

**Beitrag zur Aufklärung der
Chemoresistenz in A2780cis
Ovarialkarzinomzellen und der durch
Tinzaparin induzierten
chemosensitivierenden Mechanismen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Daniel Bastian Pfankuchen

aus Leverkusen

Bonn, Januar 2018

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2018

Erscheinungsjahr: 2018

Für meine Mutter Marion und meinen leider viel zu früh verstorbenen Vater Klaus

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
2. Theorie	4
2.1 Cisplatin	4
2.1.1 Entdeckung & Anwendung in der Tumorthherapie	4
2.1.2 Struktur & chemische Eigenschaften	5
2.1.3 Aufnahme & Bioaktivierung.....	6
2.1.4 Reaktivität & Wirkungsmechanismus.....	7
2.1.5 Erkennung & Übermittlung von DNA-Schäden	9
2.2 Chemoresistenz	15
2.2.1 <i>Pre-target</i> Resistenz.....	16
2.2.2 <i>On-target</i> Resistenz.....	18
2.2.3 <i>Post-target</i> Resistenz.....	19
2.2.4 <i>Off-target</i> Resistenz.....	20
2.2.5 Zelladhäsionsvermittelte Resistenz	21
2.3 Heparine	22
2.4 Proteoglykane.....	26
2.5 <i>Wnt-pathway</i>	30
3. Ziele dieser Arbeit	34
4. Material und Methoden	35
4.1 Chemikalien & Reagenzien.....	35
4.1.1 Chemikalien	35
4.1.2 Antikörper	39
4.1.3 Fertigarzneimittel	41
4.1.4 Hergestellte Reagenzien	42
4.2 Verbrauchsmaterialien	49
4.3 Geräte	51
4.4 Software	55
4.5 Zelllinien	56
4.6 Zellkultur.....	56
4.6.1 Inkulturnahme	56
4.6.2 Kultivierung	57
4.6.3 Dauerhafte Lagerung.....	57
4.6.4 Bestimmung der Zellzahl	58
4.6.5 Prüfung auf Mykoplasmenkontamination	58
4.7 Quantitative Bestimmung von Platin	59

4.8 Lyse der A2780 und A2780cis Zellen und Isolierung von Proteinen.....	61
4.8.1 Proteinbestimmung.....	61
4.9 Analyse der Proteinexpression von A2780 & A2780cis Zellen.....	63
4.9.1 Inkubationsansätze.....	63
4.9.2 SDS-Gelelektrophorese.....	63
4.9.3 <i>Western blot</i>	64
4.9.4 Visualisierung der Proteine.....	64
4.9.5 Auswertung und Statistik.....	65
4.10 Zytotoxizitätsstudien von A2780/A2780cis und W1/W1CR Zellen.....	66
4.10.1 Inkubationsversuche von A2780/A2780cis & W1/W1CR-Zellen.....	66
4.10.2 MTT- <i>assay</i>	68
4.10.3 Auswertung und Statistik.....	69
4.11 Durchflusszytometrie.....	70
4.11.1 Inkubationsansätze.....	70
4.11.2 Auswertung und Statistik.....	71
4.12 Durchführung der <i>in vivo</i> Experimente & Quantifizierung des Platin- und Tinzaparingehaltes in A2780 bzw. A2780cis Xenograft-Modellen.....	71
4.12.1 Behandlungsschemata der Mäuse.....	72
4.12.2 Quantitative Bestimmung von Platin.....	72
4.12.3 Auswertung und Statistik.....	72
4.12.4 Quantifizierung des Tinzaparingehaltes in Tumoren von Xenograft-Nacktmäusen.....	72
4.12.5 Auswertung und Statistik.....	74
4.13 Genanalyse der A2780cis Zellen unter Einfluss einer Tinzaparinbehandlung.....	75
4.13.1 Inkubationsansätze.....	75
4.13.2 RNA-Isolierung.....	75
4.13.3 <i>Gene array</i>	75
4.13.4 Auswertung und Statistik.....	76
4.14 Transfektion & Analyse der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren des Wnt-Signalwegs in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen.....	76
4.14.1 Aussäen der Zellen & Messung der Biolumineszenz.....	77
4.14.2 Proteinbestimmung.....	78
4.14.3 Auswertung und Statistik.....	79
5. Ergebnisse & Diskussion.....	80
5.1 Auswirkungen auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit der Dosis und Inkubationszeit des niedermolekularen Heparins Tinzaparin.....	80
5.2 Einfluss weiterer Heparinderivate auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen	85
5.2.1 Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen.....	86

5.2.2 Einfluss von RO-Heparin auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen..	89
5.2.3 Einfluss von Fondaparinux auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen	91
5.2.4 Einfluss von Enoxaparin auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen ...	92
5.3 Einfluss von Tinzaparin auf die Chemoresistenz weiterer cisplatinresistenter Ovarialkarzinomzellen	94
5.4 Charakterisierung der Funktion und Struktur bestimmter Proteoglykane in Bezug auf die Chemoresistenz von A2780cis Zellen.....	96
5.4.1 Einfluss einer enzymatischen Behandlung durch Heparitinase I auf die Toxizität von Cisplatin in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen.....	96
5.4.2 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression der Heparanase in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	98
5.4.3 Einfluss des Heparanase-Inhibitors Ronaparstat auf die Toxizität von Cisplatin in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	100
5.4.4 Analyse der Struktur der Heparansulfat-Ketten von A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen durch Radioligandbindungsstudien.....	103
5.4.5 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression der Sulfatase-2 in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	105
5.4.6 Auswirkung von Tinzaparin auf die Proteinexpression von Syndekan-1 und -4 in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	107
5.5 Zytotoxizität von Cisplatin in A2780/A2780cis und W1/W1CR Ovarialkarzinomzellen in Gegenwart von Kollagen als Substanz der extrazellulären Matrix	109
5.6 Einfluss von Tinzaparin auf die Transkription in A2780cis Ovarialkarzinomzellen.....	113
5.6.1 Identifikation der in der Resistenzsignatur vorhandenen Gene von A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen und der durch Tinzaparin bedingte Einfluss auf die Transkription in A2780cis Zellen	114
5.6.2 Identifikation von deregulierten Signalnetzwerken und biologischen Prozessen durch Tinzaparin in A2780cis Ovarialkarzinomzellen.....	119
5.7 Evaluation einer Beteiligung des PI3K- <i>pathways</i> an den Mechanismen der in A2780cis Zellen vorherrschenden Chemoresistenz.....	120
5.7.1 Einfluss des dualen Inhibitors Dactolisib (BEZ235) auf die Toxizität von Cisplatin in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	120
5.8 Evaluation einer Beteiligung des Wnt- <i>pathways</i> an den Mechanismen der in A2780cis Zellen vorherrschenden Chemoresistenz.....	123
5.8.1 Zytotoxizität des dualen Inhibitors FH535 in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	123
5.8.2 Einfluss des dualen Inhibitors FH535 auf die Toxizität von Cisplatin in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	125
5.8.3 Einfluss von 5-Aminosalicylsäure auf die Toxizität von Cisplatin in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	127
5.9 Evaluation einer Beteiligung des Wnt- <i>pathways</i> an den Mechanismen der in W1CR Zellen vorherrschenden Chemoresistenz.....	129
5.9.1 Einfluss des dualen Inhibitors FH535 auf die Toxizität von Cisplatin in W1 und W1CR Ovarialkarzinomzellen	129

5.10 Einfluss von Tinzaparin auf die Transkription Wnt-assoziiierter Gene in A2780cis Ovarialkarzinomzellen	130
5.11 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression von Glypikan-3 und -4 in A2780cis Ovarialkarzinomzellen	133
5.12 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression von p-GSK-3 β in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	137
5.13 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression von Axin1 in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	139
5.14 Einfluss von Tinzaparin auf die Aktivität des Wnt- <i>pathways</i> in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	142
5.15 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression von TCF-4 in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen	145
5.16 Generierung von A2780 und A2780cis Tumormodellen <i>in vivo</i> zur Charakterisierung der Chemoresistenz sowie Untersuchung einer potentiellen Einflussnahme durch Tinzaparin	148
5.16.1 Vergleich der Tumormodelle und Verifizierung des Resistenzmodells <i>in vivo</i>	148
5.16.2 Einfluss von Tinzaparin auf das Tumorwachstum sowie auf Auswirkungen einer Behandlung mit Cisplatin <i>in vivo</i>	150
5.16.3 Einfluss von Tinzaparin auf den Platin <i>uptake in vivo</i>	153
6. Zusammenfassung	156
7. Literaturverzeichnis	159
8. Anhang	193
8.1 Abbildungsverzeichnis	193
8.2 Tabellenverzeichnis	199
8.3 Publikationsliste	202
8.4 Danksagung	204

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen, welche Bestandteil von Produktbezeichnungen, Rechtsformen und Gesellschaften sind, sowie allgemein bekannte Abkürzungen werden hierbei nicht berücksichtigt. Weiterhin gelten chemische Abkürzungen, griechische Zahlen und römische Ziffern sowie im internationalen Einheitensystem festgelegte Dezimalpräfixe als Voraussetzung. Englische Begriffe werden *kursiv* dargestellt.

% (m/v)	Massenkonzentration in Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
A	Amper
5-ASA	5-Aminosalicylsäure
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Ac	<i>Acetyl</i>
ad	Auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
AMOTL2	<i>Angiomotin like 2</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APAF-1	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli protein</i>
ARMCX2	<i>Armadillo repeat containing, X-linked 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A	<i>Copper-transporting ATPase 1</i>
ATP7B	<i>Copper-transporting ATPase 2</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
Axin1/2	<i>Axis inhibition protein 1/2</i> , Gensymbole: AXIN1/AXIN2
B3GALT6	<i>Beta-1,3-galactosyltransferase 6</i>
B3GAT3	<i>Beta-1,3-glucuronyltransferase 3</i>

B4GALT7	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 7</i>
BAD	<i>BCL-2-associated agonist of cell death</i>
BAK	<i>BCL-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL-2 associated X, apoptosis regulator</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BCL-2	<i>Apoptosis regulator BCL-2</i>
BCL-6	<i>B-cell lymphoma 6 protein, Gensymbol: BCL6</i>
BCL-9	<i>B-cell lymphoma 9 protein</i>
BCL-XL	<i>BCL-2-like protein 1</i>
BRCA1	<i>Breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
BRCA2	<i>Breast cancer type 2 susceptibility protein</i>
BRG1	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4</i>
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
β -TrCP	<i>F-box/WD repeat-containing protein 1A</i>
c	<i>Konzentration</i>
c-ABL	<i>Tyrosine-protein kinase ABL1</i>
CAPZA1	<i>Capping actin protein of muscle Z-line alpha subunit 1</i>
Caspase	<i>Cysteine aspartate-specific protease</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CD97	<i>CD97 antigen</i>
CDC25B	<i>Cell division cycle 25B</i>
CDDP	<i>Cisplatin</i>
CHK1	<i>Checkpoint kinase-1</i>
CI	<i>Confidence interval</i>
c-Jun	<i>Transcription factor AP-1</i>
CK-1 α	<i>Casein kinase 1 alpha</i>
c-MYC	<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>

Abkürzungsverzeichnis

cpm	<i>Counts per minute</i>
cRNA	<i>Coding RNA</i>
CS	<i>Chondroitinsulfat</i>
CSA	<i>ERCC excision repair 8, CSA ubiquitin ligase complex subunit</i>
CSB	<i>ERCC excision repair 6, chromatin remodeling factor</i>
CT	<i>Chemotherapy</i>
CTR1	<i>High affinity copper uptake protein 1</i>
Da	<i>Dalton</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid</i>
DEF6	<i>DEF6, guanine nucleotide exchange factor</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DKK1/2	<i>Dickkopf-related protein 1/2</i>
DMF	<i>Dimethylfuran</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
DVL	<i>Dishevelled</i>
DYRK1B	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B</i>
EC ₅₀	<i>Half maximal effective concentration</i>
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
ECE	<i>Electrical current exclusion</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
EIF4F	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4F complex</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>

ERBB2	<i>Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, Synonym: HER-2/neu</i>
ERCC1	<i>DNA excision repair protein ERCC-1</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ESR1	<i>Estrogen receptor 1</i>
et al.	Et alii
ETV4	<i>ETS variant 4</i>
Evi/Wls	<i>Protein wntless homolog</i>
EXT1/2	<i>Exostosin-1/2</i>
EXTL2	<i>Exostosin-like 2</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAM107B	<i>Family with sequence similarity 107 member B</i>
FAS	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6</i>
FASL	<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i>
g	Gramm
GADD45a	<i>Growth arrest and DNA damage inducible alpha</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
GEM	Gemcitabin
GF-AAS	Graphitofen-Atomabsorptionsspektroskopie
GGR	<i>Global genomic repair</i>
GlcA	<i>Glucuronic acid</i>

Abkürzungsverzeichnis

GlcN	<i>Glucosamine</i>
GPC	<i>Glypican</i>
GSH	Glutathion
(p-) GSK-3 β	(Phosphorylierte-) Glykogensynthase-Kinase-3 β
GST	Glutathion-S-Transferase
GS-X	Glutathion-S-Konjugate
h	Stunde
HDAC	Histon-Deacetylase
HMG	<i>High-mobility group</i>
HMG1	<i>High mobility group protein B1</i>
HP	Heparitinase
HR23B	<i>UV excision repair protein RAD23 homolog B</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
hUBF	<i>Human upstream-binding factor</i>
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
ICR	<i>interstrand crosslink repair</i>
IdoA	<i>Iduronic acid</i>
I.E.	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
Int-1	<i>Wingless-type mouse mammary tumour virus integration site family, member 1</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
L	Liter
LATS2	<i>Large tumor suppressor homolog 2</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LGALS1	<i>Galectin 1</i>
LMWH	<i>Low molecular weight heparin</i>

LRP5/6	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
luc2P	Luciferase-Reportergen (<i>Photinus pyralis</i>)
m	Meter
m ²	Quadratmeter
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	<i>E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2</i>
min	Minute
miR	<i>Micro RNA</i>
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
mol	Mol
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRP	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
MSH2	<i>MutS homolog 2</i>
MSK1	<i>Mitogen- and stress-activated kinase 1</i>
MT2A	<i>Metallothionein 2A</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NFIB	<i>Nuclear factor I B</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NMH	Niedermolekulares Heparin
OS	<i>Overall survival</i>
p21 ^{Waf1/Cip1}	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
p27 ^{kip1}	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>

Abkürzungsverzeichnis

p38	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
p53	Tumorsuppressor p53
p63	Tumorprotein 63
p73	Tumorprotein p73
p300	<i>Histone acetyltransferase p300</i>
PARP	Poly-(ADP-Ribose) Polymerase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCM1	<i>Pericentriolar material 1</i>
pEC ₅₀	Negativer dekadischer Logarithmus der EC ₅₀
p-Glykoprotein	<i>Permeability-Glykoprotein</i>
Ph.Eur.	<i>Pharmacopoea Europaea</i>
pH-Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von H ⁺ /H ₃ O ⁺ -Ionen in wässriger Lösung
p.i.	<i>Post injection</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
pKs	pKs-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POLH	<i>DNA polymerase eta</i>
PORCN	<i>Protein-serine O-palmitoleoyltransferase porcupine</i>
PPAR γ/δ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma/delta</i>
PS	Polystyrol
PTK	<i>Protein tyrosine kinase</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pygo	<i>Pygopus homolog</i>
REV3	<i>DNA polymerase zeta catalytic subunit</i>
Rf	Resistenzfaktor
RNA	Ribonucleic acid

RO-	<i>Reduced oxy-</i>
RPA	<i>Replication protein A</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	<i>Sekunde</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i>
SFRP1-5	<i>Secreted frizzled-related protein 1-5</i>
SGK3	<i>Serum/glucocorticoid-regulated kinase 3</i>
SMAD3	<i>SMAD family member 3</i>
SOX4	<i>SRY-related high mobility group box 4</i>
Stabw	<i>Standardabweichung</i>
Sulf-1/2	<i>Sulfatase-1/2</i>
T	<i>Tesla</i>
TBP	<i>TATA-box-binding protein</i>
TBS	<i>TRIS buffered saline</i>
TBS-T	<i>TRIS buffered saline with Tween 20</i>
TCF	<i>Transcription factor</i>
TCF7L1	<i>Transcription factor 7-like 1, Synonym: TCF-3</i>
TCF7L2	<i>Transcription factor 7-like 2, Synonym: TCF-4</i>
TCR	<i>Transcription-coupled repair</i>
TFIIH	<i>Transkriptionsfaktor II H</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMP1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i>
TLE/Groucho	<i>Transducin-like enhancer protein</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TPM1	<i>Tropomyosin 1</i>
TSC22D1	<i>Transforming growth factor beta-stimulated clone 22 homolog</i>

Abkürzungsverzeichnis

TYMP	<i>Thymidine phosphorylase</i>
U	<i>Unit</i>
UACA	<i>Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats</i>
U/min	Umdrehungen/Minute
UFH	Unfraktioniertes Heparin
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDAC	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein</i>
v.l.	Von links
vs.	Versus
WHO	<i>World Health Organization</i>
WIF-1	<i>Wnt inhibitory factor 1</i> , Gensymbol: WIF1
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
Wnt-3	<i>Proto-oncogene Wnt-3</i> , Gensymbol: WNT3
Wnt-3a/-6/-11	Protein Wnt-3a/-6/-11, Gensymbole: WNT3A/WNT6/WNT11
WWOX	<i>WW domain containing oxidoreductase</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum group A-complementing protein</i>
XPB	<i>Xeroderma pigmentosum group B-complementing protein</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum group C-complementing protein</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum group D-complementing protein</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum group F-complementing protein</i>
XPG	<i>Xeroderma pigmentosum group G-complementing protein</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Krebserkrankungen zählen zu den schwerwiegendsten Erkrankungen der Gesellschaft, unabhängig vom Entwicklungsstand des jeweiligen Landes (1). In den USA stellt Krebs zurzeit die zweithäufigste Todesursache dar. Hierbei wird allerdings erwartet, dass in einigen Jahren Krebs die kardiovaskulären Erkrankungen als häufigste Todesursache ablöst (2). Die zunehmende Häufigkeit von Krebserkrankungen weltweit findet ihren Ursprung unter anderem in der wachsenden und alternden Bevölkerung. Weitere dazu beitragende Faktoren äußern sich in bereits bekannten Risiken wie Rauchen, Übergewicht und unzureichender physikalischer Aktivität. Aber auch sich generell verändernde Bedingungen wie die Verstädterung oder die wirtschaftliche Entwicklung gelten als Risikofaktoren (1).

So wurden im Jahr 2012 Schätzungen zufolge weltweit etwa 14,1 Millionen neue Krebserkrankungen und etwa 8,2 Millionen dadurch bedingte Todesfälle verzeichnet. Darunter wurden Krebserkrankungen der Lunge bei Männern und Brust bei Frauen am häufigsten diagnostiziert, welche beide zugleich beim entsprechenden Geschlecht die häufigste Anzahl an durch Krebs bedingten Todesfällen darstellten. Weitere oft diagnostizierte Krebsformen bei Männern waren solche der Prostata, des Kolons und Rektums, des Magens sowie der Leber. Bei Frauen wurden Krebsformen des Kolons und Rektums, der Lunge, des Zervix sowie des Magens am häufigsten diagnostiziert (1). Interessanterweise sind die Inzidenzraten für die Summe an Krebsarten in besser entwickelten Ländern etwa doppelt so hoch im Vergleich zu minder entwickelten Ländern. Die letztlich damit assoziierten Todesraten sind in erstgenannten Ländern jedoch nur um etwa 8-15 % höher. Dieser Unterschied spiegelt vor allem die unterschiedliche Verfügbarkeit von entsprechenden Behandlungsmöglichkeiten wider (1).

Obwohl Karzinome der Ovarien im Vergleich zu bereits erwähnten Formen von Krebserkrankungen vergleichsweise weniger häufig diagnostiziert werden (1), stellen Ovarialkarzinome die tödlichste gynäkologische Erkrankung dar (3,4). Die Tatsache, dass eine überwiegende Anzahl (etwa 70 %) an Fällen erst im fortgeschrittenen Stadium erkannt werden und folglich mit einer schlechten Prognose einhergehen, ist zum einen dem Mangel an Methoden für eine entsprechende frühe Diagnose im Verlauf dieser Erkrankung geschuldet. Zum anderen trägt der Krankheitsverlauf selbst im früheren Stadium dazu bei, da dieser häufig ohne weitere Warnzeichen voranschreitet (3). Die Behandlung von Ovarialkarzinomen in späten Stadien verläuft in den meisten Fällen ohne Erfolg. Hinzu kommt, dass sich aufgrund der starken Heterogenität solcher Tumore eine entsprechende Behandlung als schwierig herausstellt. So unterscheiden sich bspw. verschiedene histologische Varianten von epithelialen

Ovarialkarzinomen durch einen individuellen zellulären Ursprung sowie durch Nutzung unterschiedlicher *pathways* (3,5,6). Folglich ist für eine erfolgreiche Behandlung entsprechender Krebsleiden eine bessere Charakterisierung des Tumors mit einer damit einhergehenden Entwicklung erfolgsversprechender Therapien notwendig (3).

Die Standardbehandlung für Karzinome der Ovarien ist eine operative Entfernung von möglichst dem gesamten Tumor mit einer möglichen sich anschließenden platinbasierten Chemotherapie (3,7). Durch die Entfernung von Anteilen des Tumorgewebes wird unter anderem die Umgebung des Tumors derart beeinflusst, sodass eine entsprechende adjuvante Therapie verbessert werden kann (5). Eine solche Therapie stellt eine alleinige Behandlung mit platinhaltigen Therapeutika dar, welche je nach unterschiedlichen Stadien des Karzinoms auch in einer Kombination mit Paclitaxel verabreicht wird (5,7). Mit Bevacizumab wurde von der EMA ein weiteres Therapeutikum zur kombinatorischen Behandlung bei Patientinnen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen zugelassen (8). Weitere Wirkstoffe befinden sich in der Entwicklung und werden in klinischen Studien evaluiert. Zu solchen Substanzen zählen bspw. Inhibitoren des *signalings* von Wachstumsfaktoren und PARP (3).

Obwohl die Fortschritte in der primären Therapie zu einer hohen kompletten Remissionsrate führen, ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rezidivs hoch (5). Dabei richtet sich eine folgende Chemotherapie anhand der zuvor vorzufindenden Sensitivität gegenüber platinhaltigen Substanzen (3,7). Patienten mit einer entsprechend hohen Sensitivität profitieren zumeist aus einer Kombinationstherapie aus bspw. Cisplatin mit Paclitaxel oder pegyliertem, liposomalem Doxorubicin (3,7). Die Prognose bei Patienten, welche sich als unempfindlich bzw. resistent gegenüber platinhaltigen Substanzen charakterisieren lassen ist dementsprechend schlecht, da in diesen Fällen auch eine Ersatztherapie meist keinen Benefit zeigt, und folglich die hauptsächliche Intention einer solchen Therapie auf die Kontrolle der Symptome und den Erhalt der Lebensqualität fokussiert ist (5,7).

Zusammengefasst unterstreichen diese Tatsachen zum einen den dringenden Bedarf an neuen antitumoral wirksamen Substanzen in der Behandlung von Ovarialkarzinomen. Eine besondere Herausforderung hierbei stellt die Vielfältigkeit der entsprechenden Tumorform dar, wodurch eine generalisierte Bezeichnung von Ovarialkrebs nicht adäquat erscheint (5). Zum anderen gilt es die bisher mäßig aufgeklärten und vielfältigen molekularen Mechanismen einer Platinresistenz in Ovarialkarzinomen im Einzelnen aufzuklären um dieser zu entgegnen, mit einer gesteigerten bzw. anhaltenden Effektivität der seit langem etablierten Wirkstoffklasse als Konsequenz.

In diesem Rahmen war die Intention dieser Arbeit die weiterführende Charakterisierung der in A2780cis Ovarialkarzinomzellen vorherrschenden Mechanismen der Cisplatinresistenz. Zudem sollte ein Einblick in die molekularen Mechanismen des niedermolekularen Heparins Tinzaparin geleistet werden, welche in vorangegangenen Arbeiten (9,10) mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Überwindung der Cisplatinresistenz verantwortlich waren. Hierbei treten massive Beeinflussungen auf Transkriptions- und Proteinebene durch Tinzaparin hervor, welche häufig mit dem Auftreten einer Chemoresistenz in Verbindung gebracht werden. Zudem wird der durch das Heparin deregulierte *Wnt-pathway* als vielversprechendes *target* in der Überwindung einer Cisplatinresistenz skizziert. Darüber hinaus wird durch Experimente an Nacktmäusen ein erster Transfer der gewonnenen Daten auf *in vivo* Ebene dargestellt, um eine mögliche klinische Relevanz der Kombination aus einer Behandlung mit Cisplatin und Tinzaparin zu evaluieren.

2. Theorie

2.1 Cisplatin

2.1.1 Entdeckung & Anwendung in der Tumorthherapie

Cisplatin wurde erstmals im Jahr 1844 von Michel Peyrone synthetisiert (11,12), während die Struktur 1893 durch Alfred Werner aufgeklärt werden konnte. In den Fokus der naturwissenschaftlichen Forschung rückte die Verbindung aber erst durch Untersuchungen von Barnett Rosenberg in den 1960er Jahren. Hierbei wollte er mögliche Auswirkungen eines elektrischen Feldes auf die Wachstumseigenschaften von *Escherichia Coli* evaluieren und konnte feststellen, dass die Bakterien dabei in ihrer Zellteilung gehemmt wurden. Es stellte sich heraus, dass nicht das elektrische Feld selbst, sondern die Elektrolyseprodukte der beiden verwendeten halbzylindrischen Platinelektroden für diese Hemmung verantwortlich waren. Zwei aktive Komplexe wurden identifiziert, die für die Wirkung verantwortlich waren: die cis-Isomere $[\text{Pt II} (\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ (Cisplatin) und $[\text{Pt IV} (\text{NH}_3)_2\text{Cl}_4]$ (13). Daraufhin folgte 1968 eine intraperitoneale Verabreichung von Cisplatin in Mäuse, welche maligne Tumore des mesenchymalen Gewebes (Sarkome) oder des Blutes (Leukämie) in sich trugen, mit dem Ergebnis einer Tumorregression (14). Nachdem bestätigende Tests *in vivo* am *Chester Beatty Institute* in London durchgeführt wurden, erfolgte die klinische Testung des Cisplatins durch das *US National Cancer Institute*. Die ersten Patienten wurden 1971 mit dem Zytostatikum behandelt, sodass Cisplatin 1978 das erste von der FDA zugelassene Platinderivat zur Behandlung von Krebsleiden war (15,16).

Noch heute sind platinhaltige Chemotherapeutika wie Cisplatin fester Bestandteil bei der Therapie verschiedener Tumorarten, darunter z.B. Ovarial-, Hoden- und Lungentumore (7,17–20). Aufgrund zahlreicher schwerwiegender Nebenwirkungen wie Neuro-, Nephro- und Ototoxizität (21–25) kam es im Laufe der Jahre zu einer Vielzahl an Synthesen neuer, platinhaltiger Verbindungen. So erfolgte 1989 durch die FDA eine Zulassung für Carboplatin zur Behandlung von Ovarialkarzinomen (16). Es ist eine Platinverbindung der zweiten Generation und im Vergleich zu Cisplatin weniger reaktiv und besitzt eine langsamere DNA-Bindungskinetik, was zu einer deutlich verminderten Toxizität führt (21). Aufgrund der begrenzten zellulären Eliminationskinetik von Protein-Carboplatinkomplexen unterscheiden sich die beiden Derivate deutlich in ihrer Halbwertszeit (15) (Cisplatin: 1,5-3,6 h vs. Carboplatin: 30 h) (21).

Ein weiterer Grund für das Bestreben nach neuen, platinhaltigen Verbindungen ist das Auftreten von sog. Chemoresistenzen, welche sich in einer verminderten Wirksamkeit des Platinmoleküls äußern. Diese Resistenz kann sich sowohl im Verlaufe von mehreren Behandlungszyklen manifestieren (z.B. bei Ovarialkrebs), als auch intrinsischen Ursprungs sein (z.B. bei Lungen- oder Brustkrebs) (16). Aufgrund dessen folgte die Entwicklung von Oxaliplatin. Da sich dieser Wirkstoff mit dem Resistenzprofil des Cisplatin sowie des Carboplatins nicht überschneidet (26), findet dieser Wirkstoff in Kombination mit 5-Fluorouracil und Leucovorin zum Beispiel Anwendung bei Kolorektalkrebs (27), bei denen Cisplatin keine klinisch signifikanten Erfolge vorweisen kann (28,29). Weitere Entwicklungen fokussieren sich auf die Modifikation des Arzneimittels, mit dem Ziel einer verbesserten Verfügbarkeit des Wirkstoffes durch liposomal- oder copolymerbasierte Formulierungen (16,30,31).

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Resistenzentwicklung sind bis heute nicht ausreichend geklärt (32,33). Umso bedeutender ist die Identifikation der molekularen Mechanismen des Tumors, welche als Konsequenz eine verminderte Wirksamkeit des Zytostatikums nach sich ziehen. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse können neue, effiziente Wirkstoffe entwickelt werden.

2.1.2 Struktur & chemische Eigenschaften

(SP-4-2)-Diammindichloridoplatin(II) ist ein quadratisch planarer Komplex mit Platin als Zentralatom und jeweils zwei Ammin- und Chloridoliganden in cis-Orientierung (34). Die neutrale Ladung des Moleküls ist bedingt durch den Ladungsausgleich der beiden negativ geladenen Chloridionen mit dem zweifach positiv geladenen Platinatom. Bei Raumtemperatur liegt das Molekül fest in kristalliner Pulverform vor und ist schlecht löslich in Wasser (15).

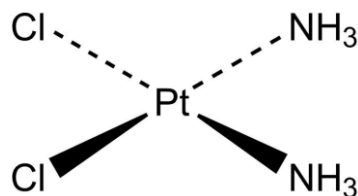


Abbildung 1: Struktur von (SP-4-2)-Diammindichloridoplatin(II)
(Cisplatin)

In Wasser liegen neben dem Ursprungsmolekül fünf weitere Hydrolyse- bzw. Dissoziationsprodukte vor (Abbildung 2). Die prozentuale Verteilung des Gleichgewichts ist hierbei stark abhängig vom pH-Wert und der Chloridionenkonzentration, welche wiederum durch die Ausgangskonzentration des Cisplatin beeinflusst wird. In stark verdünnten Lösungen ($< 5 \times 10^{-7}$ mol/L) überwiegen der Monoaqua- und Diaquakomplex. Die pKs-Werte beider Verbindungen liegen bei ca. 6,9 (Monoaquakomplex) und 5,6 bzw. 9,3 (Diaquakomplex) und aufgrund der möglichen Hydrolyse des Zytostatikums erfolgt eine Stabilisierung des Fertigarzneimittels durch Zugabe von NaCl 0,9 % (m/v) (34).

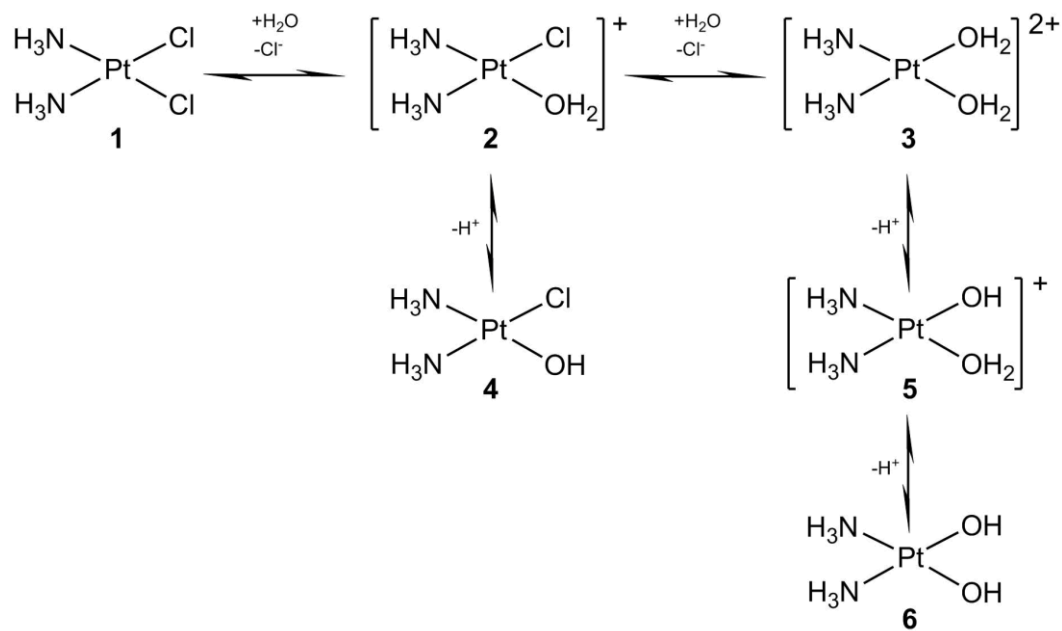


Abbildung 2: Hydrolyse von Cisplatin und Protolyseverhalten der Aquakomplexe in wässrigem Milieu. Modifiziert nach el-Khateeb et al. (35).

2.1.3 Aufnahme & Bioaktivierung

Wird Cisplatin intravenös appliziert, liegt es extrazellulär zum größten Anteil ungeladen und unverändert vor. Dies lässt sich durch die vergleichsweise hohe Chloridionenkonzentration (ca. 100 mmol/L) und der damit einhergehenden unterbleibenden Hydrolyse erklären (36). Intrazellulär ist diese Konzentration deutlich geringer (ca. 3-20 mmol/L), wodurch eine Substitution der Chlor-Atome durch ein bzw. zwei Wassermoleküle erfolgt. Die nun positiv geladenen Monoaqua- und Diaquakomplexe sind sehr reaktiv und haben eine hohe Affinität zu Strukturen mit nukleophilen Zentren (37,38). Die exakten molekularen Mechanismen, durch die Cisplatin in die Zelle gelangt, werden bis heute diskutiert. Im Vergleich zu anderen Substanzklassen der sog. *small-molecule cancer drugs* weist Cisplatin eine ausgeprägte Polarität auf und gelangt relativ langsam in den intrazellulären Raum. Die Aufnahme selbst

wird durch verschiedene Parameter, wie z.B. der Konzentration an Natrium- und Kaliumionen, des pH-Wertes sowie der Präsenz an Verbindungen mit reduzierenden Eigenschaften, beeinflusst (16). Neben der passiven Diffusion, welche lange Zeit als Hauptaufnahmemechanismus der Platinverbindung galt (37), zählen Transporter und gesteuerte Kanäle als additiver Mechanismus zur Schleusung von Cisplatin in die Zelle (39–41). So konnte der Kupfertransporter CTR1, ein an der Kupferhomöostase wesentlich beteiligter Transporter, als ein bedeutender Influxtransporter für Cisplatin identifiziert werden (42). Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 3 dargestellt.

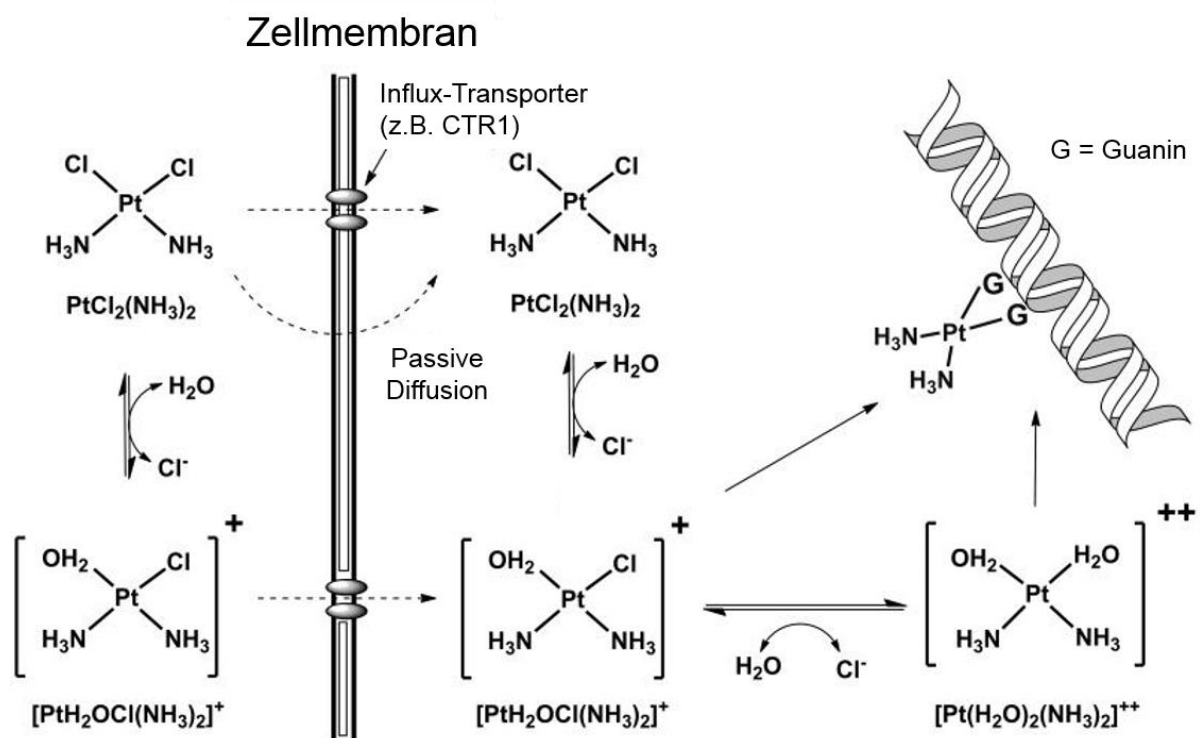


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme von Cisplatin und Hydrolyse sowie Bindung der reaktiven Aquakomplexe an die Zielstrukturen der DNA. Modifiziert nach More et al. (43).

2.1.4 Reaktivität & Wirkungsmechanismus

Wie bereits beschrieben liegt Cisplatin intrazellulär zu einem großen Anteil als Monoaqua- und Diaquakomplex vor (Abbildung 3). Besonders erstgenannter Komplex ist als sehr reaktives Molekül beschrieben, jedoch ist seine letztlich zytotoxische Wirkung begrenzt durch die Präsenz einer Vielzahl an intrazellulären Nukleophilen, wie z.B. Glutathion, Methionin, Metallothionein und Proteinen (44).

Die toxische Wirkung des Cisplatin wird hauptsächlich der Interaktion mit der N7-Position des Imidazolrings der Purinbasen Adenin und Guanin der DNA zugeschrieben, welche zur

Ausbildung von DNA-Protein-Addukten sowie DNA-DNA Interstrang- und Intrastrang-Quervernetzungen führt (45). Letztgenannte Quervernetzung der Purinbasen gilt hierbei für die zytotoxische Wirkung als hauptverantwortlich (44,46,47), innerhalb derer GpG 1,2- und ApG 1,2-Intrastränge den quantitativ größten Anteil darstellen (60-65 % bzw. 20-25 %) (48). Schließlich resultiert aus der Intrastrand-Adduktbildung eine Krümmung der DNA um etwa 35 Grad und eine damit einhergehende Schädigung der DNA, die von einer Vielzahl an Proteinen erkannt wird und nachgeschaltete Prozesse aktiviert (49).

Jedoch ist der Mechanismus, welcher letztlich die Zelle dazu verleitet den programmierten Zelltod – die Apoptose – einzuleiten, nicht einheitlich aufgeklärt. Obwohl die genomische DNA das entscheidende pharmakologische *target* des Cisplatin darstellt, werden weitere zelluläre Strukturen diskutiert, die in die zytotoxische Wirkung involviert sind (50). Die Befunde, dass nur ungefähr 1 % der intrazellulären Cisplatinkonzentration an nukleäre DNA bindet (50), manche Studien weder eine direkte Korrelation zwischen DNA-Addukten und einer Cisplatin induzierten Toxizität (51,52), noch zwischen der Inhibition der DNA-Synthese und Zytotoxizität (50,53) zeigen konnten, und dass die Platinverbindung dazu befähigt ist, eine Apoptose unter Ausschluss von DNA-Schäden zu induzieren (54), untermauert die Involvierung weiterer molekularer Mechanismen neben der DNA-Platinierung für die Induktion pro-apoptotischer Signale.

