

4.5. Das Lineare Modell ermöglicht die Identifizierung resistenzabgeleiteter Faktoren

Die Resistenz eines Tumors gegenüber der Chemotherapie kann schon vor dem ersten Behandlungszyklus z. B. durch Mutationen von P53 bereits vorhanden sein (intrinsische

Resistenz) oder sich während der Exposition des Platins schrittweise durch mehrere genomische Ereignisse entwickeln (erworbene Resistenz) [64, 275]. Zu der Identifizierung resistenzvermittelnder Faktoren wird häufig die Methode der *N-Way*-ANOVA zum Vergleich sensitiver versus resistenter Tumorzelllinien bzw. zelllinienabgeleiteter Tumoren angewandt. Problematisch ist jedoch die Tatsache der induzierten Resistenz in Kultur. Hierbei kann sich die resistente Tumorzelllinie über mehrere Passagen vermehrt resistenzunabhängige Eigenschaften, die z. B. das 2D-Wachstum in Kultur betreffen, aneignen. Des Weiteren wird selten der Einfluss der Chemotherapie selbst in die statistische Analyse miteinbezogen. Um diese resistenzunabhängigen Faktoren auszuschließen und eine (mögliche) intrinsische Resistenz in Korrelation mit der Chemotherapie miteinzubeziehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die statistische Methode des Linearen Modells auf die im *Whole Genome Bead Chip Array* (HT-12v3) ermittelten Genexpressionsdaten angewandt (Kapitel 2.2.7.1.). Insgesamt 74 differentiell exprimierte Gene wurden im Vergleich der vehikel- als auch carboplatintherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren durch das Lineare Modell identifiziert. Eine „*pathway enrichment analysis*“ ermöglichte außerdem die Einordnung der 74 differentiell exprimierten Gene in den Prozess der Apoptose (Kapitel 3.3.4.). Dieses Ergebnis unterstützt somit die im vorangegangenen Kapitel diskutierte Aussage, dass die Resistenz der A2780cis-Tumoren vorrangig auf der Deregulation der Apoptosemaschinerie basiert.

Um die Funktionalität der im Linearen Modell identifizierten potentiell resistenzabgeleiteten Gene zu überprüfen, wurden die Gene selektiert die eine carboplatininduzierte Hochregulation in den A2780-Tumoren und eine basal erhöhte Genexpression in den A2780cis-Tumoren aufweisen. Die selektierten Gene DRAM1, GDF15, SULF2, P4HA2 und LMNA wurden anschließend mittels qRT-PCR, *Westernblot* oder ELISA evaluiert. Im Allgemeinen konnte die differentielle Genexpression dieser fünf Gene im *Whole Genome Bead Chip Array* (HT-12v3) mittels quantitativer RT-PCR validiert werden. DRAM1, GDF15, SULF2, P4HA2 und LMNA zeigten eine carboplatininduzierte RNA-Hochregulation nach erfolgter Carboplatintherapie in den sensitiven Tumoren und eine basal erhöhte Genexpression in den A2780cis-Tumoren. Des Weiteren wurde – außer bei SULF2 – eine geringe oder keine weitere carboplatininduzierte RNA-Hochregulation aller fünf Gene in den A2780cis-Tumoren detektiert. Auch *in vitro* wurden ähnliche Ergebnisse reproduziert. Eine weitere Analyse dieser fünf Gene auf Proteinebene mittels *Westernblot* oder ELISA ergab jedoch z. T. Unstimmigkeiten in der Regulation in der RNA-Expression und der Proteinexpression in den kurzzeittherapierten A2780- und A2780cis-Tumoren. Dies ist eventuell auf unterschiedliche RNA- und Proteinhalfwertszeiten, negative sowie positive *Feedbackloops* oder posttranslationale Modifikationen zurückzuführen. Außerdem könnten Komponenten der Tumorumgebung für die unterschiedliche RNA- und Proteinexpression *in vitro* und *in vivo* verantwortlich sein. So könnten eingewanderte

tumorassoziierte Fibroblasten oder Makophagen Faktoren ausschütten, die die Expression der untersuchten Gene minimieren oder erhöhen [276]. Auch die Höhe der Genexpressionslevel nach der Therapie unterschied sich z. T. *in vitro* und *in vivo* in beiden Zelllinien. Dies ist z. B. eventuell auf eine unterschiedliche Art und Dauer der Carboplatinexposition zurückzuführen. Carboplatin wird für zwei Tage (jeweils Einzeldosis) intravenös in Mäuse appliziert und gelangt über das Blutgefäßsystem und Diffusion in die Tumorzellen. In Kultur werden die Tumorzellen hingegen direkt mit Carboplatin über einen Zeitraum von 72 h exponiert. Somit ist die effektive Carboplatinkonzentration höchstwahrscheinlich für die unterschiedliche carboplatininduzierte RNA-Expression ausschlaggebend. Mögliche posttranslationale Modifikationen etc. und der Beitrag der fünf Gene zu der Chemotherapieresistenz der A2780cis-Tumoren werden im Folgenden ausführlich diskutiert.

LMNA

LMNA kodiert für die kleinen Strukturproteine (Intermediärfilamente) Lamin A und C, die als Hauptbestandteil der Kernmembran den Transport von Proteinen in und aus dem Zellkern koordinieren und in den Prozessen der Chromatinorganisation, der Genregulation und in der DNA-Reparatur involviert sind [231]. Bei LMNA war eine höhere carboplatininduzierte RNA-Hochregulation in den A2780-Zellen *in vitro* im Vergleich zu den zugehörigen Tumoren *in vivo* zu beobachten. In malignen Geweben ist eine Hochregulation von Lamin A für verschiedene Tumorindikationen, wie dem Ovarialkarzinom, bekannt [277]. Als Bestandteil der Zellmembran werden Deregulationen der Laminexpression außerdem in Verbindung mit einem verformten Zellkern und dem mechanischen Stress in der Tumorumgebung gebracht [278]. Somit könnte auch die 2D-Organisation (größere Ausbreitungsfläche) im Vergleich zu einem dreidimensionalen Tumorwachstum die Ursache für die unterschiedliche LMNA-RNA-Expression *in vitro* und *in vivo* sein. Wie bereits angedeutet, war kein Unterschied in der LMNA-Proteinexpression in den kurzzeitbehandelten A2780- und A2780cis-Tumoren zu identifizieren. Die meisten Lamine unterlaufen einen mehrschrittigen Prozess in der posttranslationalen Modifikation, der u. a. eine Farnesylierung und eine katalytische Restriktion zum reifen Protein beinhaltet [279]. Einerseits könnte die Carboplatinkurzzeittherapie zeitlich nicht ausgereicht haben, um eine Veränderung des reifen LMNA-Proteins hervorzurufen (Proteinhalbwertszeit). Andererseits wäre es möglich, dass bereits die LMNA-RNA-Expression zu einer Resistenz der A2780cis-Zellen beiträgt. Eine basal erhöhte LMNA-RNA-Expression könnte beispielsweise eine Plattform für Faktoren der DNA-Reparatur wie z. B. dem *P53 binding Protein 1* (53BP1) bieten [280]. Des Weiteren zeigten Maresca *et al.*, dass eine LMNA-RNA-Herunterregulation zu einem Verlust der Fähigkeit der Zelldifferenzierung von Neuroblastomzellen führt und mit einem erhöhten aggressiven Tumorwachstum korreliert [281]. In den A2780cis-Tumoren findet keine weitere carboplatininduzierte Veränderung der LMNA-Expression statt. Dies unterstützt die

These, dass A2780cis-Zellen in der Lage sind, mögliche Gewebeschäden nach der Carboplatingabe aufgrund einer erhöhten Regenerationsfähigkeit zu eliminieren.

DRAM1

DRAM1 ist ein lysosomales Protein welches als integrativer Bestandteil in den Autophagosomen in einem P53-abhängigen Mechanismus die Autophagie auslösen kann [233]. Autophagie ist ein zellulärer Prozess der bei Wachstumsfaktormangel die Apoptose auslöst oder in einem sogenannten „Selbstverdauungsprozess“ aus eigenen Zellbestandteilen Energie bereitstellen kann [282]. Auch bei der malignen Transformation kann eine erhöhte Autophagie zu einem Überleben in einer „ernährungsarmen“ Umgebung führen. [283]. Die DRAM1-qRT-PCR unterstützte das Resultat des *Microarrays*, wobei die DRAM1-Proteinexpression keine Veränderungen in den vehikel- bzw. carboplatinbehandelten A2780- und A2780cis-Tumoren aufzeigte. Es wird bisher angenommen, dass eine erhöhte DRAM1-Expression, ein tumorsuppressiver Mechanismus ist, indem es durch Autophagie den Zelltod auslöst [284]. Dies steht annähernd im Einklang mit der DRAM1-Regulation in den A2780- und A2780cis-Tumoren: So löst die erhöhte DRAM1-RNA-Expression - ähnlich wie die basal erhöhten Apoptoserate - einen verstärkten Autophagie-induzierten Zelltod aus und verlangsamt somit das A2780cis-Tumorwachstum. Unter Carboplatintherapie jedoch wird dieser Prozess nicht weiter erhöht, wohingegen die carboplatinbehandelten A2780-Tumoren einen verstärkten DRAM1-vermittelten Autophagie-auslösenden Zelltod aufzeigen könnten. Für die Erklärung der unterschiedlichen RNA- und Proteinexpression in den A2780- und A2780cis-Tumoren gelten die gleichen Ansätze wie zuvor zu der LMNA-Expression diskutiert. Unterschiedliche RNA/Proteinhalbwertszeiten und posttranslationale Modifikationen, die einen Unterschied zwischen RNA- und Proteinregulation erklären, sind jedoch bisher noch nicht bekannt.

P4HA2

Kollagen-Proly-4-Hydroxylasen sind Schlüsselenzyme in der Kollagensynthese, indem sie die Hydroxylierung von Prolinen katalysieren [232]. Eine erhöhte P4HA2-Expression steht mit der Progression verschiedener Krebsarten und einer schlechten Prognose, wie z. B. bei Brustkrebs, im Zusammenhang. Eine erhöhte *in-vivo*-RNA-Expression von P4HA2 war nach der Carboplatintherapie in den A2780-Tumoren zu detektieren, jedoch nicht in den A2780cis-Tumoren. Dabei war die basale P4HA2-RNA-Expression in den vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren höher als in den vehikelbehandelten A2780-Tumoren. Als Onkogen ermöglicht P4HA2 eine verstärkte Kollagensynthese und erhöht somit die Motilität von Tumorzellen [285]. Somit könnte eine basal erhöhte Expression von P4HA2 unter anderem auch den fibroblastischen Phänotyp und die Fähigkeit einer verstärkten Migration unter Carboplatintherapie (Kapitel 3.1.3.) der A2780cis-Zellen erklären. Auch die Hochregulation der P4HA2-RNA-Expression in

den A2780-Zellen könnte zudem ein beginnender „Escape“-Mechanismus der A2780-Zellen unter Carboplatintherapie sein und somit als ein möglicher Faktor der intrinsischen Resistenz fungieren. In Anlehnung an die LMNA- sowie DRAM1-Proteinexpression gelten auch hier die in den vorangegangenen Abschnitten möglichen Erklärungen zu Proteinhalbwegszeiten und posttranslationalen Modifikationen.

SULF2

Sulfatasen - wie SULF2 - sind ca. 870-Aminosäurenlange Enzyme die durch Modifikation von Heparansulfatseitenketten an der Zelloberfläche die Bindung von Wachstumsfaktoren fördern (z. B. Wnt) oder inhibieren (z. B. FGF2) können [234]. Als reifes aus einem Proprotein hervorgehenden Enzym, werden Sulfatasen sezerniert oder verbleiben an den Komponenten der Extrazellulären Matrix gebunden [286]. Für SULF2 konnte eine starke carboplatininduzierte RNA- sowie Proteinexpression in den A2780-Tumoren *in vitro* und *in vivo* ermittelt werden. Im Gegensatz dazu war in den carboplatinbehandelten A2780cis-Tumoren sogar eine leichte bis starke Herunterregulation der RNA- und Proteinexpression zu detektieren. SULF2-Überexpression ist mit der Entstehung vom kleinzelligen Lungenkrebs verbunden und könnte ein potentielles neues therapeutisches Zielmolekül in der Krebstherapie darstellen [234]. Eine SULF2-Überexpression im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Chemotherapieresistenz im Ovarialkarzinom wurde bisher noch nicht untersucht. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass eine Methylierung des SULF1-Gens (ein Tumorsuppressor im Gegensatz zu SULF2) in primären Ovarialkarzinomen mit einer schlechten Ansprechbarkeit gegenüber der Chemotherapie korreliert [287]. Auf der Basis der abwesenden Proteinexpression und der leichten Herunterregulation der SULF2-RNA könnte dies in den A2780cis-Tumoren ein ähnliches Ereignis sein. Um das jedoch nachzuprüfen, wäre eine Analyse des DNA-Methylierungsstatus des SULF2-Gens in den A2780cis-Tumoren als auch in den A2780-Tumoren nach der Carboplatintherapie nötig. Des Weiteren könnte eine epigenetische Stilllegung von SULF2 durch Komponenten der Tumorumgebung verursacht sein. SULF1 verringert die Bindung von Wachstumsfaktoren, wobei SULF2 sie erhöht. So könnte zusätzlich eine Stilllegung des SULF2-Gens in den A2780cis-Tumoren zur verringerten Bindung von Wachstumsfaktoren führen und somit zu einem verringerten Tumorstadium beitragen. Ein verlangsamtes Tumorstadium bringt dementsprechend weniger replizierende Zielzellen für die Chemotherapie hervor und erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Resistenz. Die Untersuchung des Zusammenspiels von Wachstumsfaktoren, Extrazellulärer Matrix und der Expression von SULF2 wären somit Vorschläge für weiterführende Experimente.

GDF15

Die im *Microarray* ermittelte differentielle Genexpression von GDF15 in A2780- und A2780cis-Tumoren mit und ohne Carboplatintherapie konnte mithilfe der qRT-PCR und ELISA validiert werden. So zeigten A2780-Zellen eine starke carboplatininduzierte RNA- und Proteinhochregulation von GDF15 im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollbehandlung *in vitro* und *in vivo*. Auch für die vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren konnte eine basal erhöhte GDF15-Expression detektiert werden, die unter der Carboplatintherapie jedoch keine weiteren Veränderungen zeigte. GDF15, ist - wie im Kapitel 1.5.2. – Kapitel 1.5.6. bereits ausführlich beschrieben - ein pleiotroper Faktor in der Tumorprogression. So kann GDF15 zum einen als ein Tumorsuppressor fungieren, indem er das Tumorwachstum inhibiert oder zum anderen zu einer verstärkten Invasivität und Resistenz gegenüber der Chemotherapie beiträgt. Die molekularen Funktionen von GDF15 sind z. T. noch nicht bekannt und hängen stark vom Zelltyp ab [205]. Eine Erläuterung der Funktionen von GDF15 in der Resistenzentwicklung von A2780cis *in vitro* und *in vivo* wird in den folgenden Kapiteln wiedergegeben. Hier soll zunächst auf die carboplatininduzierte Expression von GDF15 in der Kurzzeittherapie eingegangen werden.