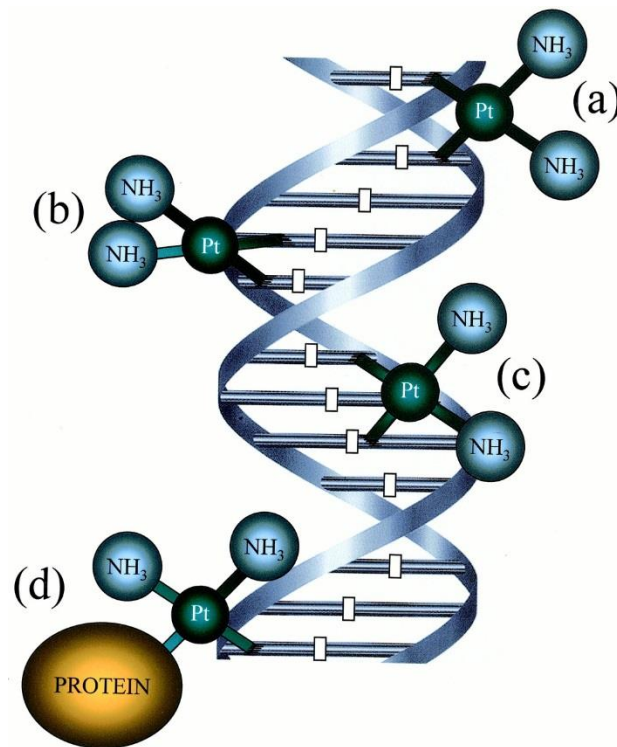


Abbildung 4: Schematische Darstellung der gebildeten Addukte durch Bindung von Cisplatin an die DNA. Interstrang- (a), 1,2-Intrastrang- (b), 1,3-Intrastrang- (c) und Protein-DNA-Quervernetzung (d). Modifiziert nach Gonzalez et al. (50).

2.1.5 Erkennung & Übermittlung von DNA-Schäden

Wie bereits beschrieben, führt die Deformierung der DNA-Helix durch Cisplatin zu einer Bindung mehrerer Proteine an die DNA, wodurch eine Reihe von Signalkaskaden induziert wird. Darunter befinden sich z.B. HMG-Box Proteine, Reparaturproteine, Transkriptionsfaktoren und weitere Proteine, die bevorzugt 1,2-Intrastrang-Quervernetzungen erkennen (55). Hierbei sind diese Proteine nicht zwingend auf die Aufgabe beschränkt, DNA-Schäden zu erkennen und diese an *downstream*-Effektoren zu übermitteln. Ein Beispiel ist das HMG1 Protein, welches seine Zytotoxizität über eine Interaktion mit dem DNA-Cisplatin-Addukt vermittelt, da auf diese Weise zelluläre Reparaturmechanismen verhindert werden (56). Weiterhin können die Cisplatin-Addukte Proteine wie hUBF und TBP maskieren, um somit dessen Beteiligung an der Transkription durch die RNA Polymerase I zu unterbinden (57,58). So kann als Konsequenz die folgende Inhibition der Transkription selbst die Übermittlung von DNA-Schäden initiieren (44,59).

Einige der durch die Schädigung der DNA regulierten Signalwege werden nachfolgend beschrieben.

2.1.5.1 AKT-pathway

AKT gehört zur Familie der durch die Phosphatidylinositol-3-Kinasen regulierten Serin/Threonin-Kinasen (60). AKT forciert die *downregulierung* pro-apoptotischer Signalwege, indem mehrere *downstream* Zielproteine phosphoryliert und moduliert werden (61,62). So kann AKT das Protein XIAP durch Phosphorylierung stabilisieren, was als Konsequenz eine verringerte Caspase-3-Aktivität und einer damit einhergehenden verminderten Induktion der Apoptose nach sich zieht (63). Folglich ist diese Kinase befähigt einer Apoptose entgegenzuwirken, die z.B. durch pro-apoptotische Stimuli wie Cisplatin induziert werden können (55,64,65). Um dem entgegenzuwirken wurde eine Vielzahl von Verbindungen, wie z.B. der duale Inhibitor Dactolisib (BEZ235) entwickelt, welcher sowohl den PI3K-pathway, als auch die mTOR-Kinase-Aktivität inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül effektiv den PI3K-pathway unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen blockiert (66,67). Aufgrund dessen befand sich dieser Wirkstoff bereits in klinischen Prüfungen (68,69).

2.1.5.2 p53-pathways

p53 ist ein bedeutendes Tumorsuppressorprotein, welches in der Gesamtheit aller humaner Tumoren eine hohe Mutationsrate aufweist (70,71). Das Protein ist befähigt die Zellproliferation zu inhibieren, indem es entweder einen Zellzyklusarrest induziert oder die Apoptose als eine Konsequenz von zellulärem Stress einleitet. Dies charakterisiert p53 als ausschlaggebenden Faktor in der Regulierung zellulärer Prozesse (72,73). So werden Gene, wie z.B. der *cyclin dependent kinase*-Inhibitor p21^{Waf1/Cip1} und GADD45a durch p53 infolge einer Cisplatinbehandlung transaktiviert (74). Weiterhin interagiert p53 mit mehreren Komponenten des NER-Mechanismus, z.B. XPC und dem RPA, was eine Funktion von p53 in der DNA-Reparatur vermuten lässt (75–77). So scheint es offensichtlich, dass die Sensitivität einer Cisplatinexposition positiv mit den Funktionen des p53-Wildtyps in vielen humanen Tumorzelllinien korreliert (78). Proteine, welche in p53 vermittelte Signalkaskaden involviert sind, steuern die Aktivität des Tumorsuppressors und folglich auch die Toxizität des Cisplatin. So ist die Aurora Kinase A in einer Vielzahl humaner Tumorarten überexprimiert, welche durch Phosphorylierung von p53 zu dessen verstärkter Ubiquitinierung durch MDM2 führt. Aufgrund dessen wird dieser Kinase eine kritische Rolle in p53-abhängigen Signalwegen zugesprochen (79). Die Tatsache, dass keine bzw. negative Korrelation zwischen dem p53-Status und der toxischen Auswirkung auf eine Cisplatinexposition existiert (80,81), verdeutlicht die Abhängigkeit des Verhältnisses von p53 und einer durch Cisplatin induzierten Toxizität von mehreren Faktoren wie z.B. der Tumorzellart, der Aktivierung spezifischer Signalkaskaden sowie der Präsenz weiterer genetischer Veränderungen. Für die vollständige Erfassung der Rolle von p53 in einer Cisplatin vermittelten Zytotoxizität bedarf es immer noch weiterer Studien (55).

2.1.5.3 MAPK, JNK & ERK-pathway

Vertreter der Proteine aus der MAPK-Familie werden in drei Untergruppen eingeteilt, welche allesamt durch eine Inkubation mit Cisplatin aktiviert werden: ERK, JNK und p38 MAPK (55,82).

Während der *ERK-pathway* hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren und Zytokine induziert wird, erfolgt der Anstoß der zwei weiteren Kaskaden vornehmlich durch mehrere Stressfaktoren wie z.B. ionisierende UV-Strahlung, DNA-Schäden, Tumornekrosefaktoren und hyperosmotischer Stress (83–86).

Diese Kinasen sind durch Integration extrazellulärer Signale an der Regulierung der Zellproliferation und Differenzierung, dem Überleben der Zellen sowie der Apoptose beteiligt (84,87–90).

p38 MAP-Kinasen regulieren eine rapide Genexpression sogenannter *immediate-early* Gene, sowie weitere zelluläre Mechanismen durch Phosphorylierung diverser Substrate wie Transkriptionsfaktoren, Komponenten des Chromatin-Protein Gerüsts sowie *downstream* Serin/Threonin Effektorinasen (91–93). So wird *in vitro* das Histon H3 an Serin 10 durch diese Kinasen und der *downstream* MSK1 phosphoryliert (92). Aufgrund der Tatsache, dass der p38 MAPK-Signalweg ebenfalls an einer durch Cisplatin induzierten Phosphorylierung an gleicher Position involviert ist (94), lässt sich der Aktivierung dieser Signalkaskaden als zelluläre Antwort auf Cisplatin eine kritische Rolle zuweisen (95).

Das Ausmaß der Beteiligung des ERK- und JNK-*pathways* an einer durch Cisplatin vermittelten Schädigung der DNA ist nicht ausreichend geklärt und wird stark diskutiert. Die unterschiedlichen Effekte diverser Studien (96–99) lassen eine Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp und dessen Aktivierungsmuster vermuten. Nach heutigem Stand der Forschung ist eine generalisierte Aussage nur bedingt möglich (55).

2.1.5.4 Zellzyklus-Kontrollpunkte und -Arrest

Die Kontrollpunkte des Zellzyklus dienen zur Überwachung korrekter Abläufe von Ereignissen innerhalb einer Zelle. Aus einer Schädigung von DNA resultiert ein Stillstand im Zellzyklus, sodass der Zelle ein Zeitraum für die DNA-Reparatur zur Verfügung steht (55). Solche Mechanismen sind für geordnete Entwicklung sowie Prävention genomischer Instabilität und karzinogener Auswirkungen von außerordentlicher Relevanz. Diese Kontrollpunkte des Zellzyklus werden in die Phasen G1/S, S und G2/M eingeteilt (100).

Die G1/S Phase gewährleistet, dass eine Schädigung von DNA nicht repliziert wird. Eine Reparatur solcher Schäden, welche in der S- bzw. späten G2-Phase des Zellzyklus auftreten, erfolgt in der G2/M Phase um einer Übertragung geschädigter DNA bei der Mitose vorzubeugen (55). Es wird vermutet, dass der G2 Arrest im Zellzyklus für den Anstoß des Zelltodes infolge einer Behandlung mit Cisplatin von besonderer Bedeutung ist (101,102).

Als Folge von DNA-Schäden werden die beiden Kinasen ATM und ATR aktiviert (103,104), wobei lediglich Letztgenannte an einer zellulären Antwort auf eine Behandlung mit Cisplatin beteiligt zu sein scheint (105). Als Konsequenz erfolgt letztlich eine Phosphorylierung an Serin 15, wodurch p53 stabilisiert wird (106). ATR aktiviert weitere *downstream targets* wie z.B. die

CHK1, was ebenfalls Modifikationen an p53 zur Folge hat (107). Des Weiteren existiert ein Zusammenhang zwischen ATR und der Aktivierung spezifischer MAPK-Signalkaskaden (108).

2.1.5.5 DNA-Reparaturmechanismen

Der NER-*pathway* gilt als hauptverantwortlich im Entfernen von Cisplatin-DNA-Addukten und kann in die Erkennung von Läsionen, das Ausschneiden und Entfernen von einsträngigen DNA-Fragmenten mit einer Länge von etwa 30 Basenpaaren, sowie die Synthese eines neuen Fragments mit anschließender Ligation gegliedert werden (109). Die NER wird in die sog. TCR und die GGR eingeteilt. Erstere ist der Reparatur transkribierter Stränge aktiver Gene unter Beteiligung der RNA-Polymerase II zuzuschreiben, wohingegen Letztere die Reparatur nicht-kodierender Abschnitte des Genoms und nicht-transkribierter Stränge aktiver Gene umfasst (110–112). Beide Mechanismen unterscheiden sich lediglich in der Schadenserkenkung durch Rekrutierung unterschiedlicher Komponenten. So ist XPC/HR23B in der GGR (113), während die sog. *cockayne syndrome* Gene, CSA und CSB, in der TCR involviert sind (114–116). Nach erfolgter Erfassung des Defekts werden mehrere Komponenten rekrutiert. Darunter befinden sich XPA in Assoziation mit dem einzelstrangbindenden Komplex RPA als Einheit zur Schadenserkenkung, gefolgt von den Helikasen XPB und XPD, welche als Bestandteile von TFIIH die Öffnung der Doppelstrang-DNA im Bereich des Adduktes induzieren. Anschließend schneiden zwei strukturspezifische Endonukleasen, XPF-ERCC1 und XPG, an der 5'- bzw. 3'-Stelle des Adduktes der DNA ein etwa 30 Basen umfassendes, die Läsion beinhaltendes Oligonukleotid heraus (117,118). Die vergleichsweise niedrige Kapazität in der Entfernung von Cisplatin-DNA-Addukten und einem geringen Kontingent an XPA, XPF und ERCC1 bei Hodentumorzelllinien wird in mehreren Studien als mögliche Erklärung für die gute klinische Prognose aufgeführt (119,120). Dies wiederum unterstreicht die DNA-Modifikation durch Cisplatin als Hauptursache für dessen Toxizität und hebt die Funktion des NER-Systems als primären Mechanismus im Entfernen der durch Cisplatin induzierten DNA-Läsionen hervor (55).

Als weitere Option steht der Zelle das MMR-System zur DNA-Reparatur zur Verfügung, indem Fehlpaarungen von Basen und weitere Schäden der DNA erkannt werden. Es folgt die Organisation eines multimeren Komplexes, welcher letztlich die Reparatur koordiniert. Zudem aktiviert der MMR-*pathway* mit p73 und c-ABL weitere Regulatoren des Zellzyklus, welche bei selbigem einen Arrest induzieren und/oder die Apoptose infolge einer Exposition durch z.B. Cisplatin anstoßen können. Des Weiteren wird auch p53 aktiviert, jedoch scheint eine durch

MMR induzierte Einleitung der Apoptose unabhängig von diesem Protein zu sein (121–123). Es wird vermutet, dass das MLH1-Gen Voraussetzung für eine Aktivierung von c-ABL und p73 durch Cisplatin darstellt (123). Allerdings ist eine direkte Verknüpfung zwischen dem MMR-*pathway* und einer Cisplatintoxizität nicht eindeutig geklärt und wird diskutiert (55).

2.1.5.6 Einleitung des Zelltods: Apoptose und Nekrose

Cisplatin induziert zwei unterschiedliche Mechanismen, welche letztlich zum Tod einer Zelle führen (55). Eine Nekrose zeichnet sich durch eine zytosolische Schwellung sowie einem frühen Verlust der Integrität der Plasmamembran aus (124,125). Hierbei konnte der PARP eine bedeutende Rolle zugewiesen werden, da sie durch eine erhebliche Schädigung der DNA eine starke Aktivierung erfährt und somit NAD⁺ zu Nicotinamid und ADP-Ribose Reste schneidet und Letzteres auf nukleäre Akzeptorproteine übertragen wird. Als Folge der geringen Konzentrationen an NAD⁺ resultiert eine verminderte Kapazität der oxidativen Phosphorylierung, respektive einer Abnahme in der Synthese von ATP. Dies leitet schließlich die Nekrose ein (126–129).

Die Apoptose, auch der „programmierte Zelltod“ genannt, grenzt sich morphologisch u.a. durch ein Schrumpfen der Zellen, einer Kondensation von Chromatin sowie einer DNA-Fragmentierung von der Nekrose ab. Sie ist eine Konsequenz aus der Aktivierung von spezifischen Proteasen - den Caspasen (50,55,125). So werden im frühen Prozess der Apoptose sog. Initiatorcaspasen wie Caspase-8 und -9 aktiviert, woraufhin das Signal weiter auf *downstream* Effektorcaspasen wie Caspase-3 und -7 übertragen wird, die zu einem großen Anteil für das Schneiden einer Vielzahl zellulärer Proteine verantwortlich sind. Als Konsequenz daraus wird die Apoptose vorangetrieben (50,55,130).

Es werden zwei regulatorische *pathways* beschrieben, durch die eine Apoptose induziert werden kann.

Der erste beginnt mit der Bindung des natürlichen Liganden FASL an den FAS Rezeptor der Zelle. FAS ist ein Typ I transmembranäres Protein der TNF/NGF Superfamilie (131,132). Dieser Rezeptor ist ubiquitär auf mehreren Zelltypen exprimiert, darunter aktivierte T-Zellen, Hepatozyten und Epithelzellen ovarialen Ursprungs (133,134). Voraussetzung für die Funktion des Rezeptors ist eine Trimerisierung der FAS-Monomere zu einem FAS-Komplex, welche durch Ligandbindung von FASL induziert wird (135,136). Intrazelluläre Todesdomänen von FAS leiten daraufhin die Rekrutierung eines DISC ein (132,137,138), welche letztlich die Aktivierung von *downstream targets* wie Caspase-8 und -3 zur Folge hat (139,140). Die aktive

Caspase-3 schneidet fortan mehrere Substrate wie z.B. Reparaturenzyme der DNA sowie zelluläre und nukleäre Strukturproteine. Dieser Abbau hat die Einleitung der Apoptose als Konsequenz (132,141,142).

Die zweite Signalkaskade wird durch eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien initiiert, welche in Gegenwart von ATP eine Bindung von APAF-1 durch seine Bindungsdomäne an die korrespondierende Stelle von Caspase-9 induziert. Letztere wird dabei aktiviert. Eine anschließende Aktivierung von Caspase-3,-6 und -7 leitet schließlich die Apoptose ein (143,144).

Der apoptotische Prozess wird vor allem durch das Verhältnis des pro-apoptotischen BAX zu dessen anti-apoptotischem Gegenspieler BCL-2 bestimmt. Cisplatin verschiebt dabei das Verhältnis zugunsten von BAX. Dies geschieht durch eine Induktion von BAX selbst oder ist bedingt durch einen Cisplatin bedingten Abbau von BCL-2. Das entstandene Produkt könnte indes selbst pro-apoptotische Signale vermitteln, indem es BAX in seiner Funktion ähnelt, oder lediglich das oben beschriebene Verhältnis zugunsten von BAX verschiebt und auf diese Weise die Apoptose einleitet (44,145,146).

Studien belegen, dass beide beschriebenen Signalwege der Apoptose durch Cisplatin angestoßen werden können (147,148).

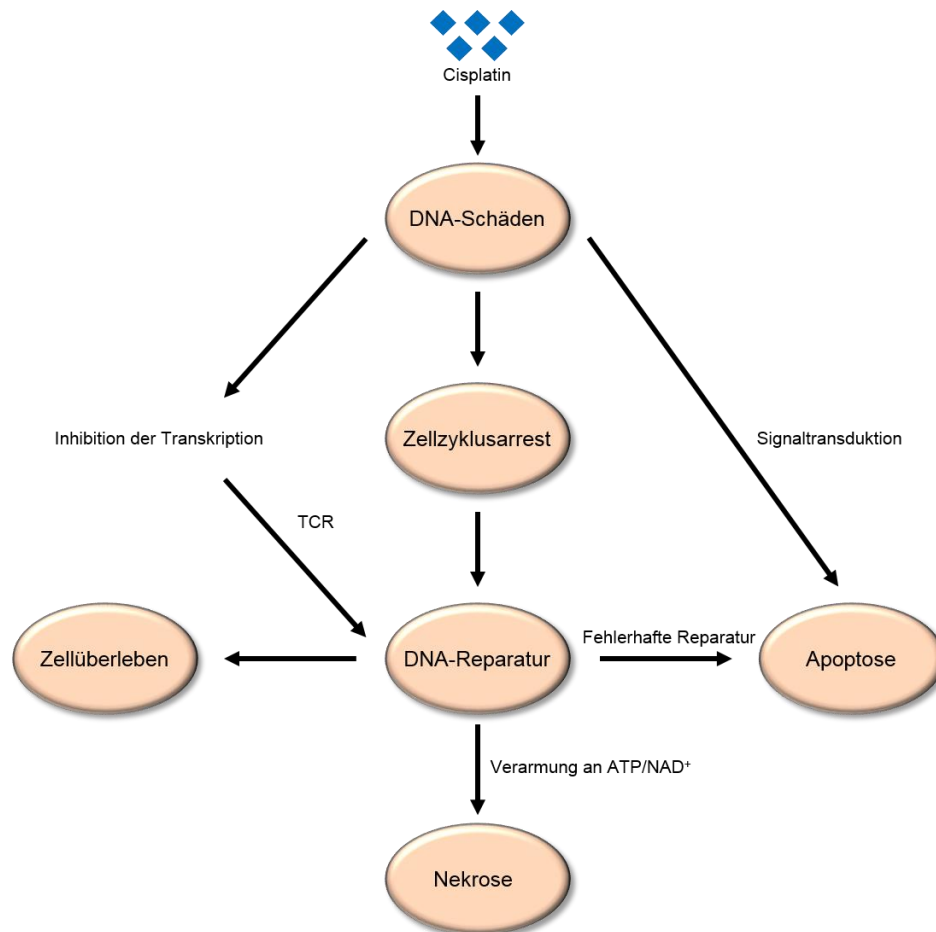


Abbildung 5: Cisplatin induzierte Möglichkeiten des Zelltodes. Modifiziert nach Wang & Lippard (55).

2.2 Chemoresistenz

Eine Reihe klinischer Studien zeigt, dass besonders eine platinbasierte Kombinationstherapie ovarialer Tumore häufig mit einer verbesserten Remission und einer erhöhten durchschnittlichen Überlebensrate einhergeht (24,149–151). Diese Art der Therapie ist aber oftmals durch das Auftreten von Chemoresistenzen limitiert (152–154). Eine solche Resistenz kann zum einen intrinsischer Herkunft entspringen, wie es frequentiert bei Kolorektal- und Lungenkrebs vorkommt, zum anderen können ursprünglich nicht-resistente Tumoren im Verlaufe einer Behandlung selbst eine Chemoresistenz entwickeln. Letzteres wird vor allem häufig bei Tumoren ovarialen Ursprungs beobachtet (155–160).

Intensiv betriebene Forschung der letzten drei Jahrzehnte führte zu einer Darstellung mehrerer Mechanismen, welche den resistenten Phänotyp charakterisieren. Nachfolgend werden diverse Prozesse erläutert, die nach Galluzzi et al. in Resistenzen eingeteilt werden, welche

- (1) der DNA-Bindung vorangehen (*pre-target*),
- (2) direkt die Cisplatin-DNA-Addukte betreffen (*on-target*),
- (3) Signalwege modifizieren, die durch den Cisplatin induzierten Schaden der DNA aktiviert wurden (*post-target*),
- (4) weitere molekulare Netzwerke betreffen, welche nicht direkt mit einer durch Cisplatin bedingten Änderung assoziiert sind (*off-target*) (161).

2.2.1 Pre-target Resistenz

Nach heutiger Erkenntnis nutzen Tumorzellen zwei entscheidende Mechanismen, die vor einer Bindung von Cisplatin an die DNA sowie zytoplasmatische Strukturen stattfinden, um die damit verbundenen zytotoxischen Effekte zu umgehen (161).

Einer dieser involvierten Prozesse basiert auf einer Reduktion der intrazellulären Akkumulation der Platinverbindung. Im Gegensatz zu einer Vielzahl weiterer antitumoral wirkenden Therapeutika, welche durch erhöhten Efflux via ATPasen der ABC-Transporterfamilie, wie beispielsweise p-Glykoprotein, aus der Zelle geschleust und infolge dessen mit einer sog. *multidrug-resistance* assoziiert werden (162,163), finden reduzierte intrazelluläre Konzentrationen von Cisplatin vorwiegend ihren Ursprung in einer verminderten Aufnahme (164–166). Unabhängig des entsprechenden Ablaufes ist das Phänomen einer reduzierten Akkumulation in mehreren cisplatinresistenten Tumorzellen gegenwärtig (166,167). Der bereits in Kapitel 2.1.3 erwähnte transmembranäre Kupfertransporter CTR1 scheint in der zellulären Aufnahme von Cisplatin eine besondere Rolle einzunehmen. Studien konnten zeigen, dass ein *knockout* des Transporters zu einer deutlich verminderten intrazellulären Akkumulation des Zytostatikums führt und eine Erhöhung der Chemoresistenz zur Folge hat (42), eine Coinkubation mit Kupfer - dem natürlichen Substrat des Transporters - die Cisplatin induzierte Toxizität abschwächt (43), wohingegen eine Chelatierung von Kupfer die zelluläre Akkumulation der Platinverbindung fördert und sich letztlich in einer Steigerung der Toxizität äußert (168). Weiterhin können klinisch relevante Konzentrationen an Cisplatin eine *downregulierung* des Transporters induzieren (169), was zusammengefasst die Relevanz von CTR1 in einer cisplatinbasierten Chemoresistenz unterstreicht.

Neben CTR1 rücken unter anderem die beiden Efflux-Transporter ATP7A und ATP7B, welche ebenfalls an der Kupferhomöostase beteiligt sind, hinsichtlich einer potentiellen Involvierung in Aspekten der Chemoresistenz in den Fokus. So wurde eine *upregulierung* beider ATPasen in cisplatinresistenten Tumorzellen beobachtet und eine induzierte Überexpression von ATP7A und ATP7B mit einer entsprechenden Resistenz assoziiert (170–173). Die klinische Relevanz ist hierbei jedoch nicht ausreichend geklärt (173,174).

Eine weitere Option zur Minderung einer Cisplatin induzierten Toxizität besteht in der Konjugation mit nukleophilen Molekülen. Cisplatin bindet intrazellulär auch cysteininhaltige Nukleophile wie Glutathion (GSH) und Metallothioneine. Durch Bildung von Glutathion-S-Konjugaten und deren Exkretion über MRP/GS-X Efflux-Transporter wird der Zelle somit reaktives Cisplatin entzogen (160,175–178). Studien an Zellen ovarialer Adenokarzinome *in vitro* und *ex vivo* (Zellen, die vom gleichen Patient stammen, eine bevor, die andere nach Entwicklung einer Chemoresistenz gegenüber Zytostatika, darunter Cisplatin) bestätigten eine Erhöhung von GSH und eine verstärkte Aktivität für die Konjugation zwischen GSH und Cisplatin verantwortlichen Enzym GST als potentiellen Mechanismus für eine Steigerung der Chemoresistenz (179).

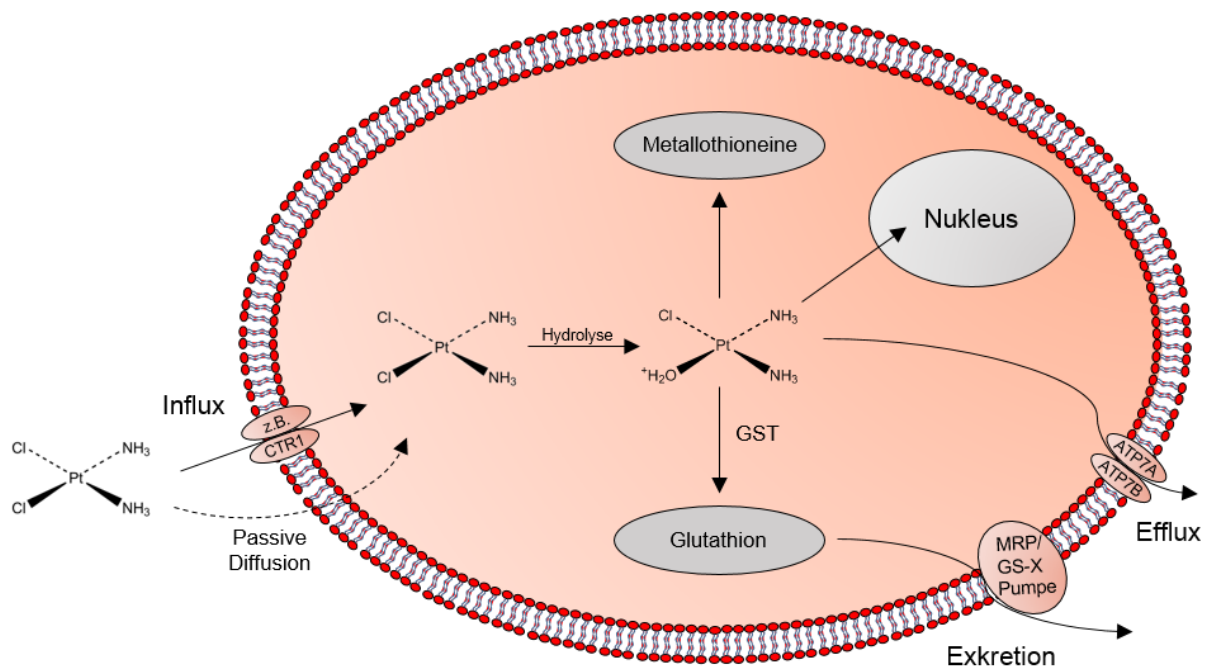


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Tumorzelle und deren potentielle *pre-target* Resistenzmechanismen am Beispiel von Cisplatin. Modifiziert nach Kelland (16).

2.2.2 *On-target Resistenz*

Die Erkennung der durch Cisplatin verursachten Inter- und Intrastrang-DNA-Addukte und einer damit einhergehenden Erzeugung pro-apoptotischer Signale ist häufig durch eine Vielzahl an Defekten beeinträchtigt. Zudem können cisplatinresistente Zellen Eigenschaften erwerben, welche zum einen eine erhöhte Reparatur der DNA-Addukte zur Folge hat, zum anderen kann die Toleranz gegenüber beschädigter DNA gesteigert werden und auf diese Weise den resistenten Phänotyp charakterisieren (161).

Der NER-Mechanismus, welcher in Kapitel 2.1.5.5 beschrieben wurde und als hauptverantwortlich für die Beseitigung von Cisplatin-DNA-Läsionen gilt, wurde hierbei schon häufig in Zusammenhang mit dem Auftreten einer Chemoresistenz gebracht (180–182). Im Detail konnten Studien eine negative Korrelation zwischen der Expression von ERCC1 und einer Ansprechbarkeit bzw. Überlebensrate infolge einer cisplatinbasierten Chemotherapie in mehreren Tumorarten konstatieren, darunter unter anderem in solchen der Blase (183), der Ovarien (184) und der Lunge (185). Diese Komponente des NER spielt ebenfalls eine Rolle im sog. ICR. Jene Form der Reparatur ist beispielsweise in cisplatinresistenten Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zur sensitiven Zellvariante stärker präsent (186). Dennoch scheint die Rolle des Proteins in Bezug auf diese Form der Chemoresistenz nicht vollständig geklärt, da hierzu kontroverse Befunde existieren. So konnte neben der oben erwähnten negativen Korrelation gezeigt werden, dass umgekehrt eine Überexpression von ERCC1 partiell ebenfalls eine erhöhte Sensitivierung des Tumors gegenüber Cisplatin bewirkt (187).

Weitere Reparaturmechanismen können durch Modulation ihrer Komponenten bzw. deren Defekt zur Resistenzentwicklung beisteuern. Im Kontext einer erworbenen Resistenz gegenüber Cisplatin sind des Öfteren die Komponenten MSH2 und MLH1 des bereits erwähnten MMR-Systems mutiert bzw. vermindert exprimiert (188–190). So werden Defekte von MLH1 mit einem gesteigerten replikativen *Bypass* assoziiert, ein Vorgang in dem die Synthese der DNA nicht geblockt, sondern weiterhin um das Cisplatin-Addukt herum fortschreitet, was schließlich mit einer Steigerung der Resistenz einhergeht (191). Diese besondere Form der Synthese wird durch eine spezifische Gruppe von DNA-Polymerasen vermittelt (192). Innerhalb jener Gruppe wird überexprimiertes REV3 mit einer gesteigerten Cisplatinresistenz in Verbindung gebracht (193). So konnte eine inverse Korrelation zwischen dem Expressionslevel von POLH und der Überlebensrate bei cisplatinbehandelten Patienten mit nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom berichtet werden (194). Unter dem Aspekt weiterer Erforschung beschriebener Mechanismen könnten die antizipierenden Komponenten des

MMR-Systems und des replikativen *Bypass* zukünftig wertvolle Anzeichen für eine Ansprechbarkeit auf eine Cisplatinbehandlung darstellen (161).

Weiter werden im Kontext einer *on-target* Chemoresistenz BRCA1 und BRCA2 diskutiert, welche Bestandteile der homologen Rekombination sind, die wiederum an der Reparatur durch Cisplatin induzierte Doppelstrangbrüche während oder direkt nach der S-Phase des Zellzyklus beteiligt ist (161,195–197). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Platinverbindung an den spannungsabhängigen Transporter VDAC bindet (198), wobei Tumorzellen durch *knockdown* des Transporters eine beachtliche Reduzierung in der Cisplatin induzierten Apoptose aufweisen. Ob dies allerdings dem Mechanismus einer *on-target* Resistenz zugehörig ist, bleibt zum momentanen Zeitpunkt offen, da eine Beteiligung von VDAC in der Übermittlung pro-apoptotischer Signale diskutiert wird und dies folglich eine Einteilung in eine *post-target* Resistenz bedeuten würde (199).

2.2.3 *Post-target* Resistenz

Wie bereits in Kapitel 2.1.5 erläutert, führt ein durch Cisplatin hervorgerufener irreparabler Schaden der DNA zur Induktion verschiedener Signalkaskaden, die letztlich zur Einleitung des programmierten Zelltods befähigt sind. Folglich können genetische und epigenetische Modulationen der genannten Signalsysteme bzw. fehlerhafte Abläufe während der Apoptose eine verminderte oder unzureichende Toxizität als Konsequenz haben. Die daraus resultierende Steigerung in der Chemoresistenz wird als *post-target* Resistenz beschrieben (161).

Unter diesem Aspekt ist der Tumorsuppressor p53 zu erwähnen, da sein Funktionsverlust, beispielsweise durch Mutationen, als bedeutender Mechanismus in Zusammenhang mit einer Chemoresistenz in der Literatur beschrieben wird. Die Tatsache, dass Mutationen von p53 in nahezu der Hälfte sämtlicher humaner Tumoren gegenwärtig sind, unterstreicht die Bedeutung des Proteins in diesem Kontext (200–202). So scheint das Maß der Sensitivität gegenüber Cisplatin von der Präsenz eines intakten p53 inklusive für dessen Funktion benötigte Mediatoren abhängig zu sein, wie es bereits an einem breiten Spektrum von Tumorzellen mit unterschiedlichem Funktionsstatus des Tumorsuppressors *in vitro* dargestellt werden konnte (203).

Eine Beteiligung von Vertretern der Proteine aus der MAPK-Familie vergrößern das Spektrum zur Charakterisierung des cisplatinresistenten Phänotyps (98). Eine unzureichende Aktivierung von beispielsweise p38 MAPK und c-Jun in Anwesenheit vom Zytostatikum hat u.a. eine

begrenzte Induktion der extrinsischen Apoptose über das FAS/FASL-System mit einer einhergehenden Steigerung der Resistenz zur Konsequenz (98,204).

Abschließend sind Veränderungen von Komponenten anzuführen, welche an der Regulierung und Ausführung der Apoptose beteiligt sind. Zum einen sind erhöhte Konzentrationen von BCL-2 und BCL-XL, welche als Gegenspieler der pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK zu verstehen sind, mit einer Cisplatinresistenz bzw. einer verminderten Resonanz gegenüber Cisplatin in Tumoren unterschiedlichen Ursprungs assoziiert (205–207). Zum anderen werden durch Cisplatin PI3K-abhängige Mechanismen angestoßen, die mit einer gesteigerten Expression des Caspase-Inhibitors Survivin einhergehen (208,209), welche wiederum mit einer verminderten Ansprechbarkeit verschiedener Tumorarten gegenüber der Platinverbindung in Zusammenhang gebracht wird (210,211). Kombinationstherapien von Inhibitoren genannter Proteine mit Cisplatin stellen somit eine logische Konsequenz dar und wurden bereits in experimentellen Studien evaluiert (212–214).

2.2.4 Off-target Resistenz

In der Literatur werden weitere Signalkaskaden diskutiert, welche durch Modulation zur Steigerung einer Resistenz gegenüber Cisplatin beitragen, jedoch nicht zwingend durch das Zytostatikum selbst angestoßen werden. Signale von ERBB2 (HER-2/neu), einem Protoonkogen, welches für einen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor codiert und in mehreren Tumorarten der Brust und der Ovarien überexprimiert ist (215), werden *downstream* über Kaskaden wie PI3K/AKT übermittelt (216,217). Dies wiederum ist mit einer Lokalisation von p21^{Waf1/Cip1} im zytoplasmatischen Bereich assoziiert (218) und wird mit einer gesteigerten Chemoresistenz in Verbindung gebracht (219). Weiterhin wurde eine *upregulierung* von DYRK1B in mehreren Tumorarten (220) konstatiert, welche wiederum eine gesteigerte Transkription der Gene antioxidativer Enzyme wie der Ferroxidase und der Superoxiddismutase-2 und -3 zur Folge hat (221). Eine Depletion von DYRK1B resultiert folglich in einer Steigerung von potentiell letalen reaktiven Sauerstoffspezies (222), wodurch eine Cisplatin induzierte Apoptose begünstigt werden kann (223). Zudem geht Studien zufolge eine erworbene Resistenz gegenüber dem Zytostatikum mit einer gesteigerten Autophagie in Lungenkarzinomzellen einher (224), welche anteilig durch Inhibition aufgehoben werden kann (224,225).

2.2.5 Zelladhäsionsvermittelte Resistenz

Abseits der bereits beschriebenen Mechanismen und den davon abhängigen Faktoren, die zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika beitragen, scheint auch die um die Tumorzelle befindliche Umgebung einen Einfluss auf die Sensitivität einer Behandlung mit zytotoxischen Substanzen zu haben. Generell können Zellen mithilfe von Integrinen - einer Familie von zellulären Adhäsionsmolekülen - mit Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) wie Kollagen oder Fibronectin interagieren (226,227). Nach erfolgter Adhäsion können dadurch diverse Signalkaskaden angestoßen werden, darunter unter anderem MAPK (228), PI3K (229) und AKT (230). Folglich kann eine Bindung von Tumorzellen an Bestandteile der EZM durch Modulation entsprechender Signalnetzwerke mit einer Steigerung der Resistenz gegenüber dem verwendeten Chemotherapeutikum assoziiert werden. Dieses Phänomen wird in der Literatur als sog. zelladhäsionsvermittelte Resistenz beschrieben (226). Im Einzelnen konnte beispielsweise eine Adhäsion von Myelomzellen an Fibronectin mit einer gesteigerten Expression von p27^{kip1} und einer damit assoziierten Induktion einer Chemoresistenz in Verbindung gebracht werden (231). Zudem zeigte eine Studie *in vivo*, dass kleinzellige Bronchialkarzinomzellen von einer umfangreichen Stroma der EZM umgeben sind, welche anteilig aus Komponenten wie Laminin, Fibronectin und Kollagen besteht und dass eine Adhäsion an jene Bestandteile eine Reduktion in der Chemotherapeutika induzierten Apoptose zur Folge hat. Die durch Adhäsion bedingte gesteigerte Aktivität des Enzyms PTK und einer damit einhergehenden Blockierung von Caspasen wird hierbei als zugrundeliegender Mechanismus diskutiert (232).

Zusammenfassend ist eine Cisplatinresistenz als multifaktoriell zu verstehen, in der zeitgleich mehrere der beschriebenen Prozesse aktiv sind um auf diese Weise der toxischen Wirkung der Platinverbindung zu entgehen. Da die gegenwärtigen Mechanismen zumindest anteilig vom Tumortyp abhängig sind und variieren, ist für eine erfolgreiche Überwindung dieser Resistenz eine Strategie, welche eine Kombination der Inhibition multipler Resistenzmechanismen vorsieht von besonderer Bedeutung. Daher bedarf es weiterer Studien, um den resistenten Phänotyp im Einzelnen genauer zu charakterisieren, damit letztlich ein Nutzen auf klinischer Ebene erzielt werden kann (161).

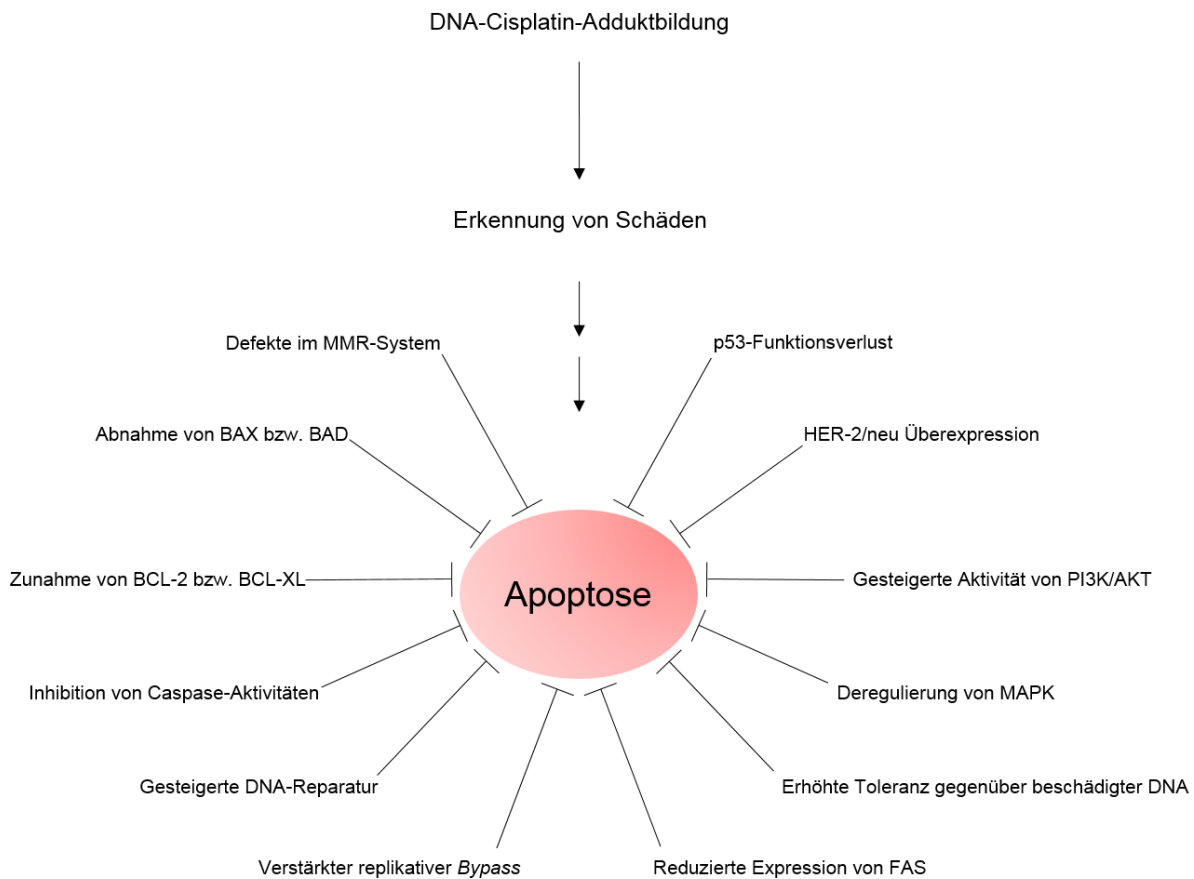


Abbildung 7: Schematischer Überblick über die unterschiedlichen potentiellen Mechanismen, die zur Inhibition einer durch Cisplatin induzierten Apoptose beitragen können. Modifiziert nach Siddik (44).

2.3 Heparine

Die Entdeckung des Heparins erfolgte im Jahr 1916 zufällig durch McLean und Howell, die ursprünglich nach Substanzen mit prokoagulativen Eigenschaften suchten (233,234). Erst 1947/1948 erfolgte die Definierung des ersten internationalen Standards des Heparins durch die WHO (233,235), und noch heute zählen sie bei der Prophylaxe venöser Thromboembolien zu den Wirkstoffen der Wahl (236). Heparin stellt mit seinen Carboxyl- und Sulfatresten ein polyanionisches Polysaccharid mit einer Molekularmasse von 6.000-30.000 Da dar, welches alternierend aus jeweils einer Uronsäure (Glucuronsäure bzw. Iduronsäure) und Glucosamin aufgebaut ist. Der heterogene Aufbau, u.a. aufgrund der Variation des Moleküls im Sulfatierungsgrad und der Molekularmasse, bedingt die übliche Dosierung von unfraktioniertem „Standard-Heparin“ in Internationalen Einheiten (237).

Die antikoagulatorische Aktivität des Heparins wird hauptsächlich der Bindung an Antithrombin zugeschrieben, wodurch sich die Konformation des Proteins verändert und dieses aktiviert wird. In seiner aktivierten Form hemmt es schließlich Thrombin sowie weitere Serin-Proteasen. Die für die Bindung an Antithrombin notwendige Struktur äußert sich in einer

Pentasaccharidstruktur des Heparins (Abbildung 8). Die Hemmung von Thrombin - durch Bildung des Komplexes von Heparin, Antithrombin und Thrombin - erfordert eine Mindestlänge des Antikoagulans von 18 Monomeren, während eine Hemmung von Gerinnungsfaktoren wie Faktor Xa unabhängig von der Kettenlänge ist. Der gerinnungshemmende Effekt von niedermolekularen Heparinen (NMH) tritt folglich vornehmlich über eine Faktor Xa Hemmung in Erscheinung und hat therapeutisch die Anwendung von unfraktioniertem Heparin (UFH) fast vollständig abgelöst (237).

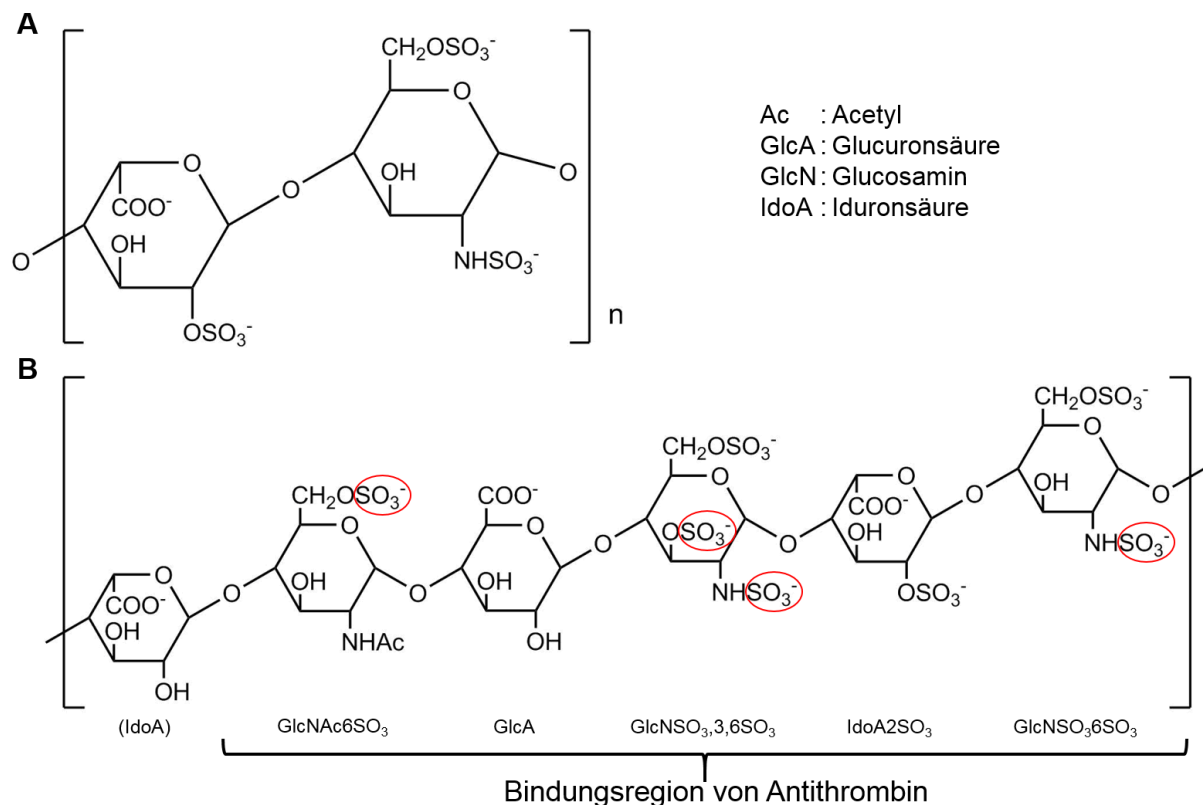


Abbildung 8: (A) Schematische Darstellung der hauptsächlich vorkommenden, sich wiederholenden dreifach-sulfatierten Disaccharid-Einheiten des Heparins. (B) Hexasaccharid-Sequenz des Heparins mit darin enthaltener Bindungsregion von Antithrombin in Form einer Pentasaccharidstruktur. Die markierten Sulfatreste sind essentiell für eine sog. *high-affinity* Bindung zum Antithrombin.(238,239). Modifiziert nach Casu, B. et al. (234).

UFH verfügt im Vergleich zu NMH über einen geringeren Anteil der für die Wirkung verantwortlichen Pentasaccharidstruktur (ca. 30 %), bindet und interagiert in größerem Ausmaß mit Plasmaproteinen, Thrombozyten, Makrophagen sowie Endothelzellen und unterliegt einer schnelleren Elimination, wodurch ein frequentiertes Monitoring in der Therapie erforderlich ist (233,237). Das in dieser Arbeit vornehmlich verwendete Tinzaparin repräsentiert mit seiner Molekülgröße von 6.500 Da eines der größten unter den niedermolekularen Heparinen (240). Die kleinste über den beschriebenen Mechanismus antikoagulatorisch wirksame Substanz ist das Fondaparinux, welches durch seine synthetisch erzeugte Pentasaccharidstruktur eine

selektive Faktor Xa Hemmung und eine verbesserte Steuerung der Therapie ermöglichen soll (233,237).

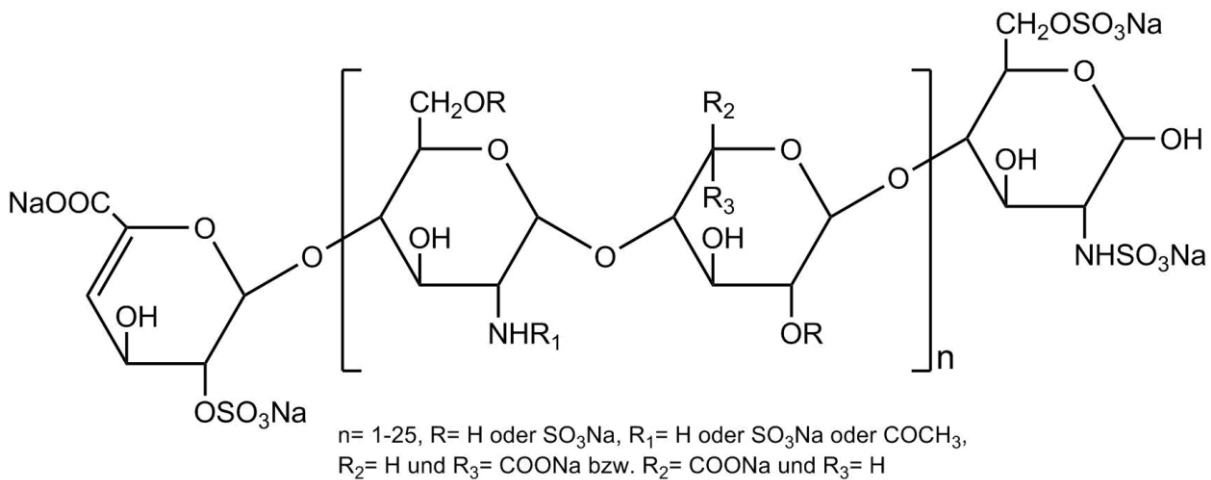


Abbildung 9: Strukturelle Darstellung des niedermolekularen Heparins Tinzaparin.

Neben der bereits beschriebenen antikoagulatorischen Wirksamkeit verfügen Heparine über ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten (241). Eine Vielzahl an physiologisch relevanten Molekülen können durch das Antikoagulans gebunden werden (242), darunter diverse Proteine wie Zytokine (243,244), Chemokine (245,246), Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle (247,248), welche zu einem großen Anteil mit Prozessen einer Entzündungsreaktion assoziiert sind (242). Studien, welche dem Heparin inhibierende Eigenschaften auf Signalwege wie p38 MAPK und PI3K/AKT attestieren (249,250), unterstreichen die Vielfältigkeit, mit der Heparin auch auf intrazelluläre Signalmechanismen Einfluss nehmen kann (242).

Das Risiko einer venösen thrombotischen Embolie ist bei Tumorpatienten um ein Vielfaches höher und folglich repräsentiert eine Thrombose die zweithäufigste Todesursache in der Onkologie. Daher wird in den verschiedenen therapeutischen Leitlinien bei entsprechenden Patienten eine Prophylaxe mittels Heparinen empfohlen (251). Hierbei werden diesen Antikoagulanzen begleitende positive Auswirkungen bei der Tumorbehandlung zugeschrieben, welche über einen reinen Einfluss auf die Blutgerinnung hinausgehen (252,253). Klinische Studien und Meta-Analysen bei heparinbehandelten Tumorpatienten geben Hinweise auf eine verbesserte Überlebensrate (254–258). Die letztliche Aussagekraft ist hierbei jedoch offen, zumal andere Studien einen Einfluss der Heparine nicht bestätigen können (259,260).

Zudem sind auch antimetastatische Effekte von Heparinen Gegenstand der Forschung (261,262) und mehrere dafür verantwortliche Mechanismen wurden bereits postuliert. So werden beispielsweise Inhibitionen von Selektinen (263), TFPI (264) sowie enzymatisch aktiver Heparanase (265,266) diskutiert, wobei eine Inhibition von Letzterer zusätzlich mit einer durch Heparin reduzierten Angiogenese assoziiert wird (252,267). Interessanterweise scheint die antimetastatische Wirkung von der Größe des Antikoagulans abhängig zu sein, da dieser Effekt für das Pentasaccharid Fondaparinux nicht bestätigt werden konnte (262).

Auswirkungen auf die Effizienz einer Chemotherapie durch potentielle Einflussnahme von Heparinen wurden bisher vergleichsweise wenig erforscht. Es existieren klinische Daten von Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom und Tumoren des Pankreas, welche von einer Kombination aus Zytostatika und UFH bzw. NMH profitieren. Unter anderem wird vermutet, dass die daraus resultierende reduzierte Thrombosetendenz des Tumors den Zugang des Chemotherapeutikums zum Tumorgewebe verbessert (254,268–270).

Ein vielversprechender Ansatz zur potentiell chemosensitivierenden Wirkung des niedermolekularen Heparins Tinzaparin auf zellulärer Ebene wurde in einer vorangegangenen Dissertation der Arbeitsgruppe durch Herrn Dr. Daniel Philipp Stölting aufgezeigt. Cisplatinresistente A2780cis Ovarialkarzinomzellen zeigten unter der Wirkung von therapeutischen Konzentrationen an Tinzaparin eine deutliche Sensitivierung gegenüber Cisplatin, welche vermutlich anteilig durch Interaktion von Tinzaparin mit Proteoglykanen auf der Zelloberfläche vermittelt wird, was offensichtlich unter anderem auf Transkriptionsebene mit einer massiven Deregulierung Cisplatinresistenz assoziierter Gene verknüpft ist (10). Die dafür zugrundeliegenden Mechanismen und Signalkaskaden waren zu dem Zeitpunkt ungeklärt. Deren Aufklärung ist folglich ein zentraler Ansatz in der von mir angefertigten Dissertation.

Zusammengefasst sind Heparine in viele komplexe biologische Prozesse integriert und zur tiefergehenden Aufklärung potentieller antitumoraler Mechanismen bedarf es weiterer Forschung, damit vor allem Tumorpatienten von positiven Effekten profitieren könnten.

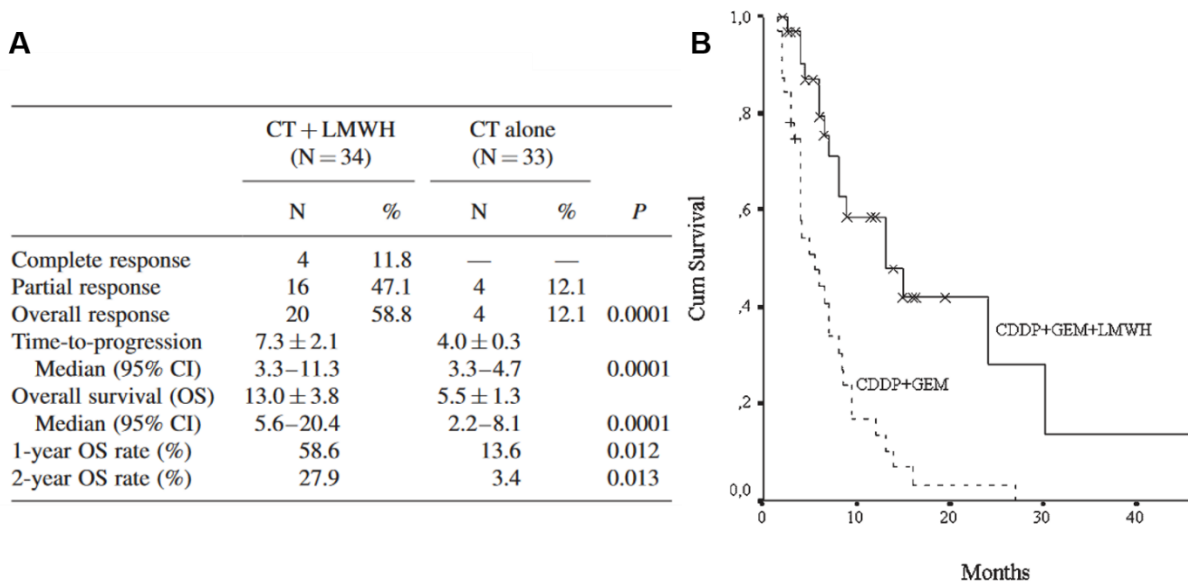


Abbildung 10: Ausschnitt der Studienergebnisse von Icli et al., in welcher der Einfluss von niedermolekularem Heparin (LMWH) auf eine Kombinationstherapie bestehend aus Cisplatin und Gemcitabin (CDDP + GEM) bei einer Anzahl Tumorpatienten (N) mit Pankreaskrebs untersucht wurde (269). (A) Tabellarische Übersicht der Studienergebnisse. (B) Kurven der insgesamten Überlebensraten beider Behandlungsmethoden entsprechend des Prinzips des „*intent-to-treat*“.

2.4 Proteoglykane

Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) repräsentieren eine facettenreiche Gruppe von Glykoproteinen, bestehend aus einem Kernprotein mit einer daran kovalent gebundenen variierenden Anzahl an Heparansulfat-Ketten. Die Molekularmasse erstreckt sich in einem Bereich von etwa 10-400 kDa, abhängig von der Beschaffenheit des Proteins sowie der Anzahl und Länge der Heparansulfat-Ketten (271), wobei letztere Struktur über ein weitaus breiteres Spektrum an Variationsmöglichkeiten verfügt als die entsprechenden Proteine (272,273). Die Verknüpfungsregion beider Komponenten besteht aus einem Tetrasaccharid und einer O-Serin-Brücke zwischen der Heparansulfat-Kette und dem Kernprotein (274). In der Literatur werden β -1,4-, β -1,3-Galaktosyltransferasen (z.B. B4GALT7 und B3GALT6) und β -1,3-Glucuronyltransferasen (z.B. B3GAT3) als an der Synthese des Tetrasaccharids beteiligte Enzyme beschrieben und diskutiert (275–277). Für die Elongation des Tetrasaccharids gilt EXTL2 als wichtiger Bestandteil (278), sowie der heterooligomere Komplex aus EXT1/2 im Golgi-Apparat als bedeutend für die Polymerisation von Heparansulfaten (279). Im Verlauf der weiteren Synthese erfolgen Modifikationen der Ketten durch eine Vielzahl von Enzymen. So kann durch C5-Epimerasen die Stereochemie beeinflusst werden, indem eine Umwandlung von Glucuronsäure zu Iduronsäure erfolgt (280). Ein weiteres Beispiel ist die Möglichkeit der Sulfatierung an den Positionen C2, C3 und C6 durch Sulfotransferasen (273), aus der mitunter der polyanionische Charakter mit Affinität zu einer Vielzahl an Liganden auf der Zelloberfläche, innerhalb der extrazellulären Matrix sowie des Plasmas resultiert (273,281).

Anhand ihrer zellulären bzw. gewebsständigen Lokalisation können HSPG grob in drei Hauptkategorien eingeteilt werden (271,273). Zur ersten Kategorie zählen sog. Plasmamembran-assoziierte HSPG mit Syndekanen und Glypikanen als deren bedeutendsten Vertreter (271,282). Die Familie der Syndekane, welche vier Mitglieder umfasst, sind transmembranäre Proteine, bestehend aus einer Signalsequenz, einer Ektodomäne, einer transmembranären sowie einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (273,282). Glypikane sind im Gegensatz dazu nicht transmembranär lokalisiert, sondern mittels eines Phosphatidylinositol-Ankers extrazellulär auf der Membran lokalisiert. Innerhalb dieser Familie existieren sechs verschiedene Subtypen (Glypikan 1-6), die alle eine für die Anheftung des Proteins an den erwähnten Anker benötigte hydrophobe Domäne am C-Terminus beinhalten. Ein weiterer Unterschied zu den Syndekanen äußert sich in den kovalent gebundenen Heparansulfat-Ketten in der Region des C-Terminus, durch die eine Lokalisierung jener Ketten in unmittelbarer Nähe zur Zelloberfläche resultiert (283,284). Weiterhin können einige HSPG in den Bereich der extrazellulären Matrix sezerniert werden und lassen sich folglich in eine zweite Kategorie einordnen. Hierzu zählen bspw. Perlecan, Agrin und Kollagen XVIII, welche allesamt große Multidomänen-Proteine darstellen (271). Perlecan bspw. repräsentiert eines der größten Einzelketten-Polypeptide in Wirbel- und Wirbellosen-Tieren und fungiert so als ein entsprechend geeigneter Verknüpfers zwischen der EZM und Rezeptoren der Zelloberfläche (285). Die letzte Kategorie bilden Proteoglykane, die in sekretorischen Vesikeln lokalisiert sind. Nach heutigem Kenntnisstand stellt das Serglycin den einzigen Vertreter dieser Klasse dar. Dieses Molekül wird unter anderem in Zellen hämatopoetischen und endothelialen Ursprungs exprimiert und nimmt eine bedeutende Funktion in der Formation und Speicherung inflammatorischer Mediatoren in Granula und sekretorischer Vesikel ein (273,286).

Das Glykosylierungs- und Sulfatierungsmuster der Heparansulfat-Ketten ist ein bedeutender Faktor für die Funktionen der HSPG, welches hauptsächlich durch die synthetisierenden Zellen bzw. des entsprechenden Gewebes kontrolliert wird (273,287,288). Zu den möglichen Liganden zählen unter anderem Rezeptoren der Zelloberfläche, Proteine der EZM, Wachstumsfaktoren und Chemokine, wodurch das Spektrum an Funktionen der HSPG aufgrund dessen Diversität sowie der Vielzahl an Liganden weit gefächert ist (289). Membran-assoziierte HSPG können beispielsweise als Co-Rezeptor für Wachstumsfaktorrezeptoren fungieren und Übertragungen von Signalkaskaden vermitteln (271,290), als Rezeptor die Endozytose fördern (291,292) oder durch Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen wie Integrinen Einfluss auf die Zellmigration nehmen (293,294).

Abseits dieser Funktionen werden in der Literatur Veränderungen der Expression mehrerer HSPG bei der Entwicklung und Progression verschiedener Tumore beschrieben (284,295). So wurde bei Brustkrebs die Expression von Syndekan-1 mit einem aggressiven Phänotyp und einer ungünstigen Prognose assoziiert (296,297). Darüber hinaus wurde ein Beitrag des HSPG zu einer *Wnt-pathway* vermittelten Tumorgenese festgestellt (298). Gegensätzliche Befunde existieren, in denen beispielsweise ein Verlust von Syndekan-1 als ein Charakteristikum hepatozellulärer Karzinomzellen mit ausgeprägtem Metastasierungspotential vermutet wird (299). Die alleinige Quantität von Syndekan-1 auf der Zelloberfläche scheint hierbei jedoch nicht die Rolle des HSPG in der Progression von Lebertumoren widerzuspiegeln, da ein beträchtlicher Anteil des Syndekans von der Zelloberfläche abgespalten werden kann und somit nicht das gesamte Kontingent repräsentiert (300). Über Syndekan-4 ist hinsichtlich einer Tumorentwicklung bisher vergleichsweise weniger bekannt (301), jedoch existieren Studien, in denen Syndekan-4 die Adhäsion und Ausbreitung von Brustzellkarzinomzellen vermitteln kann (302). Weiterhin ist dieses Proteoglykan in der Lage, Wnt5a vermitteltes *signaling* zu potenzieren und somit die Invasion und Metastasierung von Melanomzellen zu steigern. Bei Letzterem wird als möglicher Mechanismus postuliert, dass das Syndekan Wnt5a in der Region der Zelloberfläche abfängt und somit dem entsprechendem Rezeptorkomplex zuführt bzw. zugänglicher macht, was schließlich das durch Wnt5a vermittelte *signaling* fördert (303). Ein weiteres Beispiel ist das Glypikan-3, welches als extrazellulärer Co-Rezeptor an der Kontrolle diverser Signalkaskaden wie Wnt und FGF beteiligt ist. Diese *pathways* sind oftmals in Lebertumoren ungewöhnlich stark aktiviert (304–307). Zudem korreliert die Expression von Glypikan-3 bei Patienten mit hepatozellulären Tumoren mit einer signifikant geringeren Überlebensrate über einen Zeitraum von 5 Jahren (308).

Eine Modifikation der Heparansulfat-Ketten durch diverse Enzyme kann außerdem die Funktionen der HSPG beeinflussen, welche mitunter zu einer Entwicklung und Progression von Tumoren beisteuern können. Die 6-O-Sulfatasen Sulf-1 und Sulf-2 entfernen selektiv 6-O-Sulfate von Glucosaminresten von spezifischen Regionen der Heparansulfat-Ketten, was folglich die Interaktionen der HS-Liganden merklich beeinflusst. In Abhängigkeit vom zellulären Kontext vermögen genannte Sulfatasen dabei sowohl aktivierende, als auch inaktivierende Effekte auf das entsprechende, durch die Ligandbindung induzierte *signaling*, auszuüben (309) und Dysregulationen der beiden Enzyme konnten in diversen Tumorarten ausgemacht werden (310). So ist Sulf-2, welches in einer Vielzahl von hepatozellulären Karzinomen und Zelllinien als hochreguliert beschrieben wird (311), mit einer Förderung der *in vivo* Tumorgenese mittels einer Glypikan-3-abhängigen Aktivierung des Wnt/ β -catenin-

pathways assoziiert. Ein Beitrag zum potentiellen Mechanismus äußert sich hierbei in der Desulfatierung der Glypikan Heparansulfat-Ketten durch Sulf-2, welche mit einer verstärkten Freisetzung der Wnt-Proteine einhergeht und somit die zunehmende Interaktion mit den Frizzled-Rezeptoren ermöglicht (312).

Weiterhin kann durch die Endoglykosidase Heparanase ein Schneiden von Anteilen der Heparansulfat-Ketten erfolgen, wodurch die Freisetzung der an die Ketten gebundenen biologischen Mediatoren und ein Einfluss auf das *signaling* sowie eine Remodulierung der EZM gefördert werden kann (273,313,314). Das Enzym wird unter anderem mit einer verstärkten Tumormetastasierung und Chemoresistenz assoziiert (273,315–317). Als Konsequenz werden Verbindungen mit dem Enzym als *target* intensiv untersucht (309). Neben dem natürlichen Inhibitor Heparin (318), wurden daraus strukturell abgeleitete Inhibitoren entwickelt. Zu diesen Verbindungen zählt das Ronaparstat, welches als hochmolekulares Heparinderivat keine signifikanten antikoagulatorischen Effekte mehr vermittelt (319,320), in Studien aber inhibierende Effekte auf das Tumorwachstum und die Angiogenese aufweist (309,321,322).

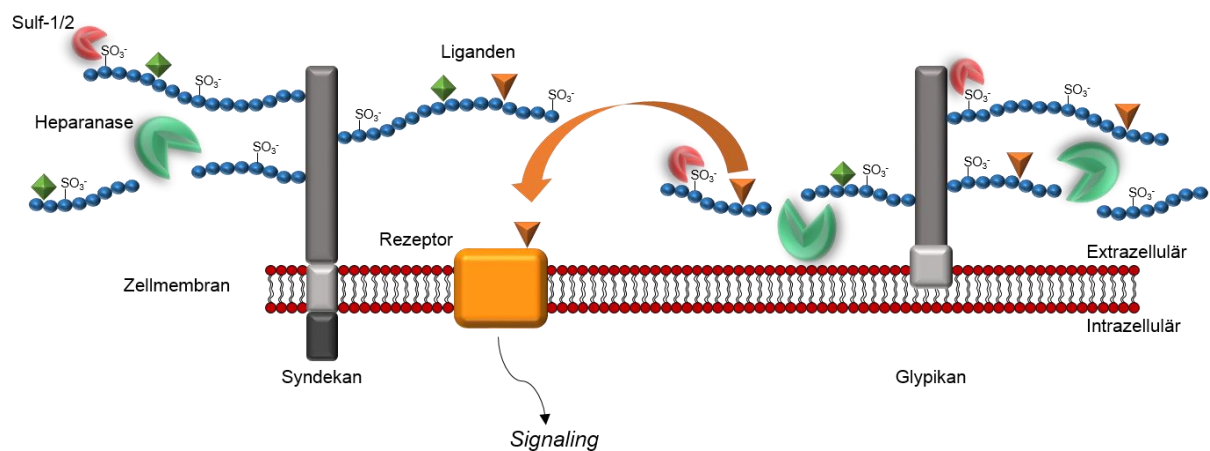


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Zelloberflächen mit potentiellen Heparansulfat-Proteoglykanen: Syndekan und Glypikan mit möglicher Modifikation der Heparansulfat-Ketten durch die extrazellulären Enzyme Heparanase und Sulfatase-1/2 (Sulf-1/2) inklusive einer potentiellen Freisetzung von Liganden und Weiterleitung an Rezeptoren mit der Möglichkeit einer Signalinduktion. Modifiziert nach Lanzi et al. (309).

2.5 Wnt-pathway

Das Gen Wnt1, ursprünglich bezeichnet als Int-1, wurde 1982 als ein Gen identifiziert, welches in viral induzierten Brusttumoren durch Integration proviraler DNA von Maus-Mammatumoviren aktiviert wurde (323,324). Das sog. *wingless* Gen, welches durch Mutation mit einem flügellosen Phänotyp in *Drosophila melanogaster* assoziiert wurde (325) und an der Kontrolle der Segmentpolarität während der Larvenentwicklung beteiligt ist (326) wurde später als ein Homolog zu Wnt1 identifiziert (324,327). Der Begriff „Int“ stellte sich dementsprechend als unzulänglich heraus und letztlich wurde die Bezeichnung Wnt (*wingless-related integration site*) gewählt, um Gene, die zur Int-1/*wingless* Familie gehören, zu bezeichnen (328,329).

Im Laufe der Jahre rückte das *Wnt-signaling* immer stärker in den Fokus und gehört mit seinen Wnt-Molekülen grundsätzlich zu den wachstumsstimulierenden Faktoren, welche die Zellproliferation fördern und dabei an mehreren Stellen des Zellzyklus Einfluss nehmen können (330,331). So repräsentiert das *Wnt-signaling* eine der Schlüsselkaskaden, welche an der Regulation während der embryonalen Entwicklung beteiligt ist und Eigenschaften von Stammzellen beeinflussen kann. Verallgemeinert kann diese Kaskade in den *canonical* und *non-canonical* Signalweg eingeteilt werden, wobei Erstgenannter von β -catenin abhängig ist (332,333) und im Folgenden näher erläutert wird. Hierbei wird sich in dieser Arbeit hauptsächlich auf die für die erhobenen Daten relevanten Moleküle und Mechanismen der komplexen Signalkaskade beschränkt.

Die Familie der Wnt-Proteine umfasst mindestens 19 Cystein-reiche Glykoproteine mit einer Länge von 350-400 Aminosäuren (330,334), die in die extrazelluläre Matrix sezerniert werden und ein Rezeptor vermitteltes *signaling* induzieren können (335). Die Synthese der Wnt-Proteine scheint hierbei einem komplexen Mechanismus zu unterliegen. Vor der Exkretion in die EZM erfolgt eine Anheftung einer Palmitoleinsäure an genannte Proteine, welche mittels der am Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Acyltransferase Porcupine vermittelt wird (332,336). Jene Lipid-modifizierten Wnt-Moleküle können an das transmembranäre Protein Evi/Wls binden, über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert (337–339) und gebunden werden, oder auf diverse Wege wie eine direkte Freisetzung von der Plasmamembran durch Solubilisation (340) oder mithilfe von Exosomen (341) die Zelle verlassen (332). Anschließend können sie an die N-terminale, extrazelluläre, Cystein-reiche Domäne von sog. Frizzled-Rezeptoren binden (342), welche eine primäre Interaktionsstelle für die Bindung mit Wnt-Proteinen darstellt (330,343) und jene Rezeptoren zur Superfamilie der G-Protein

gekoppelten Rezeptoren zählen (329). LRP5/6 agiert hierbei als Co-Rezeptor und kann mit Frizzled infolge einer Wnt-Ligand Bindung dimerisieren (330,344).

Die Schlüsselstelle im *canonical Wnt-pathway* äußert sich im zytoplasmatisch lokalisierten Protein β -catenin, wobei dessen Stabilität durch einen sog. *destruction* Komplex reguliert wird (330). Dieser Komplex besteht insbesondere aus dem Gerüstprotein Axin, APC und den Kinasen GSK-3 β und CK-1 α . In Abwesenheit potentieller Wnt-Liganden befindet sich der Signalweg im inaktiven Status, wobei β -catenin u.a. durch die im erwähnten Komplex vorhandene GSK-3 β phosphoryliert (332), durch β -TrCP ubiquitiniert (345) und letztlich für den proteasomalen Abbau markiert wird. Die daraus resultierende Absenz von nukleär lokalisiertem β -catenin führt zu einer Repression von Zielgenen durch HDACs, welche durch einen Komplex bestehend aus TCF/LEF und TLE/Groucho rekrutiert werden. Eine Aktivierung der Signalkaskade wird durch Ligandbindung von Wnt-Proteinen an Frizzled und LRP Co-Rezeptoren initiiert, woraufhin Letztere durch GSK-3 β und CK-1 α phosphoryliert werden (332). Als Konsequenz erfolgt eine Rekrutierung von Dishevelled-Proteinen zur Plasmamembran, wo sie polymerisiert und dadurch aktiviert werden (346), was schließlich den *destruction* Komplex deaktiviert und mit der Stabilisation und Akkumulation von β -catenin einhergeht. Jenes Protein kann folgend in den Nukleus wandern und dort mit LEF- und TCF-Proteinen einen aktiven Komplex bilden, indem TLE/Groucho verdrängt und weitere Co-Aktivatoren wie CBP/p300, BRG1, BCL-9 und Pygo miteinbezogen werden (332,347). Dieser Vorgang führt zu einer Änderung auf Transkriptionsebene mit dem Resultat einer Modulation multipler Prozesse auf zellulärer Ebene (332,348). Wirbeltiere verfügen über vier Mitglieder von Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF Familie, namentlich TCF-1 (TCF7), TCF-3 (TCF7L1), TCF-4 (TCF7L2) und LEF-1, welche grundsätzlich die Rekrutierung von β -catenin an die entsprechenden Zielgene vermitteln (349,350). Hierbei wird vermutet, dass die Expression und Aktivität der einzelnen Faktoren Einfluss auf die Rekrutierung von β -catenin an jeweils spezifische Gen-Promotoren ausübt. Demnach scheint das Wnt/ β -catenin *signaling* dazu befähigt zu sein, auf andere Zielgene als Antwort auf Veränderungen im zellulären Kontext umzuschalten, was die Komplexität dieser Signalkaskade unterstreicht. Die hierfür zugrundeliegenden Mechanismen sind weitgehend ungeklärt, jedoch wird u.a. eine Beteiligung posttranslationaler Modifikationen von β -catenin-TCF/LEF und dessen bindende Proteine diskutiert (350–352).

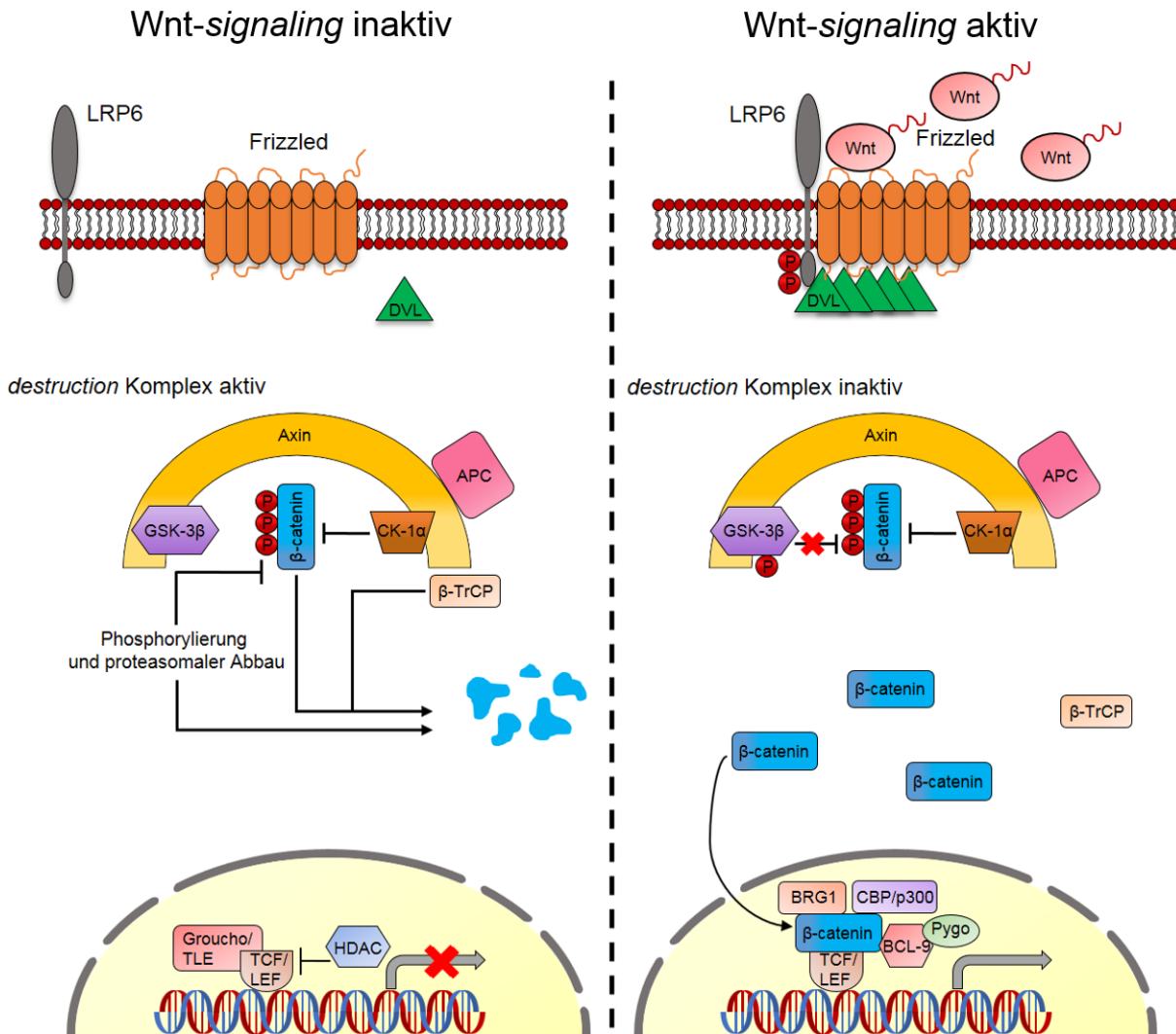


Abbildung 12: Schematisch stark vereinfachte Darstellung des *canonical Wnt-pathways* im inaktiven Zustand (links) und aktiven Zustand mit anschließender Transkription der entsprechenden Gene (rechts). Modifiziert nach Zhan et al. (332).