In beiden Tumormodellen konnte eine übereinstimmende carboplatininduzierte Regulation der GDF15-Proteinlevel im Blutplasma und in dem zugehörigen Tumorgewebe detektiert werden. In gesunden Zellen und Geweben ist die GDF15-Expression niedrig und wird u. a. bei Entzündungsreaktionen und in der malignen Progression hochreguliert [179-183]. Bei Patientinnen mit einem serösen Ovarialkarzinom korreliert eine erhöhte GDF15-Expression in den Tumoren und im zugehörigen Plasma mit einer schlechten Prognose und einer geringeren Ansprechbarkeit gegenüber der Chemotherapie. Dies erlaubt GDF15 als prognostischen Marker in der Chemotherapie des Ovarialkarzinoms einzusetzen [211]. Auch in dieser Arbeit korreliert eine basal erhöhte GDF15-Expression mit dem platinresistenten Phänotyp des Ovarialkarzinommodells A2780cis. Auf der anderen Seite kann in einem P53-abhängigen Mechanismus die GDF15-Expression durch die Exposition von NSAIDs, Liganden der PPAR γ , Substanzen wie Genistein, Retinoid, Resveratrol und Chemotherapiereagenzien wie Etoposid und Doxorubicin erhöht werden und in einem proapoptotischen Phänotyp resultieren. Somit könnte die Hochregulation der GDF15-Expression in den A2780-Tumoren mit der proapoptotischen Wirkung von Carboplatin korrelieren. Unterstützend dazu, konnten auch Konstantinopoulos *et al.* in einem Vergleich von kontrollbehandelten versus cisplatinbehandelten A2780-Zellen eine GDF15-Hochregulation detektieren [288].

Des Weiteren kann die GDF15-Expression durch P53 induziert werden [207]. Im Konsens dazu, korreliert eine erhöhte GDF15-Expression in den A2780-Tumoren nach der Carboplatintherapie mit einem erhöhten P53-Phosphorylierungslevel. Bei den A2780cis-Tumoren war hingegen eine

ausbleibende Hochregulation der GDF15-Expression mit einer geringen Induktion der P53-Expression unter der Carboplatintherapie assoziiert (Kapitel 3.2.5.). So könnte die tumorsuppressive Eigenschaft von GDF15 in diesen Ovarialkarzinommodellen abhängig von der P53-Aktivität sein. Des Weiteren kann die GDF15-Expression in den A2780cis-Zellen kontextspezifisch verändert sein. Einige Faktoren, die das Überleben von Tumorzellen fördern, induzieren die Expression von GDF15. Dies sind beispielsweise AKT, HIF1 α oder NF- κ B [182, 187, 209, 289]. Dazu passend ist sowohl eine erhöhte AKT-Phosphorylierung als auch eine basal erhöhte NF- κ B-RNA-Expression in den resistenten-Tumoren zu detektieren. Eine basal höhere GDF15-Konzentration der A2780cis-Zellen wurde im Vergleich zu den A2780-Zellen in Kultur jedoch nicht beobachtet. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass GDF15 als reifes Protein an Komponenten der extrazellulären Matrix gebunden ist. Da eine 2D-Zellkultur nur geringfügig in der Lage ist eine Extrazelluläre Matrix aufzubauen, ist ein GDF15-Speicher unwahrscheinlich. In einem Tumor hingegen könnte ein potentieller GDF15-Speicher vorhanden sein, der z. B. bei Chemotherapie sofort in das Blut abgegeben wird (bei A2780-Tumoren), oder vermehrt reifes GDF15 an der Zelloberfläche im Grundzustand lagert (bei A2780cis).

Zusammenfassend zu den im linearen Modell identifizierten potentiellen resistenzabgeleiteten Genen ist zu erwähnen, dass alle Faktoren A) auf RNA-Ebene validiert werden konnten und B) laut Literaturrecherche in dem Prozess der Chemotherapieresistenz involviert sind bzw. sein könnten. Als besonders interessanter Faktor gilt GDF15, da dieser als Zytokin zum einen als prognostischer Marker für die Chemotherapieresistenz aber auch als therapeutisches Zielmolekül fungieren könnte.

4.6. GDF15, SULF2 und DRAM1 stehen zueinander in Relation

Um die GDF15-Funktion in dem resistenten Ovarialkarzinommodell A2780cis zu analysieren, wurde eine RNA-Herunterregulation von GDF15 zunächst mittels siRNA-Transfektion und anschließend mithilfe retroviraler shRNA-Transduktion durchgeführt. In A2780cis-Zellen konnte nach einem moderaten siRNA-vermittelten GDF15-*Knockdown* eine SULF2-Herunterregulation in A2780-Zellen sowie in A2780cis-Zellen beobachtet werden. Dies führt zu der Annahme, dass die SULF2-Expression z. T. durch GDF15 beeinflusst wird. Eine GDF15-abhängige Regulation von SULF2 ist in der Literatur bisher noch nicht bekannt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass SULF2 als Tumorsuppressor die pleiotrope Rolle von GDF15 in diesen beiden Zelllinien unterstützt. Dabei könnte beispielsweise eine erhöhte SULF2-Expression in den A2780-Zellen mit einem anti-proliferativen Phänotyp in der Carboplatintherapie korrelieren. Für die A2780cis-Zellen hingegen wäre denkbar, dass die SULF2-vermittelte Unterdrückung der Proliferation ein Resistenzmechanismus ist. Da das aktive SULF2-Protein in den A2780cis-Tumoren unter der Carboplatintherapie jedoch nicht zu detektieren war, kann davon

ausgegangen werden, dass weitere posttranslationale Modifikation eine wichtige Rolle spielen. Hierbei könnten, wie bereits im Kapitel 4.5. diskutiert, weiterführende Experimente Aufschluss geben.

Des Weiteren war nach einer siRNA-vermittelten Herunterregulation von GDF15 in A2780cis-Zellen eine starke Hochregulation der DRAM1-Expression festzustellen. Die A2780-Zellen zeigten hingegen eine siGDF15-vermittelte Herunterregulation der DRAM1-Expression. Wie bei SULF2 ist auch hier eine GDF15-vermittelte DRAM1-Expression noch nicht bekannt. Ähnlich wie bei SULF2, könnte DRAM1 die Tumorsuppressoraktivität von GDF15 in den sensitiven Zellen unterstützen. Die starke DRAM1-RNA-Hochregulation in den resistenten Zellen nach GDF15-Herunterregulation lässt jedoch eine gegensätzliche Rolle von DRAM1 in diesen Zellen vermuten. Möglich wäre hier, dass der zelltodauslösende Mechanismus der Autophagie in den resistenten Zellen durch die GDF15-vermittelte DRAM1-Herunterregulation unterdrückt wird.

Interessanterweise werden DRAM1, SULF2 und GDF15 jeweils durch P53 reguliert. Auch P4HA2 und LMNA scheinen P53-abhängige Mechanismen aufzuweisen [290, 291]. Somit ist abschließend festzustellen, dass das lineare Modell Gene identifiziert hat, die vor allem im Regelnetzwerk von P53 involviert sind. Dies ist im Zusammenhang der häufig vorliegenden P53-Signatur in Tumorgeweben bei Patientinnen mit einem Typ II oder „*High-Grade*“-Ovarialkarzinom besonders interessant [24].

4.7. GDF15 fungiert als Biomarker im Ovarialkarzinom

Um festzustellen, ob die carboplatininduzierte GDF15-Expression in den A2780-Tumoren nach Kurzzeittherapie und ein basal erhöhtes GDF15-Level in den A2780cis-Tumoren auch langfristig anhält, wurden A2780- und A2780cis-Tumoren dauerhaft mit Carboplatin behandelt (Carboplatinlangzeittherapie). Die Ergebnisse der Carboplatinkurzzeittherapie unterstützend, war im Vergleich zu den A2780-Tumoren im Laufe des Tumorwachstums ein höheres GDF15-Basallevel in den A2780cis-tragenden Tieren zu detektieren. Dieses basal erhöhte GDF15-Level wurde unter Carboplatintherapie kaum verändert. Die GDF15-Plasma-Level in den A2780-tragenden Tieren zeigten hingegen gleich zu Beginn der Therapie eine starke carboplatininduzierte GDF15-Hochregulation, die ab dem Therapietag 11 leicht sank. Dies zeigt, dass Carboplatin auch dauerhaft zu einer Induktion der GDF15-Expression in sensitiven Tumoren führen kann. Da GDF15 ein P53-induzierter Faktor ist, suggeriert eine leichte Abnahme zum Ende der Therapie, dass P53 die Transaktivierung von GDF15 nicht mehr ausführt. Dies führt wiederum zu der Annahme, dass sich die A2780-Tumoren bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Apoptose befinden und Initiatorproteine der Apoptose, wie z. B. P53, bereits abgebaut werden. Die Abwesenheit einer carboplatininduzierten GDF15-Hochregulation in den A2780cis-Tumoren unterstützt hingegen die Aussage, dass die

Carboplatintherapie in diesen Tumoren auch dauerhaft zu keinem verstärkten P53-Zellzyklusarrest führt.

Eine erhöhte GDF15-Expression korreliert mit einer schlechten Prognose und einem kürzerem Überleben in verschiedenen Tumorindikationen und wurde durch Wiklund *et al.* als *All-cause-mortality*-Marker postuliert [292-295]. Um festzustellen, ob ein basal erhöhtes GDF15-Level prädiktiv für ein geringeres Ansprechen gegenüber der Chemotherapie ist, wurde die GDF15-Proteinexpression in untherapierten primären, serösen Ovarialkarzinomgeweben analysiert (Kapitel 3.5.2.). In Korrelation mit dem retrospektiv ermittelten Ansprechen der Patientinnen, wurde jedoch nur für das chemotherapiesensitive Ovarialkarzinom eine erhöhte GDF15-Expression beobachtet. Da die hier analysierten Tumorgewebe untherapiert sind und die GDF15-Sekretion nach der Therapie nicht untersucht wurde, ist die Rolle einer erhöhten GDF15-Sekretion nicht eindeutig aufgeklärt. Es ist z. B. möglich, dass die Höhe der GDF15-Sekretion eher während der Therapie ausschlaggebend für das Ansprechen gegenüber der jeweiligen Chemotherapie (Therapiemarker) als vor der Therapie ist. Diese Aussage kann auch durch die Resultate in der Carboplatinlangzeittherapie unterstützt werden. Hier verbleibt die GDF15-Sekretion in den A2780cis-Tumoren während der Carboplatintherapie gleich hoch, wobei A2780-tragende Tiere im Verlauf der Therapie einen Anstieg der GDF15-Sekretion aufweisen. Dies ist vor allem im Hinblick auf die carboplatininduzierte Expression von GDF15 denkbar. Des Weiteren wird diese Aussage durch die im vorangegangenen Abschnitt diskutierte mögliche P53-vermittelte GDF15-Sekretion unter der Carboplatintherapie unterstützt. Je höher die P53-Aktivierung unter der Carboplatintherapie, desto höher die GDF15-Sekretion und die Wahrscheinlichkeit eines P53-vermittelten Zellzyklusarrests und der Apoptose. Die Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen der P53-Phosphorylierung und der GDF15-Expression in primären Ovarialkarzinomtumorgewebe könnte diesbezüglich mehr Aufschluss geben. Werden zusätzlich alle untersuchten Tumorgewebe im Durchschnitt zum gesunden Ovargewebe betrachtet, so ist unabhängig von der Sensitivität gegenüber der Chemotherapie eine erhöhte GDF15-Expression prädiktiv für das seröse Ovarialkarzinom. Somit kann wie Staff *et al.* bereits nachgewiesen hatte, GDF15 zunächst als prädiktiver Biomarker für das Ovarialkarzinom im Allgemeinen dienen [211, 296].

Zusätzlich zu der Überprüfung als potentieller Biomarker im primären serösen Ovarialkarzinom sollte nun als nächstes die GDF15-Expression in anderen malignen Ovarialzelllinien unter Carboplatintherapie getestet werden. Die Auswahl der Zelllinien betraf diesbezüglich andere Histologien im Vergleich zu A2780 und A2780cis: Die Tumorzelllinie PA-1 wurde aus einem Teratom des Ovars und ES-2 aus einem Klarzelligen Ovarialkarzinom isoliert. Die NCI-ADR-Res ist eine Zelllinie, die ursprünglich als Brustkrebszelllinie gehandhabt, jedoch durch genomische Analysen als Ovarialzelllinie neu klassifiziert wurde und hohe Expressionslevel von MDR-1 und

P-Glykoprotein aufweist [297]. Fazit dieser Untersuchung war, dass PA-1-Zellen eine starke carboplatininduzierte Hochregulation der GDF15-Level in den Zellen selbst und im umliegenden Zellkulturmedium aufzeigten, jedoch aber nicht die Zelllinien ES-2 und NCI-ADR-RES. Somit scheint nicht jede maligne Ovarialzelllinie eine GDF15-Expression aufzuweisen. Wenn jedoch eine GDF15-Sekretion im Basalzustand detektiert wird, dann kann eine carboplatinabhängige Hochregulation der GDF15-Level beobachtet werden. Auch Bock *et al.* haben in primären Geweben ähnliche Ergebnisse erzielen können. In ihrer Analyse zeigten sie eine zelltypabhängige GDF15-Expression in verschiedenen malignen Ovarialgeweben [211]. So konnte in den Borderlinetumoren nur eine niedrige GDF15-Expression, in den serösen Tumoren hingegen hohe GDF15-Level bestimmt werden. Ein unterschiedliches P53-Basallevel könnte hierbei eine mögliche Erklärung sein.