Im Verlauf der letzten Jahre zielte eine Vielzahl Studien darauf ab, neue, am *Wnt-pathway* beteiligte Elemente sowie dessen Funktionen zu identifizieren. Die Erkenntnisse werden in zahlreichen Reviews dargestellt und diskutiert (329,330,332,335). Aus dem technischen Fortschritt in der Sequenzierung und der umfassenden Charakterisierung von Tumorgenomen (353,354) wurde ersichtlich, dass das Auftreten von Mutationen innerhalb der *Wnt*-Signalkaskade ein häufiges Erscheinungsmerkmal in Karzinomen humanen Ursprungs darstellt (332,355–357). Mutationen im APC-Gen wurden erstmals in der familiären adenomatösen Polyposis, einer autosomal-dominant vererbaren Erkrankung mit Neigung zur Krebsentwicklung, entdeckt (358,359). Ein Verlust beider APC Allele scheint in der frühen Entwicklung von Tumoren des Kolons eine Rolle zu spielen (330,360). So mündet das Ausbleiben der APC-Funktion in einen stabilen und konstitutiv aktiven Komplex aus β -catenin

und dem Transkriptionsfaktor TCF-4 (TCF7L2), was als Konsequenz ein kritisches Ereignis in der frühen malignen Transformation von Epithelzellen des Kolons darstellen kann (330,361).

Eine gesteigerte Expression von Cyclin D1, welches ein *target* von β -catenin in Brustkarzinomzellen darstellt und dessen Transaktivierung mit der Cyclin D1 Expression korreliert, wurde bei etwa der Hälfte der untersuchten Brustkarzinome konstatiert (362) und mit einer reduzierten allgemeinen Überlebensrate in Verbindung gebracht (363). Zudem sind in genannten Tumoren einige Rezeptoren der Wnt-Signalkaskade oftmals überexprimiert (364,365), während diverse Antagonisten dieses *pathways* gehemmt sind (332,366). Weiterhin konnten Veränderungen, welche Proteine des Wnt-*pathways* beeinflussen, eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese ovarialer Karzinome zugeordnet werden. Mit den Proteinen DKK1-4, WIF-1 und SFRP1-5 existieren mehrere Antagonisten der Wnt-Signalkaskade und ein Verlust eines der Mitglieder aus der letztgenannten Familie wird mit einem aggressiveren Phänotyp des Tumors assoziiert (367,368). Als weiteres Beispiel sind *upregulierungen* einiger Wnt-Liganden wie Wnt-1 und Wnt-5a zu erwähnen, wodurch eine gesteigerte Aktivität des *pathways* denkbar ist und mögliche Hinweise auf eine geringere Überlebensrate bei Patienten mit epithelialen Ovarialkarzinomen in Abhängigkeit der Expression erwähnter Liganden liefern (367,369). Eine Aktivierung des Wnt-*pathways* in genannten Karzinomen kann zudem Liganden-unabhängig durch einen sog. *cross-talk* mit anderen Signalkaskaden induziert werden. So kann eine Phosphorylierung der GSK-3 β durch PI3K/AKT erfolgen, welche in zahlreichen Tumoren aktiv ist. Dadurch wird die Phosphorylierung des β -catenins gehemmt und somit dessen Abbau verhindert (367,370).

Diese Erkenntnisse zusammengenommen mit dem Befund, dass eine Aktivierung des Wnt/ β -catenin-*pathways* mit der Förderung einer Cisplatinresistenz in Ovarialkarzinomzellen assoziiert wurde (371), verdeutlichen die Relevanz dieser Signalkaskade im Kontext einer Tumorerkrankung. Daher ist die zukünftige Entwicklung neuer Verbindungen mit genannter Kaskade als therapeutisches *target* eine logische Konsequenz, wobei sich bereits eine Vielzahl potentieller Verbindungen unter klinischer Investigation befindet (332).

3. Ziele dieser Arbeit

Intention dieser Promotionsarbeit war der überraschende Befund einer vorangegangenen Promotionsarbeit unserer Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Daniel Philipp Stölting, in der dargestellt wurde, dass niedermolekulares Heparin die Chemoresistenz cisplatinresistenter Ovarialkarzinomzellen nahezu nivellieren kann. Hierbei wurde der Effekt des Antikoagulans durch eine Interaktion mit Proteoglykanen als potentieller Wirkmechanismus postuliert. Erste Erkenntnisse offenbarten zudem eine durch Tinzaparin bedingte massive Beeinflussung der A2780cis Zellen auf Transkriptionsebene. Aufbauend auf diesen Daten wurde die Forschung in der hier vorliegenden Arbeit fortgesetzt, um einen detaillierteren Einblick in die in A2780cis Zellen vorherrschenden Mechanismen der Chemoresistenz zu erhalten. Weiterhin sollte untersucht werden, ob weitere Heparinderivate unterschiedlicher Struktur und molekularer Größe zu einer Chemosensitivierung befähigt sind und ob geringere Dosen von Tinzaparin in Abhängigkeit bedeutend längerer Inkubationszeiten diesen Effekt aufrechterhalten können. Ein weiteres Ziel war die Identifizierung der durch Tinzaparin induzierten molekularen Mechanismen, welche letztlich zur Überwindung der Cisplatinresistenz beitragen. Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Ergebnisse der Sensitivierung auf andere cisplatinresistente Ovarialkarzinomzellen übertragen lassen und inwiefern der sensitivierende Effekt auf *in vivo* Ebene zum Tragen kommt.

Hierdurch erhaltene Erkenntnisse könnten somit einen Beitrag zur Aufklärung des Phänomens der Chemoresistenz leisten, welche eventuell auf klinischer Ebene unterstützend zur Entwicklung neuer Strategien bei der Behandlung von chemoresistenten Tumoren beitragen könnten.

4. Material und Methoden

4.1 Chemikalien & Reagenzien

4.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Informationen zu den verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
5-Aminosalicylsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Argon	Air Products GmbH, Hattingen
BacilloI [®] AF	Paul Hartmann AG, Heidenheim
BEZ235 (Dactolisib)	Selleck Chemicals, München
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid-2-hydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
CASYton	OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
Cell Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cisplatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Clarity [™] Western ECL Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylfuran (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Calcium und Magnesium pH 7,4	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
EDTA-Lösung in DPBS (0,02 %) ohne Calcium und Magnesium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 96 % (v/v)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
FACS Clean™	BD Biosciences AG, Heidelberg
FACS Flow™	BD Biosciences AG, Heidelberg
FACS Rinse™	BD Biosciences AG, Heidelberg
FH535	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötales Kälberserum F7524 (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega GmbH, Mannheim
Gigasept® instru AF	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
L-Glutaminlösung (200 mmol/L)	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100×)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Helium	Praxair Deutschland GmbH, Düsseldorf
Heparin-Red® Ultra	Redprobes UG (haftungsbeschränkt), Münster

4. Material und Methoden

Heparinase III (Heparitinase I) von <i>Flavobacterium heparinum</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hygromycin B Gold-Lösung (100 mg/mL)	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Kohlenstoffdioxid	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
Kollagen I (Rat Tail)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Laemmli Probenpuffer, 2× Konzentrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
Melsept [®] SF	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Methanol	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natronlauge (1 mol/L)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ONE-Glo [™] Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
pGL4.49[luc2P/TCF-LEF/Hygro] Vector	Promega GmbH, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pierce [™] BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Precision Plus Protein [™] Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
2-Propanol	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Protease Typ XIV von Streptomyces griseus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RO-Heparin (G9694)	Ronzoni Institute, Milan, Italy
Ronaparstat (SST0001)	Sigma-Tau Research, Mendrisio, Schweiz
RPMI 1640 Zellkulturmedium mit Phenolrot	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Salpetersäure 65 %	VWR International GmbH, Darmstadt
Salpetersäure 65 % Suprapur®	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Salzsäure (1 mol/L)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf
Tris-Base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton® X 100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) ohne Calcium und Magnesium, mit Phenolrot	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt

4.1.2 Antikörper

4.1.2.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2: Informationen zu den verwendeten primären Antikörpern.

Antikörper	Epitop	Eigenschaften	Hersteller
β -Aktin (C4)	Umfasst das β -Aktin aus dem Muskelmagen des Vogels.	Maus, monoklonal, IgG1	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Axin1 (N1N2)	Umfasst eine Sequenz innerhalb der N-terminalen Region. Die genaue Sequenz ist Firmeneigentum.	Kaninchen, polyklonal, IgG	GeneTex Inc., Irvine, USA
GAPDH (GT239)	Umfasst eine Sequenz innerhalb der zentralen Region von humanem GAPDH. Die genaue Sequenz ist Firmeneigentum.	Maus, monoklonal, IgG2b	GeneTex Inc., Irvine, USA
Glypikan-3 (1G12)	Aminosäuren 511-580	Maus, monoklonal, IgG1	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Glypikan-4 (AT51E3)	Aminosäuren 401-529	Maus, monoklonal, IgG2a	GeneTex Inc., Irvine, USA
p-GSK-3 β (Ser 9)	Umfasst eine kurze Aminosäuresequenz, welche eine phosphorylierte Stelle an Serin 9 beinhaltet.	Ziege, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

Heparanase 1	Umfasst das rekombinante Protein der humanen Heparanase.	Kaninchen, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Sulf-2 (G-4)	Aminosäuren 481-560 innerhalb einer extrazellulären Domäne von Sulf-2	Maus, monoklonal, IgG1	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Syndekan-1 (H-174)	Aminosäuren 82-256	Kaninchen, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Syndekan-4 (H-140)	Aminosäuren 1-140 lokalisiert am N-terminus.	Kaninchen, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
TCF-4 (H-125)	Aminosäuren 486-610	Kaninchen, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

4.1.2.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3: Informationen zu den verwendeten sekundären Antikörpern.

Antikörper	Epitop	Eigenschaften	Hersteller
Donkey anti-goat IgG-HRP	Ziegen-IgG	Esel, polyklonal, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Donkey anti-mouse IgG-HRP	Maus-IgG	Esel, polyklonal, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Donkey anti-rabbit IgG-FITC	Kaninchen-IgG	Esel, polyklonal, Fluorescein-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

4. Material und Methoden

Goat anti-rabbit IgG-HRP	Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
m-IgGκ BP-HRP	Maus-IgGκ leichte Kette	Maus, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Mouse F(ab)2 IgG (H+L) Fluorescein-conjugated	Maus-IgG	Ziege, polyklonal, Fluorescein-konjugiert	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA

4.1.3 Fertigarzneimittel

Tabelle 4: Informationen zu den verwendeten Fertigarzneimitteln.

Arzneimittel	Zusammensetzung	Hersteller/Inhaber der Zulassung
Arixtra® 7,5 mg/0,6 mL Injektionslösung, Fertigspritze	Fondaparinux-Natrium 7,5 mg Natriumchlorid Natriumhydroxid Salzsäure Wasser für Injektionszwecke	Aspen Pharma Trading Limited, Dublin, Irland
Clexane® 4.000 I.E. (40 mg)/0,4 mL Fertigspritzen, Injektionslösung	Enoxaparin-Natrium 4.000 I.E. Anti-Xa-Aktivität (entsprechend 40 mg) Wasser für Injektionszwecke	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®	Heparin-Natrium 5.000 I.E./0,2 mL Natriumhydroxid Schwefelsäure Wasser für Injektionszwecke	Ratiopharm GmbH, Ulm
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	Heparin-Natrium 25.000 I.E./5 mL Benzylalkohol Natriumchlorid Natriumhydroxid Schwefelsäure Wasser für Injektionszwecke	Ratiopharm GmbH, Ulm

Innohep® 20.000 Anti-Xa I.E./mL (241,143 mg/mL) Fertigspritzen, Injektionslösung	Tinzaparin-Natrium 20.000 Anti-Xa I.E./mL Natriumhydroxid Natriummetabisulfit (Ph.Eur.) (E 223) Wasser für Injektionszwecke	Leo Pharma A/S, Ballerup, Dänemark Örtlicher Vertreter: LEO Pharma GmbH, Neu-Isenburg
--	--	---

4.1.4 Hergestellte Reagenzien

4.1.4.1 Hergestellte Antikörperverdünnungen

Tabelle 5: Informationen zu den hergestellten Antikörperverdünnungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
β-Aktin (C4) (1:200)	BSA	500 mg
	Natriumazid	10 mg
	β-Aktin (C4) Antikörper	50 µL
	TBS-T	10 mL
Axin1 (N1N2) (1:1000)	BSA	500 mg
	Natriumazid	10 mg
	Axin1 Antikörper	10 µL
	TBS-T	10 mL
Sekundärer donkey anti-goat IgG-HRP Antikörper (1:20.000)	Magermilchpulver	0,5 g
	Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	0,5 µL
	Sekundärer anti-goat Antikörper	0,5 µL
	TBS-T	10 mL
Sekundärer donkey anti-mouse IgG-HRP Antikörper (1:10.000; 1:20.000)	Magermilchpulver	0,5 g
	Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	0,5 µL
	Sekundärer anti-mouse Antikörper	0,5 µL; 1 µL
	TBS-T	10 mL
Sekundärer donkey anti-rabbit IgG-FITC Antikörper (1:100)	BSA (0,5 %) in DPBS-Puffer	99 µL
	Sekundärer anti-rabbit Antikörper	1 µL

4. Material und Methoden

GAPDH (GT239) (1:10.000; 1:20.000)	BSA	500 mg
	Natriumazid	10 mg
	GAPDH Antikörper	0,5 µL; 1 µL
	TBS-T	10 mL
Glypikan-3 (1G12) (1:200)	BSA	500 mg
	Natriumazid	10 mg
	Glypikan-3 Antikörper	50 µL
	TBS-T	10 mL
Glypikan-3 (1G12) (1:50) (Durchflusszytometrie)	BSA (2 %) in DPBS-Puffer	98 µL
	Glypikan-3 Antikörper	2 µL
Glypikan-4 (AT51E3) (1:200) (Durchflusszytometrie)	BSA (2 %) in DPBS-Puffer	99,5 µL
	Glypikan-4 Antikörper	0,5 µL
Sekundärer goat anti-rabbit IgG-HRP Antikörper (1:10.000; 1:20.000)	Magermilchpulver	0,5 g
	Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	0,5 mL
	Sekundärer anti-rabbit Antikörper	0,5 µL ; 1 µL
	TBS-T	10 mL
p-GSK-3β (Ser 9) (1:200)	BSA	500 mg
	Natriumazid	10 mg
	p-GSK-3β Antikörper	50 µL
	TBS-T	10 mL
Heparanase (1:200)	BSA	500 mg
	Natriumazid	10 mg
	Heparanase Antikörper	50 µL
	TBS-T	10 mL
Sekundärer m-IgGκ BP-HRP Antikörper (1:10.000)	Magermilchpulver	0,5 g
	Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	0,5 µL
	Sekundärer m-IgGκ Antikörper	1 µL
	TBS-T	10 mL
Sekundärer mouse F(ab)2 IgG (H+L) Fluorescein- conjugated Antikörper (1:50)	BSA (0,5 %) in DPBS-Puffer	98 µL
	Sekundärer anti-mouse Antikörper	2 µL

Sulf-2 (G-4) (1:200)	BSA	500 mg
	Natriumazid	10 mg
	Sulf-2 Antikörper	50 µL
	TBS-T	10 mL
Syndekan-1 (H-174) (1:19)	BSA (2 %) in DPBS-Puffer	180 µL
	Syndekan-1 Antikörper	10 µL
Syndekan-4 (H-140) (1:19)	BSA (2 %) in DPBS-Puffer	180 µL
	Syndekan-4 Antikörper	10 µL
TCF-4 (H-125) (1:200)	BSA	500 mg
	Natriumazid	10 mg
	TCF-4 Antikörper	50 µL
	TBS-T	10 mL

4.1.4.2 Hergestellte Substanzlösungen

Tabelle 6: Informationen zu den verwendeten Substanzlösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
5-Aminosalicylsäure-Stammlösung (1 mmol/L)	5-Aminosalicylsäure DPBS-Puffer, steril	1,991 mg ad 13,0 mL
BEZ235 (Dactolisib)-Stammlösung (5 mmol/L)	BEZ235 (Dactolisib) DMF	10,0 mg ad 4,2594 mL
Cisplatin-Arbeitslösung (10 µg/mL)	Cisplatin-Stammlösung (5 mmol/L) in Purelab Plus® Wasser	66,6 µL ad 10,0 mL
Cisplatin-Qualitätskontrolle (10 ng/mL)	Cisplatin-Arbeitslösung (10 µg/mL) Purelab Plus® Wasser	50,0 µL ad 50,0 mL
Cisplatin-Qualitätskontrolle (20 ng/mL)	Cisplatin-Arbeitslösung (10 µg/mL) Purelab Plus® Wasser	100,0 µL ad 50,0 mL
Cisplatin-Qualitätskontrolle (40 ng/mL)	Cisplatin-Arbeitslösung (10 µg/mL) Purelab Plus® Wasser	200,0 µL ad 50,0 mL

4. Material und Methoden

Cisplatin-Stammlösung (5 mmol/L) in DPBS-Puffer	Cisplatin DPBS-Puffer	15,0 mg ad 10,0 mL
Cisplatin-Stammlösung (5 mmol/L) in Purelab Plus® Wasser	Cisplatin Purelab Plus® Wasser	15,0 mg ad 10,0 mL
Cisplatin-Standard (50 ng/mL)	Cisplatin-Arbeitslösung (10 µg/mL) Purelab Plus® Wasser	250,0 µL ad 50,0 mL
DAPI-Stammlösung (14,3 mmol/L)	DAPI Aqua millipore	10,0 mg 2,0 mL
Enoxaparin-Stammlösung (0,5 mg/mL)	Clexane® 4.000 I.E. (40 mg)/0,4 mL Nährmedium A2780/A2780cis	15,0 µL ad 3,0 mL
FH535-Stammlösung (0,2 mg/mL)	FH535 DMSO	2,0 mg ad 10,0 mL
Fondaparinux-Stammlösung (0,5 mg/mL)	Arixtra® 7,5 mg/0,6 mL DPBS-Puffer, steril	52,0 µL ad 1,3 mL
Heparin-Natrium-5000- ratiopharm®-Stammlösung (95 I.E./mL)	Heparin-Natrium-5000-ratiopharm® DPBS-Puffer, steril	4,94 µL ad 1,3 mL
Heparin-Natrium-25 000- ratiopharm®-Stammlösung (11,5 I.E./mL)	Heparin-Natrium-25000-ratiopharm® DPBS-Puffer, steril	2,30 µL ad 1,0 mL
Heparitinase I-Stammlösung (1 Unit/mL)	Heparitinase I Tris-HCl-Stammlösung	1 Vial (5 Units) ad 5,0 mL
Kollagen I (Rat Tail)- Stammlösung (1 mg/mL)	Kollagen I (Rat Tail) Essigsäure DBPS-Puffer	10,0 mg 20,0 µL ad 10,0 mL
RO-Heparin (G9694)- Stammlösung (21,2 mg/ml)	RO-Heparin (G9694) DPBS-Puffer, steril	21,2 mg ad 1,0 mL

Ronaparstat (SST0001)- Stammlösung (60 mg/mL)	Ronaparstat (SST0001) Wasser für Injektionszwecke	150,0 mg 2,5 mL
Tinzaparin-Stammlösung (24,114 mg/mL)	Innohep® 20.000 Anti-Xa I.E./mL DPBS-Puffer, steril	100,0 µL ad 1,0 mL
Tinzaparin-Stammlösung zur Erstellung einer Kalibriergeraden (100 µg/mL)	Tinzaparin-Stammlösung (24,114 mg/mL) Aqua millipore/Tumorlysat A2780cis (Es wurde jeweils eine Kalibrierung in Aqua millipore sowie eine im Tumorlysat erstellt)	4,1 µL ad 1,0 mL
Tris-HCl-Stammlösung (20 mmol/L)	BSA Calciumchlorid-2-hydrat Tris-HCl Aqua Millipore	5,0 mg 29,404 mg 157,6 mg ad 50,0 mL

4.1.4.3 Hergestellte Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Informationen zu den hergestellten Puffern und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
BCA-Lösung	BCA-Reagenz B BCA-Reagenz A (Beide Reagenzien im Pierce™ BCA Protein Assay Kit enthalten)	196,1 µL ad 10,0 mL
<i>Blocking</i> -Lösung	Magermilchpulver TBS-T	5,0 g ad 100,0 mL
BSA (2 %) in PBS	BSA DPBS-Puffer	1,0 g ad 50,0 mL
BSA (0,5 %) in PBS (Waschpuffer)	BSA DPBS-Puffer	0,25 g ad 50,0 mL
Elektrodenpuffer 1×	Elektrodenpuffer 10×	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL

4. Material und Methoden

Elektrodenpuffer 10×	Glycin	72,0 g
	Tris-Base	15,0 g
	SDS	5,0 g
Kryomedium	FKS	45,0 mL
	DMSO	5,0 mL
Luminol-Peroxidlösung	Clarity Western Peroxid-Reagenz	4,0 mL
	Clarity Western Luminol-Reagenz	4,0 mL
	(Beides im Clarity™ Western ECL Blotting Substrate enthalten)	
Lysepuffer	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100×)	25 µL
	PMSF (0,3 mol/L)	17 µL
	Cell Extraction Buffer	ad 5,0 mL
MTT-Reagenz (5 mg/mL)	MTT	50,0 mg
	DPBS-Puffer	ad 10,0 mL
Nährmedium A2780/A2780cis	Fötale Kälberserum F7524	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	L-Glutaminlösung (200 mmol/L)	7,5 mL
	RPMI 1640 Zellkulturmedium	500,0 mL
Nährmedium W1/W1CR	Cisplatin-Stammlösung (5 mmol/L)	370,0 µL
	Fötale Kälberserum F7524	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	RPMI 1640 Zellkulturmedium	500 mL
ONE-Glo™ Luciferase Assay-Detektionsreagenz	ONE-Glo™ Luciferase Assay Substrat (lyophilisiert)	1 Vial
	ONE-Glo™ Luciferase Assay Puffer	10,0 mL
PMSF-Stammlösung (0,3 mol/L)	PMSF	261,3 mg
	DMSO	ad 5,0 mL
Salpetersäure (6,5 %) (v/v)	Salpetersäure (65 %) Suprapur® Aqua millipore	50,0 mL ad 500,0 mL
Salpetersäure (6,5 %) (v/v) zur Reinigung/Dekontamination	Salpetersäure (65 %) Aqua millipore	100 mL ad 1000,0 mL

Selektionsmedium A2780/A2780cis	Fötale Kälberserum F7524	50,0 mL
	Hygromycin B Gold-Lösung (100 mg/mL)	562,5 µL 5,0 mL
	Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	7,5 mL
	L-Glutaminlösung (200 mmol/L)	500,0 mL
	RPMI 1640 Zellkulturmedium	
Spüllösung (GF-AAS)	Aqua Millipore (mit Helium entgast)	1000,0 mL
	Salpetersäure (65 %) (v/v)	1,0 mL
	Triton® X 100-Lösung (1 %) (m/v)	1,0 mL
TBS-Puffer 1×	TBS-Puffer 10×	100 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
TBS-Puffer 10×	Natriumchlorid	40,0 g
	Tris-Base	6,06 g
	Aqua millipore	ad 500,0 mL
	pH-Wert Einstellung auf 7,3 erfolgte mit Salzsäure (1 mol/L)	
TBS-T-Puffer	Aqua millipore	720,0 mL
	TBS-Puffer 10×	80,0 mL
	Tween® 20	1,6 mL
Transfektionsreagenz (FuGENE® HD : DNA Verhältnis 4:1)	FuGENE® HD	8,8 µL
	pGL4.49[luc2P/TCF-LEF/Hygro] Vector	3,52 µL
	Steriles Wasser	97,48 µL
Transferpuffer 1×	Transferpuffer 10×	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
Transferpuffer 10×	Glycin	72,0 g
	Tris-Base	15,0 g
	Aqua millipore	ad 500,0 mL
Triton® X 100-Lösung (1 %) (m/v)	Triton® X 100	1,0 g
	Aqua millipore	ad 100,0 mL

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
96-Well Platte Nunc™ MicroWell™, schwarz, PS, steril	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96-Well Platte Nunc™ MicroWell™, weiß, PS, steril	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CASYcups	OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
Combitips advanced® (1,0 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
CytoOne® 6 Well-Platte, TC-behandelt, steril	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg
CytoOne® 24 Well-Platte, TC-behandelt, steril	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg
CytoOne® 96 Well-Platte, TC-behandelt, steril	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg
Einmalspritzen NORM-JECT® (10 mL)	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Einmalspritzen NORM-JECT® (20 mL)	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Gel-Pipettenspitzen MultiFlex Round	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, USA
Graphitröhrchen, Omega platform tubes	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Gummisauger für Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Handdispenser Aufsätze (0,5 mL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Handdispenser Aufsätze (2,5 mL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim

Handdispenser Aufsätze (12,5 mL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Handdispenser Aufsätze (25 mL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (7,5-12 %)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini Trans-Blot® Filter Paper	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nalgene™ Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen TipOne® (10 µL), natur	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen TipOne® (200 µL), gelb	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen TipOne® (1000 µL), blau	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen (5 mL) Plastibrand®, natur	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Platinhohlkathodenlampe, UltrAA Lampe	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
Probenflaschen (2 mL), konisch	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
Reagenzbehälter für Multikanal-Pipetten, 25 mL, Polystyrol, steril	VWR International GmbH, Darmstadt
Reagiergefäße (0,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (2,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (5,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

4. Material und Methoden

Röhrchen CELLSTAR [®] , 15 mL, Polypropylen, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen CELLSTAR [®] , 50 mL, Polypropylen, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Schnappdeckelfläschchen-Rotilabo [®] ND18/ND22 (15 mL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturflaschen CELLSTAR [®] TC, 50 mL, 25 cm ² , PS, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen CELLSTAR [®] TC, 250 mL, 75 cm ² , PS, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen CELLSTAR [®] TC, 550 mL, 175 cm ² , PS, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

4.3 Geräte

Tabelle 9: Informationen zu den verwendeten Geräten.

Bezeichnung	Hersteller
Absaugsystem BVC 21 NT	VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Accu-Jet [®] pro	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Analysenwaage Mettler Toledo Classic Plus AB135-S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Analysenwaage Sartorius basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen

Autosampler PSD 100	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CO ₂ -Inkubator IncuSafe	Panasonic Biomedical Sales Europe B.V., Etten-Leur, Niederlande
Durchflusszytometer BD FACSCalibur	BD Biosciences AG, Heidelberg
Graphitrohratomisator GTA 100	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Inkubationshaube TH 15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Kompaktschüttler KS 15 und KS 15 CONTROL	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Nikon A1R	Nikon GmbH, Düsseldorf
Laminar-Air-Flow-Werkbank Heraeus Herasafe HSP 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Laminar-Air-Flow-Werkbank Holten safe 2010	Heto-Holton A/S, Allerød, Dänemark
Lichtmikroskop Wilovert 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Lichtmikroskop Wilovert Standard HF/K	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Mehrfachdispenser HandyStep® S	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Membran-Vakuumpumpe	VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Messkolben BLAUBRAND® (10 mL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Messkolben BLAUBRAND® (50 mL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Messkolben BLAUBRAND® (100 mL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim

4. Material und Methoden

Messkolben BLAUBRAND® (250 mL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Messkolben BLAUBRAND® (500 mL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Messkolben BLAUBRAND® (1 L)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Messpipetten Klasse AS (1 mL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Messpipetten Klasse AS (5 mL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Messpipetten Klasse AS (10 mL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Mini Trans-Blot® Module and PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg
Multiskan® EX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Multiwell Reader FLUOstar™ OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
Multiwell Reader POLARstar™ OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
PARAFILM® M	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Peleusball	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
pH-Meter S20 SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Pinzetten (verschiedene Größen)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pipette Finnpiquette™ (1–5 mL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipette Research® (10 µL)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Research® (100 µL)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Research® (1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg

Pipette Transferpette [®] S (10 µL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Pipette Transferpette [®] S (100 µL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Pipette Transferpette [®] S (1000 µL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Pipette Transferpette [®] S-12 (200 µL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Pipette Transferpette [®] -12 electronic (100 µL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Pipette Transferpette [®] -12 electronic (200 µL)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Purelab [®] Plus Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle
Reagenzglasschüttler VWR Collection	VWR International GmbH, Darmstadt
RS-P42 Drucker	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Skalpell Griff Nr. 4 inkl. Klinge	Otto Herder Manicure, Solingen
Spatel (verschiedene Größen)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Spektrometer SpectrAA [®] Zeeman 220	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Stickstoffbehälter MVE CryoSystem 4000	Chart BioMedical GmbH, Wuppertal
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tiefkühl-lagerschrank Herafreeze HFU 586 Basic	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Trockenschrank Heraeus T6030	Heraeus Holding GmbH, Hanau
TissueLyser LT	QIAGEN, Hilden
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vakuum-Chemiepumpstand	VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim

Vakuum-Konzentrations-Zentrifuge UNIVAPO 100 H	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg
Wasserdestillierer Köttermann 1032	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Zellzähler CASY® Model TT	OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
Zentrifuge Micro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Zentrifuge Minispin®	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

4.4 Software

Tabelle 10: Informationen zur verwendeten Software.

Bezeichnung	Urheberrechte
Ascent Software™ v2.6	© Thermo Labsystems Oy 1996–2002
ChemDraw® Prime Version 16.0.1.4	© PerkinElmer Informatics, Inc. 1998–2017
Image Lab (Beta 2), Version 3.0.1	© Bio-Rad Laboratories 2010
Microsoft Office Standard 2013 : <ul style="list-style-type: none"> • Microsoft Excel • Microsoft PowerPoint • Microsoft Word 	© Microsoft Corporation 2012
NIS-Elements Advanced Research	© Nikon Instruments 2000–2010
Prism 5 for Windows, Version 5.00	© GraphPad Software, Inc. 1992-2007
SpectrAA 220Z, AA 240Z v5.1 PRO	© Varian Australia 1997–2006

4.5 Zelllinien

Für die Durchführung der Experimente für diese Dissertation wurden die beiden humanen Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und A2780cis verwendet. Die A2780 Zellen wurden aus einem Tumorgewebe einer unbehandelten Patientin etabliert und wachsen als *monolayer* adhärent in der Zellkultur. Die cisplatinresistente Ovarialkarzinomzelllinie A2780cis wurde durch chronische Exposition von steigenden Konzentrationen an Cisplatin mit der A2780 Zelllinie generiert. Beide Zelllinien wurden von der ECACC erworben (A2780 Katalognummer: 93112519, A2780cis Katalognummer: 93112517). Einige Experimente wurden mit den humanen Ovarialkarzinomzelllinien W1 und W1CR durchgeführt, welche uns freundlicherweise von Herrn Dr. Januchowski von der *University of Medical Sciences* in Posen, Polen zur Verfügung gestellt wurden. Die W1 Zelllinie stammt ebenfalls aus dem Tumorgewebe einer unbehandelten Patientin und die cisplatinresistente Zelllinie W1CR wurde durch schrittweise ansteigende Konzentrationen an Cisplatin generiert (372).

4.6 Zellkultur

Für sämtliche zellulären Arbeiten wurde unter aseptischen Bedingungen unter einer Laminar-*Air-Flow* Bank gearbeitet um sowohl Kontaminationen mit Fremdmaterial, als auch mit den Zellen untereinander zu vermeiden. Die Cisplatinresistenz der A2780cis und W1CR Zellen wurde in regelmäßigen Abständen durch Zytotoxizitäts-*assays* überprüft (Kapitel 4.10). Weiterhin wurden die A2780/A2780cis Zellen maximal bis zur zwölften Passage kultiviert, um genetischen Abweichungen vorzubeugen und da darüber hinaus ein Abfall des Resistenzgrades zu beobachten war. Die Identität wurde nach dem kommerziellen Erwerb erneut im April 2015 durch die DSMZ überprüft und bestätigt. Des Weiteren wurden alle Zellen in regelmäßigen Zeitabständen auf Mykoplasmen geprüft.

4.6.1 Inkulturnahme

Die jeweiligen Kryoröhrchen mit den darin enthaltenen Zellen wurden aus einem Stickstofftank entnommen und wahlweise im vorgeheizten Inkubator bei 37°C bzw. bei Raumtemperatur aufgetaut. Zeitnah wurde durch Zugabe von 1 mL Zellkulturmedium die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt, in der bereits 4 mL Medium vorgelegt waren. Sowohl das Mikroskop, als auch der im Medium enthaltende Indikator Phenolrot dienten als visuelle Kontrolle des Wachstums der Zellpopulation. Sobald die jeweiligen Zellen einen bestimmten Grad der Konfluenz erreicht hatten (ca. 80-90 %), wurden diese in eine größere Zellkulturflasche überführt (75 cm² oder 175 cm²), in der eine entsprechende

Weiterkultivierung stattfand. Um eine optimale Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, erfolgte spätestens nach drei Tagen ein Wechsel zu frischem Zellkulturmedium (je nach Größe der Zellkulturflasche 5, 15 bzw. 25 mL).

4.6.2 Kultivierung

Erreichten die Zellen in ihrem Wachstum eine ca. 80-90 %ige Konfluenz oder wurden für experimentelle Ansätze in einer bestimmten Anzahl benötigt, wurde das Zellkulturmedium abgesaugt. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 5, 15 bzw. 25 mL DPBS-Puffer (je nach Größe der Zellkulturflasche) und erneutes Absaugen. Dies bewirkte, dass sowohl abgestorbene Zellen, als auch deren intrazelluläre Bestandteile und Stoffwechselprodukte bedingt durch partielle Zelllyse, entfernt wurden. Es erfolgte das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden durch Zugabe von 0,5, 1 bzw. 2 mL (abhängig von der Fläche der Zellkulturflasche) EDTA- bzw. Trypsin/EDTA-Lösung (je nach Versuchsansatz) und eine Inkubation im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ für 2-3 min. Anschließend wurden durch Auf- und Abpipetieren mithilfe von 8-9,5 mL Medium die Zellen vollständig vom Flaschenboden abgelöst und in ein 15 mL Röhrchen überführt. Nach erfolgter Zentrifugation bei 1680 rpm und 4°C für 4 min wurde das Medium entfernt und das Zellpellet erneut in 1 mL frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden ca. 10-20 % des Volumens in eine neue Zellkulturflasche überführt. Da die Wachstumsrate der beiden cisplatinresistenten Zelllinien etwa der Hälfte der jeweils nicht-resistenten Zelllinien entspricht, wurde das doppelte Volumen überführt, um eine annähernd gleiche Zellzahl zu gewährleisten.

4.6.3 Dauerhafte Lagerung

Um genetische Veränderungen durch dauerhafte Kultivierung zu vermeiden, erfolgte eine Kryokonservierung sämtlicher Zellen. Hierbei wurde zunächst wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben vorgegangen. Anschließend wurden die Zellen zu einer Konzentration von 1 Millionen Zellen pro 1 mL Kryomedium aliquotiert und eine Woche im Tiefkühlagerschrank bei -80°C gelagert. Durch das Einfrieren werden zelluläre Prozesse abrupt gestoppt und durch die Abwesenheit von Wasser im Kryomedium werden die Zellen nicht durch spontane Bildung von Eiskristallen physisch beschädigt. Nach einer Woche wurden die Zellen in einen stickstoffhaltigen Lagertank überführt und aufbewahrt.

4.6.4 Bestimmung der Zellzahl

Die für die durchgeführten Experimente benötigten Zellzahlen wurden mithilfe des Zellzählers CASY® Model TT gemessen. Die zugrundeliegende Technik basiert auf der *Electrical Current Exclusion* (ECE®). Hierbei werden die zu vermessenden Zellen in einer isotonischen Pufferlösung suspendiert und mithilfe einer Kapillare durch eine Messpore definierter Größe gesaugt an der ein niedriges Spannungsfeld angelegt ist. Diese Kapillare wird durch zwei Platinelektroden separiert. Die Zellen generieren durch Verdrängung der Pufferlösung an der Messpore einen individuellen elektrischen Puls, welcher proportional zum Volumen der Zelle ist. Hierdurch können lebende von toten Zellen separiert werden, da letztere über keine intakte Zellmembran verfügen und hier das gemessene Volumen dem des jeweiligen Zellkerns entspricht. Die Anzahl der Messereignisse sind dabei das Maß für die Zellzahl, welches anschließend in einem Diagramm dargestellt wird (373).

Zur Quantifizierung der Zellen wurde zunächst wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben vorgegangen, jedoch nach erfolgter Zentrifugation in 10 mL Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 20 µL in ein mit 10 mL steril filtriertem CASYton befülltes CASYcup überführt und anschließend vermessen.

4.6.5 Prüfung auf Mykoplasmenkontamination

Um zu gewährleisten, dass während sämtlicher experimenteller Versuche eine Kontamination mit Mykoplasmen ausgeschlossen war, erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Kontrolle jeder Zelllinie.

Dazu wurde zunächst wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben vorgegangen. Nach erfolgter Zellzählung (Kapitel 4.6.4) erfolgte ein Resuspendieren von jeweils 100.000 Zellen in 1 mL Medium. Diese Zellsuspension wurde in eine 24-Well Platte überführt und 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 1 mL DAPI-Lösung (3 µmol/L), welche aus der Stammlösung hergestellt wurde. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur konnte die Fluoreszenzdetektion am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop durchgeführt werden. Die Anregungswelle betrug 405 nm und die Aufnahme des Emissionsspektrums lag im Bereich von 425-475 nm.

DAPI bindet bevorzugt Adenin/Thymin-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA-Helix (374). Da dies sowohl bei DNA von Zellen, als auch bei derer von Mykoplasmen der Fall ist, erfolgte die Differenzierung unter dem Mikroskop aufgrund der Größenunterschiede. Die

Prüfung auf Mykoplasmen galt als negativ, wenn im Vergleich zu den fluoreszierenden Zellen keine weiteren deutlich kleineren Partikel visuell detektierbar waren.

4.7 Quantitative Bestimmung von Platin

Zur Ermittlung der tatsächlichen Cisplatinkonzentration in den verwendeten Stammlösungen, erfolgte zu jeder neuen Herstellung einer solchen Lösung anschließend eine Bestimmung mithilfe der Graphitofen-Atomabsorptionsspektroskopie (GF-AAS). Bei dieser Methode werden 20 μL der flüssigen Probe durch einen elektrothermischen Atomisator bei niedriger Temperatur eingedampft und anschließend in einem elektrisch geheizten Graphitrohr mit steigender Temperatur verascht (Tabelle 11). Durch eine erneute Temperatursteigerung auf 2700°C erfolgt die Atomisierung des Platins aus dem Cisplatinkomplex und die anschließende Messung. Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, ist das Graphitrohr mit pyrolytischem Kohlenstoff überzogen. Dies wiederum vermeidet eine durch die natürliche Porosität des Graphitrohrs bedingte Diffusion des Analyten in das Rohr, welche letztlich zu einer Verlangsamung des Atomisierungsprozesses führen würde und schließlich mit kleineren Analytsignalen einherginge. Als Quelle für die Atomabsorptionsmessungen dient eine Hohlkathodenlampe, welche aus einer zylindrischen Kathode und einer Wolframanode in einer mit Argon befüllten Glasröhre besteht. Schließlich erfolgt die Bestrahlung des atomisierten Platins, wodurch ein Teil des eingestrahnten Lichtes absorbiert wird. Unter Einsatz eines Monochromators wird daraufhin die Intensität des ausgestrahlten Lichtes detektiert. Aus der sich ergebenden Differenz des in die Probe ein- und ausgestrahlten Lichtes kann gemäß des Lambert-Beerschen Gesetzes die Cisplatinkonzentration ermittelt werden (375). Zusätzlich erfolgt bei dieser Methode eine Untergrundkorrektur mithilfe des Zeeman-Effektes. Dieser beruht auf der Tatsache, dass das Anlegen eines magnetischen Feldes zur Aufspaltung und Polarisierung der atomaren Spektrallinien in eine π -, sowie zweier σ -Linien führt. Hierbei finden zwei aufeinander folgende Messungen statt, wobei bei der ersten die gesamte Absorption vermessen wird, während es bei letzterer durch Anlegen eines magnetischen Feldes von 0,8 T zu genannter Aufspaltung kommt und die zentrale π -Komponente durch einen Polarisator von der Detektion ausgeschlossen wird. Da mögliche störende Substanzen, Reste oder Partikel, die eine Hintergrundabsorption verursachen können, vom magnetischen Feld unbeeinflusst sind, kann dementsprechend die alleinige Absorption des Platins ermittelt werden, indem der zweite Messwert vom ersten subtrahiert wird (376).