4.8. GDF15 - ein Tumorsuppressorgen in A2780cis?

Der Effekt von GDF15 ist zelltypabhängig und beeinflusst je nach epigenetischer Regulation positiv oder negativ die Proliferation, die Differenzierung oder die Migration von Zellen [205]. Um die Rolle von GDF15 als resistenzvermittelnden Faktor in A2780cis zu identifizieren, wurde neben der siRNA-vermittelten Herunterregulation *in vitro* zusätzlich ein stabiler shRNA-vermittelter GDF15-*Knockdown* in den A2780cis-Zellen *in vitro* und *in vivo* durchgeführt. Die Transduktion der fünf verschiedenen lentiviralen shRNA-Konstrukten in A2780cis-Zellen verursachte im Durchschnitt eine 50-prozentige GDF15-RNA-Herunterregulation. Dies korrelierte mit einer rund 3-fachen Herunterregulation auf Proteinebene in den A2780cis-Zellen selbst und im zugehörigen Zellkulturüberstand. Die stabil transduzierte shGDF15-2-A2780cis-Zelllinie wurde hierbei aufgrund des stärksten *Knockdown*-Effektes auf RNA-Ebene und Proteinebene im Vergleich zu den shRNA-Kontroll-transduzierten A2780cis-Zellen für weitere Analysen ausgewählt. Die Auswirkungen des shGDF15-*Knockdowns* in A2780cis werden im Folgenden ausführlich diskutiert:

Im Koloniebildungsassay konnte eine geringere Erhöhung der A2780cis-Proliferation und eine Veränderung der Morphologie der Zellkolonien nach shGDF15-Transduktion detektiert werden. So waren die Zellkolonien der stabil transduzierten shGDF15-A2780cis-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-shRNA-transduzierten A2780cis-Zellen im Durchschnitt größer, wiesen jedoch einen größeren Abstand zwischen den einzelnen Kolonien auf. Dies spricht u.a. für ein verändertes Migrationsverhalten in Kultur. Cheng *et al.* zeigte diesbezüglich, dass GDF15 die Migration von Prostatakarzinomzellen inhibiert und die Zelladhäsion reduziert, jedoch keinen Einfluss auf die Zellproliferation zeigte [298]. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte ein erhöhtes Migrationspotential der shGDF15-A2780cis-Zelllinien im Vergleich zu den Kontroll- bzw. untransduzierten A2780cis-Zellen festgestellt werden, welche unter Carboplatintherapie

wieder leicht reduziert wurde. Bezüglich der Proliferationsinhibition wurden ähnliche Ergebnisse wie bei Cheng *et al.* erzielt: So zeigten alle fünf stabil transduzierten shGDF15-(1-5)-A2780cis-Zelllinien im Vergleich zu shTRC1- bzw. untransduzierten A2780cis-Zellen kaum eine Veränderung der Proliferation nach 72 h Inkubation mit Carboplatin. Somit scheint GDF15 in den A2780cis-Zellen *in vitro* eher einen Einfluss auf die Migration und nicht auf die Proliferation auszuüben. Dies unterstützt auch die Beobachtung, dass untransduzierte A2780cis-Zellen ohne Behandlung eine geringere Migration in einem FBS-Gradienten aufweisen (Kapitel 3.1.3.). Andere Studien belegten außerdem eine Korrelation zwischen erhöhter Invasivität und GDF15-Expression. Lee *et al.* zeigte beispielsweise, dass eine GDF15-Überexpression in Magenkarzinomzelllinien zu einer erhöhten Invasivität mittels ERK1/2-Signaltransduktion und uPA-Hochregulation (*urokinase-type plasminogen activator*) führen kann [299].

4.9. GDF15-vermittelte AKT-Regulation – ein Überlebensmechanismus für A2780cis

Kim *et al.* berichteten eine GDF15-abhängige Induktion der AKT-Phosphorylierung in Brust- sowie Magenkarzinomzelllinien [300]. Auch andere Autoren in den folgenden Jahren wie Corre *et al.* oder Joshi *et al.* zeigten, dass GDF15 das invasive Potential durch die Hochregulation der AKT-Aktivierung z. B. in Myelomzelllinien oder die Resistenz gegenüber Trastuzumab in Brustkrebszelllinien erhöhen kann [301, 302]. Da ein erhöhtes phospho-AKT-Level im Zusammenhang mit einer Chemotherapieresistenz im Ovarialkarzinom steht [127, 303], sollte nun überprüft werden, ob eine GDF15-abhängige AKT-Regulation eine mögliche Ursache der Carboplatinresistenz in den A2780cis-Zellen ist.

Interessanterweise konnte tatsächlich in allen shGDF15-transduzierten A2780cis Zelllinien eine Herunterregulation der AKT-Phosphorylierung im Vergleich zu den kontrolltransduzierten A2780cis-Zellen festgestellt werden. Dies wurde qualitativ auf *Westernblot*-Ebene und quantitativ im ELISA nachgewiesen. Im umgekehrten Schluss konnte mittels des AKT-Inhibitors BAY 1001931 in den A2780cis-Zellen eine GDF15-Herunterregulation auf Proteinebene selbst und im umliegenden Zellkulturmedium mit und ohne Carboplatintherapie erreicht werden. A2780-Zellen zeigten hierbei eine ähnliche GDF15-abhängige Regulation nach AKT-Inhibition. Somit scheint die AKT-GDF15-Regulation unabhängig vom Zelltyp stattzufinden. Eine Überprüfung dieser Regulation wäre dementsprechend auch in anderen Tumorindikationen interessant. Die GDF15-induzierte AKT-Phosphorylierung könnte ein negativer Rückkopplungsmechanismus zu der P53-induzierten GDF15-Expression und dessen Funktion als Tumorsuppressor fungieren. Zusätzliche Inhibitoren oder Aktivatoren, die die AKT-, P53- oder GDF15-Expression beeinflussen, können außerdem je nach Zelltyp zum Überleben oder zur Apoptose führen. Um diesem Regulationsdreieck P53-AKT-GDF15 nachzugehen, wäre für die

Funktionsüberprüfung von GDF15 ein shGDF15-vermittelter *Knockdown* in den A2780-Zellen ein Vorschlag für nachfolgende Experimente.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal die direkte GDF15-Herunterregulation nach AKT-Inhibition gezeigt. Joshi *et al.* zeigten einen ähnlichen Mechanismus, bei dem sie eine Verringerung der GDF15-abhängigen AKT-Phosphorylierung nach Her2-Tyrosinkinaseinhibition beobachteten [301]. Somit könnte GDF15 ein geeigneter Biomarker zum Nachweis der erfolgreichen Inhibition der AKT-Phosphorylierung sein. Um weiterhin einen möglichen Zusammenhang zwischen Chemotherapiesensitivität, AKT und GDF15-Regulation festzustellen, wurde eine IC_{50} -Bestimmung des AKT-Inhibitors in A2780-, untransduzierten und shGDF15-transduzierten Zelllinien durchgeführt. Das Resultat der AKT-Inhibition in A2780 und untransduzierten A2780cis-Zelllinien war zunächst überraschend: Trotz eines unterschiedlichen phospho-AKT-Level zeigten beide Zelllinien annähernd die gleichen IC_{50} -Werte. Somit scheint zunächst der Inhibitor unabhängig vom ursprünglichen pAKT-Level eine gleiche Effektivität in beiden Zelllinien aufzuweisen.

Darüber hinaus konnte eine Kombinationstherapie mit Carboplatin in den A2780-Zellen einen synergistischen Effekt und in den A2780cis-Zellen einen schwachen additiven Effekt induzieren. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass in den A2780-Zellen die Carboplatintherapie bereits zu einer leichten Herunterregulation der pAKT-Level führt (Kapitel 3.2.5.). Das würde außerdem das bessere Ansprechen der A2780-Zellen gegenüber der Kombinationstherapie mit Carboplatin und AKT-Inhibition erklären.

Eine zusätzliche GDF15-Herunterregulation in den A2780cis-Zellen in der Kombinationstherapie von AKT-Inhibition durch BAY 1001931 und Carboplatin ermöglichte außerdem eine leichte Verbesserung des Ansprechens (Kapitel 3.7.3.). Dies ist ein indirekter Nachweis, dass GDF15 zu der Chemotherapieresistenz der A2780cis-Zellen in einem AKT-abhängigen Mechanismus beiträgt. Aufgrund der eindeutigen Korrelation eines erhöhten phospho-AKT-Level und der Entwicklung einer Chemotherapieresistenz in Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom, ist die AKT-Inhibition als zielgerichtete Therapie sehr vielversprechend. Dazu sind wie bereits im Kapitel 1.4.2. beschrieben, bereits einige Inhibitoren in verschiedenen klinischen Phasen [304]. Wie die Erfahrung bei Herceptin und anderen zielgerichteten Therapien gezeigt hat, kann die Inhibition eines spezifischen Zielmoleküls durch andere Signalwege ausgeglichen werden und somit die Effektivität dieser Therapie verringern [305]. Bei einer erfolgreichen Einführung der AKT-Inhibition in Patientinnen mit einem chemotherapieresistenten Ovarialkarzinom könnte somit GDF15 zum einen als Biomarker aber auch als therapeutisches Zielmolekül bei möglichen negativen AKT-*Feedback*-Reaktionen fungieren.

4.10. GDF15 ist verantwortlich für ein verlangsamtes Tumorwachstum

Da das Tumorwachstum *in vivo* generell mehr Aufschluss über die mögliche Funktion eines onkogenen Faktors vor allem bei einem Zytokin geben kann, als Untersuchungen in Zellkultur, wurde die Auswirkung eines shGDF15-*Knockdowns* in A2780cis *in vivo* analysiert. Die abgeleiteten subkutanen shGDF15-A2780cis-Tumoren in SCID-Mäusen zeigten erwartungsgemäß im Vergleich zu den untransduzierten A2780cis-WT-Tumoren und den shTRC1-A2780cis-abgeleiteten Tumoren eine ca. 50 % geringere GDF15-Expression in den Tumoren selbst und in den zugehörigen Plasma-Level der SCID-Mäuse. Eine leichte carboplatininduzierte GDF15-Hochregulation konnte jedoch in den shGDF15-A2780cis-Tumoren detektiert werden. Dies wurde auch beim siRNA-vermittelten GDF15-Herunterregulation beobachtet. Platinkomplexe wie Cisplatin erhöhen die Bindung von P53 an die DNA und ermöglichen dessen Funktion als Transaktivator für verschiedene proapoptische Gene, wie auch eventuell für GDF15 [59]. So könnte trotz geringer P53-Aktivierung in den A2780cis-Tumoren nach Carboplatintherapie, dennoch eine schwache P53-Bindung an den GDF15-Promotor der GDF15-Herunterregulation entgegenwirken und dessen Transkription fördern. Die verringerte carboplatininduzierte GDF15-Expression in den A2780-Tumoren ist, wie bereits bei der Carboplatinlangzeittherapie diskutiert, auf ein fortgeschrittenes Stadium der Apoptose zurückzuführen, indem GDF15 als proapoptischer Faktor nicht mehr benötigt und durch P53 nicht mehr transaktiviert werden könnte.

Trotz einer verringerten *Knockdown*-Effizienz *in vivo* konnte dennoch ein signifikant erhöhtes Tumorwachstum der shGDF15-A2780cis-Tumoren im Vergleich zu den untransduzierten und shTRC1-Kontroll-transduzierten A2780cis-Tumoren festgestellt werden. Dies korrelierte mit einer leichten Wachstumsverzögerung („*median survival*“) unter der Carboplatintherapie im Vergleich zu WT- und shTRC1-A2780cis-Tumoren. Dieses Resultat zeigt eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit: GDF15 trägt zu der Platinresistenz von A2780cis durch Suppression des Tumorwachstums bei. In den A2780-Tumoren korreliert jedoch eine erhöhte GDF15-Expression mit einem verbesserten Ansprechen und einem reduzierten Tumorwachstum nach Carboplatintherapie. Diese unterschiedliche Wirkungsweise von GDF15 im Tumorwachstum wird durch viele unterschiedliche Studien belegt: So inhibiert eine GDF15-Überexpression in HCT-116 Kolon- und Brustkarzinomzelllinien das Tumorwachstum in Nacktmäusen [306], erhöht jedoch gleichzeitig das Zellwachstum in LNCaP33-Zellen [307]. Dass ein erhöhtes GDF15-Level im Zusammenhang mit einer Resistenz in der Platintherapie steht, wurde auch durch andere Studien gezeigt. [214, 215, 308].

Des Weiteren scheint GDF15 als Zytokin die tumorsuppressive Funktion über die Beeinflussung der Tumorumgebung auszuüben. Dies ist eventuell mit der unveränderten Proliferation der

shGDF15-A2780cis-Zellen *in vitro* zu erklären: Hier kann ein shGDF15-Knockdown keinen Einfluss auf andere Zellen in der Umgebung ausüben. In einem Tumor kann hingegen das Ausbleiben der GDF15-Sekretion einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorumgebung und schlussendlich auf das Tumorstadium haben. Auch Albertoni *et al.* identifizierte einen ähnlichen potentiellen parakrinen Mechanismus hinsichtlich der proapoptischen Eigenschaft von GDF15 in Glioblastomzellen. Hierbei zeigte eine GDF15-Überexpression keinen Einfluss auf die Zellproliferation der Glioblastomzelllinien *in vitro*, inhibierte jedoch eindeutig das tumorigene Potential *in vivo* [180]. Andere Studien verdeutlichen zusätzlich eine beeinflussende Komponente der Tumorumgebung auf die Expression von GDF15. Unter hypoxischen Bedingungen führt beispielsweise HIF1 α zu der Aktivierung der Histondemethylase JMJD1A, die ihrerseits zu einer verringerten Histonmethylierung und zu einer erhöhten GDF15-Expression führt [182]. Als inhibierender Faktor gegenüber der späten Phase in der Makrophagenaktivierung spielt GDF15 auch eine zentrale Rolle in der Entzündungsreaktion [176]. Interessanterweise wurde in den vehikelbehandelten A2780cis-Tumoren in der Kurzzeittherapie eine verringerte Anzahl an CD45-positiven Zellen als im Vergleich zu den vehikelbehandelten A2780-Tumoren detektiert. Dies korrelierte außerdem mit einer verringerten IL-6- und TNF- α -Sekretion im Basalzustand, die jedoch unter der Carboplatintherapie im Vergleich zu den A2780-Tumoren leicht hochreguliert wurde. Somit könnte eine basal erhöhte GDF15-Expression außerdem die körpereigene Immunantwort für die Erhaltung des malignen Wachstums supprimieren und unter Carboplatintherapie mittels IL-6 und TNF- α -Sekretion die Tumorummunantwort zum Überleben „umfunktionieren“ [309]. Hierzu zeigten Dijkgraaf *et al.* unterstützend, dass eine erhöhte IL-6-Sekretion mit einer Chemotherapieresistenz und einer schlechteren Prognose von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom korreliert [310]. Eine Korrelation zwischen der Immunantwort mit anderen Zytokinen und der GDF15-Funktion in Tumoren wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, wäre jedoch durchaus ein interessanter Aspekt um die Pleiotropie dieses Faktors weiter aufzuklären.

Des Weiteren fand in den shGDF15-Tumoren neben einer Zunahme der Blutgefäßdichte und des Nekrosenanteils zusätzlich die Veränderung der Tumorstruktur im Vergleich zu WT- bzw. shTRC1-A2780cis-Tumoren statt. So wiesen shGDF15-A2780cis-Tumoren eine „leberläppchenartige“ bzw. lobuläre Struktur mit einem zentralen Blutgefäß auf. Wie auch andere Mitglieder der TGF- β -Familie, ist GDF15 in dem Prozess der Differenzierung von verschiedenen Geweben während der embryonalen Entwicklung und im adulten Organismus, z. B. bei Osteozyten und Keratinozyten involviert [311-313]. Auch die Hochregulation von GDF15 bei Stress oder Gewebeverletzungen indiziert eine zentrale Rolle in der Gewebsregeneration und Wundheilung [295, 314, 315]. Somit könnte die Herunterregulation

der GDF15-Expression zu einem Verlust der Gewebereparatur führen und eine Ursache für die beobachtete verstärkte Nekrose sein [316]. Dieser Verlust der Gewebereparatur und die damit verbundene Akkumulation von Gewebeschäden könnten schließlich zu der beobachteten verbesserten Sensitivität in den shGDF15-A2780cis-Tumoren nach der Carboplatintherapie führen. Auf der anderen Seite kann jedoch ein erhöhter Stroma- und Blutgefäßanteil auf einen verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix und ein erhöhtes invasives Potential hindeuten [317]. Dies war auch hinsichtlich der erhöhten Zellmigration von shGDF15-Zellen *in vitro* zu beobachten. Eventuell ist jedoch diese erhöhte Migration im Zusammenhang mit einem erhöhten Tumorwachstum eine größere Angriffsfläche für die Carboplatintherapie. Die Zellen gehen öfter die S-Phase ein und ermöglichen damit eine erhöhte DNA-Platin-Komplexbildung, die schließlich durch verminderte „Gewebesreparatur“ verstärkt die Apoptose einleiten. Hier zeigte eine Publikation von Tanno *et al.*, dass über einen AKT- bzw. SOX-2-abhängigen Mechanismus, das von Knochenmarkszellen produzierte GDF15, das tumorinitiierende Potential und die Selbsterneuerung von Myelomzellen fördern kann [318]. Somit könnte die basal erhöhte Expression in A2780cis-Zellen einen stammzellähnlichen Zelltyp hervorrufen und zusätzlich zu einer erhöhten Gewebereparatur beitragen. Die RNA-Herunterregulation von GDF15 würde dementsprechend in einer Differenzierung der A2780cis-Zellen münden und eventuell die „leberläppchenartige“ Struktur erklären. Ein Ziel der Tumorthherapie besteht darin, die immortalisierte Form der Tumorzelle zurück zu einer ausdifferenzierten somatischen Zelle zu transformieren (z. B. bei Leukämiezellen), diese dann geordnet in die Apoptose eingehen können [319]. Die hiermit gezeigte Histologieveränderung nach GDF15-RNA-Herunterregulation, zeigt GDF15 auch in diesem Kontext als mögliches therapeutisches Zielmolekül im chemotherapieresistenten Ovarialkarzinom.

4.11. GDF15 trägt zu der Resistenz von A2780cis-Tumoren bei

Das erhöhte Tumorwachstum der shGDF15-Tumoren konnte auf histologischer Ebene mithilfe der Ki-67-Färbung und auf *Westernblot*-Ebene mit dem S-Phase-Marker PCNA nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten shGDF15-A2780cis-Tumoren ähnlich hohe Level an Ki-67 und PCNA wie die A2780-Tumoren unter Vehikel- als auch Carboplatintherapie. Auch ein ähnlich hoher Stromaanteil im Zusammenhang mit einem erhöhten Tumorwachstum lässt vermuten, dass sich die shGDF15-A2780cis-Tumoren phänotypisch den A2780-Tumoren wieder annähern. Dies würde bedeuten, dass die differentielle Regulation von GDF15 einer der Hauptmechanismen ist, aus dem die A2780cis-Zellen aus den A2780-Zellen hervorgegangen sind.

Caspase-3 ist eine sogenannte Effektorcaspase, welche durch Restriktion von Caspase-9 während der Apoptose aktiviert wird (*cleaved Caspase-3*). Wie in der Kurzzeittherapie, war in

den vehikelbehandelten WT- sowie shTRC1-A2780cis-Tumoren grundsätzlich eine höhere Anzahl an *Cleaved Caspase-3*-positiven Zellen im Vergleich zu den vehikeltherapierten A2780-Tumoren zu detektieren. Diese basal erhöhte Apoptoserate wurde auch quantitativ mittels *Cleaved-Caspase-3*- und *phospho-P53-MSD-Assay* untermauert. Unter der Carboplatintherapie war in den A2780cis-Tumoren - wie zu erwarten - eine schwächere Hochregulation der *Cleaved-Caspase-3*-Aktivität im Vergleich zu den A2780-Tumoren festzustellen. Dies war sogar von einer Herunterregulation der P53-Aktivität begleitet. Überraschenderweise verhinderte eine GDF15-RNA-Herunterregulation in den A2780cis-Tumoren jedoch diese Verringerung der P53-Aktivität unter der Carboplatintherapie. Dies bedeutet, dass GDF15 im Normalzustand in den A2780cis-Zellen sogar eine leichte inhibitorische Wirkung auf die P53-Expression aufweist. Hierzu zeigten Song *et al.*, dass GDF15 in einem HIF1 α abhängigen Mechanismus den P53-MDM2-Komplex stabilisiert und die MDM2-vermittelten P53-Ubiquitylierung fördern kann [320]. So wird eventuell im Gegensatz zu den A2780-Zellen die tumorsupprimierende Funktion der P53-vermittelten Transduktion von GDF15 in A2780cis-Zellen durch Faktoren der Tumorumgebung moduliert. Ein *Knockdown* von GDF15 könnte diese Möglichkeit der „Modulation“ unterbinden, und der P53-Abbau findet nicht mehr statt. Das P53-Level wird daraufhin stabilisiert und die Funktion von P53 einen Zellzyklusarrest oder die Apoptoseinduktion auszulösen, wird wieder hergestellt.

Außerdem wiesen Tsui *et al.* nach, dass GDF15 dazu in der Lage ist, die IL-6-Sekretion in PC-3-Zellen zu erhöhen und damit zu der Invasivität dieser Zellen beizutragen [321]. Des Weiteren korreliert eine erhöhte IL-6-Sekretion mit einer erhöhten Invasivität und Resistenz von Ovarialkarzinomen [310]. Da im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine leichte Erhöhung der IL-6-Sekretion in den carboplatintherapierten A2780cis-Tumoren beobachtet wurde, kann dies eventuell durch GDF15 verursacht sein und somit eine Ursache für die resistenzvermittelnde Aktivität von GDF15 bilden. Auch die GDF15-induzierte Sekretion von TNF- α in A2780cis-Tumoren könnte hierbei eine resistenzvermittelnde Rolle einnehmen [322]. In den A2780-Tumoren ist die IL-6-Sekretion nach der Carboplatintherapie reduziert. So überwiegt in diesem Fall eher der tumorsuppressive Effekt von GDF15 nach P53-Transduktion. Zusammenfassend ist somit zu sagen, dass GDF15 seine tumorsuppressorgene Eigenschaft in Abhängigkeit anderer sezernierter Faktoren, Zytokine und Modulatoren der Tumorumgebung entfaltet. Dies könnte entweder zu einer Resistenz (A2780cis) oder zu einer erhöhten Sensitivität (A2780) gegenüber der Carboplatintherapie führen. Des Weiteren impliziert ein erhöhtes P53-Level eine verstärkte Einleitung der Differenzierung. So kann die These, dass GDF15 zu einem stammzellähnlichen, regenerationsfähigen A2780cis-Phänotyp beiträgt, weiter untermauert werden [323].

4.12. Ein Zusammenspiel von GDF15 und P27: potentielle Ursache der Carboplatinresistenz in A2780cis

Um der Grundlage eines möglichen GDF15-vermittelten stammzellähnlichen Phänotyps in den A2780cis-Tumoren weiter nachzugehen, wurden verschiedene Zellzyklusinhibitoren, die in unterschiedlicher Weise zu einem „Ruhezustand“ einer Tumorzelle beisteuern können, untersucht. Peter Sicinski und Kollegen haben 2007 in einem exzellenten *Review* die duale Rolle des Zellzyklusinhibitors P27 in der Tumorigenese zusammengefasst. Auf der einen Seite fungiert P27 als Inhibitor der Cyclin-CDK-Komplexe und trägt damit zu einem Zellzyklusarrest bei, auf der anderen Seite kann es die Formierung der cyclin-D-CDK4/6-Komplexe unterstützen [324]. Auch Patientendaten sprechen für sich: Ein allgemein reduziertes Level an P27 in Tumoren korreliert häufig mit einem geringen Überleben von Krebspatienten, wobei ein hohes zytoplasmatisches P27-Vorkommen ebenfalls mit einer schlechten Prognose im Zusammenhang stehen kann [325] [326]. Interessanterweise zeigen WT- und shTRC1-A2780cis-Tumoren ein höheres Level an P27 als A2780-Tumoren und shGDF15-A2780cis-Tumoren. Damit sind zunächst zwei Dinge zu schlussfolgern: (1) In dem Ovarialkarzinommodell A2780cis korreliert ein erhöhtes P27-Level mit einer erhöhten Resistenz gegenüber der Carboplatintherapie. (2) Ein erhöhtes Level an P27 ist GDF15-induziert, da die shGDF15-A2780cis-Tumoren ein niedrigeres P27-Level als die WT- und shTRC1-A2780cis-Tumoren vorweisen. Somit scheint P27 hier eher die onkogene Funktion in den untersuchten Ovarialkarzinommodellen zu übernehmen. Des Weiteren gibt es mehr und mehr Hinweise, dass ein erhöhtes P27-Level mit einer erhöhten Fähigkeit der Selbsterneuerung in Stammzellen und in Krebsstammzellen korreliert. So zeigten beispielsweise Chuodhury *et al.*, dass ein erhöhtes P27-Level über die Aktivierung der TGF- β -Signaltransduktion den „Ruhezustand“ (*Quiescence*) in Brustkrebszellen induziert [327]. Da GDF15 ebenfalls ein Mitglied der TGF- β -Superfamilie ist, könnte dies eine direkte Verbindung zwischen P27-vermittelter Induktion des Krebsstammzellcharakters und der basal erhöhten GDF15-Expression in A2780cis-Tumoren liefern.

Des Weiteren beeinflusst eine erhöhte P16-Expression die Zelldifferenzierung von Tumorzellen [328]. Dies unterstützt die These, dass eine erhöhte P16-Expression in den shGDF15-A2780-Tumoren zu einer möglichen Differenzierung von A2780cis-Tumoren nach GDF15-*Knockdown* mit oder ohne Carboplatintherapie beiträgt. Allerdings war auch in den shTRC1-transduzierten A2780cis-Tumoren ein erhöhtes P16-Level festzustellen. Aufgrund der signifikant höheren P16-Expression in den shGDF15-A2780cis-Tumoren ist dies jedoch als unspezifischer Effekt zu verstehen.

Des Weiteren konnte nur in den A2780-Tumoren ein erhöhtes Level von P21 nach Carboplatintherapie detektiert werden. Dies ist konsistent mit den Daten der Kurzzeittherapie. Da die shGDF15-A2780cis-Tumoren keine differentielle Proteinexpression von P21 im Vergleich

zu den WT- und shTRC1-A2780cis-Tumoren aufzeigten, scheint die GDF15-vermittelte Resistenz in den A2780cis-Tumoren dementsprechend P21-unabhängig zu sein.

Abschließend ist somit zusammenzufassen, dass GDF15 in einem P53- und P27-abhängigen Mechanismus zu der Selbsterneuerung und somit zu einer Resistenz der A2780cis-Tumoren beiträgt. Die GDF15-vermittelte Carboplatinresistenz in A2780cis-Zellen wird im folgenden Abschnitt schematisch in einem hypothetischen Modell zusammengefasst (Abbildung 4.1.).

4.13. Modell zu der GDF15-vermittelten Carboplatinresistenz in A2780cis

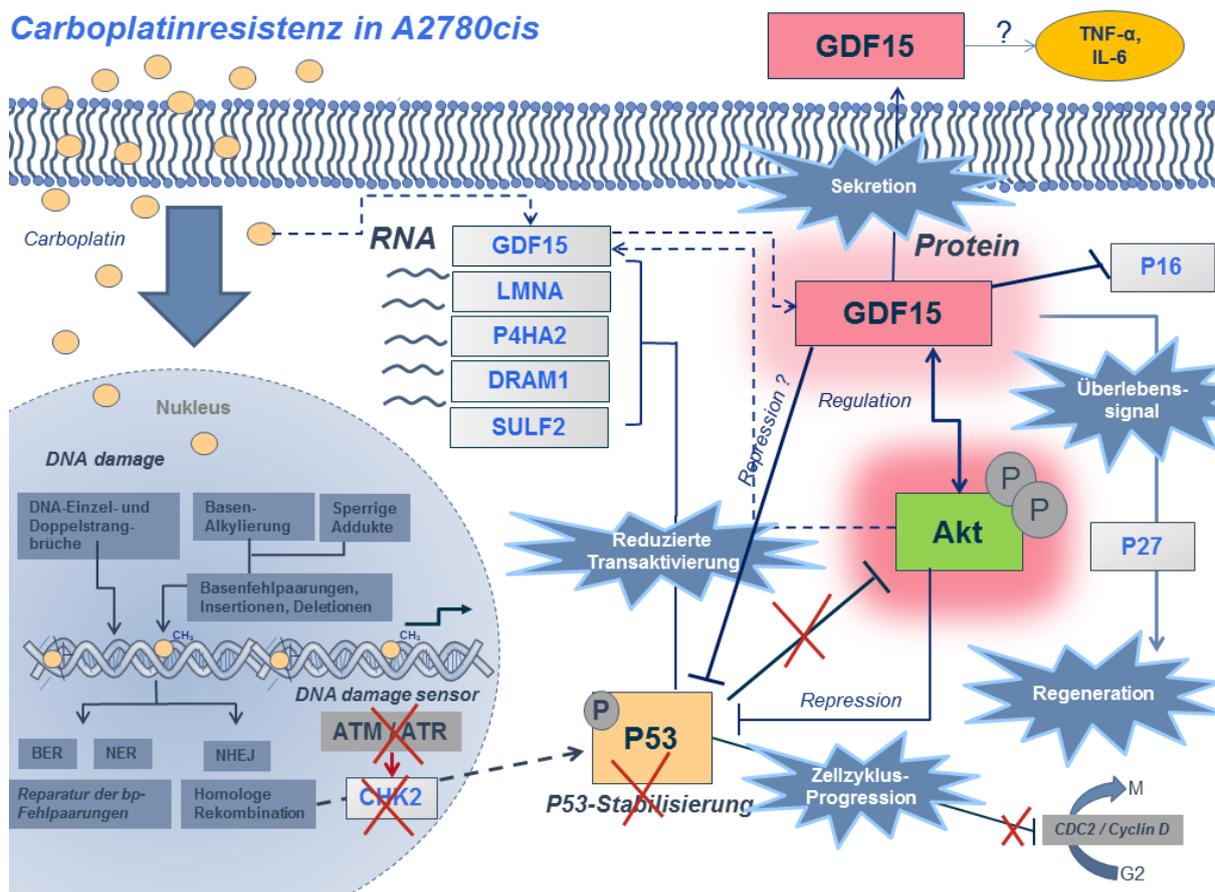


Abbildung 4.1. Modell zu der GDF15-vermittelten Carboplatinresistenz in A2780cis-Zellen. Carboplatin gelangt in die Zelle und induziert u. a. DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche. Eine verminderte ATM-CHEK2-Signaltransduktion resultiert dabei in einem verminderten p53-Zellzyklusarrest. Dies kann schließlich zu einer erhöhten AKT-Aktivierung führen, die wiederum die p53-Stabilisierung unterbinden kann. Eine AKT-Aktivierung führt außerdem zu einer erhöhten GDF15-Expression und *vice versa*. Carboplatin selbst kann jedoch auch in einem AKT-unabhängigen Weg die GDF15-Expression induzieren. GDF15 führt schließlich zu einer erhöhten Expression von p27. Dies mündet in einem langsameren Tumorwachstum. Die GDF15-vermittelte Inhibition von p53 und p16 kann schließlich zu einer erhöhten Regenerationsfähigkeit unter der Carboplatintherapie führen und damit zu einer Resistenz beitragen..

5. Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass GDF15 in einem P53- und P27-abhängigen Mechanismus zu der platininduzierten Resistenz im Ovarialkarzinom beiträgt. Dementsprechend könnte GDF15 als ein potentielles Zielmolekül in der targetierten Therapie bei Patientinnen mit einem chemotherapieresistenten Ovarialkarzinom fungieren. Um das Potential dieses Faktors als neues Zielmolekül weiter zu untermauern, wäre die Untersuchung anderer Ovarialkarzinommodelle und Tumorindikationen im Zusammenhang mit der Platinresistenz ein nächster möglicher Schritt.

Beispielsweise könnte die orthotope oder intravenöse Applikation von Tumorzellen in Mäuse, die Wirkungsweise von GDF15 auf die Wirtsumgebung und das Immunsystem nachweisen. Orthotope Modelle hätten dabei den Vorteil, dass die GDF15 Sekretion direkt im Ursprungsort des Eierstockkrebses - dem Ovar - untersucht werden kann. Die intravenöse Applikation ermöglicht außerdem die Analyse der GDF15-Funktion im Prozess der Metastasierung.

Des Weiteren wären die Identifizierung des GDF15-Rezeptors und die Analyse der Komponenten des TGF- β /SMAD-Signalweges wichtig, um einen Einblick in die Rolle von GDF15 in der Vermittlung der Chemotherapieresistenz zu erhalten.

Da AKT im chemotherapieresistenten Ovarialkarzinom häufig überexprimiert ist und in dieser Arbeit eine AKT-vermittelte GDF15-Regulation identifiziert wurde, ist zudem die Interaktion der AKT- und TGF- β -Signalwege interessant. Vor allem in Hinblick auf die Entwicklung diverser AKT-Inhibitoren in der Klinik und der möglichen Funktion von GDF15 als therapeutischer Marker kann dies sehr nützlich sein.

Da Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom das Tumorgewebe vor der Chemotherapie entnommen wird und somit eine Analyse resistenzvermittelnder Faktoren während der Chemotherapie nicht möglich ist, könnte die Eigenschaft von GDF15 als Therapiemarker von besonderer Bedeutung sein. So würde beispielsweise die Passagierung dieser patientenabgeleiteten Gewebe auf Mäuse und der anschließenden Analyse der GDF15-Ausschüttung mit und ohne Platintherapie in den tumortragenden Tieren eine mögliche Vorhersage bezüglich der Ansprechbarkeit der Patientinnen gegenüber der Standardtherapie geben können. Als P53-transaktivierter Faktor ist GDF15 im Zusammenhang mit der häufig auftretenden P53-Mutation im Ovarialkarzinom ebenfalls interessant. Ein relativ einfach durchzuführender ELISA, der die Konzentration von GDF15 im Blutplasma der Patientinnen bestimmt, könnte einen Hinweis auf die P53-Aktivität geben und die Wirkung der Chemotherapie überprüfen. Dies zeigt, dass diese Arbeit mit der Identifizierung von GDF15 als potentieller Resistenzfaktor und möglicher Therapiemarker im chemoresistenten Ovarialkarzinom einen Beitrag zu der translationalen Krebsforschung geleistet hat.

6. Zusammenfassung

Eierstockkrebs ist die vierthäufigste maligne Erkrankung des gynäkologischen Traktes und die häufigste Todesursache bei Frauen mit gynäkologischen Krebserkrankungen in den westlichen Industrieländern. Dies ist zum einen auf eine zu späte Diagnose und zum anderen auf die Entwicklung von Resistenzen gegenüber der platinbasierenden Standardchemotherapie zurückzuführen. Deshalb ist die Identifizierung möglicher Zielmoleküle als Basis für eine zielgerichtete Therapie in Patientinnen mit einem chemotherapieresistenten Ovarialkarzinom unabdingbar.

Intention dieser Arbeit war es, potentielle resistenzvermittelnde Faktoren für eine zielgerichtete Therapie im chemotherapieresistenten Ovarialkarzinom zu identifizieren und zu evaluieren. Dazu wurde die humane Ovarialkarzinomzelllinie A2780 und dessen cisplatinresistente Variante A2780cis umfangreich *in vitro* und *in vivo* charakterisiert. Basierend auf einer verminderten Proliferationsinhibition, einem verzögerten G2/M-Arrest und einem verstärkten Migrationsverhalten, konnte zunächst eine Kreuzresistenz der A2780cis-Zellen gegenüber der Carboplatintherapie festgestellt werden. Die anschließende Analyse des subkutanen Tumorwachstums in *SCID*-Mäusen ergab außerdem ein langsames Tumorwachstum im Basalzustand und eine fehlende Induktion der Apoptose nach der Kurzzeittherapie mit Carboplatin im Vergleich zu den sensitiven Tumoren. Dies war durch einen Verlust des P53- und P21-vermittelten Zellzyklusarrest und einer erhöhten AKT-Überlebenssignaltransduktion gekennzeichnet.

Für die Identifizierung resistenzabgeleiteter Faktoren wurde schließlich eine differentielle Genexpressionsanalyse in diesen Tumoren mittels humanen *Bead Chip Arrays* (HT-12v3) durchgeführt. Durch Anwendung des linearen Modells konnten die fünf P53-regulierten Gene *DRAM1*, *SULF2*, *P4HA2*, *LMNA* und *GDF15* als potentiell resistenzvermittelnd identifiziert werden. *GDF15*, ein Mitglied der TGF- β -Superfamilie, wurde als einer der am stärksten durch Carboplatin regulierten Faktoren auf RNA- und Proteinebene evaluiert. Dieses Zytokin zeigte in sensitiven Zellen unter der Carboplatintherapie eine starke Hochregulation der RNA- und Proteinexpression *in vitro* und *in vivo*. In den resistenten Zellen A2780cis wurde außerdem eine basal erhöhte RNA- sowie Proteinexpression detektiert, die jedoch unter Therapie nicht weiter anstieg. Diese differentielle *GDF15*-Regulation spiegelte sich auch im Blutplasma tumortragender Tiere während der Kurz- und Langzeittherapie mit Carboplatin wieder. Des Weiteren konnte in unbehandelten primären Ovarialkarzinomgeweben, die während der zytoreduktiven Therapie entnommen wurden, eine erhöhte *GDF15*-Expression beobachtet werden.

Um festzustellen, ob ein basal erhöhtes GDF15-Level im kausalen Zusammenhang mit der Platinresistenz steht, wurde eine shRNA-vermittelte Herunterregulation von GDF15 in den resistenten Zellen durchgeführt. Dabei veränderte die shRNA-vermittelte GDF15-Herunterregulation die Bildung von Zellkolonien und erhöhte das Migrationspotential. Die Proliferation dieser Zellen war jedoch kaum verändert. Im Gegensatz dazu führte eine subkutane Transplantation der shGDF15-A2780cis-Zellen in *SCID*-Mäusen zu einem basal erhöhten Tumorwachstum und einer signifikanten Resensitivierung gegenüber der Carboplatintherapie. Molekulare Ursachen für diesen veränderten Phänotyp *in vivo* waren eine Erhöhung der P53- und P16-Expression und eine Verringerung des P27-induzierten Zellzyklusarrestes. Dies ging einher mit einer erhöhten Nekrose und einer differenzierten „lobulären“ Tumorstruktur.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass GDF15 in einem P53- und P27-abhängigen Mechanismus die Selbsterneuerung in Tumorzellen unterstützt und somit zu einer Resistenz der A2780cis-Tumoren beiträgt. GDF15 stellt somit ein potentiell neues *Target* für die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie in Patientinnen mit einem chemoresistenten Ovarialkarzinom dar.

7. Summary

Advanced epithelial ovarian cancer remains the most lethal gynecological malignancy due to the high risk of chemoresistance against the platinum-based standard treatment. Therefore, it is a high medical need to identify new potential factors as a basis for a targeted therapy in patients with chemoresistant ovarian cancer.

Aim of this thesis was to identify resistance-related genes as potential targets for therapy of patients with platinum-resistant ovarian cancer. Therefore, the human ovarian cancer cell line A2780 and its cisplatin-resistant variant A2780cis were characterized *in vitro* and *in vivo*. Firstly, cross resistance of the cisplatin-resistant cell line A2780cis to carboplatin treatment was verified as a reduced proliferation, a delayed G2/M cell cycle arrest and an enhanced migration after carboplatin treatment *in vitro*. Subcutaneous transplantation of A2780 and A2780cis onto immunodeficient *SCID* mice revealed a slower tumor growth during vehicle treatment and decreased induction of apoptosis in A2780cis tumors following carboplatin short-term treatment compared to A2780 tumors. This was associated with a lack of P27- and P53-mediated cell cycle arrest and an enhanced AKT survival signaling.

Furthermore, linear model analysis was applied to the microarray-based gene expression data of short-term treated A2780 and A2780cis tumors, allowing the identification of five P53-regulated potential resistance related genes, namely SULF2, DRAM1, LMNA, P4HA2 and GDF15. Due to its high carboplatin-induced expression at the RNA- and protein-level in A2780 *in vitro* and *in vivo*, GDF15, a cytokine and member of the TGF- β -superfamily, was selected for further analyses.

Although a high GDF15 RNA and protein expression was observed in A2780cis cells and A2780cis tumors at the basal level, no further enhancement of GDF-15 expression was induced by carboplatin treatment. This carboplatin-mediated GDF15 regulation was also reflected by the plasma levels of A2780- and A2780cis-bearing mice during carboplatin long-term treatment. Furthermore, GDF15 showed higher expression in advanced primary ovarian cancer tissues, which have been resected from patients during debulking surgery before chemotherapy. In order to determine the causal relationship between GDF15 and chemoresistance, a siRNA- and shRNA-mediated GDF15 knockdown in A2780cis was performed. The siRNA-mediated knockdown of GDF15 revealed a GDF15-dependent effect on SULF2 and DRAM1 expression in A2780cis cells *in vitro*. Moreover, the shRNA-knockdown of GDF15 in A2780cis induced a change of cell colony formation as well as an enhancement of cell migration. However, only a slight altered proliferation behavior of these cells *in vitro* was detected. In contrast, subcutaneous transplantation of shGDF15-A2780cis cells onto *SCID* mice revealed a basal enhanced tumor growth and an increased sensitivity of these tumors to carboplatin treatment as compared to the non-transduced or shTRC1-(control)-A2780cis tumors. This was associated with larger necrotic areas, a lobular tumor structure and increased P53 and P16 expression of the carboplatin treated shGDF15-A2780cis tumors. Furthermore, shRNA-mediated GDF15 knockdown abrogated the enhanced P27 expression in the non-transduced or shTRC1-(control)-A2780cis tumors.

For the first time, this study shows that GDF15 contributes to chemoresistance by maintaining a quiescent, self-renewable phenotype in a P53 and P27 dependent manner. Hence, GDF15 might serve as a potential new factor for a targeted therapy in patients with ovarian cancer.

8. Literaturverzeichnis

1. A, L., *Krebs in Deutschland 2007/2008*. UMID 2012. **1/2012: 51-52**.
2. Hanahan, D. and R. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**: p. 57 - 70.
3. Christoph Wagener, O.M., *Molekulare Onkologie*. Entstehung, Progression, klinische Aspekte. Vol. 3. Ausgabe. 2010: Thieme Verlag. 424.
4. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F., *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.
5. Ferlay J, S.-F.E., Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. , *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. Eur J Cancer, 2013 Apr. **49(6):1374-403**.
6. Bray, F., et al., *Ovarian cancer in Europe: Cross-sectional trends in incidence and mortality in 28 countries, 1953–2000*.
7. Jacobs, I.J., et al., *Risk of diagnosis of ovarian cancer after raised serum CA 125 concentration: a prospective cohort study*. Bmj, 1996. **313(7069)**: p. 1355-8.
8. Bast, R.C., Jr., et al., *New tumor markers: CA125 and beyond*. Int J Gynecol Cancer, 2005. **15 Suppl 3**: p. 274-81.
9. Mok, S.C., et al., *Prostasin, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93(19)**: p. 1458-64.
10. Kim, J.H., et al., *Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer*. Jama, 2002. **287(13)**: p. 1671-9.
11. Yurkovetsky, Z., et al., *Development of a Multimarker Assay for Early Detection of Ovarian Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28(13)**: p. 2159-2166.
12. Silverberg, S.G., *Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal*. Int J Gynecol Pathol, 2000. **19(1)**: p. 7-15.
13. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*.
14. (Hon), W.K.H.M.D., et al., *Holland-Frei Cancer Medicine 8th edition*. 2009. **ISBN 978-1-60795-014-1**.
15. Rebbeck, T.R., *Prophylactic oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. J Clin Oncol, 2000. **18(21 Suppl)**: p. 100s-3s.
16. Cramer DW, H.G., Welch WR, Scully RE, Ryan KJ., *Determinants of ovarian cancer risk. I. Reproductive experiences and family history*. J Natl Cancer Inst, 1983. **71(4):711-6**.
17. Pearce, C.L., et al., *Increased ovarian cancer risk associated with menopausal estrogen therapy is reduced by adding a progestin*. Cancer, 2009. **115(3)**: p. 531-9.
18. Negri, E., et al., *Pooled analysis of 3 european case-control studies: I. Reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer*. International Journal of Cancer, 1991. **49(1)**: p. 50-56.
19. Sueblinvong, T. and M. Carney, *Current Understanding of Risk Factors for Ovarian Cancer. Current Treatment Options in Oncology*, 2009. **10(1-2)**: p. 67-81.
20. Feeley, K.M. and M. Wells, *Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy*. Histopathology, 2001. **38(2)**: p. 87-95.
21. Bell, D.A., *Origins and molecular pathology of ovarian cancer*. Mod Pathol, 2005. **18 Suppl 2**: p. S19-32.
22. Rosen, D.G., et al., *Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 2089-102.
23. Jones, P.M. and R. Drapkin, *Modeling High-Grade Serous Carcinoma: How Converging Insights into Pathogenesis and Genetics are Driving Better Experimental Platforms*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 217.
24. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications*. Int J Gynecol Pathol, 2008. **27(2)**: p. 151-60.
25. Iwabuchi, H., et al., *Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors*. Cancer Res, 1995. **55(24)**: p. 6172-80.