Tabelle 11: Zyklus einer Messung am Spektrometer SpectrAA® Zeeman 220.

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

Die für die Kalibrierung benötigte Standardlösung (50 ng/mL), sowie die zur Messung benötigten Qualitätskontrollproben (10, 20 und 40 ng/mL) wurden jeweils frisch aus einer Cisplatin-Arbeitslösung (10 µg/mL) hergestellt, welche wiederum aus einer vorher genau quantifizierten Cisplatin-Stammlösung (5 mmol/L) in Purelab Plus® Wasser hergestellt wurde. Für die Verdünnung der Standardlösung, sowie als Nullwert diente 6,5 %ige Salpetersäure Suprapur®. Zu Anfang und Ende der gesamten Messung erfolgte die Vermessung dreier unterschiedlicher Qualitätskontrollproben. Zwischen der Messung der verschiedenen Proben triplikate wurde jeweils eine zufällig gewählte Qualitätskontrollprobe vermessen. Das validierte Akzeptanzkriterium für die erhaltenen Ergebnisse wurde erfüllt, insofern sich mindestens 67 % der gemessenen Qualitätskontrollproben innerhalb des Kalibrierbereichs befanden, wobei eine maximale Abweichung von 15 % erlaubt war (377).

Für die jeweilige Quantifizierung wurden die Cisplatin-Stammlösungen (5 mmol/L) 1:50.000 und die Lysate der Maustumore (Kapitel 4.12.2) bis 1:100 verdünnt. Dabei ist das Gerät in der Lage selbstständig bis zu einem gewissen Grad zu verdünnen. Die Anzahl

Wiederholungsmessungen betrug mindestens zwei, wobei die interne Präzision um maximal 5 % abweichen durfte, jedoch maximal vier, falls die Untergrenze nicht eingehalten werden konnte. Aus den resultierenden Werten wurde für die Auswertung der jeweilige Mittelwert gebildet.

4.8 Lyse der A2780 und A2780cis Zellen und Isolierung von Proteinen

Nach entsprechender Inkubationszeit der A2780 und A2780cis Zellen wurde das Zellkulturmedium entfernt und nach einem Waschschriff mit 15 bzw. 25 mL (je nach Größe der Zellkulturflasche) DPBS-Puffer erfolgte das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden durch Zugabe von 1-2 mL Trypsin/EDTA und anschließender zweiminütiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂. Durch mechanisches Schütteln der Flaschen sowie mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit jeweils 5 mL kaltem DPBS-Puffer konnten sämtliche Zellen abgelöst und in ein 15 mL Röhrchen überführt werden. Nach Zentrifugation bei 1680 rpm und 4°C für 4 min wurde der flüssige Bestandteil abgesaugt. Je nach Volumen des zentrifugierten Zellpellets wurde anschließend in 0,5-1,2 mL Lysepuffer resuspendiert und die Zellsuspension in Reagiergefäße (1,5 mL) überführt. Es schloss sich eine Lyse bei 4°C und 800 U/min für 30 min auf dem Thermomixer comfort an. Die Proteine wurden anschließend von nicht löslichen zellulären Bestandteilen durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 10 min separiert. Der daraus erhaltene klare proteinhaltige Überstand wurde auf mehrere Reagiergefäße (1,5 mL) aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die zu verwendenden Lysate nicht älter als 6 Monate waren.

4.8.1 Proteinbestimmung

Zur Quantifizierung der Menge an Gesamtprotein der Zelllysate wurde das PierceTM BCA Protein Assay Kit verwendet. Der hierbei zugrundeliegende Mechanismus beruht auf zwei wesentlichen Reaktionen. Zunächst bilden Proteine in alkalischem Milieu einen blauen Komplex mit zweiwertigen Kupferionen. Hierbei handelt es sich um die sog. Biuret-Reaktion. Durch die in den Proteinen enthaltenen Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin kommt es zu einer Reduktion der Cu²⁺-Ionen zu Cu¹⁺-Ionen (378,379). Anschließend komplexiert die in dem *assay* enthaltene Bicinchoninsäure die entstandenen einwertigen Kupferionen in einem Verhältnis von 2:1 unter Ausbildung einer violetten Färbung (Abbildung 13). Da dieser Komplex eine starke Absorption bei 562 nm besitzt und die Intensität der Färbung proportional zur Proteinkonzentration ist, kann durch Anfertigen einer Kalibriergerade

mittels verschiedener BSA-Verdünnungen die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe bestimmt werden (378,380).

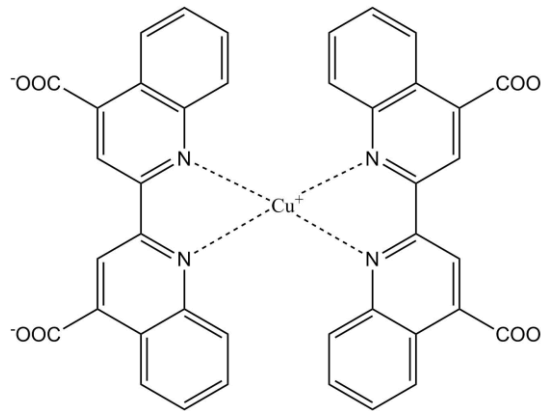


Abbildung 13: Struktur des violetten BCA-Komplexes.

Die zu bestimmenden Proteinproben wurden mit DPBS-Puffer 1:10, 1:50 und 1:100 in 0,5 mL Reagiergefäße zu einem Gesamtvolumen von 50 μ L verdünnt. Die BSA-Proben für die Erstellung der Kalibrierung hatten einen Konzentrationsbereich von 50-400 μ g/mL. Als Qualitätskontrollen kamen drei Konzentrationen zum Einsatz (150, 250 und 350 μ g/mL) und DPBS-Puffer diente als Blindwert. Anschließend wurden die Verdünnungen der Proben, die Konzentrationen zur Kalibrierung, die Qualitätskontrollen sowie der Blindwert in Form von Duplikaten zu 20 μ L in eine durchsichtige 96-Well Platte pipettiert (Abbildung 14). Nach Zugabe von jeweils 200 μ L BCA-Lösung zu jedem Well wurde für 60 min bei 60°C im Trockenschrank inkubiert. Nachdem die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt war, erfolgte die Messung der Absorption am Multiskan® EX bei einer Wellenlänge von 570 nm.

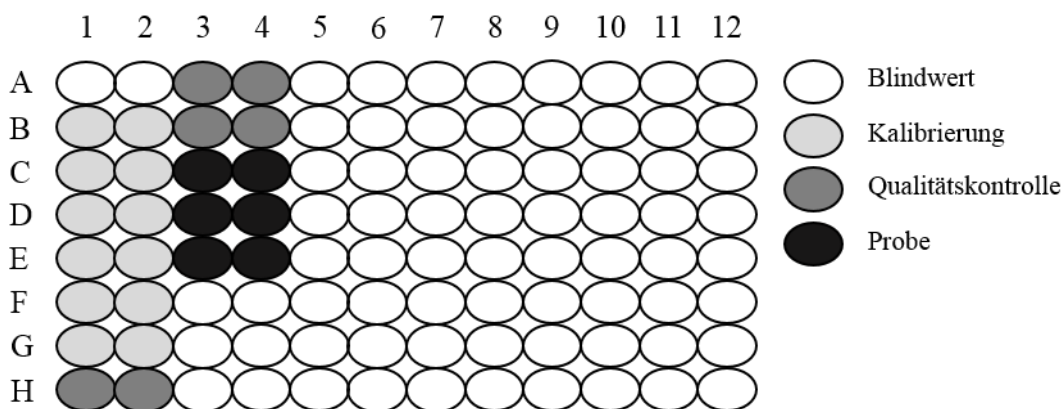


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Pipettierschemas bei der Proteinbestimmung in einer 96-Well Platte mit einem Endvolumen von 220 μ L/Well.

4.9 Analyse der Proteinexpression von A2780 & A2780cis Zellen

4.9.1 Inkubationsansätze

Die A2780 und A2780cis Zellen wurden hierzu zunächst wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben kultiviert und anschließend zu gleichen Anteilen auf die entsprechende Anzahl Zellkulturflaschen aufgeteilt. Eine Inkubation mit Tinzaparin erfolgte 1 h nach dem Aussäen der Zellen in einer Konzentration von 50 µg/mL. Weitere 24 h später wurden die entsprechenden Ansätze mit einer Lösung von 2 µmol/L Cisplatin versetzt. Es folgte eine Inkubation über die Zeitdauer von 72 h mit einer sich anschließenden Zellyse zur Isolierung der Proteine (Kapitel 4.8). Sämtliche Inkubationsschritte fanden bei 37°C und 5 % CO₂ statt. Eine Übersicht der unterschiedlichen experimentellen Ansätze ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Informationen zu den Inkubationsansätzen für die Analysen der Proteinexpressionen von A2780 und A2780cis Zellen.

A2780	A2780cis
Unbehandelt	
+ Tinzaparin (50 µg/mL)	
+ Cisplatin (2 µmol/L)	
+ Tinzaparin (50 µg/mL) und Cisplatin (2 µmol/L)	

4.9.2 SDS-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt die elektrophoretische Trennung der Proteine aufgrund deren Größe. Durch Zugabe von Laemmli-Puffer findet durch das darin enthaltene reduzierende Agens β-Mercaptoethanol eine Spaltung der intra- und intermolekularen Disulfidbrücken statt. Das anionische Detergenz SDS bewirkt durch Aufspalten von Wasserstoffbrücken eine Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur und eine Streckung der Proteine. Zudem resultiert aus der Anlagerung von SDS, welches die Eigenladungen der Proteine überdeckt, ein konstantes Masse/Ladungsverhältnis. Als

Konsequenz ist die Wanderung im elektrischen Feld von der Größe der Proteine abhängig (381,382).

Die jeweiligen Proben wurden mit äquivalentem Volumen Laemmli Probenpuffer, 2× Konzentrat versetzt, gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die entsprechenden Polyacrylamidgele in die Halterungen der Elektrophoresekammer eingebracht und mit Elektrodenpuffer 1× befüllt.

Nach beendeter Inkubation erfolgte die Zugabe der Proteinproben zu den Geltaschen. Dabei wurde ein Volumen gemäß der Proteinbestimmung (Kapitel 4.8.1) gewählt, sodass sich in jeder Tasche 20 µg Protein befanden. Nach Zugabe eines Proteinstandards (2,5-5 µL) zur späteren Identifizierung der Proteingrößen, erfolgte die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 200 V. Die Dauer der Elektrophorese lag zwischen 45-50 min, abhängig vom verwendeten Gel.

4.9.3 Western blot

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Durch Reinigung und Umbau der Elektrophoresekammer konnte der *western blot* in der gleichen Apparatur stattfinden. Hierzu wurde der *blot*-Einsatz eingebaut und die Kammer zur Hälfte mit Transferpuffer befüllt. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden hierbei auf eine PVDF-Membran übertragen, welche kurz vor Verwendung für 20 s mit Methanol aktiviert wurde. Nach Zusammenbau des *blot-sandwiches*, welches aus dem Gel und der PVDF-Membran sowie beidseitig jeweils einem *fiber pad* und einem *blotting-paper* bestand, erfolgte die Installation in die Kammer und eine vollständige Befüllung mit Transferpuffer. Eine ausreichende Kühlung während des *blotting*-Vorgangs konnte durch Einsatz eines Kühlakkus sowie eines Rührfisches gewährleistet werden. Die Dauer betrug 60 min bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 350 mA.

4.9.4 Visualisierung der Proteine

Sobald der *western blot* beendet und die PVDF-Membran aus der Kammer in eine Schale mit TBS-Puffer 1× übertragen worden war, erfolgte die für die Besetzung freier Bindungsstellen erforderliche Blockierungsreaktion. Hierzu wurde der TBS-Puffer 1× von der Membran entfernt und durch 50 mL *blocking*-Lösung ersetzt. Nach 1 h wurde jeweils dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen und es folgte die Reaktion mit den entsprechenden primären Antikörpern. Hierbei wurde nach Entfernen des TBS-T-Puffers 10 mL der Antikörperlösung zur

entsprechenden Membran gegeben. Anschließend wurde für 60 min bei Raumtemperatur abgedeckt geschüttelt, bevor die restliche Lagerung bis zum nächsten Tag im Kühlschrank stattfand. Am darauffolgenden Tag wurde erneut dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen, bevor sich die Reaktion mit den entsprechenden sekundären Antikörpern anschloss. Hierzu wurden nach Entfernen des TBS-T-Puffers 10 mL der entsprechenden sekundären Antikörperlösung zu der Membran gegeben und für 1,5 h bei Raumtemperatur abgedeckt geschüttelt. Nach zwei folgenden Waschschrritten konnten die Zielproteine am ChemiDoc™ XRS+ System visualisiert werden. Dabei wurde die Membran in eine Schale überführt, welche mit 4 mL Luminol-Peroxidlösung befüllt war. Nach 120 s Inkubation bei Raumtemperatur und Lichtschutz konnte die aus der Luminolreaktion resultierende Chemilumineszenz detektiert werden. Bei dieser Reaktion ist der sekundäre Antikörper, welcher spezifisch an den primären bindet, mit dem Enzym HRP gekoppelt. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des Luminols in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Über ein Epoxid-Intermediat entsteht schließlich 3-Aminophthalat mit einer einhergehenden Lumineszenz, welche bei 430 nm detektiert werden kann (383–385).

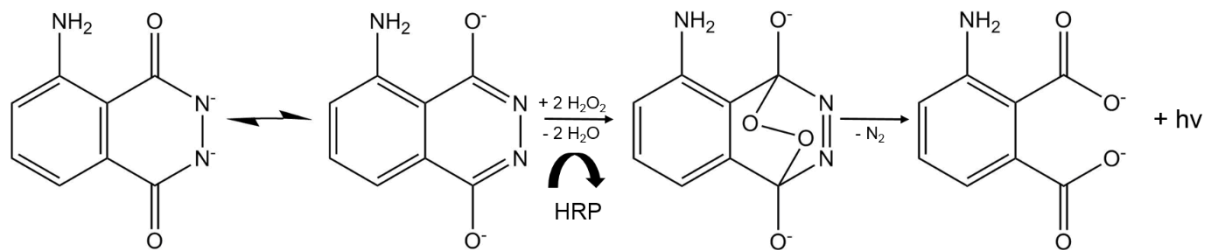


Abbildung 15: Darstellung der durch die *horseradish peroxidase* katalysierten Luminolreaktion.

Hierbei wurden durch das Gerät mehrere Aufnahmen über eine Belichtungszeit von maximal 15 min angefertigt.

4.9.5 Auswertung und Statistik

Um aus den detektierten Lumineszenzwerten eine quantitative Aussage zu ermöglichen, wurden die jeweiligen zu untersuchenden Proteine auf ein sogenanntes *housekeeping*-Protein normalisiert. Demnach wurde für jede Probe sowohl das zu untersuchende Protein, als auch das entsprechende *housekeeping*-Protein auf dessen Lumineszenzintensität analysiert. Dies geschah entweder innerhalb desselben *blots*, oder auf einem Duplikat, je nach Unterschied der Molekülgröße zwischen zu untersuchendem und *housekeeping*-Protein. Als *housekeeping*-Proteine dienten β -Aktin oder GAPDH.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird in dieser Arbeit jeweils ein repräsentativer *blot* visuell abgebildet. Bei den dargestellten Graphen wurden die jeweiligen Pixeldichten der zu untersuchenden Proteine auf die der jeweiligen internen *housekeeping*-Proteine normalisiert. Anschließend wurden die Werte von unbehandelten A2780 Proben als 100 % gesetzt und alle Werte der restlichen Ansätze darauf normalisiert. Die jeweiligen Graphen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Lediglich bei der Quantifizierung von Glypikan-3 wurden abweichend Daten aus zwei unabhängigen Versuchen zur Auswertung herangezogen (n=2). Auf statistische Signifikanz wurde mittels *One Way ANOVA* mit nachgeschaltetem Tukey Test überprüft. Hierbei repräsentiert der Stern, bzw. Doppelstern einen p-Wert kleiner als 0,05 bzw. 0,01.

4.10 Zytotoxizitätsstudien von A2780/A2780cis und W1/W1CR Zellen

Um einen Einblick in die Viabilität der humanen Ovarialkarzinomzellen A2780/A2780cis sowie W1/W1CR in Abhängigkeit verschiedener Substanzen zu erhalten, wurden Zytotoxizitätsstudien durchgeführt.

4.10.1 Inkubationsversuche von A2780/A2780cis & W1/W1CR-Zellen

Hierzu wurde zunächst wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben vorgegangen und nach erfolgter Bestimmung der Zellzahl (Kapitel 4.6.4) wurden die jeweiligen Zellen in definierter Zellzahl/Well in Form von vertikal angeordneten Triplikaten in eine 96-Well Platte ausgesät und für mindestens 1 h vor Zugabe potentieller Testsubstanzen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine Adhärenz der Zellen zu gewährleisten. Die Zellzahl bei A2780/A2780cis Zellen betrug jeweils 20.000 und 40.000 Zellen/Well bzw. bei W1/W1CR 5.000 und 10.000 Zellen/Well. Hierbei diente die äußerste Reihe an Wells als Verdunstungsschutz, indem in diese jeweils 90 µL DPBS-Puffer pipettiert wurden. Eine detaillierte Anordnung der Plattenbelegung sowie eine Auflistung der getesteten Substanzen, die vor der Beimpfung mit der Cisplatin-Verdünnungsreihe in die entsprechenden Wells pipettiert wurden, ist in der Abbildung 16 bzw. Tabelle 13 dargestellt. Bei Experimenten mit Tinzaparin erfolgte die fünf- bzw. zehntägige Vorinkubation in Zellkulturflaschen. Zusätzlich wurden bei einigen der Platten die Wells vorher mit Kollagen beschichtet. Dies erfolgte aus einer Kollagen-Stammlösung zu einer finalen Konzentration von 10 µg/cm². Hierzu wurde nach einer einstündigen Inkubation unter Schütteln bei 37°C die Lösung abgesaugt und mit DPBS-Puffer gespült. Nachdem die

4. Material und Methoden

Trocknung für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgt war, wurden die Platten bis zur Verwendung unter Luftschutz bei 4°C gelagert.

Nach dem Aussäen der Zellen und einer Inkubation bis zum nächsten Tag bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte die Beimpfung der Wells mit jeweils 10 µL einer von links nach rechts steigenden Konzentration von Cisplatin bzw. FH535, wobei die erste vertikale Reihe mit jeweils 10 µL/Well DPBS-Puffer als Wachstumskontrolle diente. Die Endkonzentrationen von Cisplatin betragen 10^{-7,5}-10^{-3,5} mol/L bzw. für FH535 10^{-8,26}-10^{-4,26} mol/L. Das Endvolumen in jedem Well betrug 100 µL. Abhängig von der zusätzlichen Beimpfung mit einer weiteren Substanz ergaben sich vor der Zugabe der Verdünnungsreihe von Cisplatin bzw. FH535 unterschiedliche Volumina, die jedoch durch Zugabe des Lösungsmittels (DBPS-Puffer oder entsprechendes Nährmedium) der zu testenden Substanz in die anderen Platten ausgeglichen wurde. Anschließend wurden die Platten für 72 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

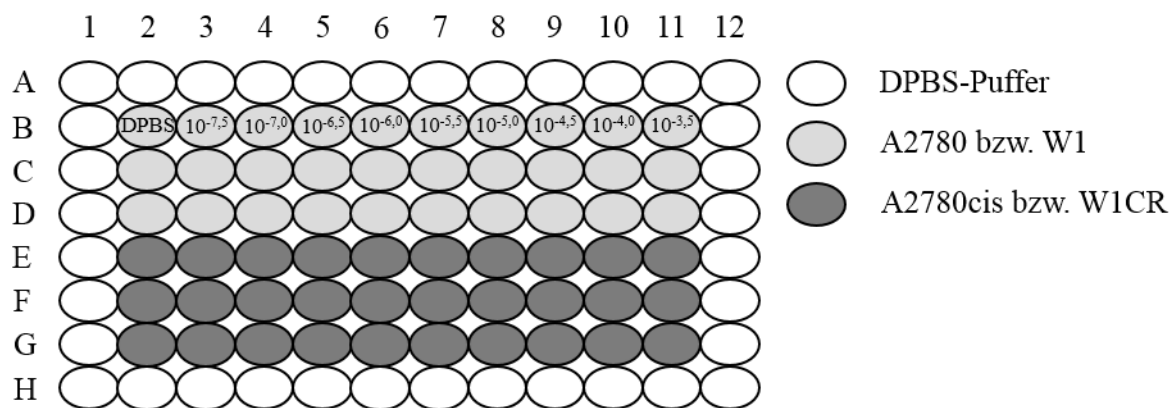


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Pipetierschemas zur Durchführung des MTT-assays in 96-Well Platten. Die abgebildeten Konzentrationen repräsentieren die Konzentrationen der Verdünnungsreihe von Cisplatin (10^{-7,5}-10^{-3,5} mol/L). Falls anstelle mit FH535 beimpft wurde, betragen die Konzentrationen 10^{-8,26}-10^{-4,26} mol/L. Die Zellzahl/Well betrug 20.000 bzw. 40.000 bei A2780 und A2780cis Zellen, sowie 5.000 bzw. 10.000 bei W1 und W1CR Zellen. Das finale Volumen/Well betrug 100 µL.

Tabelle 13: Informationen zu den im MTT-assay verwendeten Substanzen.

Substanz	Finale Konzentration der Substanz im Well	Zeit [h] vor der Zugabe von Cisplatin
5-Aminosalicylsäure	100 µmol/L	1,5
BEZ235 (Dactolisib)	100 nmol/L	1,5

Enoxaparin	50 µg/mL	24
FH535	0,5 µmol/L	1,5
Fondaparinux	50 µg/mL	24
Heparinase III (Heparitinase I)	10 mU/mL	22,5
RO-Heparin (G9694)	50 µg/mL	24
Roneparstat (SST0001)	5 µmol/L	5
	10 µmol/L	120
Tinzaparin	10 µg/mL	240
		120
	20 µg/mL	240
Unfraktioniertes Heparin	0,115 bzw. 0,950 I.E./100µL	24

4.10.2 MTT-*assay*

Die Zellviabilität von A2780/A2780cis sowie W1/W1CR Zellen unter Behandlung verschiedener Substanzen wurde mittels MTT-*assay* analysiert. Bei diesem kolorimetrischen *assay* wird das MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch lebende Zellen zu einem magenta-blauen Formazan Produkt reduziert (386). Aktuellen Erkenntnissen zufolge sind die hauptsächlichen Reaktionspartner hierbei die Pyridinnukleotid-Cofaktoren NADH und NADPH, während der früher angenommenen mitochondrialen Beteiligung, im Besonderen der Succinat-Dehydrogenase, eher eine untergeordnete Rolle zugesprochen wird (387,388). Da die hierbei entstandene Färbung, welche aus der Bildung der in DMSO löslichen Formazankristalle resultiert, proportional zur Anzahl lebender Zellen ist, kann durch photometrische Bestimmung die konzentrationsabhängige Zytotoxizität verschiedener Substanzen analysiert werden.

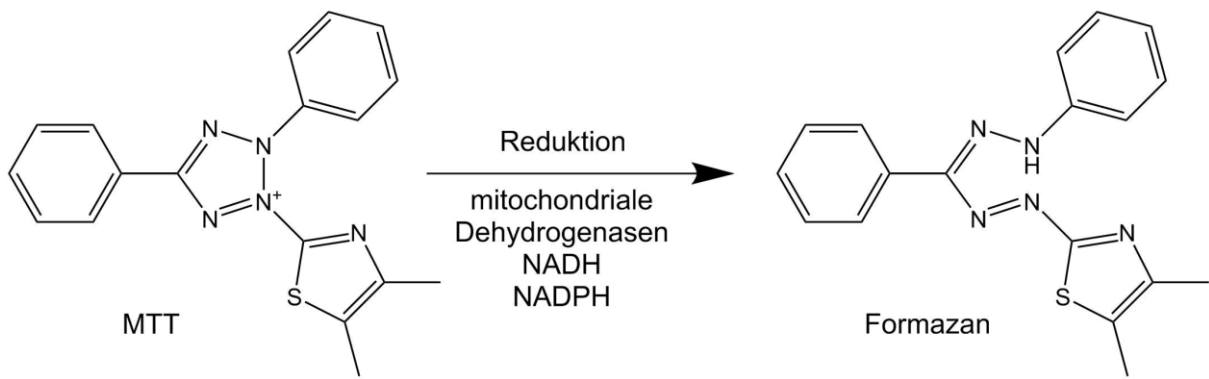


Abbildung 17: Reduktion des MTT zu Formazan durch den in lebenden Zellen vorhandenen mitochondrialen Dehydrogenasen, NADH und NADPH.

72 h nach der Zugabe der Verdünnungsreihe von Cisplatin bzw. FH535 wurden jeweils 20 μL des MTT-Reagenz zu jedem Well der Platten pipettiert und für 60 min bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend konnten die Platten auf Zellstoff ausgeschlagen und die Formazankristalle durch Zugabe von 200 μL DMSO/Well in Lösung gebracht werden. Abschließend erfolgte am Multiskan[®] EX die Homogenisierung durch Schütteln sowie die Messung der Absorption bei 590 nm. Um Hintergrundabsorptionen auszuklammern, wurde zudem bei 690 nm vermessen. Durch Bildung der Differenz erhielt man schließlich die korrigierten Werte.

4.10.3 Auswertung und Statistik

Die erhaltenen Daten aus den gemessenen Absorptionen wurden gegen den dekadischen Logarithmus der Cisplatin- bzw. FH535-Konzentration aufgetragen und anschließend auf den höchsten Wert im Datensatz normalisiert (=100 %). Durch nichtlineare Regression erfolgte eine Anpassung der Kurven als sog. *dose response* Kurven eines Inhibitors. Hieraus wurden die entsprechenden EC_{50} ermittelt. Der Wendepunkt der sigmoidal verlaufenden Kurve beschreibt jene Konzentration der eingesetzten Substanz, bei der 50 % der Zellen abgestorben sind.

Die Zytotoxizitätsstudien wurden in Triplikaten in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten (n=3) durchgeführt. Lediglich bei den Ansätzen, welche mit den transfizierten A2780/A2780cis Zellen zur Resistenzkontrolle durchgeführt wurden, sowie bei den Studien mit BEZ235 bei 20.000 Zellen/Well und bei Auswertungen der Versuche mit fünftägiger Tinzaparin-Vorinkubation, sowie bei den mit Enoxaparin durchgeführten Studien wurden abweichend Daten aus zwei unabhängigen Versuchen zur Auswertung herangezogen (n=2). Der Pilotversuch mit UFH (welcher einer Dosierung von etwa 4.200 I.E. entsprach) wurde

einmal durchgeführt (n=1). Aus Gründen der Übersicht wird in dieser Arbeit jeweils ein repräsentativer MTT-Graph des entsprechenden Experiments dargestellt.

Zur Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurde der pEC₅₀-Wert verwendet, welcher sich aus dem negativen dekadischen Logarithmus der EC₅₀ errechnet. Abschließend erfolgte die erneute Umrechnung der statistisch betrachteten Werte in gemittelte EC₅₀.

Um die Werte innerhalb des entsprechenden Zellpärchens unter Anbetracht der Chemoresistenz vergleichen zu können, wurde ein sog. Resistenzfaktor ermittelt. Dieser ergibt sich aus dem Quotienten der jeweiligen EC₅₀ von cisplatinresistenten A2780cis/W1CR Zellen und den nicht-resistenten A2780/W1 Zellen. Als Resultat spiegelt dieser Faktor die erhöhte Toleranz der resistenten Zelle gegenüber der exponierten Substanz in Kontrast zur entsprechenden nicht-resistenten Zelle wider.

4.11 Durchflusszytometrie

In dieser Arbeit wurden mithilfe der Durchflusszytometrie die Proteoglykane Glypikan-3 und -4, sowie Syndekan-1 und -4 hinsichtlich ihrer quantitativen Verteilung auf den Zelloberflächen von A2780 und A2780cis Zellen untersucht. Außerdem auch inwiefern Tinzaparin einen Einfluss auf die Regulierung der Expression oben genannter Proteoglykane besitzt. Bei der angewendeten Durchflusszytometrie wird aus einer Zellsuspension eine Serie feinsten Tröpfchen erzeugt, die beim Durchtritt durch die Messeinheit einen Laserstrahl passieren, sodass hierbei vereinzelte Zellen und Zellpopulationen detektiert werden können. Durch Markierung von Zelloberflächenproteinen durch fluoreszenzmarkierte Antikörper kann beim Durchtritt der Zelle durch die Messeinheit eine quantitative Aussage über die Präsenz von entsprechenden Oberflächenproteinen getroffen werden, da die gemessene Fluoreszenzintensität proportional zum Anteil gebundener Antikörper am zu untersuchenden Oberflächenprotein ist (381).

4.11.1 Inkubationsansätze

Hierbei wurde zunächst wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben verfahren und nach erfolgter Zentrifugation in 2 mL Waschpuffer resuspendiert und bei 2020 rpm für 2 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend erfolgte die Zellzählung (Kapitel 4.6.4) und ein Resuspendieren in 2 %iger BSA-Lösung zu einer Konzentration von 1 Millionen Zellen/98 bzw. 180 µL und eine Aufteilung zu Triplikaten in 1,5 mL Reagiergefäße für jeden Ansatz (Tabelle 14). Es folgte eine Zugabe der entsprechenden primären Antikörper in

entsprechender Verdünnung (Tabelle 5) und eine 45-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und Lichtschutz. Nach zwei erneuten Waschschritten und Zentrifugation bei 2020 rpm für 5 min wurden die Zellpellets in 100 μ L Waschpuffer resuspendiert. Dem schloss sich die Zugabe des sekundären Antikörpers mit einer Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz für weitere 30 min an. Erneut folgten zwei Waschschrritte mit einer sich anschließenden Aufnahme der Zellpellets in je 150 μ L Waschpuffer. Abschließend konnten die finalen Volumina der Proben in eine 96-Well Platte pipettiert und am Durchflusszytometer gemessen werden.

Tabelle 14: Informationen zu den Inkubationsansätzen zur Analyse von Proteoglykanen von A2780 und A2780cis Zellen.

A2780	A2780cis
Unbehandelt	
Tinzaparin-Vorinkubation (24 h)	

4.11.2 Auswertung und Statistik

Die Experimente wurden in Form von Triplikaten angesetzt. Auf Grund der Übersichtlichkeit ist in dieser Arbeit jeweils ein repräsentativer Graph dargestellt.

4.12 Durchführung der *in vivo* Experimente & Quantifizierung des Platin- und Tinzaparingehaltes in A2780 bzw. A2780cis Xenograft-Modellen

Um einen Einfluss des Cisplatin und des Tinzaparin, sowie einer Kombination beider Substanzen auf das Tumorwachstum unter *in vivo* Bedingungen zu untersuchen, wurden Xenograft-Modelle in athymischen Nacktmäusen generiert. Hierbei wurden jeweils acht Millionen Zellen der A2780 bzw. A2780cis Zelllinie subkutan in die Flanke der Maus injiziert. Nachdem diese Tumore in den Mäusen etabliert waren, erfolgte eine Aufteilung der Mäuse in vier Gruppen unter dem Kriterium eines gleichen durchschnittlichen Tumolvolumens und einer gleichen Verteilung der Tumorumina zwischen den Gruppen. Sämtliche *in vivo* Experimente und histologischen Analysen wurden im Zuge einer Kooperation unter der Leitung von Herrn Dr. Thomas Mueller am Universitätsklinikum Halle (Saale) durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der experimentellen Durchführungen ist in Mueller et al. beschrieben (389).

4.12.1 Behandlungsschemata der Mäuse

Die Gabe von Tinzaparin erfolgte täglich intraperitoneal in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht. Cisplatin wurde einmal wöchentlich intraperitoneal verabreicht, wobei die Dosis 6 mg/kg Körpergewicht betrug. Die Kontrollgruppe erhielt Natriumchlorid. Das jeweilige Versuchsende variierte und war abhängig von der jeweiligen maximalen akzeptablen Tumorgröße.

4.12.2 Quantitative Bestimmung von Platin

Für die Analyse des intratumoral akkumulierten Platins in den unterschiedlich behandelten Tumoren wurden diese nach den angegebenen Zeitpunkten aus den Mäusen entfernt und gefroren. Die Proben wurden anschließend an das pharmazeutische Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn versendet und erneut bei -80°C gelagert. Zum Zeitpunkt der Messung wurden die Tumorproben aufgetaut und gewogen. Nachdem die Tumore mittels eines Skalpellts zerkleinert und in 50 mL Röhrchen überführt wurden, erfolgte die Lyse des Gewebes durch Zusatz von 10 mL Salpetersäure 65 % Suprapur[®] für 60 min bei 80°C auf dem Wasserbad. Die so entstandenen klaren Lösungen wurden anschließend wie in Kapitel 4.7 beschrieben mittels Graphitofen-Atomabsorptionsspektroskopie auf deren Platingehalt untersucht.

4.12.3 Auswertung und Statistik

Das Tumorwachstum in den Nacktmäusen unter dem Einfluss der verschiedenen Behandlungsmethoden wurde wie in Mueller et al. beschrieben überwacht und berechnet (389). Die gemessenen Konzentrationen des Platins wurden auf das jeweilige Gewicht des Maustumors normalisiert. Die daraus erhaltenen Werte von in Kombination mit Tinzaparin behandelten Tumoren wurden anschließend auf die ausschließlich mit Cisplatin behandelten Tumore normalisiert, welche als 100 % gesetzt worden sind.

4.12.4 Quantifizierung des Tinzaparingehaltes in Tumoren von Xenograft-Nacktmäusen

Um Aussagen über eine potentielle Akkumulierung von Tinzaparin in den Tumoren der Nacktmäuse treffen zu können, wurden Experimente mit Heparin-Red[®] Ultra durchgeführt. Heparin-Red[®] Ultra beinhaltet einen Polyamid-modifizierten Perylen-diimid-Fluorophor (Abbildung 18). Dieser polykationische Fluorophor ist in der Lage, Aggregate mit polyanionischen Glykosaminoglykanen auszubilden, was letztlich eine Fluoreszenzlöschung

zur Folge hat (390). Da diese Löschung der Eigenfluoreszenz in einem Konzentrationsbereich (0-7 $\mu\text{g/mL}$) proportional zur Menge des entsprechenden Heparins ist, kann über die Erstellung einer Kalibriergeraden eine quantitative Aussage getroffen werden (391). Diese Methode der Quantifizierung von unfraktioniertem Heparin mithilfe des Heparin Red[®] Ultra Kits konnte bisher in humanem Plasma und Urin angewendet werden (391).

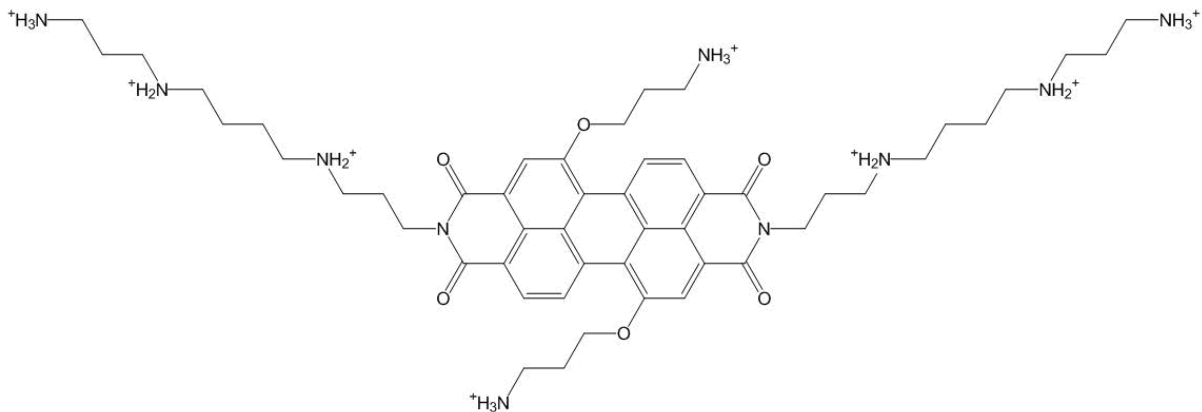


Abbildung 18: Struktur des Fluorophors Heparin-Red[®].

Zur Analyse wurde jeweils ein unbehandelter und ein mit Tinzaparin behandelter A2780cis Xenograft-Tumor der beschriebenen Nacktmäuse analysiert. Hierzu wurden die Tumore ausgefroren, gewogen, mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend auf jeweils fünf Reagiergefäße (1,5 mL) aufgeteilt. Nach Zugabe von 500 μL Aqua millipore in jedes Reagiergefäß wurde mithilfe des TissueLyser LT zweimal für 10 min bei 50 [1/s] das Gewebe weiter zerkleinert und homogenisiert. Nach sich anfügender Vereinigung der Volumina innerhalb einer Probe in ein großes Reagiergefäß (5 mL) erfolgte die Zugabe einer Protease in einer Konzentration von 2 mg/mL mit einer anschließenden Inkubation über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 . Dieser Schritt wurde angefügt, da gezeigt werden konnte, dass das Protein Albumin eine Maskierung des durch Heparin induzierten Effektes hinsichtlich der Fluoreszenzlöschung bewirkt (391). Am nächsten Tag wurde das Volumen auf mehrere Reagiergefäße aufgeteilt und die Volumina der Lysate durch Anschluss an die Vakuum-Konzentrations-Zentrifuge bei Reduzierung auf Minimaldruck eingengt. Abschließend wurden die entsprechenden Volumina der entsprechenden Proben vereint, das Gesamtvolumen bestimmt und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Zur Quantifizierung des Tinzaparins im Xenograft-Tumor wurden anschließend zwei Kalibriergeraden im Bereich von 0-10 $\mu\text{g/mL}$ erstellt. Bei der ersten erfolgte die Verdünnung des Tinzaparins in Aqua millipore, bei der zweiten in Lysat des unbehandelten Xenograft-Tumors. Dies hat den Hintergrund, dass

mögliche Interferenzen aufgrund des Gewebelysates selbst, evtl. aufgrund hoher Proteinkonzentrationen, ersichtlich werden und somit eine potentielle fehlerbehaftete Aussage bei der tatsächlichen Messung des mit Tinzaparin behandelten Xenograft-Tumors ausgeschlossen werden kann. Anschließend wurde das Lysat des mit Tinzaparin behandelten Tumors mit Aqua millipore 1:2, 1:5 und 1:10 verdünnt. Zusätzlich wurde eine Verdünnung mit Tinzaparin versetzt zu einer finalen Konzentration von 5 µg/mL. Dies diente als Kontrolle, da hierdurch im Vergleich mit der Kalibrierung überprüft werden konnte, ob generell ein gewisser Anteil Tinzaparin im Gewebe akkumuliert. Abschließend wurden jeweils 5 µL der Proben sowie der Kalibrierungen in eine schwarze 96-Well Platte pipettiert (Abbildung 19) und mit 180 µL Heparin Red[®] Ultra/Well versetzt. Es folgte eine unmittelbare Homogenisierung und Detektion am Fluostar Optima bei einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 544 bzw. 620 nm.