26. Bell, D.A. and R.E. Scully, *Early de novo ovarian carcinoma. A study of fourteen cases.* Cancer, 1994. **73**(7): p. 1859-64.
27. Waun Ki Hong, R.C.B., William N. Hait, Donald W. Kufe, Raphael E. Pullock, Ralph R. Weichselbaum, James F. Holland, Emil Frei III, *CANCER MEDICINE, 8TH EDITION.* ISBN: 978-1-60795-014-1, 2010.
28. Marks, J.R., et al., *Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer.* Cancer Res, 1991. **51**(11): p. 2979-84.
29. Rechsteiner, M., et al., *TP53 mutations are common in all subtypes of epithelial ovarian cancer and occur concomitantly with KRAS mutations in the mucinous type.* Exp Mol Pathol, 2013. **95**(2): p. 235-41.
30. *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma.* Nature, 2011. **474**(7353): p. 609-15.
31. Berchuck, A., et al., *The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers.* Am J Obstet Gynecol, 1994. **170**(1 Pt 1): p. 246-52.
32. Feng, W., et al., *Imprinted tumor suppressor genes ARHI and PEG3 are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation.* Cancer, 2008. **112**(7): p. 1489-502.
33. Bast, R.C., Jr., B. Hennessy, and G.B. Mills, *The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation.* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(6): p. 415-28.
34. Rubin, S.C., et al., *Prevalence and significance of HER-2/neu expression in early epithelial ovarian cancer.* Cancer, 1994. **73**(5): p. 1456-9.
35. Skirnisdottir, I., B. Sorbe, and T. Seidal, *The growth factor receptors HER-2/neu and EGFR, their relationship, and their effects on the prognosis in early stage (FIGO I-II) epithelial ovarian carcinoma.* Int J Gynecol Cancer, 2001. **11**(2): p. 119-29.
36. Mok, S.C., et al., *Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy.* Cancer Res, 1993. **53**(7): p. 1489-92.
37. Rosen, D.G., et al., *Expression of the tumor suppressor gene ARHI in epithelial ovarian cancer is associated with increased expression of p21WAF1/CIP1 and prolonged progression-free survival.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(19): p. 6559-66.
38. Orsulic, S., et al., *Induction of ovarian cancer by defined multiple genetic changes in a mouse model system.* Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 53-62.
39. Berchuck, A., et al., *Regulation of growth of normal ovarian epithelial cells and ovarian cancer cell lines by transforming growth factor-beta.* Am J Obstet Gynecol, 1992. **166**(2): p. 676-84.
40. Wu, S., et al., *Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression.* Cancer Res, 1993. **53**(8): p. 1939-44.
41. Maccio, A. and C. Madeddu, *Inflammation and ovarian cancer.* Cytokine, 2012. **58**(2): p. 133-47.
42. Lo, C.W., et al., *IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer.* Cancer Res, 2011. **71**(2): p. 424-34.
43. Drummond, A.E. and P.J. Fuller, *Activin and inhibin, estrogens and NFkappaB, play roles in ovarian tumorigenesis is there crosstalk?* Mol Cell Endocrinol, 2012. **359**(1-2): p. 85-91.
44. Yang, J., et al., *The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation.* Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 620-4.
45. Suh, D.S., et al., *Significance of E2F-1 overexpression in epithelial ovarian cancer.* Int J Gynecol Cancer, 2008. **18**(3): p. 492-8.
46. Reed, J., et al., *Significance of Fas receptor protein expression in epithelial ovarian cancer.* Hum Pathol, 2005. **36**(9): p. 971-6.
47. Lengyel, E., *Ovarian cancer development and metastasis.* Am J Pathol, 2010. **177**(3): p. 1053-64.
48. Ren, J., et al., *Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells.* Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3006-14.

49. Barbolina, M.V., et al., *Microenvironmental regulation of membrane type 1 matrix metalloproteinase activity in ovarian carcinoma cells via collagen-induced EGR1 expression*. J Biol Chem, 2007. **282**(7): p. 4924-31.
50. Moss, N.M., et al., *Ovarian cancer cell detachment and multicellular aggregate formation are regulated by membrane type 1 matrix metalloproteinase: a potential role in *I.p.* metastatic dissemination*. Cancer Res, 2009. **69**(17): p. 7121-9.
51. Kisielewski, R., et al., *Inflammation and ovarian cancer--current views*. Ginekol Pol, 2013. **84**(4): p. 293-7.
52. Markman, M., et al., *Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin*. J Clin Oncol, 1991. **9**(3): p. 389-93.
53. Markman, M., *Current standards of care for chemotherapy of optimally cytoreduced advanced epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2013. **131**(1): p. 241-5.
54. Calvert, A.H., et al., *Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function*. J Clin Oncol, 1989. **7**(11): p. 1748-56.
55. Rosenberg, B., L. Vancamp, and T. Krigas, *INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE*. Nature, 1965. **205**: p. 698-9.
56. Wiltshaw, E., *Cisplatin in the treatment of Cancer - The first metal anti-tumor drug*. Platinum Metals Rev, 1979. **23** (3).
57. Galanski, M., *Recent developments in the field of anticancer platinum complexes*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2006. **1**(2): p. 285-95.
58. Kostova, I., *Platinum complexes as anticancer agents*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2006. **1**(1): p. 1-22.
59. Wang, D. and S.J. Lippard, *Cellular processing of platinum anticancer drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(4): p. 307-20.
60. Cepeda, V., et al., *Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity*. Anticancer Agents Med Chem, 2007. **7**(1): p. 3-18.
61. Michalke, B., *Platinum speciation used for elucidating activation or inhibition of Pt-containing anti-cancer drugs*. J Trace Elem Med Biol, 2010. **24**(2): p. 69-77.
62. Wang, D. and S.J. Lippard, *Cellular processing of platinum anticancer drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(4): p. 307-320.
63. Timerbaev, A.R., et al., *Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology*. Chem Rev, 2006. **106**(6): p. 2224-48.
64. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cisplatin resistance*. Oncogene, 2012. **31**(15): p. 1869-83.
65. Harrap, K.R., *Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative*. Cancer Treat Rev, 1985. **12 Suppl A**: p. 21-33.
66. Gonzalez, V.M., et al., *Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?* Mol Pharmacol, 2001. **59**(4): p. 657-63.
67. CONCONI, L.d.D.A., D.d.M.e. d'Infectiologie, and U.d. Sherbrooke, 2013: p. http://www.google.de/imgres?start=159&client=firefox-a&hs=qe1&rls=org.mozilla:de:official&channel=fflb&biw=1525&bih=715&tbn=isch&tbnid=4-OmCrM6Jy3Q_M:&imgrefurl=http://www.conconilab.ca/project-2/&docid=CNLcIpF5kPaVM&imgurl=http://www.conconilab.ca/wp-content/uploads/2013/05/image-cisplatin-3.jpg&w=713&h=277&ei=f9DCUrfIMcaGswb48oHQCA&zoom=1&iact=rc&dur=330&page=5&tbnh=116&tbnw=263&ndsp=42&ved=1t:429,r:94,s:100,i:286&tx=95&ty=45.
68. Zhou, B.B. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 433-9.
69. Marechal, A. and L. Zou, *DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(9).
70. Pellegrini, M., et al., *Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 222-5.

71. Lavin, M.F. and S. Kozlov, *ATM activation and DNA damage response*. Cell Cycle, 2007. **6**(8): p. 931-42.
72. Stevens, C., L. Smith, and N.B. La Thangue, *Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 401-9.
73. Tan, Y., P. Raychaudhuri, and R.H. Costa, *Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(3): p. 1007-16.
74. Lee, J.S., et al., *The function of BRCA1 in DNA damage response*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2000. **65**: p. 547-52.
75. Jiang, H. and Y.C. Wang, [*Cyclin-dependent kinase inhibitors in mammal cells*]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 1996. **27**(2): p. 107-12.
76. Smith, J., et al., *The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer*. Adv Cancer Res, 2010. **108**: p. 73-112.
77. Lopez-Girona, A., et al., *Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein*. Nature, 1999. **397**(6715): p. 172-5.
78. Furnari, B., N. Rhind, and P. Russell, *Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1495-7.
79. Rhind, N. and P. Russell, *Signaling pathways that regulate cell division*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(10).
80. Chehab, N.H., et al., *Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53*. Genes Dev, 2000. **14**(3): p. 278-88.
81. Persons, D.L., E.M. Yazlovitskaya, and J.C. Pelling, *Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35778-85.
82. Hernlund, E., et al., *Cisplatin-induced nitrosylation of p53 prevents its mitochondrial translocation*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(12): p. 1607-13.
83. Hanawalt, P.C., *Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation*. Oncogene, 2002. **21**(58): p. 8949-56.
84. Kirschner, K. and D.W. Melton, *Multiple roles of the ERCC1-XPF endonuclease in DNA repair and resistance to anticancer drugs*. Anticancer Res, 2010. **30**(9): p. 3223-32.
85. Bellacosa, A., *Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins*. Cell Death Differ, 2001. **8**(11): p. 1076-92.
86. Ding, X., et al., *MLH1 expression sensitises ovarian cancer cells to cell death mediated by XIAP inhibition*. Br J Cancer, 2009. **101**(2): p. 269-77.
87. Herceg, Z. and Z.Q. Wang, *Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death*. Mutat Res, 2001. **477**(1-2): p. 97-110.
88. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
89. Lacour, S., et al., *Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(10): p. 3593-8.
90. Polyak, K., et al., *A model for p53-induced apoptosis*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 300-305.
91. Hershberger, P.A., et al., *Cisplatin potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis in association with increased mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEKK-1) expression*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(10): p. 821-9.
92. Manic, S., et al., *Mechanisms controlling sensitivity to platinum complexes: role of p53 and DNA mismatch repair*. Curr Cancer Drug Targets, 2003. **3**(1): p. 21-9.
93. Zamble, D.B., T. Jacks, and S.J. Lippard, *p53-Dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6163-8.
94. Blackledge, G., et al., *Response of patients in phase II studies of chemotherapy in ovarian cancer: implications for patient treatment and the design of phase II trials*. Br J Cancer, 1989. **59**(4): p. 650-3.
95. du Bois, A., et al., *2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIIG OCCC 2004)*. Ann Oncol, 2005. **16 Suppl 8**: p. viii7-viii12.

96. Coleman, R.L., et al., *Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2013. **10**(4): p. 211-24.
97. Nathan, S.S., et al., *Elevated physiologic tumor pressure promotes proliferation and chemosensitivity in human osteosarcoma*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(6): p. 2389-97.
98. Melvik, J.E., J.M. Dornish, and E.O. Pettersen, *The binding of cis-dichlorodiammineplatinum(II) to extracellular and intracellular compounds in relation to drug uptake and cytotoxicity in vitro*. Br J Cancer, 1992. **66**(2): p. 260-5.
99. Takahashi, K., et al., *Antitumor activity and toxicity of serum protein-bound platinum formed from cisplatin*. Jpn J Cancer Res, 1985. **76**(1): p. 68-74.
100. Berube, M., et al., *Role of the extracellular matrix proteins in the resistance of SP6.5 uveal melanoma cells toward cisplatin*. Int J Oncol, 2005. **26**(2): p. 405-13.
101. Holzer, A.K., G.H. Manorek, and S.B. Howell, *Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(4): p. 1390-4.
102. Katano, K., et al., *Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6559-65.
103. Safaei, R., et al., *Cross-resistance to cisplatin in cells with acquired resistance to copper*. Cancer Chemother Pharmacol, 2004. **53**(3): p. 239-46.
104. Yamasaki, M., et al., *Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in chemoresistance and clinical outcome in oesophageal squamous cell carcinoma*. Br J Cancer, 2011. **104**(4): p. 707-13.
105. Holzer, A.K., et al., *Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(19): p. 6744-9.
106. Stewart, D.J., *Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin*. Critical reviews in oncology/hematology, 2007. **63**(1): p. 12-31.
107. Shen, D.W., et al., *Reduced expression of small GTPases and hypermethylation of the folate binding protein gene in cisplatin-resistant cells*. Br J Cancer, 2004. **91**(2): p. 270-6.
108. Liang, X.J., et al., *Endocytic recycling compartments altered in cisplatin-resistant cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 2346-53.
109. Chen, H.H. and M.T. Kuo, *Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy*. Met Based Drugs, 2010. **2010**.
110. Chau, Q. and D.J. Stewart, *Cisplatin efflux, binding and intracellular pH in the HTB56 human lung adenocarcinoma cell line and the E-8/0.7 cisplatin-resistant variant*. Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **44**(3): p. 193-202.
111. Dabholkar, M., et al., *ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients*. J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(19): p. 1512-7.
112. Olausson, K.A., *A new step ahead for the consideration of ERCC1 as a candidate biomarker to select NSCLC patients for the treatment of cetuximab in combination with cisplatin*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(20): p. 1922-3.
113. Brown, R., et al., *hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents*. Oncogene, 1997. **15**(1): p. 45-52.
114. Fink, D., S. Aebi, and S.B. Howell, *The role of DNA mismatch repair in drug resistance*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(1): p. 1-6.
115. Ceppi, P., et al., *Polymerase eta mRNA expression predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(3): p. 1039-45.
116. Shachar, S., et al., *Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals*. Embo j, 2009. **28**(4): p. 383-93.
117. Edwards, S.L., et al., *Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1111-5.
118. Sakai, W., et al., *Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1116-20.
119. Ali-Osman, F., et al., *Topoisomerase II inhibition and altered kinetics of formation and repair of nitrosourea and cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and cytotoxicity in human glioblastoma cells*. Cancer Res, 1993. **53**(23): p. 5663-8.

120. Britten, R.A., S. Kuny, and S. Perdue, *Modification of non-conservative double-strand break (DSB) rejoining activity after the induction of cisplatin resistance in human tumour cells*. Br J Cancer, 1999. **79**(5-6): p. 843-9.
121. Tajeddine, N., et al., *Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death*. Oncogene, 2008. **27**(30): p. 4221-32.
122. Ali, A.Y., et al., *Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1271**: p. 58-67.
123. Mansouri, A., et al., *Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19245-56.
124. Brozovic, A., et al., *Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance*. Int J Cancer, 2004. **112**(6): p. 974-85.
125. Agarwal, R. and S.B. Kaye, *Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(7): p. 502-516.
126. Ryan, B.M., N. O'Donovan, and M.J. Duffy, *Survivin: a new target for anti-cancer therapy*. Cancer Treat Rev, 2009. **35**(7): p. 553-62.
127. Cheng, J.Q., et al., *Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway*. Drug Resist Updat, 2002. **5**(3-4): p. 131-46.
128. Zhang, P., et al., *Inducible degradation of checkpoint kinase 2 links to cisplatin-induced resistance in ovarian cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(2): p. 567-72.
129. Janson, V., A. Johansson, and K. Grankvist, *Resistance to caspase-8 and -9 fragments in a malignant pleural mesothelioma cell line with acquired cisplatin-resistance*. Cell Death Dis, 2010. **1**: p. e78.
130. Hengstler, J.G., et al., *Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer*. Cancer Res, 1999. **59**(13): p. 3206-14.
131. Zhou, B.P., et al., *Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 245-52.
132. Ferrandina, G., et al., *Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients*. Ann Oncol, 2002. **13**(8): p. 1205-11.
133. Chekhun, V.F., et al., *The role of expression of the components of proteome in the formation of molecular profile of human ovarian carcinoma A2780 cells sensitive and resistant to cisplatin*. Exp Oncol, 2005. **27**(3): p. 191-5.
134. Ishii, T., et al., *The effects of S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) on cell cycle status, viability, and chemoresistance in A549 lung adenocarcinoma cells*. Exp Lung Res, 2004. **30**(8): p. 687-703.
135. Ren, A., et al., *Down-regulation of mammalian sterile 20-like kinase 1 by heat shock protein 70 mediates cisplatin resistance in prostate cancer cells*. Cancer Res, 2008. **68**(7): p. 2266-74.
136. Venkatraman, M., et al., *Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis*. Mol Carcinog, 2005. **44**(1): p. 51-9.
137. Kim, J.K., et al., *Up-regulation of Bfl-1/A1 via NF-kappaB activation in cisplatin-resistant human bladder cancer cell line*. Cancer Lett, 2004. **212**(1): p. 61-70.
138. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
139. Fan, Y., R. Mao, and J. Yang, *NF-kappaB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer*. Protein Cell, 2013. **4**(3): p. 176-85.
140. Kang, S., A.G. Bader, and P.K. Vogt, *Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 802-7.
141. Matulonis, U.A., et al., *High throughput interrogation of somatic mutations in high grade serous cancer of the ovary*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24433.