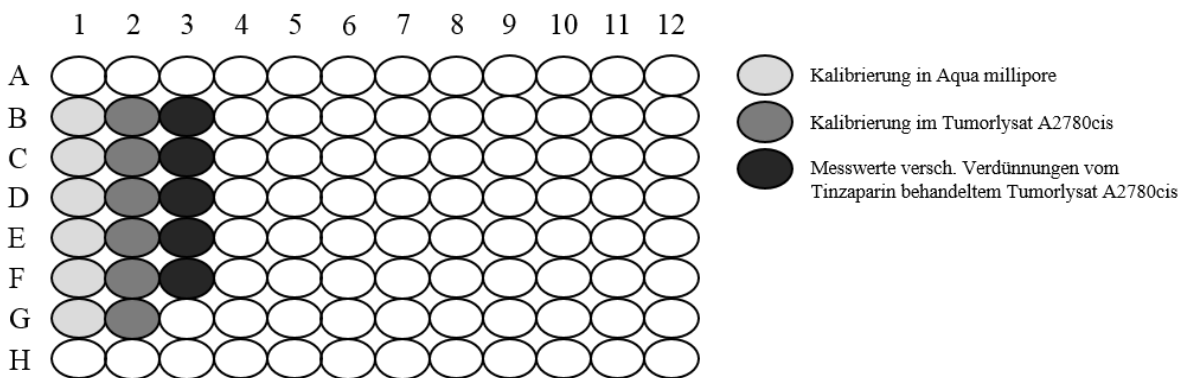


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Pipettierschemas bei der Quantifizierung von Tinzaparin in einer 96-Well Platte mit einem Endvolumen von 185 µL/Well.

4.12.5 Auswertung und Statistik

Die Fluoreszenzwerte wurden über einen Zeitraum von 15 s bei einem Intervall von einer Messung/Sekunde detektiert. Bei der Auswertung wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten jeder einzelnen Messung berechnet.

4.13 Genanalyse der A2780cis Zellen unter Einfluss einer Tinzaparinbehandlung

4.13.1 Inkubationsansätze

Die A2780cis Zellen wurden wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben kultiviert und nach Überführung in neue Zellkulturflaschen erfolgte eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ für 1 h. Während eine Flasche unbehandelt blieb, wurde eine weitere Flasche mit 50 µg/mL Tinzaparin beimpft, sodass sich insgesamt zwei experimentelle Ansätze ergaben. 24 h nach der Tinzaparinzugabe erfolgte die Isolierung der RNA.

4.13.2 RNA-Isolierung

Wie bereits in der Dissertation von Herrn Dr. Daniel Stölting beschrieben, erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA der jeweiligen Zellen mithilfe des RNeasy® Plus Mini Kits. Hierbei wurde nach Anweisungen des Handbuchs verfahren (392). Nach beendeter Inkubationszeit wurden die Zellen kultiviert und gezählt (Kapitel 4.6.2 und 4.6.4). Die ermittelten Zellzahlen lagen in einem Bereich von 5×10^6 bis 1×10^7 . Gemäß Protokoll wurden die Puffervolumina angepasst und es erfolgte eine Lyse der zentrifugierten Zellen. Anschließend wurde genomische DNA durch Zentrifugation in einer gDNA-*eliminator*-Säule abgeschieden. Nach Zugabe von gleichen Volumina Ethanol (70 %) erfolgte die Überführung in eine RNeasy® Mini-Säule und es wurde mehrfach zentrifugiert. Hierdurch konnten restliche zelluläre Bestandteile entfernt werden. Im letzten Schritt wurde die RNA mithilfe von RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.13.3 Gene array

Die wie im Kapitel zuvor beschrieben erhaltenen RNA-Proben wurden an unseren Kooperationspartner im Institut für Humangenetik der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf gesendet. Die dortige Analyse der Gendaten wurde unter Leitung von Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer durchgeführt. Zusammengefasst wurden für die jeweiligen Analysen 500 ng der RNA-Proben amplifiziert und mit CY-3-CTP markiert. Mittels Nanodrop Photometer konnte die erforderliche Einschussrate gemessen werden (≥ 8 pmol/µg cRNA). Anschließend wurden jeweils 825 ng der cRNAs auf Agilent 44k *whole genome microarray* Platten hybridisiert und mithilfe eines Agilent Microarray Scanners vermessen. Die Gewinnung der

Rohdaten erfolgte mithilfe der Agilent *feature extraction* Software. Die Bearbeitung der Rohdaten ist in Royer-Pokora et al. (393) beschrieben.

4.13.4 Auswertung und Statistik

Zur Identifizierung biologischer Prozesse, welche mit den entsprechenden Genexpressionsprofilen assoziiert sind, wurde die Software MetaCore™ genutzt. Dabei wurden lediglich Rohdaten analysiert, welche mindestens eine Fluoreszenzintensität >300 und eine Expressionsrate >2 aufwiesen. Der Array der unbehandelten A2780cis Zellen wurde dabei *in silico* mit dem Array der 24 h Tinzaparin präinkubierten A2780cis Zellen verglichen. Zur Analyse der durch Tinzaparin beeinflussten Gene spezieller funktioneller Gruppen wurde zusätzlich die Java Applikation *Advanced Search* verwendet.

Die Auswertung, Statistik sowie die Durchführung *des gene arrays* wurde von Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer durchgeführt.

4.14 Transfektion & Analyse der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren des Wnt-Signalwegs in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Um einen funktionalen Einblick in die Wnt-Signalaktivität auf Transkriptionsebene zu erhalten, wurde ein geeigneter Vektor in die Genome der A2780 und A2780cis Zellen durch Transfektion eingebracht und anschließend durch sog. Luciferase Reporter-*assays* analysiert. Die Grundlage dieser Methodik beruht auf der Messung der Aktivität eines Reporterenzym. Da das hierfür verantwortliche Reporter gen direkt dem zu untersuchenden Promotor auf dem verwendeten Vektor nachgeschaltet ist, kann durch Determinierung der Aktivität dieses Enzyms rückwirkend eine Aussage über die Aktivität des Wnt-Signalweges auf Transkriptionsebene getroffen werden (394). In dem hierfür verwendeten Vektor sind acht Kopien eines TCF-LEF *response elements* mit einem *minimal promoter* integriert. Kommt es nun zur Bindung eines Transkriptionsfaktors des Wnt-Signalweges an jenen Promotor, erfolgt die Transkription des nachgeschalteten luc2P (*Photinus pyralis*) Reporter gens. Dieses Gen kodiert die Luciferase, welche letztendlich durch Zugabe von 5'-Fluoroluciferin, ATP, Magnesium und Sauerstoff Biolumineszenz erzeugt, die photometrisch am Luminometer quantifiziert werden kann (Abbildung 20). Zudem ist ein weiteres Gen integriert, wodurch die erfolgreich transfizierte Zelle eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin erlangt. Dies ermöglicht eine

gezielte Selektion der Zellen, sodass eine stabil transfizierte Zelllinie generiert werden kann (395,396).



Abbildung 20: Darstellung der durch die Firefly Luciferase katalysierten Monoxygenierung von 5'-Fluoroluciferin zu Oxyfluoroluciferin unter Emission von Licht. Mit freundlicher Genehmigung der Promega Corp./Courtesy of Promega Corp (396).

Für die Transfektion wurde nach der Vorschrift für nicht optimierte Zellen von Promega verfahren. Die A2780 und A2780cis Zellen wurden zunächst wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben kultiviert, gezählt (Kapitel 4.6.4) und anschließend in einer Konzentration von 50.000 (A2780) bzw. 100.000 (A2780cis) Zellen pro 1 mL Medium in eine 24-Well Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag lag die Konfluenz der beiden Zelllinien bei ca. 50 %, was die Voraussetzung für eine anschließende Zugabe von jeweils 25 µL des Transfektionsreagenzes (FuGENE[®] HD:DNA Verhältnis 4:1) sowie eine 24-stündige Inkubation im Inkubator darstellte. Nach erneutem Wechsel zu frischem Medium wurden die Zellen weitere 24 h später durch Hygromycinzusatz (100 µg/mL) zum Medium selektiert. Mit zunehmender Vermehrung wurden sie zunächst in einer 6-Well Platte und anschließend in Zellkulturflaschen kultiviert. Sobald eine ausreichend hohe Zellzahl vorhanden war, erfolgte die dauerhafte Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff und wurden bei Bedarf für entsprechende Versuche erneut in Kultur genommen.

4.14.1 Aussäen der Zellen & Messung der Biolumineszenz

Hierzu wurden die A2780 und A2780cis Zellen wie bereits beschrieben kultiviert, gezählt (Kapitel 4.6.2 und 4.6.4) und in einer Anzahl von 40.000 Zellen in 80 µL Medium/Well in einer weißen 96-Well Platte ausgesät. Es wurde jeder unterschiedliche Behandlungsansatz in Form von Duplikaten ausgesät. 1 h später erfolgte die Zugabe von 10 µL einer Tinzaparinlösung in die dafür vorgesehenen Wells (Abbildung 21), sodass die finale Konzentration im Well 50 µg/mL betrug. Die Volumina der restlichen Wells wurden durch Zugabe von DPBS-Puffer angeglichen. 24 h später wurden die Zellen mit jeweils 10 µL einer Cisplatinlösung beimpft, sodass eine Konzentration von 2 µmol/L im Well erreicht wurde. Erneut wurden die Volumina der restlichen Wells durch DPBS-Puffer angeglichen, sodass ein finales Volumen von 100 µL/Well vorlag. Nach 72-stündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte die Entnahme

der Platte aus dem Inkubator und der Zusatz von 100 μL ONE-GloTM-Lösung zu den dafür vorgesehenen Wells. 5 min später wurde die Biolumineszenz der Wells am Luminometer detektiert.

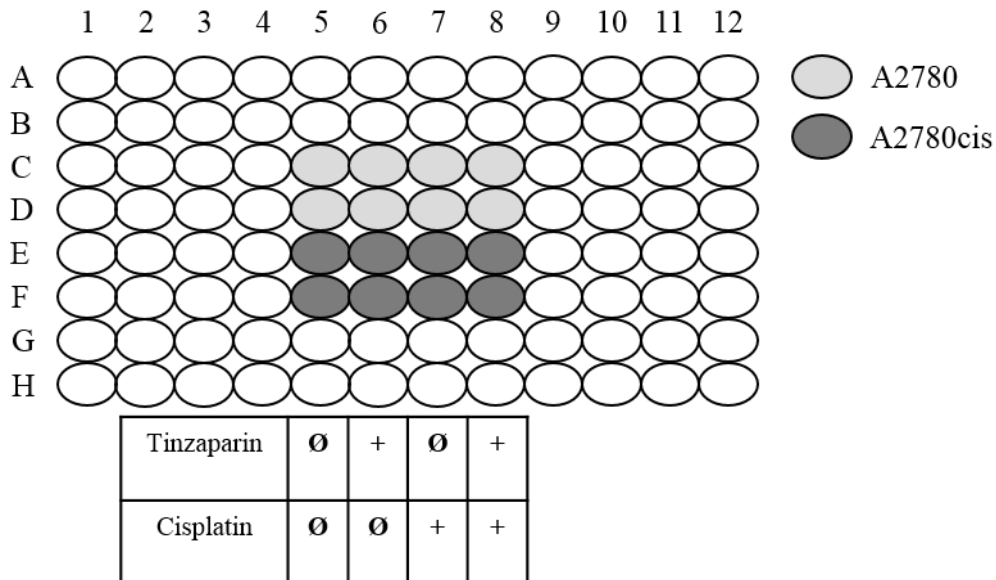


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Pipettierschemas bei der Bestimmung der *Wnt-pathway*-Aktivität in einer weißen 96-Well Platte mit einem Endvolumen nach dem Aussäen der Zellen von 100 μL /Well.

4.14.2 Proteinbestimmung

Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, erfolgte die Messung der Lumineszenz an den Proben der jeweiligen Duplikate der entsprechenden Ansätze.

Die zweite Probe des Duplikats diente zudem als Referenz zur Proteinbestimmung, um eine geeignete Bezugsgröße zum Vergleich des Lumineszenzsignals unterschiedlicher Behandlungsmethoden untereinander zu ermitteln (Angabe als Lumineszenz/Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]). Hier wurde nach 72 h Inkubation zunächst das Medium entfernt und durch 100 μL DPBS-Puffer ersetzt. Dies minimierte den potentiellen Effekt eines versuchsunabhängigen Proteinanteils im Medium. Anschließend erfolgte parallel auch hier die Zugabe von 100 μL ONE-GloTM-Lösung.

Zur Proteinbestimmung wurden gleiche Volumina der Lysate der jeweiligen Wells entnommen und mit DPBS-Puffer verdünnt (1:10, 1:50 und 1:100). Anschließend wurden Duplikate mit einem Volumen von 20 μL der entsprechenden Verdünnungen, der Kalibrierkonzentrationen sowie der Qualitätskontrollen in eine neue, durchsichtige 96-Well Platte pipettiert. Für die weitere Vorgehensweise wurde wie in Kapitel 4.8.1 verfahren.

4.14.3 Auswertung und Statistik

Die gemessenen Biolumineszenzwerte der Proben wurden auf die jeweilige Proteinkonzentration des einen Duplikats normalisiert, um unterschiedliche Geschwindigkeiten der Proteinbiosynthese, bzw. mögliche unterschiedliche Zellzahlen aufgrund leicht schwankender Zellwachstumsraten, auszugleichen. Die erhaltenen Werte eines unabhängigen Versuches wurden auf eine Wachstumskontrolle unbehandelter A2780 Zellen normalisiert, die zusätzlich auf jede Platte aufgebracht wurde (=100 %). Der dargestellte Graph repräsentiert Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Auf statistische Signifikanz wurde mittels *One Way* ANOVA mit nachgeschaltetem Tukey Test überprüft. Hierbei repräsentiert der Stern, bzw. Doppelstern einen p-Wert kleiner als 0,05 bzw. 0,01.

5. Ergebnisse & Diskussion

5.1 Auswirkungen auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit der Dosis und Inkubationszeit des niedermolekularen Heparins Tinzaparin.

Vorangegangene Untersuchungen von Dr. Daniel Philipp Stölting (9) konnten dem niedermolekularen Heparin Tinzaparin eine chemosensitivierende Wirkung bei cisplatinresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen attestieren. Für diesen Effekt war eine Vorinkubation (18-24 h) der Zellen mit einer Konzentration des Tinzaparins von 50 µg/mL nötig, bevor sich eine Behandlung mit Cisplatin für 72 h anfügte. Aus den Ergebnissen ließ sich schließen, dass der sensitivierende Effekt sowohl von der Dosis als auch von der Inkubationsdauer des Heparins abhängt. Aufgrund der Größe sowie des polyanionischen Charakters des Antikoagulans wurde eine potentielle Interaktion von Tinzaparin mit extrazellulären Bestandteilen der resistenten Zelle als mögliche Initiation intrazellulärer Signalkaskaden postuliert, welche letztlich die Zytotoxizität des Zytostatikums erhöht. Die Tatsache, dass eine Tinzaparin-Vorinkubation mit keiner gesteigerten intrazellulären Akkumulation des Cisplatins einherging, bekräftigt diese Theorie (10).

5. Ergebnisse & Diskussion

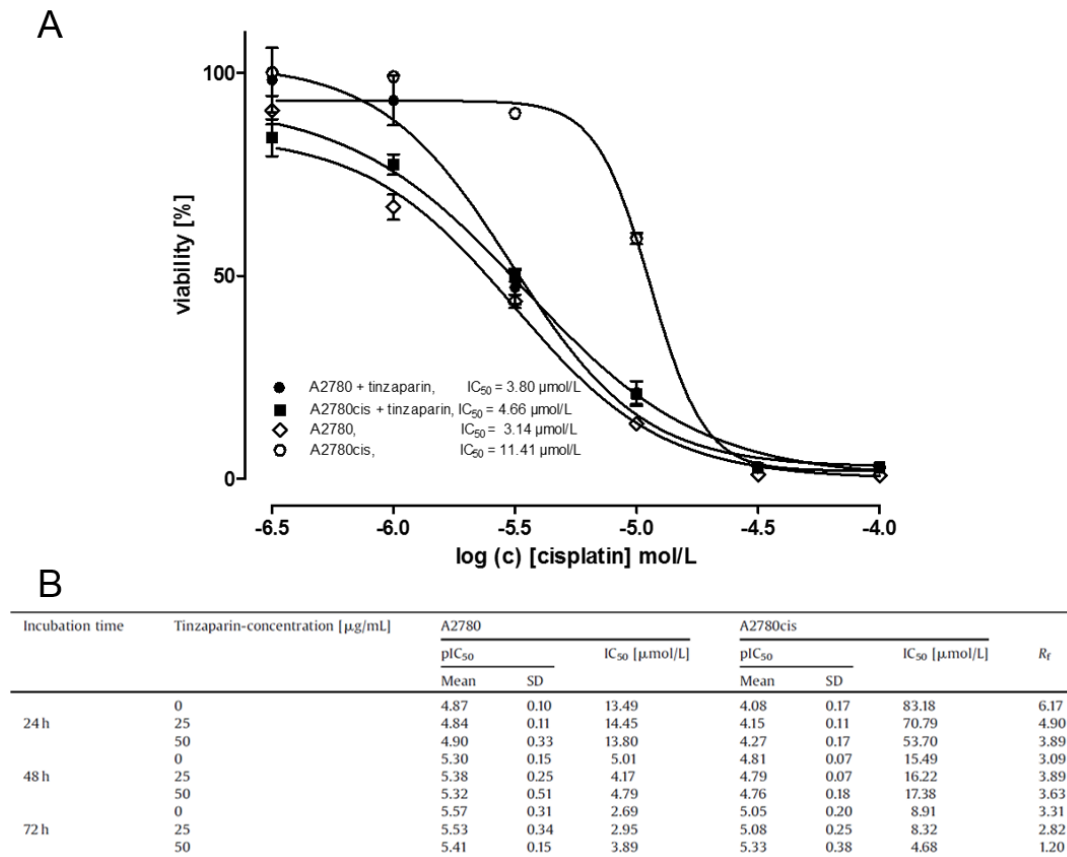


Abbildung 22: (A) Zytotoxizität von Cisplatin allein und nach Vorinkubation mit 50 $\mu\text{g/mL}$ Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 40.000 Zellen. (B) Zusammenfassung der Zytotoxizität von Cisplatin allein oder mit einer Vorinkubation (24 h) von 25 bzw. 50 $\mu\text{g/mL}$ Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 24, 48 und 72 h Inkubationszeit mit 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren. Die Abbildungen wurden zum Zweck der Übersicht aus der gemeinsamen Veröffentlichung mit Dr. Daniel Philipp Stölting entnommen, welche zugleich Bestandteil seiner Dissertation sind (10).

Die beschriebenen Befunde zusammen mit weiteren Erkenntnissen, welche im Laufe dieser Arbeit erwähnt werden, dienen als Ausgangspunkt für die hier angefertigte Dissertation. Zunächst galt es zu evaluieren, ob eine reduzierte Dosis des Heparins durch Modulation der Inkubationszeit einen ähnlich chemosensitivierenden Effekt auszulösen vermag. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Konzentrationen (10 bzw. 20 $\mu\text{g/mL}$) des Tinzaparins und zwei Inkubationszeiträume (fünf bzw. zehn Tage Vorinkubation) vor der Zugabe des Zytostatikums gewählt, um einen umfassenden Einblick in potentielle Effekte zu erhalten. Für sämtliche folgenden Toxizitätsstudien wurde durch regelmäßige alleinige Behandlung mit Cisplatin gewährleistet bzw. überprüft, dass die A2780cis Zellen eine ausreichende Chemoresistenz aufweisen, um eine direkte Vergleichbarkeit zu ermöglichen und potentielle Einflüsse auf diese zu untersuchen.

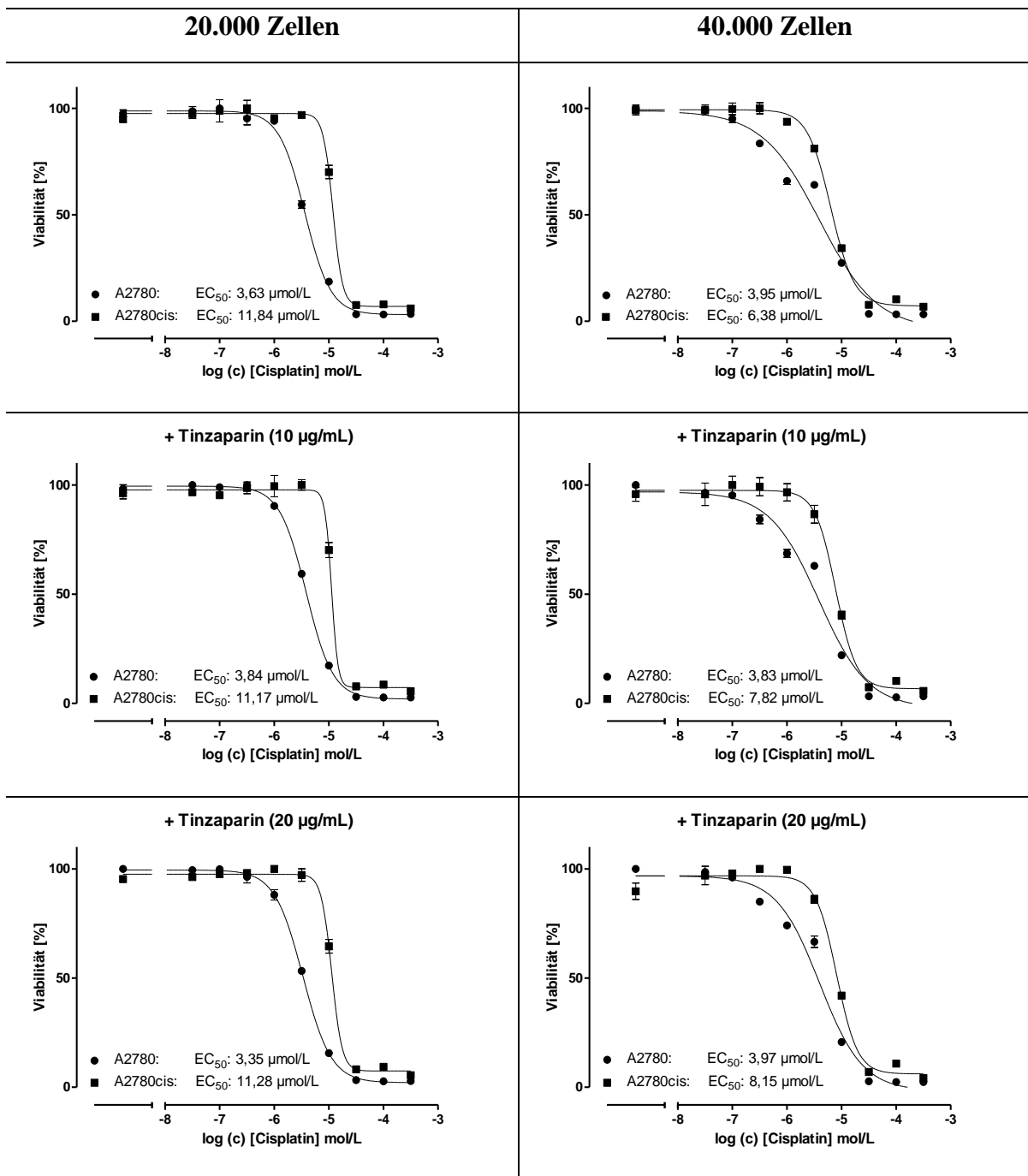


Abbildung 23: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer fünftägigen Vorinkubation von 10 bzw. 20 $\mu\text{g/mL}$ Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

5. Ergebnisse & Diskussion

Tinzaparin-Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Tage]	Inkubationsansatz	Zellzahl/Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	20.000	5,38	0,08	4,16	4,78	0,21	16,77	4,0
		40.000	5,34	0,09	4,57	5,02	0,24	9,50	2,1
5	Cisplatin + 10 µg/mL Tinzaparin	20.000	5,36	0,09	4,41	4,79	0,22	16,08	3,6
		40.000	5,30	0,16	4,99	5,00	0,14	9,89	2,0
	Cisplatin + 20 µg/mL Tinzaparin	20.000	5,31	0,23	4,86	4,75	0,28	17,91	3,7
		40.000	5,32	0,12	4,83	4,88	0,30	13,28	2,7

Tabelle 15: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer fünftägigen Vorinkubation von 10 bzw. 20 µg/mL Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=2).

Zunächst zeigte die alleinige Behandlung mit Cisplatin einen deutlichen Unterschied der zusammengefassten EC₅₀-Werte beider Zelllinien, welche sich folglich in den Resistenzfaktoren der gewählten Zellzahlen wiederfinden (Rf= 4,0 bzw. 2,1) und somit das Zellsystem allgemein zur Charakterisierung einer Chemoresistenz bestätigte. Eine vorangegangene Inkubation mit dem niedermolekularen Heparin Tinzaparin für fünf Tage erzielte bei beiden Zellzahlen nahezu keine Veränderung der EC₅₀-Werte der resistenten A2780cis Zellen im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit dem Zytostatikum (bspw. 9,50 vs. 9,89 vs. 13,28 µmol/L; 40.000 Zellen). Die Reduktion der Resistenzfaktoren bei 20.000 Zellen mit einer Heparin-Vorinkubation ist vornehmlich der Tatsache geschuldet, dass die EC₅₀-Werte der untersuchten A2780 Zellen leicht zunahm und somit eine partielle Sensitivierung vortäuschen. Die Ursache für die Reduktion der Cisplatin induzierten Toxizität bei einer Vorinkubation mit 20 µg/mL Tinzaparin (9,50 vs. 13,28 µmol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen) ist hierbei unerwartet und bleibt offen, unterstreicht jedoch die Annahme, dass eine reduzierte Dosierung des Heparins bei gewählter Inkubationszeit keine chemosensitivierende Wirkung vermitteln kann. Aufgrund dessen wurde die potentielle Interaktionszeit zwischen Heparin und den Ovarialkarzinomzellen auf einen Zeitraum von zehn Tagen verdoppelt, um weitere Aussagen treffen zu können.

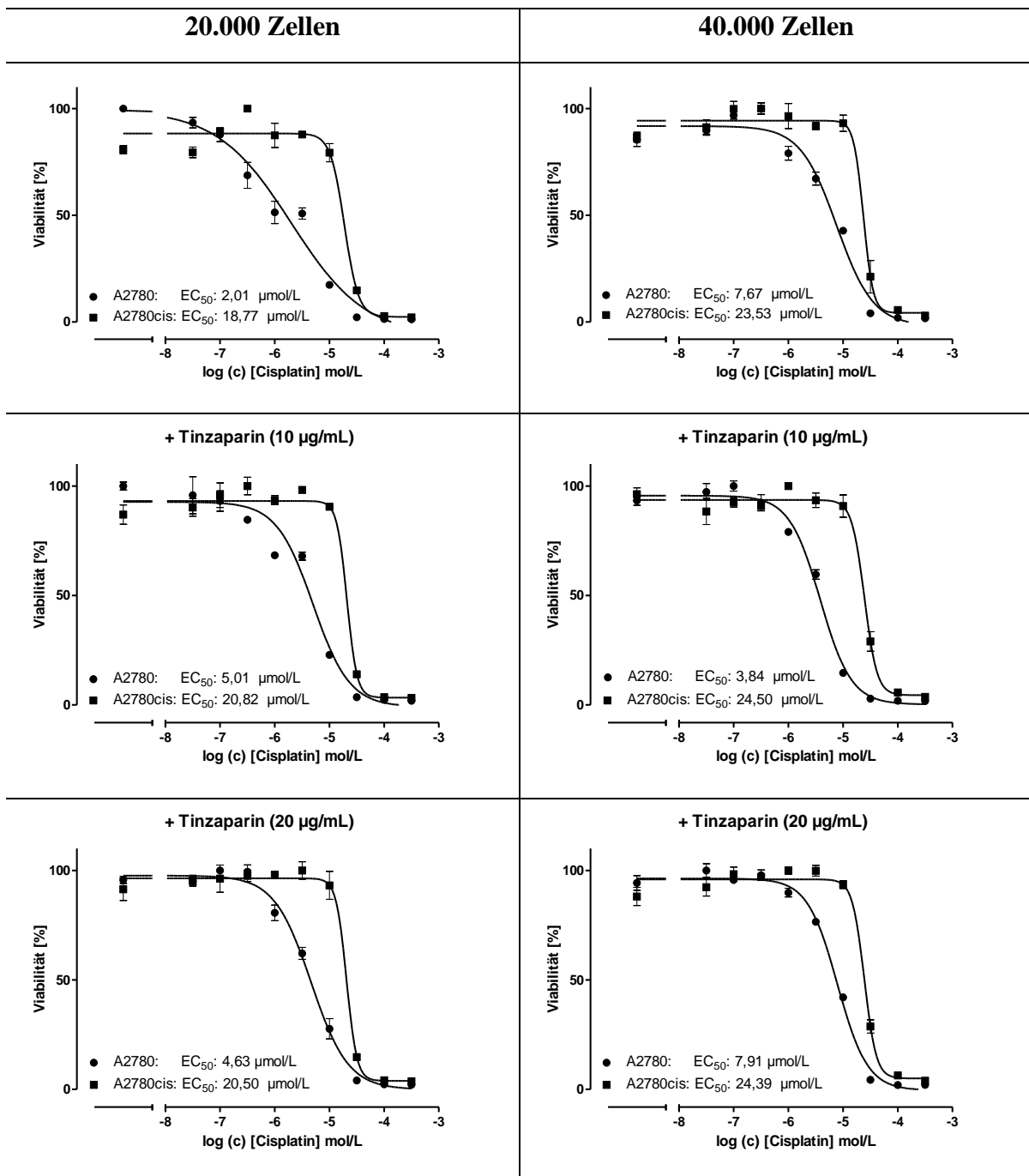


Abbildung 24: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer zehntägigen Vorinkubation von 10 bzw. 20 $\mu\text{g/mL}$ Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

5. Ergebnisse & Diskussion

Tinzaparin-Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Tage]	Inkubationsansatz	Zellzahl/Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	20.000	5,47	0,21	3,41	4,99	0,24	10,24	3,0
		40.000	5,32	0,17	4,82	5,10	0,42	7,90	1,6
10	Cisplatin + 10 µg/mL Tinzaparin	20.000	5,33	0,03	4,63	4,97	0,26	10,60	2,3
		40.000	5,35	0,06	4,47	5,15	0,47	7,01	1,6
	Cisplatin + 20 µg/mL Tinzaparin	20.000	5,34	0,03	4,54	4,93	0,21	11,88	2,6
		40.000	5,24	0,12	5,74	5,11	0,44	7,75	1,4

Tabelle 16: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer zehntägigen Vorinkubation von 10 bzw. 20 µg/mL Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).

Eine Verdopplung der Inkubationszeit des Heparins führte zu vergleichbaren Resultaten einer fünftägigen Vorinkubation. Überraschenderweise gingen partiell beide Dosierungen des Antikoagulans mit einer leichten Steigerung der EC₅₀-Werte der zwei Zelllinien einher (bspw. 10,24 vs. 10,60 vs. 11,88 µmol/L bei A2780cis; 20.000 Zellen), was zusammen mit der Tatsache, dass jene Steigerung in nicht-resistenten A2780 Zellen deutlicher ausgeprägt war, die Aussagekraft der Resistenzfaktoren erneut in den Hintergrund treten lässt. Die erhobenen Daten lassen zusammenfassend darauf schließen, dass der chemosensitivierende Effekt des niedermolekularen Heparins vornehmlich der gewählten Dosierung zuzuschreiben ist und unabhängig von der gewählten Vorinkubationszeit zu sein scheint. Demnach ist ein Inkubationszeitraum von 18-24 h, welcher in vorangegangenen Untersuchungen von Dr. Daniel Philipp Stöltzing determiniert wurde ausreichend, damit eine vorausgesetzte Mindestdosis an Tinzaparin den sensitivierenden Effekt vermitteln kann.

5.2 Einfluss weiterer Heparinderivate auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Aufgrund der Tatsache, dass eine Vielzahl verschiedener Heparinderivate in der antithrombotischen Therapie Anwendung finden, zielten die folgenden Toxizitätsstudien durch Einsatz mehrerer Heparine unterschiedlicher Struktur darauf ab, Einblicke in potentielle Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erhalten. Um die folgenden Ergebnisse mit den Tinzaparin Daten von Herrn Dr. Daniel Philipp Stöltzing vergleichen zu können, wurde die gleiche experimentelle Vorgehensweise inkl. des Zeitraums der Vorinkubation gewählt.

5.2.1 Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Zunächst wurde UFH untersucht, da es sich u.a. aufgrund seiner Molekularmasse deutlich von dem niedermolekularen Tinzaparin unterscheidet (237) und eine erste Eingrenzung der Abhängigkeit des Effektes von der Molekülgröße erlaubt. Da Angaben der Massenkonzentrationen in den Fachinformationen der entsprechenden Arzneimittel fehlen, wurde zunächst in einem Pilotversuch eine Dosis gewählt, die einer therapeutischen Dosierung von 4.200 I.E. bei einer Person mit einem Gewicht von 60 kg entspricht (70 I.E./kg Körpergewicht) (397).

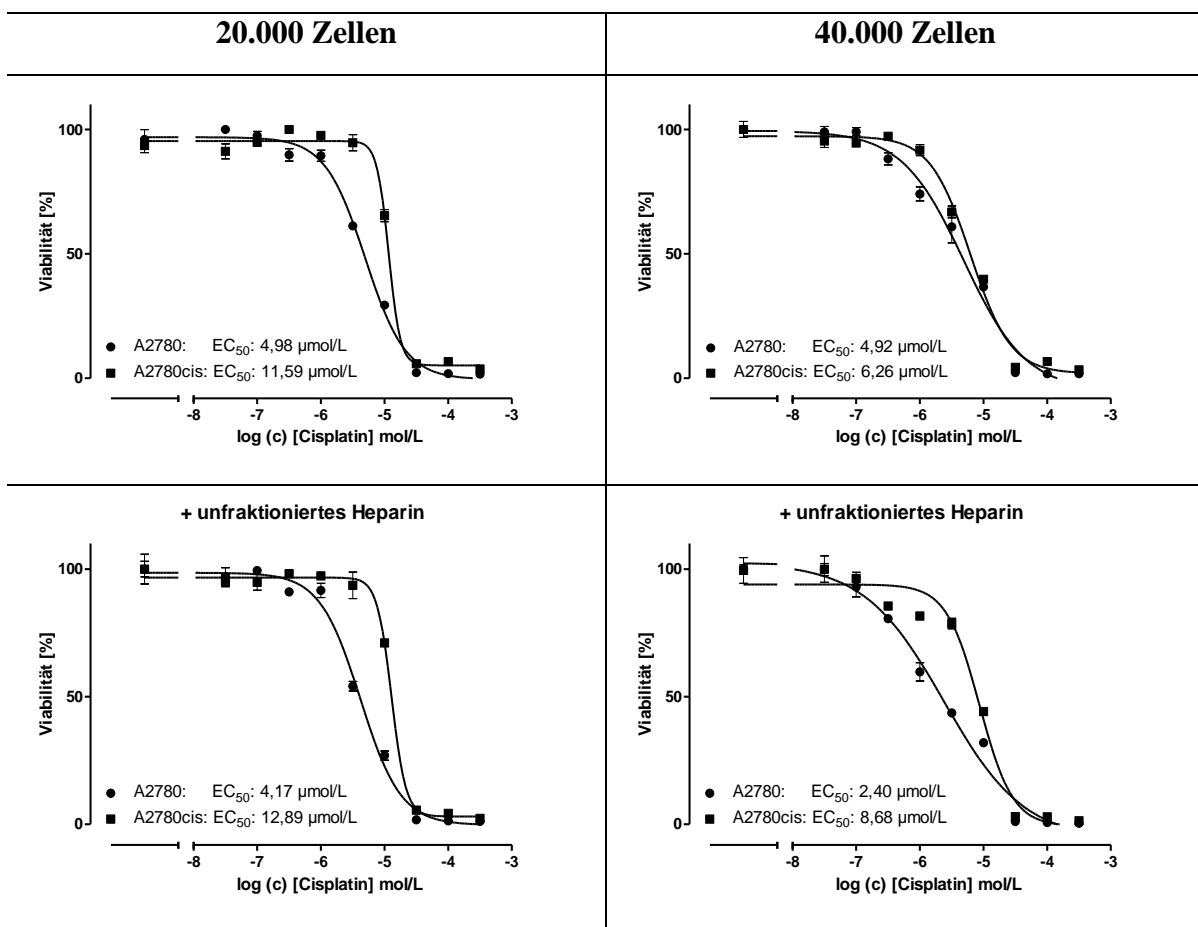


Abbildung 25: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von unfraktioniertem Heparin (entspricht einer Dosierung von etwa 4.200 I.E.) in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

5. Ergebnisse & Diskussion

Ein Einsatz therapeutischer Dosen von UFH hatte bei den resistenten A2780cis Zellen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Cisplatin eine leichte Minderung der Toxizität zur Konsequenz (bspw. 6,26 vs. 8,68 $\mu\text{mol/L}$ bei A2780cis; 40.000 Zellen) und steht somit im Kontrast zu einer Behandlung mit Tinzaparin. Der partiell toxisitätsfördernde Effekt bei nicht-resistenten A2780 Zellen (bspw. 4,92 vs. 2,40 $\mu\text{mol/L}$ bei A2780; 40.000 Zellen) ist unerwartet und seine Ursache bleibt ungeklärt. Jedoch scheint anhand dieses Versuchs ein chemosensitivierendes Potential von unfraktioniertem Heparin bei resistenten A2780cis Zellen - in gewählter Dosierung - unwahrscheinlich. Wie bereits erwähnt fehlen bei UFH die Konzentrationsangaben in Gewichtseinheiten und gestalten folglich einen massebasierten Vergleich mit Tinzaparin als schwierig. In der Literatur wird jedoch ein Standardverhältnis angegeben, wobei 1 mg Standard Heparin etwa 170 I.E. entspricht (237). Da es sich hierbei um einen generellen Richtwert handelt, wurde für die nächsten Studien ein Verhältnis von 1 mg zu 190 I.E. gewählt, welches im Vergleich zum oben dargestellten Pilotversuch einen deutlichen Überschuss des Heparins repräsentiert.