142. Kato, M., et al., *Aberrant expression of the mammalian target of rapamycin, hypoxia-inducible factor-1alpha, and glucose transporter 1 in the development of ovarian clear-cell adenocarcinoma*. Int J Gynecol Pathol, 2012. **31**(3): p. 254-63.
143. Engelman, J.A., *Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 550-62.
144. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-1274.
145. Romashkova, J.A. and S.S. Makarov, *NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling*. Nature, 1999. **401**(6748): p. 86-90.
146. Liang, J. and J.M. Slingerland, *Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression*. Cell Cycle, 2003. **2**(4): p. 339-45.
147. Leary, A., et al., *The PI3K/Akt/mTOR Pathway in Ovarian Cancer: Biological Rationale and Therapeutic Opportunities*. Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update. 2013.
148. Fraser, M., T. Bai, and B.K. Tsang, *Akt promotes cisplatin resistance in human ovarian cancer cells through inhibition of p53 phosphorylation and nuclear function*. Int J Cancer, 2008. **122**(3): p. 534-46.
149. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
150. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
151. Kane, L.P., et al., *Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase*. Curr Biol, 1999. **9**(11): p. 601-4.
152. Gesbert, F., et al., *BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39223-30.
153. King, F.W., et al., *Inhibition of Chk1 by activated PKB/Akt*. Cell Cycle, 2004. **3**(5): p. 634-7.
154. Zhou, B.P., et al., *HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(11): p. 973-82.
155. Tanwar, P.S., et al., *Mammalian target of rapamycin is a therapeutic target for murine ovarian endometrioid adenocarcinomas with dysregulated Wnt/beta-catenin and PTEN*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20715.
156. Crul, M., et al., *Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours*. Eur J Cancer, 2002. **38**(12): p. 1615-21.
157. Leighl, N.B., et al., *A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **108**(1): p. 87-92.
158. Fu, S., et al., *Perifosine plus docetaxel in patients with platinum and taxane resistant or refractory high-grade epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2012. **126**(1): p. 47-53.
159. Kubiczkova, L., et al., *TGF-beta - an excellent servant but a bad master*. Journal of Translational Medicine, 2012. **10**(1): p. 183.
160. Anzano, M.A., et al., *Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells*. Cancer Res, 1982. **42**(11): p. 4776-8.
161. Massague, J., S.W. Blain, and R.S. Lo, *TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders*. Cell, 2000. **103**(2): p. 295-309.
162. Massagué, J., S.W. Blain, and R.S. Lo, *TGFβ Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders*. Cell, 2000. **103**(2): p. 295-309.
163. de Larco, J.E. and G.J. Todaro, *Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(8): p. 4001-5.
164. Coffey, R.J., Jr., et al., *Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(8): p. 3088-93.
165. Murdoch, W.J., *Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis*. Biol Rev Camb Philos Soc, 1996. **71**(4): p. 529-43.
166. Choi, K.C., et al., *The regulation of apoptosis by activin and transforming growth factor-beta in early neoplastic and tumorigenic ovarian surface epithelium*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 2125-35.

167. Meulmeester, E. and P. Ten Dijke, *The dynamic roles of TGF-beta in cancer*. J Pathol, 2011. **223**(2): p. 205-18.
168. Elliott, R.L. and G.C. Blobe, *Role of transforming growth factor Beta in human cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(9): p. 2078-93.
169. Daopin, S., et al., *Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily*. Science, 1992. **257**(5068): p. 369-73.
170. Mueller, T.D. and J. Nickel, *Promiscuity and specificity in BMP receptor activation*. FEBS Lett, 2012. **586**(14): p. 1846-59.
171. Wakefield, L.M. and C.S. Hill, *Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(5): p. 328-41.
172. Isoe, S., et al., *Resistance to growth inhibition by transforming growth factor-beta in malignant glioma cells with functional receptors*. J Neurosurg, 1998. **88**(3): p. 529-34.
173. Kang, Y., C.R. Chen, and J. Massague, *A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells*. Mol Cell, 2003. **11**(4): p. 915-26.
174. Rodriguez, G.C., et al., *Regulation of invasion of epithelial ovarian cancer by transforming growth factor-beta*. Gynecol Oncol, 2001. **80**(2): p. 245-53.
175. Kuwabara, Y., et al., *Establishment of an ovarian metastasis model and possible involvement of E-cadherin down-regulation in the metastasis*. Cancer Sci, 2008. **99**(10): p. 1933-9.
176. Bootcov, M.R., et al., *MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(21): p. 11514-11519.
177. Fairlie, W.D., et al., *MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation*. Journal of Leukocyte Biology, 1999. **65**(1): p. 2-5.
178. Breit, S.N., et al., *The TGF-beta superfamily cytokine, MIC-1/GDF15: a pleiotropic cytokine with roles in inflammation, cancer and metabolism*. Growth Factors, 2011. **29**(5): p. 187-95.
179. Zimmers, T.A., et al., *Growth differentiation factor-15: induction in liver injury through p53 and tumor necrosis factor-independent mechanisms*. J Surg Res, 2006. **130**(1): p. 45-51.
180. Albertoni, M., et al., *Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1*. Oncogene, 2002. **21**(27): p. 4212-9.
181. Akiyama, M., et al., *Macrophage inhibitory cytokine MIC-1 is upregulated by short-wavelength light in cultured normal human dermal fibroblasts*. FEBS Lett, 2009. **583**(5): p. 933-7.
182. Krieg, A.J., et al., *Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia-inducible factor 1 alpha enhances hypoxic gene expression and tumor growth*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(1): p. 344-53.
183. Ding, Q., et al., *Identification of macrophage inhibitory cytokine-1 in adipose tissue and its secretion as an adipokine by human adipocytes*. Endocrinology, 2009. **150**(4): p. 1688-96.
184. Strelau, J., et al., *Progressive postnatal motoneuron loss in mice lacking GDF-15*. J Neurosci, 2009. **29**(43): p. 13640-8.
185. Ago, T. and J. Sadoshima, *GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein*. Circ Res, 2006. **98**(3): p. 294-7.
186. Kempf, T., et al., *The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury*. Circ Res, 2006. **98**(3): p. 351-60.
187. Baek, S.J., et al., *Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(2): p. 356-64.
188. Baek, S.J., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia*. Gastroenterology, 2006. **131**(5): p. 1553-60.

189. Yamaguchi, K., et al., *Identification of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) as a novel downstream target of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3beta pathway.* J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 49617-23.
190. Shnaper, S., et al., *Elevated levels of MIC-1/GDF15 in the cerebrospinal fluid of patients are associated with glioblastoma and worse outcome.* Int J Cancer, 2009. **125**(11): p. 2624-30.
191. Brown, D.A., et al., *Macrophage inhibitory cytokine 1: a new prognostic marker in prostate cancer.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(21): p. 6658-64.
192. Boyle, G.M., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 is overexpressed in malignant melanoma and is associated with tumorigenicity.* J Invest Dermatol, 2009. **129**(2): p. 383-91.
193. Wakchoure, S., et al., *Expression of macrophage inhibitory cytokine-1 in prostate cancer bone metastases induces osteoclast activation and weight loss.* Prostate, 2009. **69**(6): p. 652-61.
194. Brown, D.A., et al., *MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(7): p. 2642-50.
195. Bottner, M., et al., *Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1).* Gene, 1999. **237**(1): p. 105-11.
196. Bauskin, A.R., et al., *The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1.* Embo j, 2000. **19**(10): p. 2212-20.
197. Unsicker, K., B. Spittau, and K. Krieglstein, *The multiple facets of the TGF-beta family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1.* Cytokine Growth Factor Rev, 2013. **24**(4): p. 373-84.
198. Lawton, L.N., et al., *Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta.* Gene, 1997. **203**(1): p. 17-26.
199. Yokoyama-Kobayashi, M., et al., *Human cDNA Encoding a Novel TGF-beta Superfamily Protein Highly Expressed in Placenta.* Journal of Biochemistry, 1997. **122**(3): p. 622-626.
200. Bauskin, A.R., et al., *The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome.* Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2330-6.
201. Tsuji, A., et al., *Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. Potential role of PACE4 in the activation of proproteins in the extracellular matrix.* Biochim Biophys Acta, 2003. **1645**(1): p. 95-104.
202. Soto-Cerrato, V., et al., *The anticancer agent prodigiosin induces p21WAF1/CIP1 expression via transforming growth factor-beta receptor pathway.* Biochem Pharmacol, 2007. **74**(9): p. 1340-9.
203. Tan, M., et al., *PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 109-14.
204. Johnen, H., et al., *Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-[beta] superfamily cytokine MIC-1.* Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1333-1340.
205. Mimeault, M. and S.K. Batra, *Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer.* J Cell Physiol, 2010. **224**(3): p. 626-35.
206. Yang, H., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation.* Mol Cancer Ther, 2003. **2**(10): p. 1023-9.
207. Wong, J., P.-X. Li, and H.J. Klamut, *A Novel p53 Transcriptional Repressor Element (p53TRE) and the Asymmetrical Contribution of Two p53 Binding Sites Modulate the Response of the Placental Transforming Growth Factor-beta Promoter to p53.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(29): p. 26699-26707.
208. Massague, J. and D. Wotton, *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system.* Embo j, 2000. **19**(8): p. 1745-54.
209. Wollmann, W., et al., *The macrophage inhibitory cytokine integrates AKT/PKB and MAP kinase signaling pathways in breast cancer cells.* Carcinogenesis, 2005. **26**(5): p. 900-7.

210. Kim, J.S., et al., *The conventional nonsteroidal anti-inflammatory drug sulindac sulfide arrests ovarian cancer cell growth via the expression of NAG-1/MIC-1/GDF-15*. *Mol Cancer Ther*, 2005. **4**(3): p. 487-93.
211. Staff, A.C., et al., *Growth differentiation factor-15 as a prognostic biomarker in ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2010. **118**(3): p. 237-43.
212. Bock, A.J., et al., *Expression and Clinical Role of Growth Differentiation Factor-15 in Ovarian Carcinoma Effusions*. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2010. **20**(9): p. 1448-1455 10.1111/IGC.0b013e3181f7d6be.
213. Zhao, L., et al., *Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling*. *Cancer Res*, 2009. **69**(19): p. 7696-703.
214. Whiteside, M.A., et al., *A novel time-course cDNA microarray analysis method identifies genes associated with the development of cisplatin resistance*. *Oncogene*, 2004. **23**(3): p. 744-52.
215. Campbell, R.A., et al., *Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-mediated Activation of Estrogen Receptor α : A NEW MODEL FOR ANTI-ESTROGEN RESISTANCE*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(13): p. 9817-9824.
216. Proutski, I., et al., *Prostate-derived factor--a novel inhibitor of drug-induced cell death in colon cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2009. **8**(9): p. 2566-74.
217. Chapman, P.B., et al., *A phase I trial of intraperitoneal recombinant interleukin 2 in patients with ovarian carcinoma*. *Invest New Drugs*, 1988. **6**(3): p. 179-88.
218. Berek, J.S., et al., *A phase I-II trial of intraperitoneal cisplatin and alpha-interferon in patients with persistent epithelial ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 1991. **40**(3): p. 237-43.
219. Bonavida, B., et al., *Synergy is documented in vitro with low-dose recombinant tumor necrosis factor, cisplatin, and doxorubicin in ovarian cancer cells*. *Gynecol Oncol*, 1990. **38**(3): p. 333-9.
220. Burger, R.A., et al., *Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(33): p. 5165-71.
221. Cannistra, S.A., et al., *Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(33): p. 5180-6.
222. Shigetomi, H., et al., *Targeted molecular therapies for ovarian cancer: an update and future perspectives (Review)*. *Oncol Rep*, 2012. **28**(2): p. 395-408.
223. Yap, T.A., C.P. Carden, and S.B. Kaye, *Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(3): p. 167-81.
224. Hatch, K.D., et al., *Responsiveness of patients with advanced ovarian carcinoma to tamoxifen. A Gynecologic Oncology Group study of second-line therapy in 105 patients*. *Cancer*, 1991. **68**(2): p. 269-71.
225. Yokoyama, Y. and H. Mizunuma, *Recurrent epithelial ovarian cancer and hormone therapy*. *World J Clin Cases*, 2013. **1**(6): p. 187-90.
226. Behrens, B.C., et al., *Characterization of a cis-Diamminedichloroplatinum(II)-resistant Human Ovarian Cancer Cell Line and Its Use in Evaluation of Platinum Analogues*. *Cancer Research*, 1987. **47**(2): p. 414-418.
227. Havrilesky, L.J., et al., *Regulation of apoptosis in normal and malignant ovarian epithelial cells by transforming growth factor beta*. *Cancer Res*, 1995. **55**(4): p. 944-8.
228. Chou, T.C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. *Adv Enzyme Regul*, 1984. **22**: p. 27-55.
229. Godwin, P., et al., *Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 120.
230. Rufini, A., et al., *Senescence and aging: the critical roles of p53*. *Oncogene*, 2013. **32**(43): p. 5129-43.
231. Dittmer, T.A. and T. Misteli, *The lamin protein family*. *Genome Biol*, 2011. **12**(5): p. 222.
232. Bulleid, N.J., D.C. John, and K.E. Kadler, *Recombinant expression systems for the production of collagen*. *Biochem Soc Trans*, 2000. **28**(4): p. 350-3.
233. Xie, X., et al., *Autophagy is induced through the ROS-TP53-DRAM1 pathway in response to mitochondrial protein synthesis inhibition*. *Autophagy*, 2012. **8**(7): p. 1071-84.