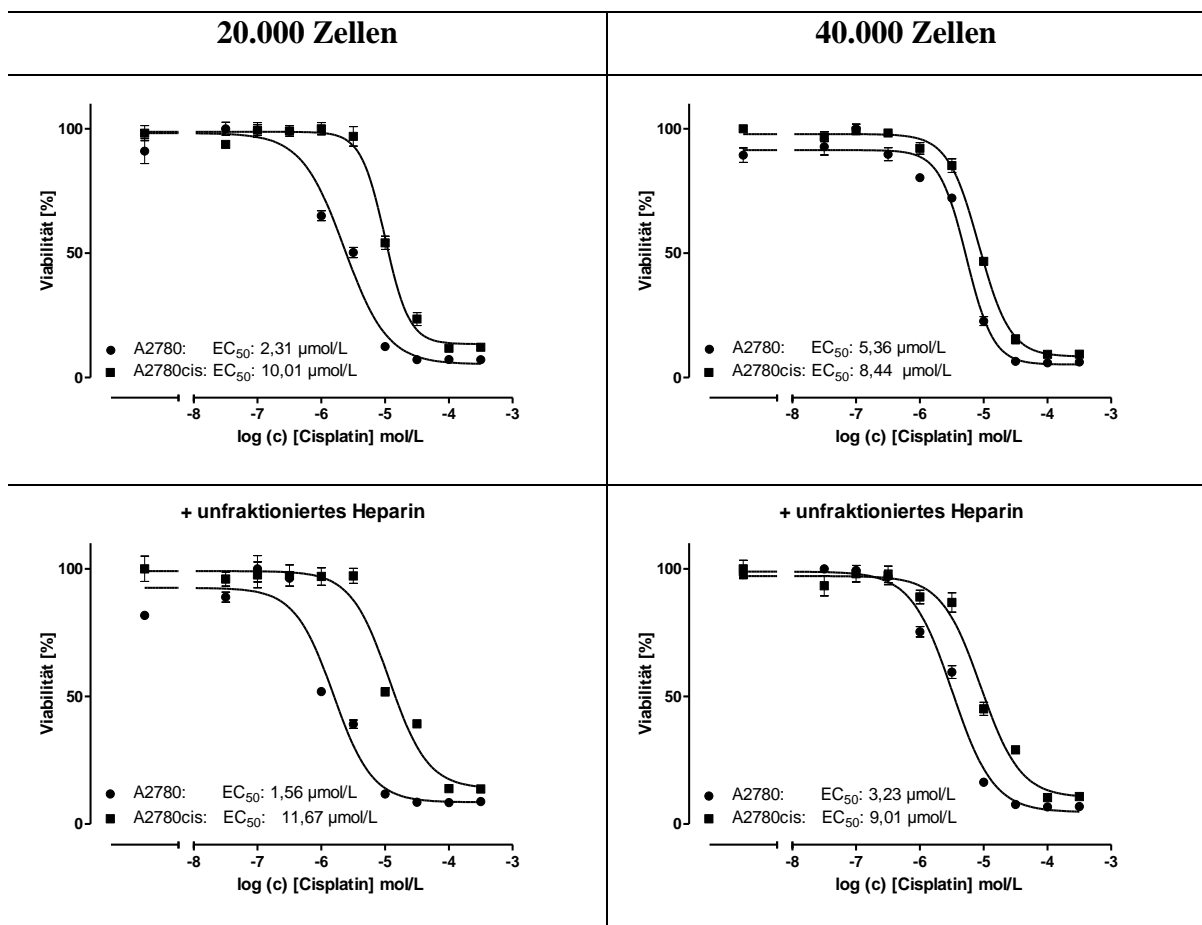


Abbildung 26: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von unfraktioniertem Heparin (entspricht einer Dosierung von etwa 34800 I.E.) in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

UFH-Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubations- ansatz	Zellzahl/ Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	20.000	5,59	0,27	2,56	5,11	0,33	7,84	3,1
		40.000	5,20	0,10	6,28	4,85	0,21	14,22	2,3
24	Cisplatin + UFH	20.000	5,58	0,20	2,63	4,75	0,18	17,92	6,8
		40.000	5,31	0,33	4,93	4,77	0,26	16,82	3,4

Tabelle 17: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von unfraktioniertem Heparin (entspricht einer Dosierung von etwa 34800 I.E.) in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).

Trotz des deutlichen Überschusses an Heparin im Vergleich zum Pilotversuch waren die daraus resultierenden Ergebnisse ähnlich. Wohingegen erneut eine anteilige leichte Sensitivierung der A2780 Zellen zu verzeichnen war (6,28 vs. 4,93 µmol/L bei A2780; 40.000 Zellen), trat ein entgegengesetzter, resistenzfördernder Effekt bei cisplatinresistenten A2780cis Zellen ein (bspw. 14,22 vs. 16,82 mol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen). Die Ursache für den gegensätzlichen Effekt im Vergleich zum niedermolekularen Heparin Tinzaparin bleibt an dieser Stelle ungeklärt. Allerdings liefern die erhobenen Daten Hinweise auf eine Abhängigkeit der chemosensitivierenden Wirkung von der Kettenlänge des Antikoagulans, da Tinzaparin eine bedeutend kleinere Molekularmasse aufweist (237). Denkbar ist, dass Tinzaparin aufgrund seiner Größe unterschiedliche sterisch bedingte Einflüsse auf extrazelluläre Komponenten der Zelle ausübt, welche letztlich die sensitivierende Wirkung erzielen, wozu größeres, unfraktioniertes Heparin unter den gewählten Bedingungen nicht in der Lage zu sein scheint. Weiterhin ist es möglich, dass Letzteres durch Interaktion mit unterschiedlichen extrazellulären Molekülen der entsprechenden Zelle andere Signalkaskaden anstößt als Tinzaparin, welche zumindest partiell zu einer gesteigerten Resistenz in A2780cis Zellen beisteuern können. Um diese Theorie weiterhin zu bestätigen, wurde folgend ein weiteres Heparinderivat getestet, welches sich in der Größe von UFH ähnelt, jedoch strukturell unterscheidet.

5.2.2 Einfluss von RO-Heparin auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Das so genannte RO-Heparin (*reduced oxy*-Heparin) wurde durch Periodat-Oxidation mit anschließender Reduktion mittels Borhydrid erhalten (398). Periodat oxidiert hierbei u.a. selektiv benachbarte Kohlenstoffatome mit unsubstituierten Hydroxylgruppen (399), was zu einer Spaltung der C2-C3 Bindung von unsulfatierten Uronsäuren innerhalb der Antithrombin-Bindungsstelle führt, welche wiederum essentiell für eine hohe antikoagulatorische Aktivität ist (398,400). Hieraus resultieren nicht-antikoagulatorische Heparine, ohne dabei weitere biologische Aktivitäten des Moleküls zu beeinträchtigen. Die anschließende Reduktion führt zu den so bezeichneten „glycol-split“ bzw. *reduced oxyheparins* (319,398). Das verwendete RO-Heparin wurde freundlicherweise von Dr. Annamaria Naggi vom Ronzoni Institut aus Mailand zur Verfügung gestellt, der an dieser Stelle ein besonderer Dank gilt.

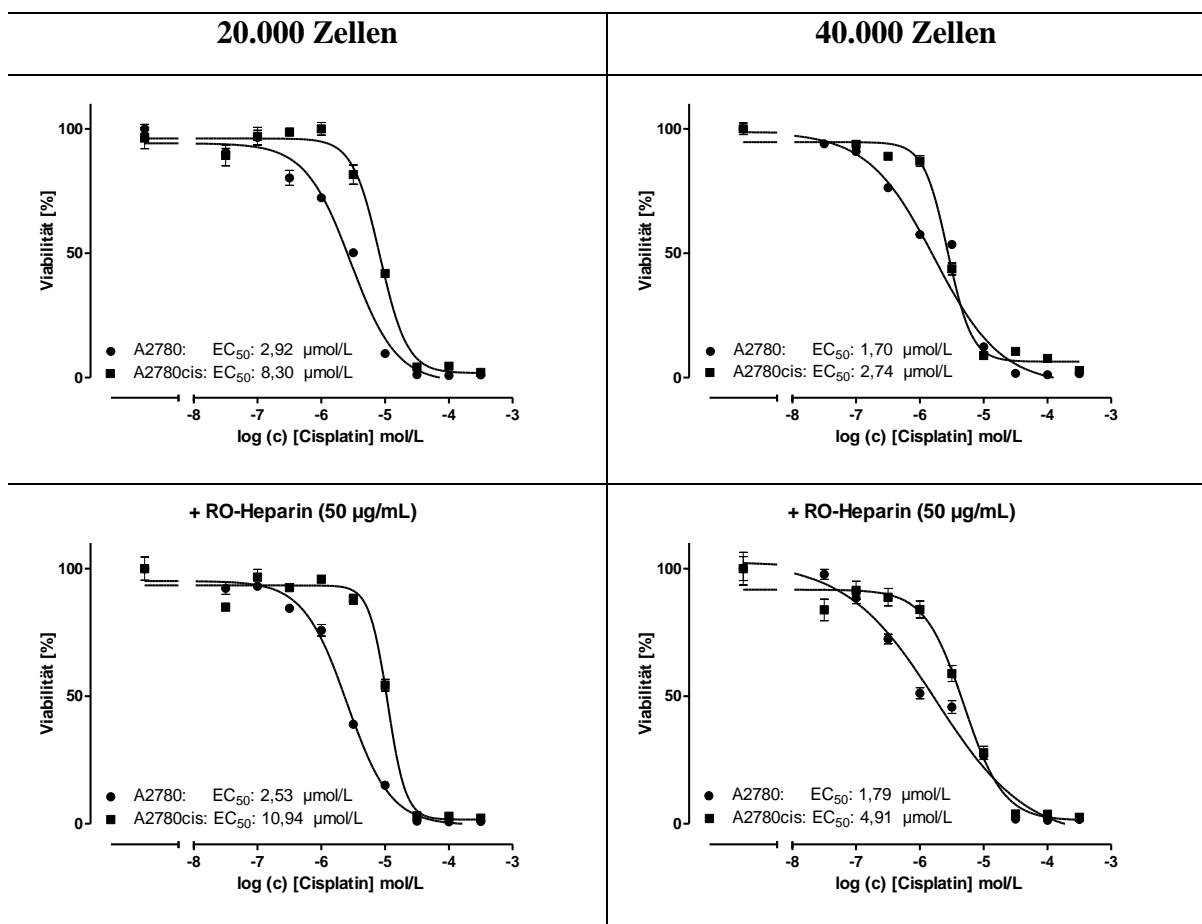


Abbildung 27: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 $\mu\text{g/mL}$ RO-Heparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplicaten.

RO-Heparin- Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubations- ansatz	Zellzahl/ Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	20.000	5,57	0,04	2,67	5,01	0,06	9,71	3,6
		40.000	5,58	0,16	2,60	5,37	0,17	4,27	1,6
24	Cisplatin + 50 µg/mL RO-Heparin	20.000	5,65	0,06	2,22	4,96	0,03	10,94	4,9
		40.000	5,66	0,10	2,18	5,13	0,18	7,37	3,4

Tabelle 18: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 µg/mL RO-Heparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).

Der Einsatz einer Konzentration von 50 µg/mL des modifizierten Heparins bewirkte ebenfalls vergleichbare Effekte, die sich durch eine Behandlung mit unfraktioniertem Heparin ergaben. Erneut resultierte aus einer Vorinkubation mit besagtem Heparinderivat eine resistenzsteigernde Wirkung bei A2780cis Zellen bei beiden Zellzahlen (bspw. 4,27 vs. 7,37 µmol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen), wohingegen eine geringe Erniedrigung der EC₅₀-Werte bei A2780 Zellen zu verzeichnen war (bspw. 2,60 vs. 2,18 µmol/L bei A2780; 40.000 Zellen), im Vergleich mit der Veränderung besagter Werte bei A2780cis Zellen jedoch deutlich vermindert ausgeprägt in Erscheinung trat. Diese Befunde untermauern die Theorie, dass ein potentiell resistenzmindernder Effekt der Heparine im wesentlichen Ausmaß von der entsprechenden Kettenlänge des Antikoagulans abhängig zu sein scheint. Weiterhin konnte eine strukturelle Modifikation des Heparins als Beitrag zu benanntem Effekt zumindest bei diesem Experiment ausgeschlossen werden, da eine Behandlung mit RO-Heparin vergleichbare Resultate von UFH erzielte. Die bereits erläuterten Befunde in der Literatur, in der dem RO-Heparin außer der antikoagulatorischen Wirksamkeit keine bedeutende Beeinträchtigung weiterer biologischer Aktivitäten unfraktionierter Heparine zugesprochen wird (319,398), rückt die erhobenen Daten somit in einen nachvollziehbaren Kontext.

5.2.3 Einfluss von Fondaparinux auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Basierend auf den bereits erhobenen Daten erfolgte anschließend eine Inkubation mit dem kleinsten Vertreter aus dieser Stoffgruppe der glykosidischen Antikoagulanzen, dem Fondaparinux, um weitere Einblicke über eine strukturell bedingte Abhängigkeit des chemosensitivierenden Effektes zu erhalten.

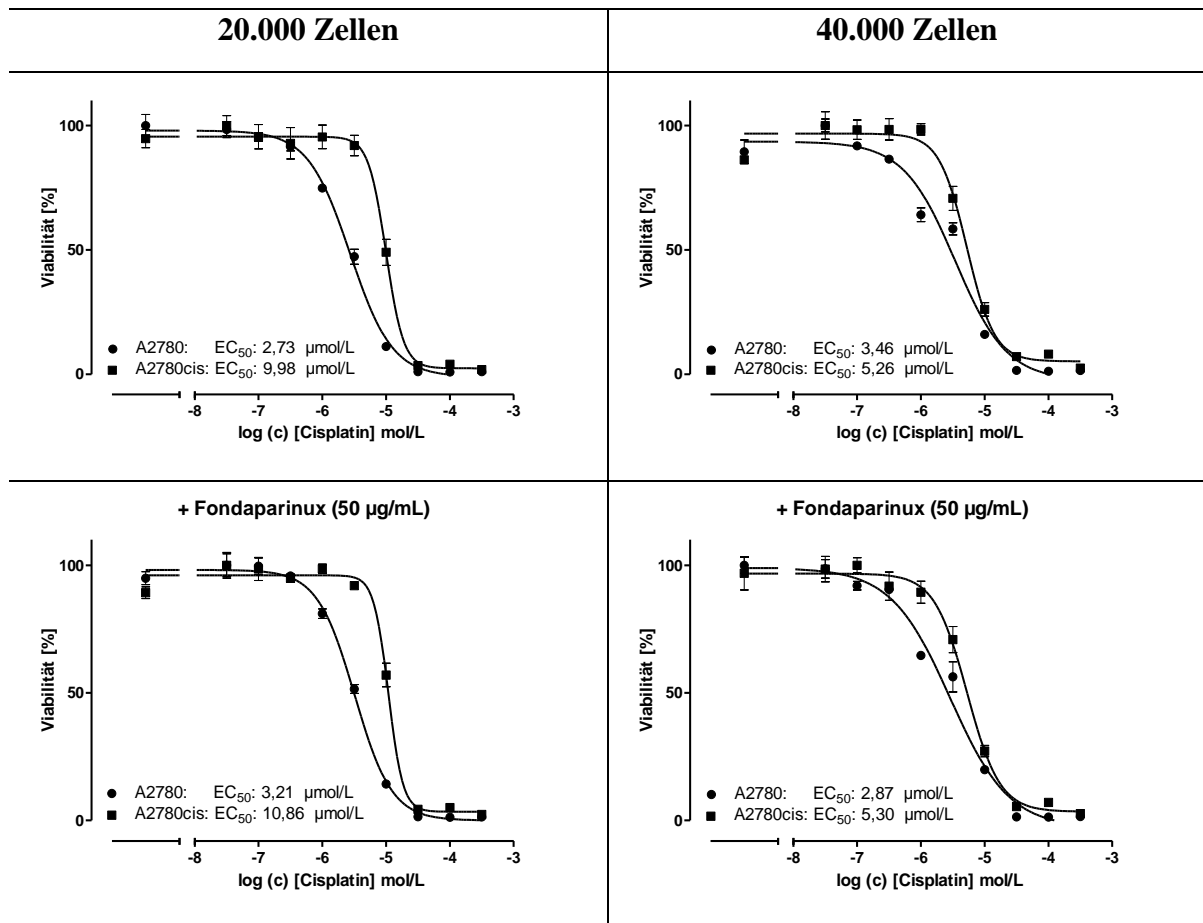


Abbildung 28: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 $\mu\text{g/mL}$ Fondaparinux in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

Fondaparinux-Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubationsansatz	Zellzahl/Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	20.000	5,57	0,04	2,67	5,01	0,06	9,71	3,6
		40.000	5,58	0,16	2,60	5,37	0,17	4,27	1,6
24	Cisplatin + 50 µg/mL Fondaparinux	20.000	5,56	0,13	2,74	5,02	0,05	9,60	3,5
		40.000	5,61	0,11	2,44	5,41	0,18	3,90	1,6

Tabelle 19: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 µg/mL Fondaparinux in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).

Eine Vorinkubation mit 50 µg/mL Fondaparinux hatte nahezu keine Auswirkung auf die EC₅₀-Werte beider Zelllinien. Interessanterweise ergab sich hierbei jedoch im Vergleich zu vorherigen Resultaten keine Erniedrigung der Toxizität bei cisplatinresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (bspw. 4,27 vs. 3,90 µmol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen). Demnach scheint das Pentasaccharid nicht dazu befähigt, sowohl die Tinzaparin induzierten Mechanismen, als auch jene, die mit einer Behandlung mit unfraktioniertem und RO-Heparin einhergehen, anzustoßen. Erneut liefert diese Tatsache zusätzliche Erkenntnisse über eine bestimmte Kettenlänge der Heparine als Voraussetzung für den chemosensitivierenden Effekt. Abseits der hier erhobenen Daten existieren Studien über Inhibitionen einer von Wachstumsfaktor induzierten endothelialen Zellproliferation durch Heparine, bei denen das Ausmaß benannter Inhibition maßgeblich von der Kettenlänge abhängig zu sein scheint. Hierbei erwiesen sich niedermolekulare Heparine als potentere Inhibitoren im Vergleich zu unfraktioniertem Heparin, wohingegen der Effekt bei Fondaparinux gänzlich abwesend war (242). Die hierfür verantwortlichen Mechanismen mögen sich vermutlich von den hier postulierten Theorien unterscheiden, jedoch zeigen sie gewisse Parallelen in der strukturellen Abhängigkeit und der damit verbundenen Wirkungen auf.

5.2.4 Einfluss von Enoxaparin auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Die bis zum dem Zeitpunkt erhobenen Daten gaben Anlass zu der Annahme, dass eine Reduzierung der Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen auf Tinzaparin und eventuell weitere niedermolekulare Heparine limitiert zu sein scheint. Daher wurde mit Enoxaparin ein weiteres Derivat der benannten Klasse getestet, um das Wirkungsprofil weiter zu charakterisieren.

5. Ergebnisse & Diskussion

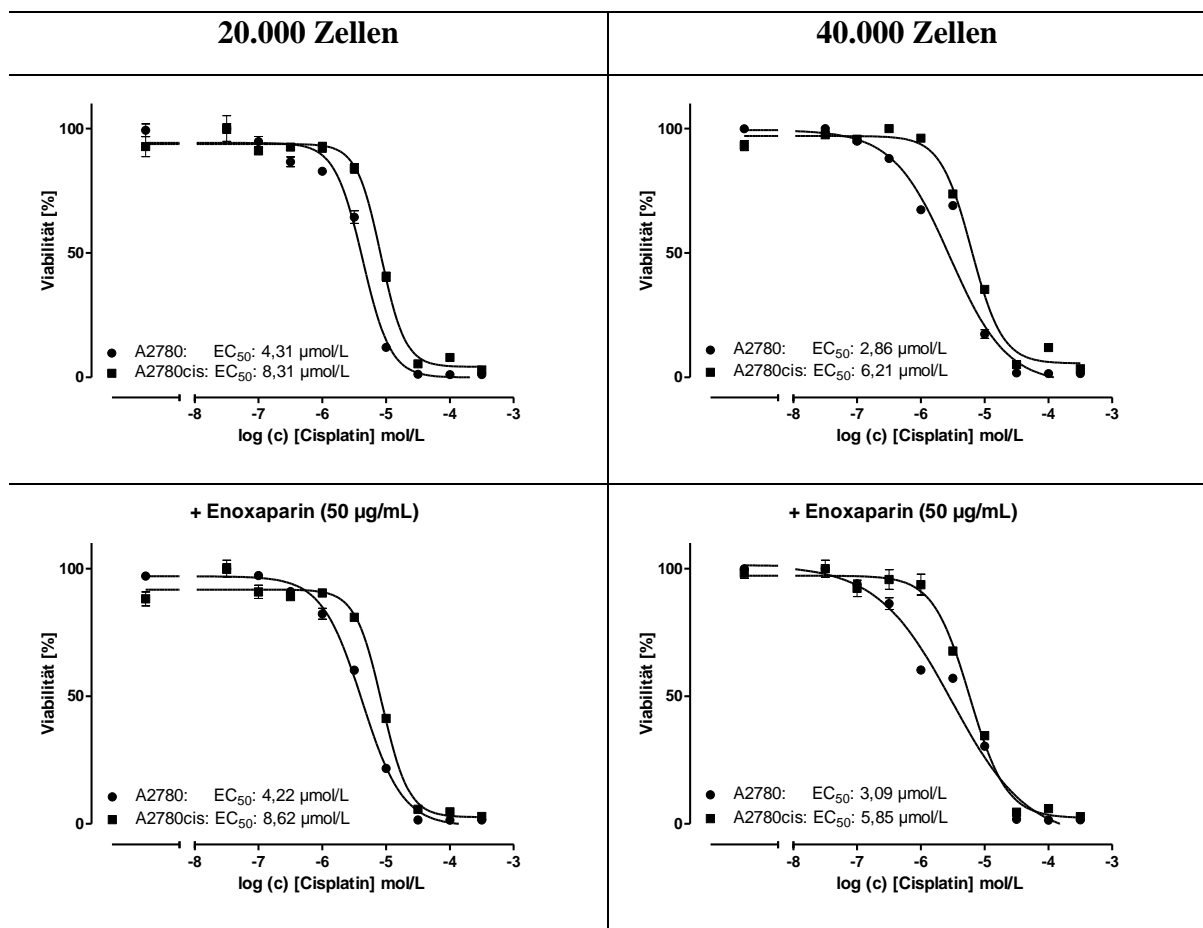


Abbildung 29: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 $\mu\text{g/mL}$ Enoxaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

Enoxaparin-Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubationsansatz	Zellzahl/Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC_{50}		EC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]	pEC_{50}		EC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	20.000	5,41	0,07	3,85	5,02	0,08	9,50	2,5
		40.000	5,43	0,16	3,69	5,09	0,17	8,22	2,2
24	Cisplatin + 50 $\mu\text{g/mL}$ Enoxaparin	20.000	5,46	0,09	3,45	5,01	0,06	9,85	2,9
		40.000	5,39	0,10	4,04	5,13	0,12	7,39	1,8

Tabelle 20: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 $\mu\text{g/mL}$ Enoxaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=2).

Die Vorinkubation mit 50 µg/mL Enoxaparin führte schließlich zu einer leichten Sensitivierung in cisplatinresistenten A2780cis Zellen (8,22 vs. 7,39 µmol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen), welche sich anteilig im leicht erniedrigten Resistenzfaktor widerspiegelt (2,2 vs. 1,8 bei 40.000 Zellen). Diese Resultate decken sich mit den Befunden aus der Dissertation von Dr. Daniel Philipp Stölting, in denen für den sensitivierenden Effekt eine Zellzahl von 40.000 Voraussetzung war (9), da besagte Wirkung bei der Hälfte der Zellzahl nicht eintrat (9,50 vs. 9,85 µmol/L bei A2780cis; 20.000 Zellen). Der Einfluss von Enoxaparin auf die Toxizität einer Cisplatinbehandlung war allerdings im Vergleich zu Tinzaparin bedeutend abgeschwächt und lässt somit keine allgemeine Aussage zu Struktur-Wirkungsbeziehung der Heparine zu. Zusammenfassend kann jedoch eine Tendenz zu einer strukturellen Abhängigkeit von der chemosensitivierenden Wirkung bei cisplatinresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen vermutet werden. Hier besitzt Tinzaparin mit seiner durchschnittlichen Molekularmasse von 6,5 kDa den von den in dieser Arbeit getesteten Heparinderivaten bedeutendsten Einfluss auf die Chemoresistenz benannter Zellen. Die Tatsache, dass unfraktioniertes-, RO-Heparin und Fondaparinux diesen Effekt nicht vermitteln konnten, zusammen mit dem Befund, dass das größentechnisch ähnliche Derivat Enoxaparin eine bedeutend abgeschwächte Sensitivierung induzierte, lassen darauf schließen, dass die Steigerung einer Cisplatintoxizität in einem stringenten Rahmen von der Kettenlänge des Heparins abhängig ist. Eine strukturelle Abhängigkeit innerhalb einer gewissen Spannweite der Kettenlänge kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

5.3 Einfluss von Tinzaparin auf die Chemoresistenz weiterer cisplatinresistenter Ovarialkarzinomzellen

Vor dem Hintergrund der bereits durchgeführten Versuche stellte sich die Frage, ob der chemosensitivierende Effekt des Tinzaparins in dem A2780 Zellsystem auf weitere Karzinomzellen gleichen Ursprungs transferiert werden kann. Hierzu wurde das Zellpaar W1/W1CR genutzt, welches freundlicherweise von Herrn Dr. Januchowski von der *University of Medical Sciences* in Posen, Polen zur Verfügung gestellt wurde, dem dafür ein besonderer Dank gilt. Der experimentelle Ansatz entsprach folglich den bereits oben durchgeführten Versuchen mit einer Vorinkubation von 24 h und einer Konzentration des Tinzaparins von 50 µg/mL.

5. Ergebnisse & Diskussion

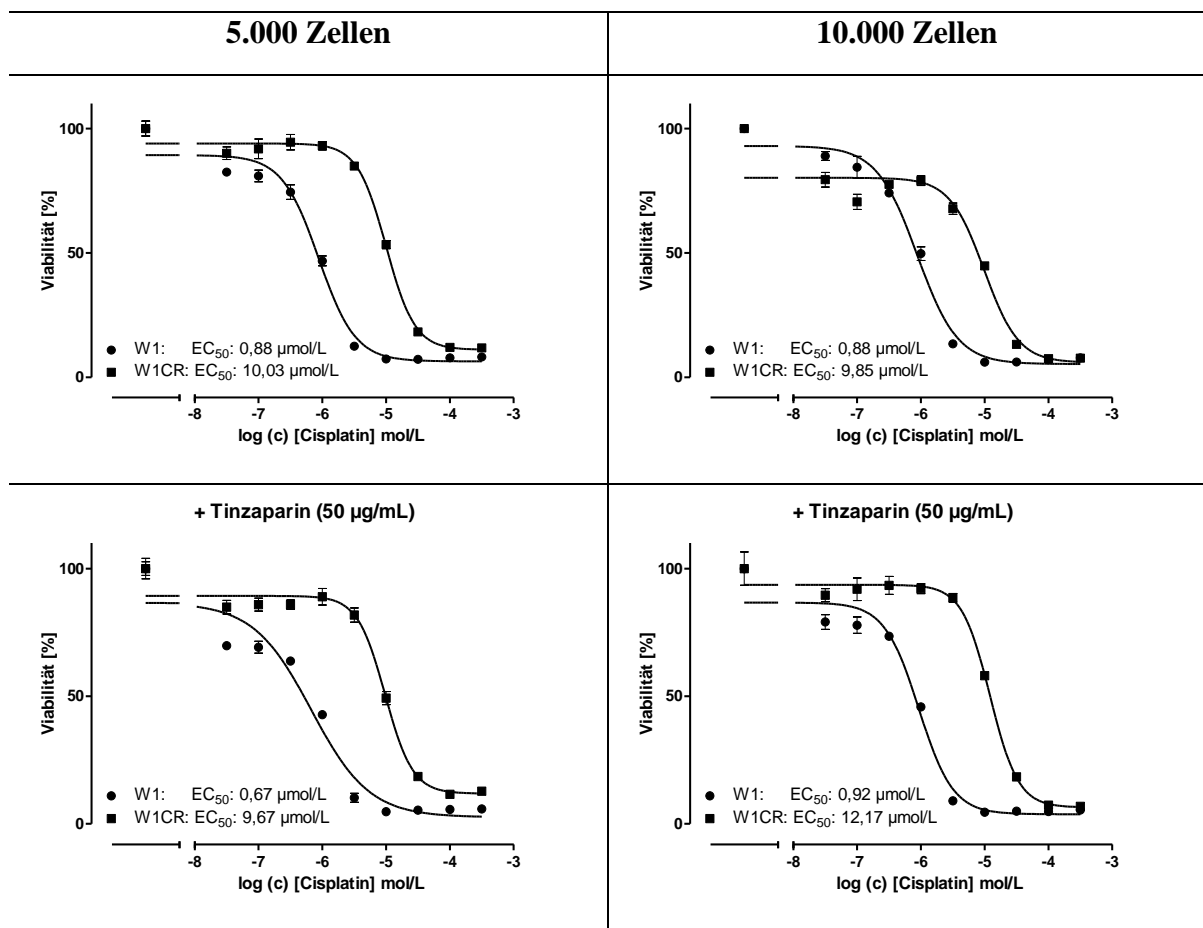


Abbildung 30: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 $\mu\text{g/mL}$ Tinzaparin in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

Tinzaparin-Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubationsansatz	Zellzahl/Well	W1			W1CR			Rf
			p EC_{50}		EC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]	p EC_{50}		EC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	5.000	6,08	0,05	0,83	5,15	0,17	7,12	8,6
		10.000	6,03	0,09	0,93	5,11	0,10	7,68	8,3
24	Cisplatin + 50 $\mu\text{g/mL}$ Tinzaparin	5.000	6,15	0,04	0,71	5,14	0,11	7,22	10,2
		10.000	6,03	0,05	0,93	5,02	0,11	9,51	10,2

Tabelle 21: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 $\mu\text{g/mL}$ Tinzaparin in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).

Zunächst trat die im Vergleich zum A2780 Zellsystem deutlichere Differenz der Cisplatin-Toxizität zwischen der W1- und der cisplatinresistenten W1CR Zelllinie in den Vordergrund (bspw. 0,93 vs. 7,68 $\mu\text{mol/L}$; 10.000 Zellen), welche sich in deutlich größeren Resistenzfaktoren widerspiegelt (bspw. 8,3; 10.000 Zellen). Abseits dieser Werte hatte eine Vorinkubation mit Tinzaparin keine Minderung der EC_{50} in W1CR Zellen zur Konsequenz. Während die toxische Wirkung des Cisplatins bei W1 Zellen unbeeinflusst von einer Tinzaparin-Vorinkubation zu sein schien (bspw. 0,93 $\mu\text{mol/L}$ bei W1; 10.000 Zellen), führte eine potentielle Interaktion der resistenten Zelle mit dem Antikoagulans zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber dem Zytostatikum (bspw. 7,68 vs. 9,51 $\mu\text{mol/L}$ bei W1CR; 10.000 Zellen). Zusammenfassend kann dem niedermolekularen Heparin Tinzaparin anhand dieser Ergebnisse kein chemosensitivierender Effekt bei cisplatinresistenten W1CR Zellen zugesprochen werden. Den molekularen Mechanismus gilt es aufzuklären, warf jedoch die Frage auf, inwiefern die beiden resistenten Zelllinien potentiell unterschiedliche Resistenzmechanismen nutzen, um dem toxischen Effekt des Zytostatikums entgegenzuwirken. Ein vorhandener Unterschied dieser Mechanismen könnte somit Aufschluss über die Funktionalität des Heparins im Kontext einer Chemoresistenz mit sich bringen.

5.4 Charakterisierung der Funktion und Struktur bestimmter Proteoglykane in Bezug auf die Chemoresistenz von A2780cis Zellen

5.4.1 Einfluss einer enzymatischen Behandlung durch Heparitinase I auf die Toxizität von Cisplatin in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Aufgrund der postulierten Theorie, dass Tinzaparin mit extrazellulären Bestandteilen wie Proteoglykanen interagiert um auf diese Weise bestimmte Signaltransduktionen anzustoßen, welche letztlich den chemosensitivierenden Effekt induzieren können, wurde folgend evaluiert, inwiefern sich eine während des gesamten Versuchs andauernde Behandlung mit Heparitinase I auf die Toxizität von Cisplatin bei A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen auswirkt. Eine kurzzeitige Inkubation der A2780cis Zellen mit dem Enzym wurde bereits durchgeführt und brachte den Verlust der sensitivierenden Eigenschaften des Tinzaparins mit sich (10). Das Enzym Heparitinase I schneidet die Verknüpfung zwischen N-acetylierten oder N-sulfatierten Glucosaminen und Glucuronsäure von Heparansulfat-Ketten, wobei für die Spaltung eine Absenz einer Sulfatierung an Position 6 des Glucosamins Voraussetzung ist (401). Diese

5. Ergebnisse & Diskussion

enzymatischen Spaltungen können die Funktionalität von Proteoglykanen maßgeblich beeinflussen (402,403) und dienen folglich zur Evaluierung, inwiefern die in A2780cis Zellen präsente Chemoresistenz von einer intakten Maschinerie jener Moleküle abhängig ist.

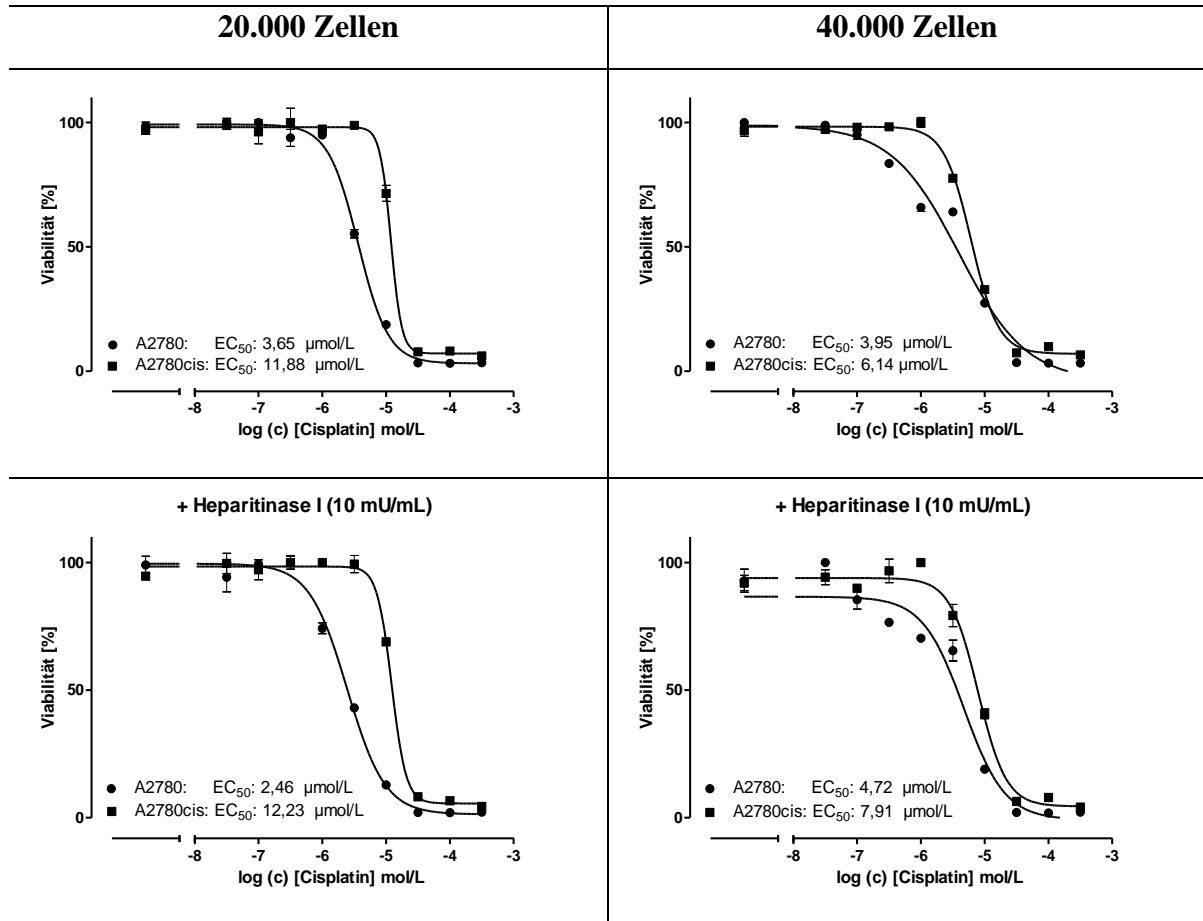


Abbildung 31: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 10 mU/mL Heparitinase I in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

HP I-Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubations- ansatz	Zellzahl/ Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [μmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [μmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	20.000	5,46	0,14	3,44	4,86	0,10	13,75	4,0
		40.000	5,41	0,05	3,93	5,10	0,09	7,87	2,0
22,5	Cisplatin + HP I	20.000	5,59	0,14	2,59	4,90	0,03	12,47	4,8
		40.000	5,37	0,09	4,25	5,06	0,06	8,76	2,1

Tabelle 22: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 10 mU/mL Heparitinase I in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=4).

Eine Vorbehandlung mit Heparitinase I in einer Konzentration von 10 mU/mL bewirkte geringfügige Veränderungen in der Cisplatin-Toxizität bei A2780cis Zellen (bspw. 7,87 vs. 8,76 µmol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen) und die Resistenzfaktoren beider Zellzahlen nahmen durch die enzymatische Behandlung in unterschiedlicher Intensität zu (4,0 vs. 4,8 bei 20.000 Zellen und 2,0 vs. 2,1 bei 40.000 Zellen), wozu die Veränderung der EC₅₀-Werte in nicht-resistenten Zellen maßgebend beitrug. Die entgegengesetzte Veränderung der Cisplatin-Toxizität in A2780cis Zellen bei beiden Zellzahlen infolge einer während der gesamten Versuchszeit andauernden Inkubation mit Heparitinase I lässt eine Abhängigkeit von der Konfluenz der Zellen vermuten (13,75 vs. 12,47 und 7,87 vs. 8,76 µmol/L bei A2780cis). Aufgrund dieser Ergebnisse scheint eine durch Heparitinase I vermittelte Modifikation der Heparansulfat-Ketten der Proteoglykane Auswirkungen auf eine Cisplatin-Toxizität der A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen zu haben, wenn auch in geringem Ausmaß. Die Tatsache, dass das verwendete Enzym wie beschrieben jedoch nur über ein spezifisches Spektrum an potentiellen Substraten verfügt und weitere Heparinasen zusätzliche Modifikationen der Proteoglykane induzieren können, gestalten letztlich eine an dieser Stelle verallgemeinernde Aussage über eine durch Proteoglykane vermittelte Chemoresistenz als schwierig und es bedarf folglich weiterer Studien.

5.4.2 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression der Heparanase in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Wie bereits beschrieben verfügen (Tumor-)Zellen mit der Endoglycosidase Heparanase über ein Enzym, welches durch Schneiden von Anteilen der Heparansulfat-Ketten zu einer Modifikation von Proteoglykanen befähigt ist und u.a. mit dem Auftreten einer Chemoresistenz in Verbindung gebracht wird (273,315). Unter diesem Gesichtspunkt erfolgte eine Quantifizierung des Enzyms, um sowohl mögliche Unterschiede zwischen A2780 und A2780cis Zellen selbst, als auch den Einfluss einer Tinzaparinbehandlung zu charakterisieren.

5. Ergebnisse & Diskussion

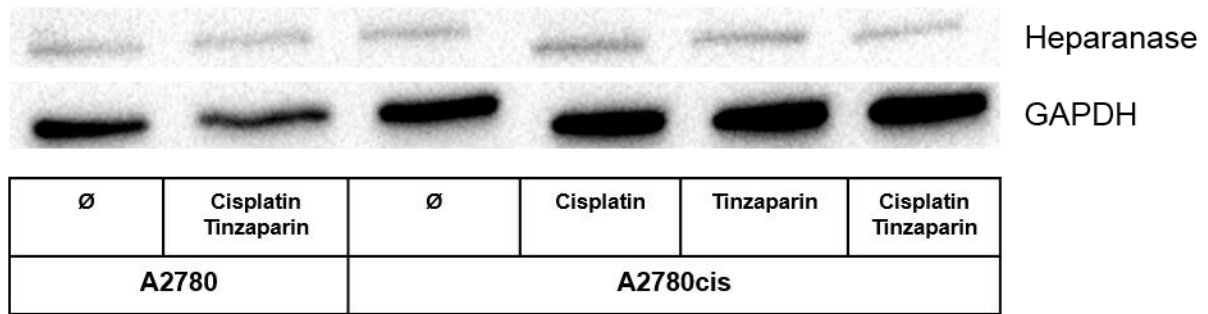


Abbildung 32: Proteinexpression der Heparanase von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression der Heparanase wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte *blot* repräsentiert einen exemplarischen Versuch.