234. Rosen, S.D. and H. Lemjabbar-Alaoui, *Sulf-2: an extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate*. *Expert Opin Ther Targets*, 2010. **14**(9): p. 935-49.
235. Gibson, D., *The mechanism of action of platinum anticancer agents-what do we really know about it?* *Dalton Transactions*, 2009(48): p. 10681-10689.
236. Sorenson, C.M. and A. Eastman, *Mechanism of cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced Cytotoxicity: Role of G2 Arrest and DNA Double-Strand Breaks*. *Cancer Research*, 1988. **48**(16): p. 4484-4488.
237. Basu, A. and S. Krishnamurthy, *Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage*. *Journal of Nucleic Acids*, 2010. **2010**: p. 16.
238. Janda, E., et al., *Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways*. *J Cell Biol*, 2002. **156**(2): p. 299-313.
239. Haslehurst, A.M., et al., *EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 91.
240. Rosano, L., et al., *Acquisition of chemoresistance and EMT phenotype is linked with activation of the endothelin A receptor pathway in ovarian carcinoma cells*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(8): p. 2350-60.
241. Marchini, S., et al., *Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer*. *Eur J Cancer*, 2013. **49**(2): p. 520-30.
242. Ye, J., et al., *The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment*. *Tumour Biol*, 2014. **14**: p. 14.
243. Zhang, L., et al., *Preclinical and Clinical Estimates of the Basal Apoptotic Rate of a Cancer Predict the Amount of Apoptosis Induced by Subsequent Proapoptotic Stimuli*. *Clinical Cancer Research*, 2010. **16**(17): p. 4478-4489.
244. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(9): p. 647-56.
245. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
246. Fulda, S., *Tumor resistance to apoptosis*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(3): p. 511-5.
247. Yip, K.W. and J.C. Reed, *Bcl-2 family proteins and cancer*. *Oncogene*, 2008. **27**(50): p. 6398-406.
248. Adams, J.M. and S. Cory, *Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential*. *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(5): p. 488-96.
249. Biliran, H., et al., *Overexpression of Cyclin D1 Promotes Tumor Cell Growth and Confers Resistance to Cisplatin-Mediated Apoptosis in an Elastase-myc Transgene-Expressing Pancreatic Tumor Cell Line*. *Clinical Cancer Research*, 2005. **11**(16): p. 6075-6086.
250. Hashimoto, T., et al., *Cyclin D1 predicts the prognosis of advanced serous ovarian cancer*. *Exp Ther Med*, 2011. **2**(2): p. 213-219.
251. Harper, J.W., et al., *Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21*. *Mol Biol Cell*, 1995. **6**(4): p. 387-400.
252. Macleod, K.F., et al., *p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage*. *Genes Dev*, 1995. **9**(8): p. 935-44.
253. Koul, H.K., M. Pal, and S. Koul, *Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors*. *Genes Cancer*, 2013. **4**(9-10): p. 342-359.
254. Vazquez de la Torre, A., et al., *PI3 k/akt inhibition induces apoptosis through p38 activation in neurons*. *Pharmacol Res*, 2013. **70**(1): p. 116-25.
255. Guo, X., et al., *Increased p38-MAPK is responsible for chemotherapy resistance in human gastric cancer cells*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 375.
256. Aguirre-Ghiso, J.A., et al., *ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK)*. *Cancer Res*, 2003. **63**(7): p. 1684-95.
257. Chen, L., et al., *ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage*. *Embo j*, 2005. **24**(19): p. 3411-22.
258. Jiang, H., et al., *The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response*. *Genes Dev*, 2009. **23**(16): p. 1895-909.

259. Austen, B., et al., *Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion*. J Clin Oncol, 2007. **25**(34): p. 5448-57.
260. Yoon, J.H., et al., *Role of autophagy in chemoresistance: regulation of the ATM-mediated DNA-damage signaling pathway through activation of DNA-PKcs and PARP-1*. Biochem Pharmacol, 2012. **83**(6): p. 747-57.
261. Shiloh, Y. and Y. Ziv, *The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(4): p. 197-210.
262. McCool, K.W. and S. Miyamoto, *DNA damage-dependent NF-kappaB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 311-26.
263. Rashi-Elkeles, S., et al., *Parallel induction of ATM-dependent pro- and antiapoptotic signals in response to ionizing radiation in murine lymphoid tissue*. Oncogene, 2006. **25**(10): p. 1584-92.
264. Bivona, T.G., et al., *FAS and NF-kappaB signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR*. Nature, 2011. **471**(7339): p. 523-6.
265. Kay, M.M., *Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3521-5.
266. Serrano, M., *Cancer: final act of senescence*. Nature, 2011. **479**(7374): p. 481-2.
267. Toledo, L.I., et al., *ATR signaling can drive cells into senescence in the absence of DNA breaks*. Genes Dev, 2008. **22**(3): p. 297-302.
268. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell, 1997. **88**(5): p. 593-602.
269. Rader, J., et al., *Dual CDK4/CDK6 Inhibition Induces Cell-Cycle Arrest and Senescence in Neuroblastoma*. Clinical Cancer Research, 2013.
270. Humbert, N., et al., *Regulation of ploidy and senescence by the AMPK-related kinase NUA1*. Embo j, 2010. **29**(2): p. 376-86.
271. Katakura, Y., et al., *Protein kinase C delta plays a key role in cellular senescence programs of human normal diploid cells*. J Biochem, 2009. **146**(1): p. 87-93.
272. Chang, B.D., et al., *p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells*. Oncogene, 2000. **19**(17): p. 2165-70.
273. Liu, N., et al., *Increased CD70 expression is associated with clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy and poor survival in advanced ovarian carcinomas*. Onco Targets Ther, 2013. **6**: p. 615-9.
274. Giusiano, S., et al., *TP53INP1 overexpression in prostate cancer correlates with poor prognostic factors and is predictive of biological cancer relapse*. Prostate, 2012. **72**(2): p. 117-28.
275. Siddik, Z.H., *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7265-79.
276. Hale, M.D., J.D. Hayden, and H.I. Grabsch, *Tumour-microenvironment interactions: role of tumour stroma and proteins produced by cancer-associated fibroblasts in chemotherapy response*. Cell Oncol, 2013. **36**(2): p. 95-112.
277. Wang, Y., et al., *Differential protein mapping of ovarian serous adenocarcinomas: identification of potential markers for distinct tumor stage*. J Proteome Res, 2009. **8**(3): p. 1452-63.
278. Chow, K.-H., R.E. Factor, and K.S. Ullman, *The nuclear envelope environment and its cancer connections*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(3): p. 196-209.
279. Davies, B.S., et al., *Investigating the purpose of prelamin A processing*. Nucleus, 2011. **2**(1): p. 4-9.
280. Redwood, A.B., et al., *A dual role for A-type lamins in DNA double-strand break repair*. Cell Cycle, 2011. **10**(15): p. 2549-60.
281. Maresca, G., et al., *LMNA Knock-Down Affects Differentiation and Progression of Human Neuroblastoma Cells*. PLoS ONE, 2012. **7**(9): p. e45513.
282. Morselli, E., et al., *Anti- and pro-tumor functions of autophagy*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(9): p. 1524-32.

283. Mah, L.Y., et al., *DRAM-1 encodes multiple isoforms that regulate autophagy*. *Autophagy*, 2012. **8**(1): p. 18-28.
284. Crighton, D., S. Wilkinson, and K.M. Ryan, *DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death*. *Autophagy*, 2007. **3**(1): p. 72-4.
285. Xiong, G., et al., *Prolyl-4-hydroxylase alpha subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition*. *BMC Cancer*, 2014. **14**(1): p. 1.
286. Tang, R. and S.D. Rosen, *Functional consequences of the subdomain organization of the sulfs*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(32): p. 21505-14.
287. Staub, J., et al., *Epigenetic silencing of HSulf-1 in ovarian cancer: implications in chemoresistance*. *Oncogene*, 2007. **26**(34): p. 4969-78.
288. Konstantinopoulos, P., et al., *Carboplatin-induced gene expression changes in vitro are prognostic of survival in epithelial ovarian cancer*. *BMC Medical Genomics*, 2008. **1**(1): p. 59.
289. Eling, T.E., et al., *NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis*. *J Biochem Mol Biol*, 2006. **39**(6): p. 649-55.
290. Kudlow, B.A., et al., *Suppression of proliferative defects associated with processing-defective lamin A mutants by hTERT or inactivation of p53*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(12): p. 5238-48.
291. Berger, B., et al., *Defective p53 antiangiogenic signaling in glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(9): p. 894-907.
292. Wang, X., S.J. Baek, and T.E. Eling, *The diverse roles of nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene (NAG-1/GDF15) in cancer*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **85**(5): p. 597-606.
293. Kaur, S., et al., *Potentials of plasma NGAL and MIC-1 as biomarker(s) in the diagnosis of lethal pancreatic cancer*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(2): p. 1.
294. Staff, A.C., et al., *Elevated plasma growth differentiation factor-15 correlates with lymph node metastases and poor survival in endometrial cancer*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(14): p. 4825-33.
295. Wiklund, F.E., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15): a new marker of all-cause mortality*. *Aging Cell*, 2010. **9**(6): p. 1057-64.
296. Bock, A.J., et al., *Expression and clinical role of growth differentiation factor-15 in ovarian carcinoma effusions*. *Int J Gynecol Cancer*, 2010. **20**(9): p. 1448-55.
297. Roschke, A.V., et al., *Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel*. *Cancer Res*, 2003. **63**(24): p. 8634-47.
298. Cheng, J.C., H.M. Chang, and P.C. Leung, *Wild-type p53 attenuates cancer cell motility by inducing growth differentiation factor-15 expression*. *Endocrinology*, 2011. **152**(8): p. 2987-95.
299. Lee, D.H., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system*. *Cancer Res*, 2003. **63**(15): p. 4648-55.
300. Kim, K.K., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(4): p. 704-12.
301. Joshi, J.P., et al., *Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2 phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells*. *Biochem Pharmacol*, 2011. **82**(9): p. 1090-9.
302. Corre, J., et al., *Bioactivity and prognostic significance of growth differentiation factor GDF15 secreted by bone marrow mesenchymal stem cells in multiple myeloma*. *Cancer Res*, 2012. **72**(6): p. 1395-406.
303. Ali, A.Y., et al., *Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum*. *Ann N Y Acad Sci*, 2012.
304. Stronach, E., et al., *Targeting the AKT Pathway in Ovarian Cancer*, in *Emerging Therapeutic Targets in Ovarian Cancer*, S. Kaye, et al., Editors. 2011, Springer New York. p. 73-94.
305. Lackner, M.R., T.R. Wilson, and J. Settleman, *Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies*. *Future Oncology*, 2012. **8**(8): p. 999-1014.

306. Baek, S.J., J.M. Horowitz, and T.E. Eling, *Molecular cloning and characterization of human nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene promoter. Basal transcription is mediated by Sp1 and Sp3*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33384-92.
307. Chen, S.J., et al., *Prostate-derived factor as a paracrine and autocrine factor for the proliferation of androgen receptor-positive human prostate cancer cells*. Prostate, 2007. **67**(5): p. 557-71.
308. Huang, C.Y., et al., *Molecular alterations in prostate carcinomas that associate with in vivo exposure to chemotherapy: identification of a cytoprotective mechanism involving growth differentiation factor 15*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(19): p. 5825-33.
309. Sethi, G., et al., *Multifaceted link between cancer and inflammation*. Bioscience Reports, 2012. **32**(1): p. 1-15.
310. Dijkgraaf, E.M., et al., *Interleukin-6/interleukin-6 receptor pathway as a new therapy target in epithelial ovarian cancer*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(25): p. 3816-27.
311. Marjono, A.B., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 in gestational tissues and maternal serum in normal and pre-eclamptic pregnancy*. Placenta, 2003. **24**(1): p. 100-6.
312. Hinoi, E., et al., *Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor 15 upregulated in osteocytic cells under hypoxia*. Journal of Bone and Mineral Research, 2012. **27**(4): p. 938-949.
313. Ichikawa, T., et al., *TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation*. Oncogene, 2008. **27**(4): p. 409-20.
314. Kempf, T. and K.C. Wollert, *Growth-differentiation factor-15 in heart failure*. Heart Fail Clin, 2009. **5**(4): p. 537-47.
315. Brown, D.A., et al., *Serum macrophage inhibitory cytokine 1 in rheumatoid arthritis: a potential marker of erosive joint destruction*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(3): p. 753-64.
316. Zong, W.X. and C.B. Thompson, *Necrotic death as a cell fate*. Genes Dev, 2006. **20**(1): p. 1-15.
317. Furue, M., *Epithelial tumor, invasion and stroma*. Ann Dermatol, 2011. **23**(2): p. 125-31.
318. Tanno, T., et al., *Growth Differentiating Factor 15 enhances the tumor initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells*. Blood, 2013.
319. Sell, S., *Stem cell origin of cancer and differentiation therapy*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **51**(1): p. 1-28.
320. Song, H., D. Yin, and Z. Liu, *GDF-15 promotes angiogenesis through modulating p53/HIF-1alpha signaling pathway in hypoxic human umbilical vein endothelial cells*. Mol Biol Rep, 2012. **39**(4): p. 4017-22.
321. Tsui, K.H., et al., *Growth differentiation factor-15 upregulates interleukin-6 to promote tumorigenesis of prostate carcinoma PC-3 cells*. J Mol Endocrinol, 2012. **49**(2): p. 153-63.
322. Hu, W., et al., *Augmenting therapy of ovarian cancer efficacy by secreting IL-21 human umbilical cord blood stem cells in nude mice*. Cell Transplant, 2011. **20**(5): p. 669-80.
323. Molchadsky, A., et al., *p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention*. Carcinogenesis, 2010. **31**(9): p. 1501-1508.
324. Sicinski, P., S. Zacharek, and C. Kim, *Duality of p27Kip1 function in tumorigenesis*. Genes Dev, 2007. **21**(14): p. 1703-6.
325. Kruck, S., et al., *High cytoplasmic expression of p27(Kip1) is associated with a worse cancer-specific survival in clear cell renal cell carcinoma*. BJU Int, 2012. **109**(10): p. 1565-70.
326. Slingerland, J. and M. Pagano, *Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer*. J Cell Physiol, 2000. **183**(1): p. 10-7.
327. Choudhury, S., et al., *Molecular Profiling of Human Mammary Gland Links Breast Cancer Risk to a p27+ Cell Population with Progenitor Characteristics*. Cell Stem Cell, 2013. **13**(1): p. 117-130.
328. Payal Agarwal, F.M.L.K., Patricia DeInnocentes and Richard Curtis Bird, *Tumor Suppressor Gene p16/INK4A/CDKN2A and Its Role in Cell Cycle Exit, Differentiation, and Determination of Cell Fate*. InTech, 2012(978-953-307-879-3,).

9. Publikationen

Artikel

Knockdown of platinum-induced growth differentiation factor 15 (GDF15) abrogates P27-mediated tumor growth delay in the chemoresistant ovarian cancer model A2780cis Julia C. Meier, Bernard Haendler, Henrik Seidel, Philip Groth, Robert Adams, Karl Ziegelbauer, Bertolt Kreft, Georg Beckmann, Anette Sommer and Charlotte Kopitz (Cancer Medicine 2014)

Poster

Inhibition of Akt signaling: a strategy to overcome platinum resistance in ovarian cancer. Julia C. Meier, Bernard Haendler, Anette Sommer, Andrea Hägebarth, Georg Beckmann, Bertolt Kreft, Karl Ziegelbauer, and Charlotte C. Kopitz, AACR, 2013, Washington, USA

A novel approach to identify a resistance related gene signature in resistant ovarian cancer models *in vitro* and *in vivo*. Julia Meier, Bernard Haendler, Andrea Hägebarth and Charlotte Kopitz, Young Scientist poster session, Bayer Pharma AG, 2012, Berlin, Germany

Linear Model Analysis Allows the Identification of De Novo and Acquired Resistance Related Genes. J. Meier, H. Seidel, A. Sommer, P. Groth, B. Händler, B. Kreft, C. Kopitz, 2012, EACR, Barcelona, Spain

Molecular characterization of Carboplatin-induced effects in primary ovarian carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. J. Meier, S. Hammer, A. Sommer, P. Groth, N. Arnold, F. Hilpert, C. Kopitz, Young Scientist poster session, Bayer Pharma AG, 2010, Berlin, Germany

10. Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen entfällt der Lebenslauf in der Online-Version.

Aus Datenschutzgründen entfällt der Lebenslauf in der Online-Version.

Erklärung gemäß §7 Absatz 4 der Promotionsordnung zum Dr.rer.nat. der Freien Universität Berlin

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltliche übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Julia Meier

Berlin, 11.02.2014