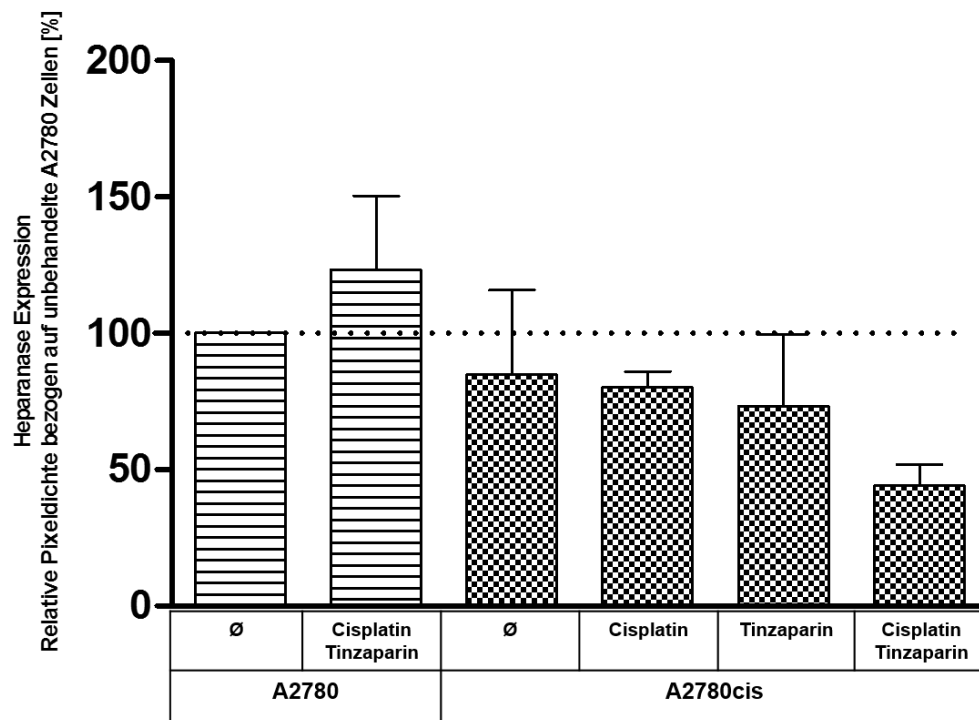


Abbildung 33: Relative Quantifizierung der Heparanase Expression von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurden. Die Expression der Heparanase wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=3).

Der Analyse der Proteinexpression der Heparanase von unbehandelten A2780 und A2780cis Zellen zufolge verfügen Letztere über ein leicht vermindertes Repertoire an besagtem Enzym (Abbildung 33, 1. vs. 3. Balken v.l.). Dies erschien zunächst gegensätzlich zu der in der Literatur erwähnten Vermutung über eine mit dem Enzym assoziierten Chemoresistenz. Allerdings war lediglich die Menge in A2780cis Zellen reduziert und geht nicht zwingend gleichzeitig mit einer verminderten enzymatischen Aktivität einher. Die Steigerung der Proteinexpression in A2780 Zellen durch eine kombinierte Behandlung von Cisplatin und

Tinzaparin (Abbildung 33, 2. Balken v.l.) könnte als Gegenregulationsversuch der Zelle interpretiert werden, indem durch ein erhöhtes Vorkommen des Enzyms ein verstärktes *signaling* induziert wird, da aufgrund der Spaltung von Heparansulfat-Ketten die daran gebundenen Moleküle freigesetzt und zu diversen Rezeptoren zugeführt werden können. Inwiefern dieser Mechanismus hierbei zum Tragen kommt, gilt es aufzuklären. Interessanterweise fällt im Vergleich der unbehandelten A2780cis Zellen die leichte Reduktion der Heparanase Expression auf, die sowohl durch alleinige Behandlung mit Cisplatin als auch mit Tinzaparin in Erscheinung trat. Eine Kombination beider Substanzen bewirkte hierbei eine zwar nicht statistisch signifikante, aber dennoch erkennbare Erniedrigung in der Proteinexpression des Enzyms (Abbildung 33, 6. Balken v.l.), welche sich aufgrund der Intensität nicht nur aus der Summe beider einzelnen Auswirkungen zu ergeben schien. Unter Vorbehalt, dass auch hier keine direkten parallelen zur entsprechenden Enzymaktivität möglich sind, kann Anhand dieser Daten vermutet werden, dass eine Behandlung der cisplatinresistenten A2780cis Zellen mit Tinzaparin zu einer verminderten Präsenz des Enzyms Heparanase führt, welches fortan durch seine verringerte Kapazität der Spaltung von Heparansulfat-Ketten mit einem reduzierten *signaling* einhergeht. Welche Signalkaskaden diese Theorie betreffen, bleibt hierbei ungeklärt. Der Effekt scheint jedoch besonders durch die Kombination mit Cisplatin hervortreten und obwohl eine bereits erwähnte erhöhte Heparanaseaktivität vermutlich nicht einer der prävalenten Resistenzmechanismen von A2780cis Ovarialkarzinomzellen zu sein scheint, äußert sich das niedermolekulare Heparin Tinzaparin dennoch als Regulator in der Expression des Enzyms.

5.4.3 Einfluss des Heparanase-Inhibitors Ronaparstat auf die Toxizität von Cisplatin in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Um funktionell zu überprüfen, ob Heparanase in die Mechanismen einer Chemoresistenz von A2780cis Zellen involviert ist, wurden folgend Zytotoxizitätsstudien mit dem Heparanase-Inhibitor Ronaparstat durchgeführt, welcher freundlicherweise von der Firma Sigma-Tau Research in Mendrisio, Schweiz zur Verfügung gestellt wurde.

5. Ergebnisse & Diskussion

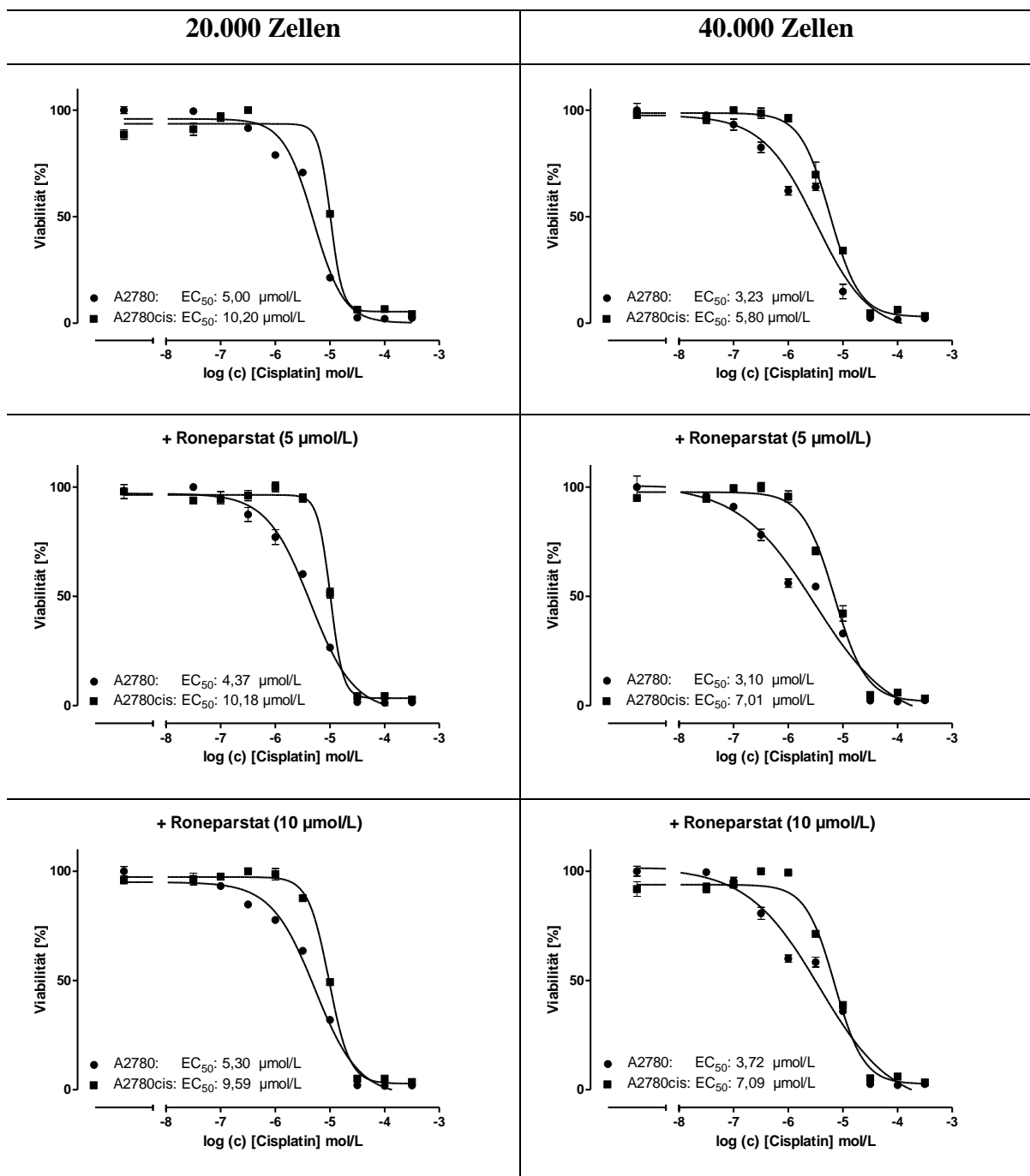


Abbildung 34: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 5 bzw. 10 $\mu\text{mol/L}$ Roneparstat in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

Roneparstat- Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubations- ansatz	Zellzahl/ Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	20.000	5,36	0,25	4,38	4,97	0,04	10,63	2,4
		40.000	5,29	0,19	5,14	5,10	0,13	8,02	1,6
5	Cisplatin + 5 µmol/L Roneparstat	20.000	5,39	0,35	4,12	4,95	0,06	11,30	2,7
		40.000	5,28	0,32	5,19	5,06	0,12	8,66	1,7
	Cisplatin + 10 µmol/L Roneparstat	20.000	5,37	0,35	4,22	4,96	0,06	10,96	2,6
		40.000	5,34	0,20	4,60	5,07	0,12	8,54	1,9

Tabelle 23: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 5 bzw. 10 µmol/L Roneparstat in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).

Eine Vorinkubation der A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen mit dem Heparanase-Inhibitor Roneparstat hatte keinen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von Cisplatin, was sich in den nahezu identischen EC₅₀-Werten der jeweiligen Behandlungsmethoden widerspiegelt (bspw. 8,02 vs. 8,66 vs. 8,54 µmol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen). Selbst eine doppelte Konzentration des Inhibitors bewirkte keine Veränderung der Toxizität des Zytostatikums. Die Tatsache, dass beide Zelllinien durch eine Vorbehandlung mit Roneparstat unbeeinflusst in ihrer Toxizität gegenüber Cisplatin blieben, macht einen Beitrag der Heparanase zu einer Cisplatinresistenz in A2780cis Zellen unwahrscheinlich. Da diese Ergebnisse an Tumorzellen *in vitro* erfasst wurden, die in einem zweidimensionalen System als *monolayer* vorlagen, können keine Aussagen zur potentiellen *in vivo* Wirksamkeit des Inhibitors in einem dreidimensionalen Tumorgewebe getroffen werden. Dementsprechend ist eine an dieser Stelle verallgemeinernde Aussage über Roneparstat als Werkzeug in der Minderung einer Chemoresistenz nicht möglich und es bedarf dazu weiterer Forschung. Den Ergebnissen zufolge kann allerdings eine Beteiligung der Heparanase im Kontext der Chemoresistenz bei A2780cis Zellen *in vitro* als unwahrscheinlich eingestuft werden. Demnach bedienen sich benannte Zellen anderer molekularer Mechanismen, um der toxischen Wirkung des Cisplatins zu entgegnen.

5.4.4 Analyse der Struktur der Heparansulfat-Ketten von A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen durch Radioligandbindungsstudien

Aufgrund der postulierten Interaktion des niedermolekularen Heparins Tinzaparin mit extrazellulären Membranbestandteilen der cisplatinresistenten A2780cis Zellen (10), insbesondere den Proteoglykanen, welche vermutlich zum chemosensitivierenden Effekt beitragen, war die Untersuchung potentieller struktureller Unterschiede der Heparansulfat-Ketten von A2780 und A2780cis Zellen von besonderem Interesse. Für diese Aufklärung wurden Radioligandbindungsstudien durchgeführt, um sowohl einen Einblick in die Kettenlänge benannter Heparansulfate zu erhalten, als auch Auskunft über den Sulfatierungsgrad zu ermöglichen. Diese Studien wurden in einer Kooperation von Herrn Fabian Baltes und Frau Tahira Batool unter Leitung von Frau Professor Jin-ping Li im *Department of Medical Biochemistry and Microbiology* der Universität Uppsala in Schweden durchgeführt, denen an dieser Stelle gedankt wird.

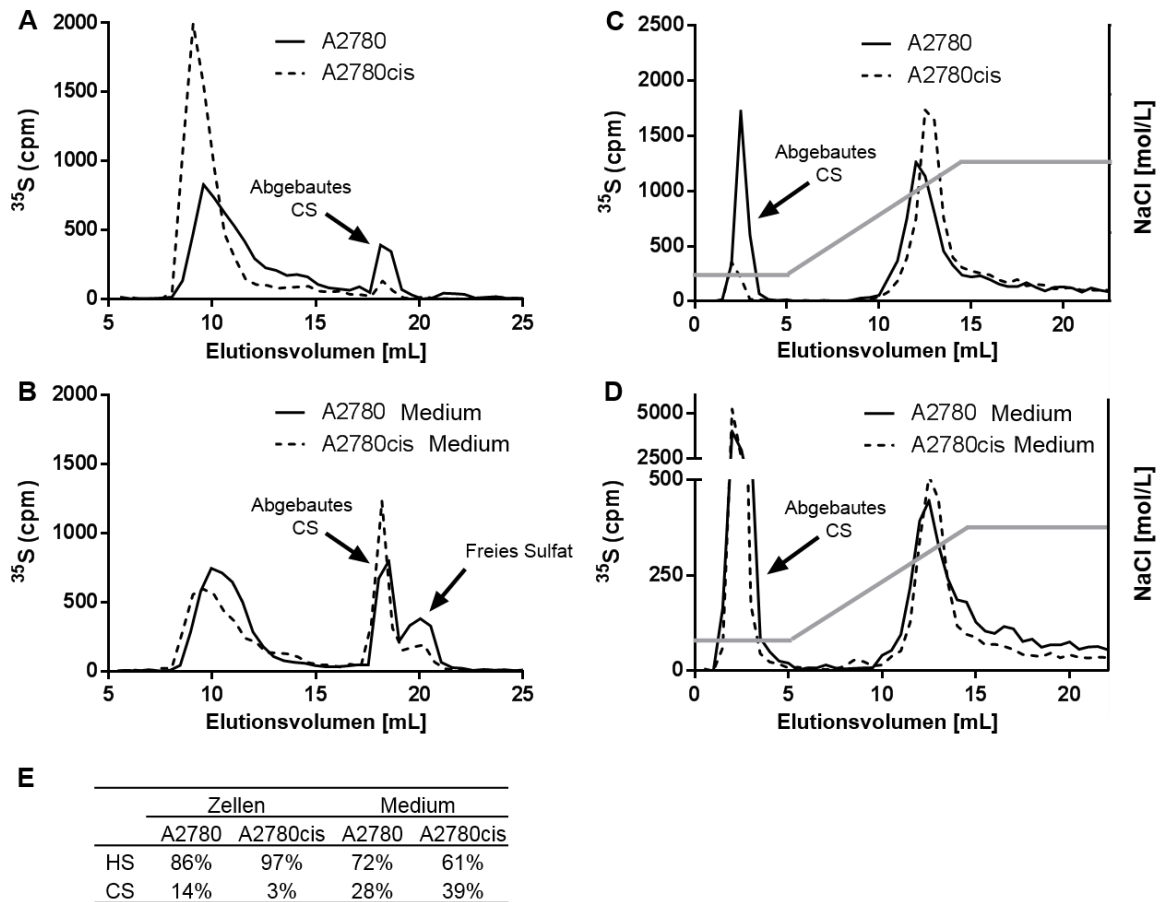


Abbildung 35: Charakterisierung der molekularen Struktur von Glykosaminoglykanen in A2780 und A2780cis Zellen. Metabolisch markierte Glykosaminoglykane wurden aus A2780 und A2780cis Zellen (A, C) sowie aus deren Kulturmedien (B, D) isoliert und analysiert. (A, B) Analyse der ^{35}S -markierten Proben durch Größenausschlusschromatographie. (C, D) Ionenaustauschchromatographie zur Analyse der ^{35}S -markierten Proben, welche durch einen linearen NaCl Gradienten (0,25-2 mol/L) (dargestellt als graue Linie) eluiert wurden. Das Verhältnis von Heparansulfat (HS) zu Chondroitinsulfat (CS) in A2780 und A2780cis Zellen und in deren Medien ist in Tabelle (E) angegeben. Die Daten repräsentieren das Mittel aus zwei Versuchen ($n=2$). Die genaue methodische Vorgehensweise ist in Pfankuchen et al. (404) beschrieben.

Die Auswertung der metabolisch ^{35}S -markierten Glykosaminoglykane offenbarte einige Unterschiede zwischen A2780 und den cisplatinresistenten A2780cis Zellen. Demnach waren die in den A2780cis Zellen präsenten Heparansulfat-Ketten im Vergleich zu nicht-resistenten A2780 Zellen von größerer Länge (Abbildung 35, A). Diese Tatsache ließ sich in geringerem Ausmaß auch in den entsprechenden Zellkulturmedien wiederfinden (Abbildung 35, B). Dieser Befund passt zu der bereits zuvor durchgeführten Proteinquantifizierung der Heparanase, welche in A2780cis Zellen vermindert exprimiert wurde (Abbildung 33). Die daraus zu vermutende verringerte Enzymaktivität könnte eine Erklärung für den Unterschied der Heparansulfat-Kettenlängen sein. Ebenso scheinen sich jene Strukturen in ihrer Ladungsintensität zu unterscheiden, da den A2780cis Zellen ein höherer Sulfatierungsgrad nachgewiesen werden konnte (Abbildung 35, C), welcher ebenfalls in entsprechenden Medien vorhanden war (Abbildung 35, D). Interessanterweise war der prozentuale Anteil an

Heparansulfaten mit 97 % in A2780cis Zellen höher im Vergleich zu nicht resistenten A2780 Zellen mit 86 % (Abbildung 35, E), wobei diese Fraktion im Vergleich zu vorhandenen Chondroitinsulfaten mit einem Anteil von 14 % bzw. 3 % in A2780 bzw. A2780cis deutlich ausgeprägter in Erscheinung trat. In den Zellkulturmedien repräsentierten ebenfalls die Heparansulfate den größten Anteil an analysierten Glykosaminoglykanen, jedoch diesmal mit einer höheren Quantität bei A2780 Zellen (72 %) im Vergleich zu A2780cis Zellen (61 %). Hier war der prozentuale Anteil an Chondroitinsulfaten mit 28 % bei A2780 bzw. 39 % bei A2780cis Zellen deutlich größer als bei der entsprechenden zellgebundenen Fraktion.

Zusammengefasst existieren den dargestellten Ergebnissen zufolge Unterschiede im strukturellen Muster der Glykosaminoglykane der beiden analysierten Zelllinien. Der Befund der längeren Heparansulfat-Ketten als auch deren ausgeprägterer Grad der Sulfatierung in cisplatinresistenten A2780cis Zellen könnte einen Mechanismus von Tinzaparin auf die chemosensitivierende Wirkung bei A2780cis Zellen beschreiben, indem durch Interaktion mit Proteoglykanen und/oder deren Heparansulfat-Ketten der cisplatinresistenten Zellen bestimmte Signalkaskaden antagonisiert werden. Das daraus resultierende verminderte *signaling* könnte letztlich zur Reduktion der Cisplatinresistenz beitragen. Eine untergeordnete Rolle jener Signalkaskaden in nicht-resistenten A2780 Zellen könnte somit das dortige Ausbleiben einer chemosensitivierenden Wirkung erklären. Ebenso denkbar ist eine unzureichende Interaktion des niedermolekularen Heparins mit den dort präsenten Proteoglykanen und/oder dessen Heparansulfat-Ketten bei A2780 Zellen, welche aus der beschriebenen differenzierten Struktur letztgenannter Moleküle resultiert. Zur Überprüfung dieser Theorie ist allerdings weitere Forschung nötig.

5.4.5 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression der Sulfatase-2 in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Aufgrund der Unterschiede im Sulfatierungsgrad der Heparansulfat-Ketten zwischen A2780 und A2780cis Zellen erfolgte die Quantifizierung der Sulfatase-2, welche wie in Kapitel 2.4 beschrieben durch selektive Entfernung von 6-O-Sulfaten die Interaktion von an Heparansulfat gebundenen Proteinen beeinflussen kann und in diversen Tumorarten als dereguliert beschrieben wurde (309,310).

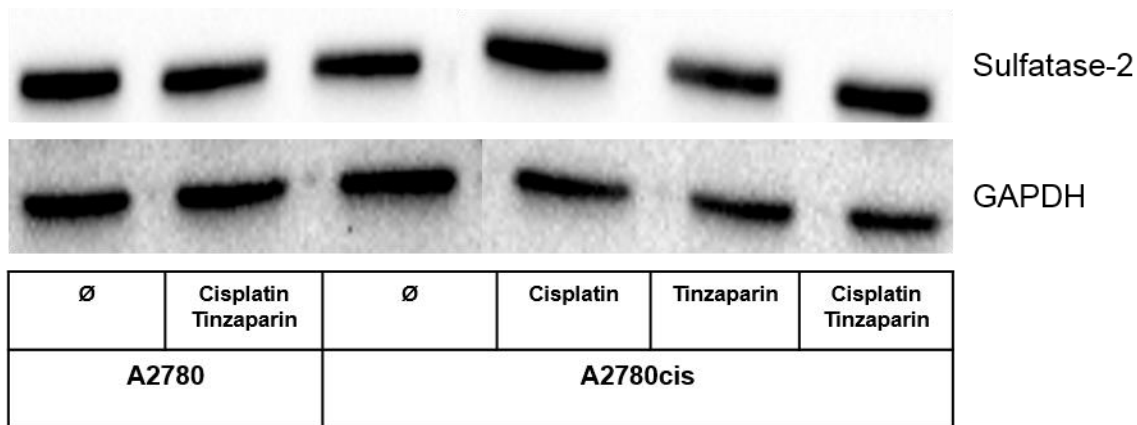


Abbildung 36: Proteinexpression der Sulfatase-2 von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression der Sulfatase-2 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte *blot* repräsentiert einen exemplarischen Versuch.

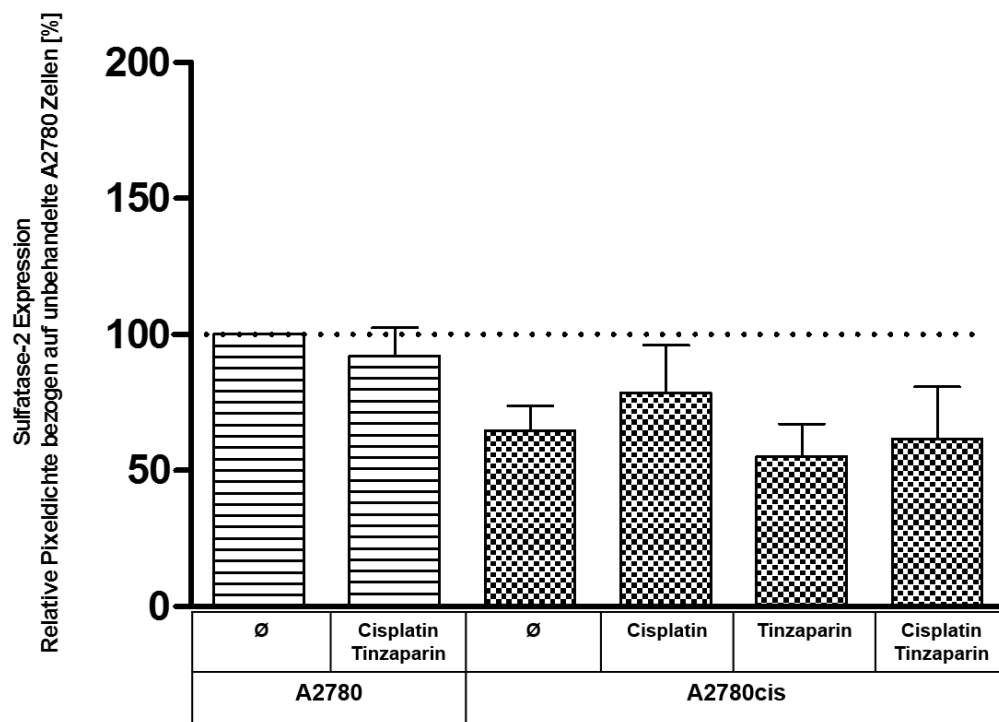


Abbildung 37: Relative Quantifizierung der Sulfatase-2 Expression von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurden. Die Expression der Sulfatase-2 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=3).

Die Analyse der Proteinexpression des Enzyms Sulfatase-2 unbehandelter A2780 und A2780cis Zellen lieferte vergleichbare Ergebnisse zur Bestimmung der Heparanase (Kapitel 5.4.2). Auch hier war im Vergleich zu A2780 Zellen eine reduzierte Menge an Sulfatase-2 in resistenten A2780cis Zellen zu verzeichnen (Abbildung 37, 1. vs. 3. Balken v.l.). Eine Kombination des Zytostatikums mit dem niedermolekularen Heparin hatte hierbei kaum

Einfluss auf die Expression des Enzyms in beiden Zelllinien (Abbildung 37, 1. vs. 2. und 3. vs. 6. Balken v.l.). Die Steigerung durch alleinige Behandlung mit Cisplatin in A2780cis Zellen könnte eine Art Gegenregulation der Zelle vermuten lassen, indem durch eine gesteigerte Enzymaktivität eine vermehrte Anzahl an die an Heparansulfat gebundener Liganden freigesetzt wird (309), um wiederum ein verstärktes *signaling* unbestimmter Art zu fördern. Es sei jedoch auch hier erwähnt, dass eine Veränderung in der Proteinexpression nicht zwangsläufig auch eine entsprechend veränderte Aktivität des Enzyms hervorruft. Da Sulfatasen sowohl aktivierende als auch inaktivierende Effekte auf das durch an die Heparansulfat-Ketten gebundenen Proteinliganden vermittelte *signaling* haben kann, welche abhängig vom zellulären Kontext zu sein scheinen (309,405), fällt eine Interpretation zu diesem Zeitpunkt schwer. Jedoch passen die Proteinquantifizierungen der Sulfatase-2 von unbehandelten A2780 und A2780cis Zellen zu den bereits diskutierten Ergebnissen der Radioligandbindungsstudien. Der erhöhte Sulfatierungsgrad, welcher in A2780cis Zellen vorherrscht, könnte durch die reduzierte Quantität der Sulfatase-2 erklärt werden, vorausgesetzt, dass dies auch mit einer reduzierten Aktivität einhergeht. Diese Erkenntnisse bekräftigen die bereits dargestellte Theorie, aus der durch strukturelle Unterschiede der Heparansulfat-Ketten der beiden Zelllinien eine differenzierte Interaktion mit Tinzaparin resultieren könnte, welche bei A2780cis Zellen eine reduzierte Intensität von Signalkaskaden, die an der Chemoresistenz beteiligt sind, zur Folge haben könnte. Die mögliche erhöhte Aktivität jener resistenzfördernder *pathways* in A2780cis Zellen könnte ebenfalls Ursache der benannten strukturellen Unterschiede beider Zelllinien sein. Für die Bestätigung dieser Theorien bedarf es aber folglich noch weiterer Untersuchungen. Da sich im Vergleich zu unbehandelten A2780cis Zellen jedoch keine Änderung in der Expression von Sulfatase-2 durch alleinige Behandlung mit Tinzaparin ergab (Abbildung 37, 3. vs. 5. Balken v.l.), scheint eine direkte Involvierung des Enzyms in einer durch Tinzaparin reduzierten Chemoresistenz in besagten Zellen eher unwahrscheinlich.

5.4.6 Auswirkung von Tinzaparin auf die Proteinexpression von Syndekan-1 und -4 in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Nach der strukturellen Aufklärung von Glykosaminoglykanen in A2780 und A2780cis Zellen galt es folgend zu evaluieren, inwiefern das niedermolekulare Heparin Tinzaparin Einfluss auf die Expression von bestimmten Proteoglykanen ausüben kann. Wie bereits beschrieben (Kapitel 2.4) fungieren Proteoglykane wie Syndekan-1 und -4 unter anderem als Vermittler von Übertragungen diverser Signalkaskaden (271,290). Eine veränderte Expression der

Proteoglykane durch Tinzaparin könnte folglich das entsprechend vermittelte *signaling* verändern. Hierzu wurden die A2780cis Zellen mit dem niedermolekularen Heparin (50 µg/mL) für 24 h inkubiert und anschließend erfolgte die Quantifizierung dieser Proteoglykane, um gleiche Bedingungen zu schaffen, welche für den chemosensitivierenden Effekt notwendig waren.

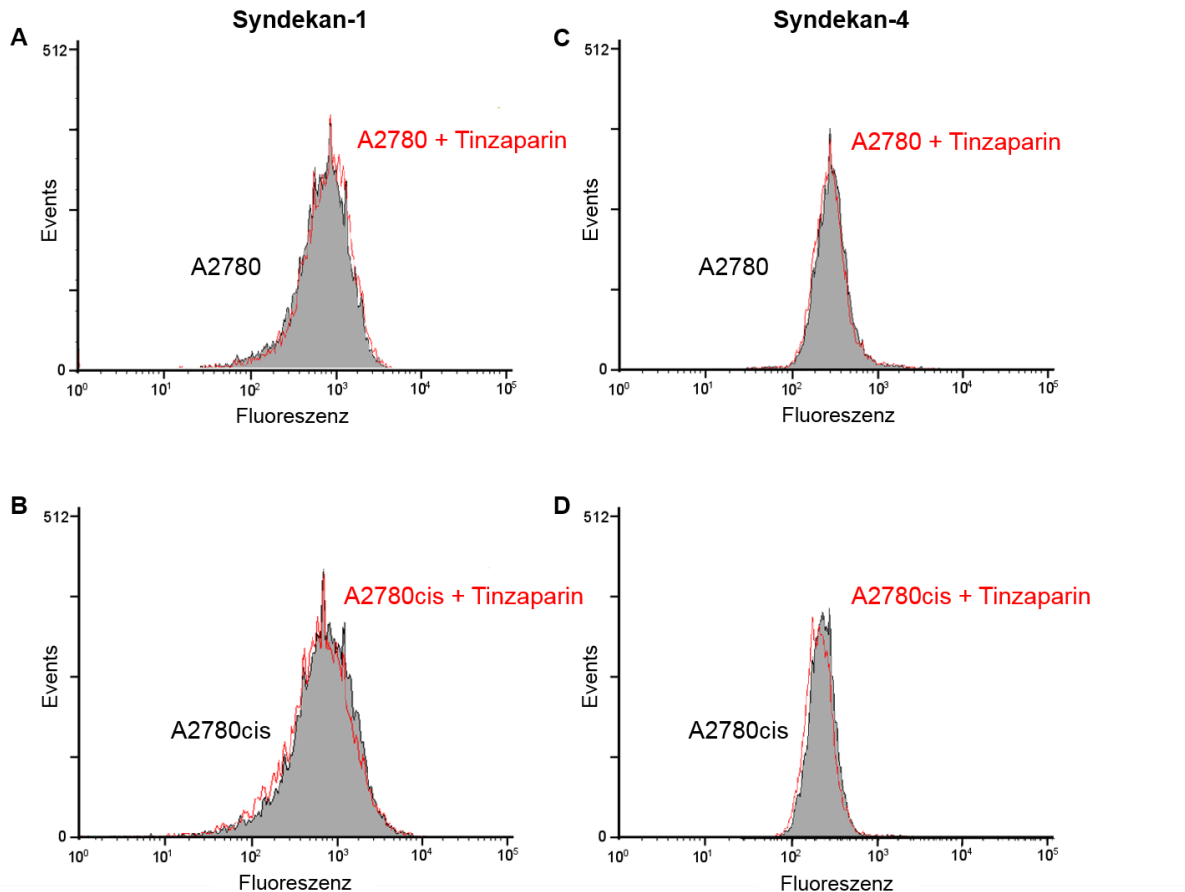


Abbildung 38: Analyse der Proteineexpression von Syndekan-1 (links) und -4 (rechts) in unbehandelten oder mit Tinzaparin (50 µg/mL) vorinkubierten (24 h) A2780 (A,C) und A2780cis Zellen (B,D). Die Expression wurde mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Experimente wurden in Triplikaten angesetzt.

Eine Vorbehandlung mit dem niedermolekularen Heparin Tinzaparin in der für den chemosensitivierenden Effekt notwendigen Konzentration hatte den erhobenen Daten zufolge keinen Einfluss auf die Expression beider Syndekane. Dieser Befund äußert sich sowohl in A2780 (Abbildung 38, A, C), als auch in den cisplatinresistenten A2780cis Zellen (Abbildung 38, B, D). Da in den Toxizitätsstudien nach erfolgter Behandlung mit Cisplatin weitere 72 h inkubiert wurde, ist ein erst später eintretender Einfluss auf die Expression der analysierten Proteoglykane durch Tinzaparin nicht auszuschließen. Da allerdings eine 24-stündige Vorinkubation für den chemosensitivierenden Effekt notwendig war, ist davon auszugehen, dass bereits diverse Mechanismen angestoßen werden müssen, bevor die entsprechenden Zellen

mit dem Zytostatikum in Kontakt treten, damit letztlich der toxizitätssteigernde Effekt von Cisplatin in Erscheinung tritt.

5.5 Zytotoxizität von Cisplatin in A2780/A2780cis und W1/W1CR Ovarialkarzinomzellen in Gegenwart von Kollagen als Substanz der extrazellulären Matrix

Die Tatsache, dass für den resistenzmindernden Effekt des Tinzaparins in A2780cis Ovarialkarzinomzellen eine höhere Zellzahl von 40.000 als Voraussetzung festgestellt wurde, legte eine Signalweiterleitung über Zell-Zell Kontakte oder Adhäsionsvorgänge zur Ausübung der Resistenzmechanismen nahe (9). Da Proteoglykane zudem auch als Co-Rezeptoren für Integrine fungieren können (293) (Kapitel 2.4), welche wiederum maßgeblich an Zelladhäsionsvorgängen sowie am Phänomen einer zelladhäsionsvermittelten Chemoresistenz beteiligt sind (226) (Kapitel 2.2.5), erfolgten Toxizitätsstudien der A2780 und A2780cis Zellen auf Kollagen als Bestandteil der extrazellulären Matrix, um Erkenntnisse über eine potentielle Involvierung einer zelladhäsionsvermittelten Resistenz gegenüber Cisplatin zu erhalten.

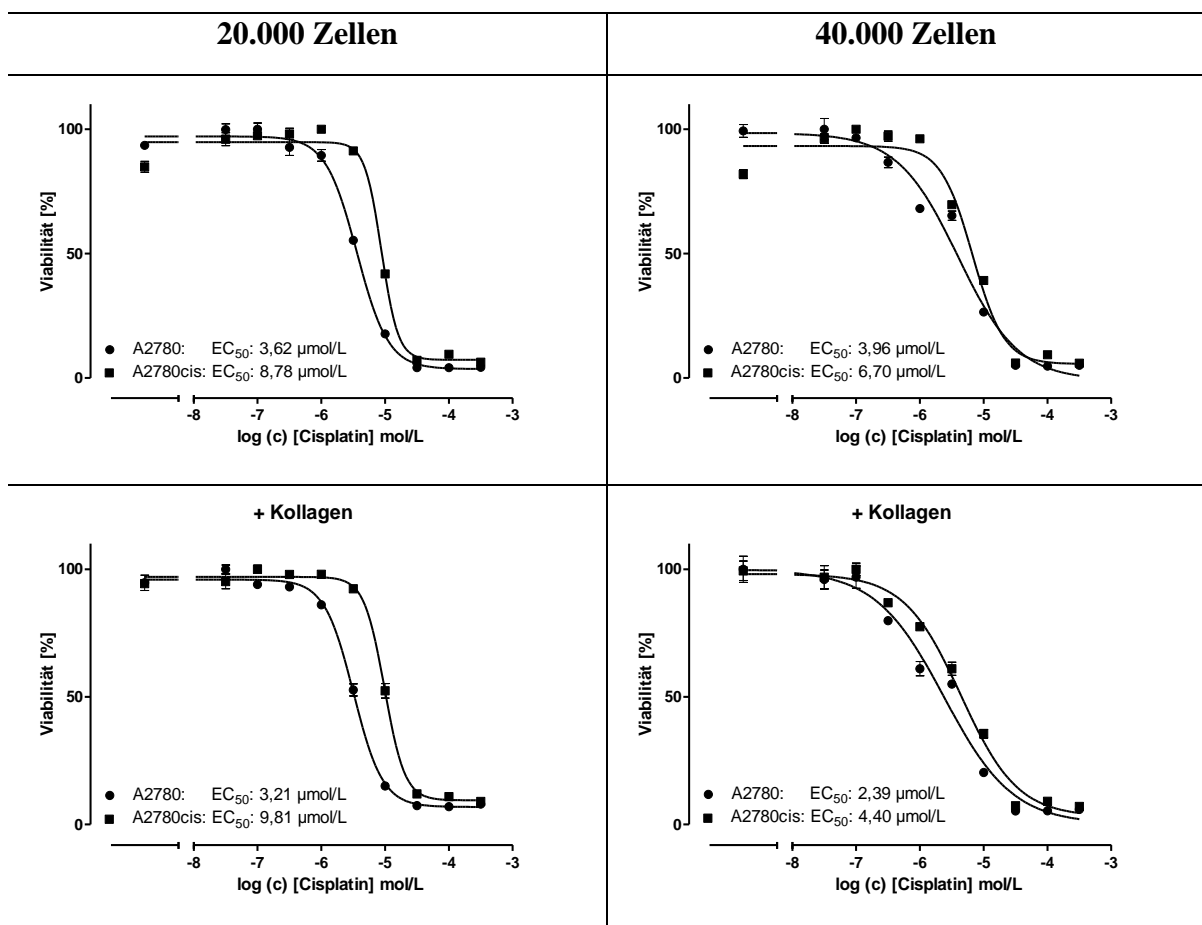


Abbildung 39: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Kultivierung auf Kollagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichteten Platten in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

Kultivierung auf Kollagen bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubationsansatz	Zellzahl/Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
/	Cisplatin	20.000	5,61	0,25	2,44	5,12	0,10	7,60	3,1
		40.000	5,51	0,12	3,10	5,40	0,23	3,99	1,3
24	Cisplatin + Kollagen	20.000	5,74	0,27	1,81	5,07	0,06	8,48	4,7
		40.000	5,74	0,10	1,83	5,42	0,06	3,76	2,1

Tabelle 24: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Kultivierung auf Kollagen (10 µg/cm²) beschichteten Platten in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).

Eine Beschichtung der Platten mit Kollagen hatte für die A2780cis Zellen nahezu keine Auswirkung auf die Toxizität des Cisplatins (bspw. 3,99 vs. 3,76 µmol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen). Interessanterweise bewirkte eine Kultivierung der A2780 Zellen auf der Substanz der extrazellulären Matrix eine leichte Steigerung in der Toxizität des Zytostatikums (bspw. 3,10 vs. 1,83 µmol/L bei A2780; 40.000 Zellen), welche nicht erwartet wurde. Durch die ermittelten Resistenzfaktoren könnten demnach schnell falsche Schlussfolgerungen getroffen werden, da die daraus zu vermutende Steigerung in der Resistenz lediglich aus den erniedrigten EC₅₀-Werten der nicht-resistenten A2780 Zellen auf den mit Kollagen beschichteten Platten resultiert. Auch wenn im Vergleich zu vorherigen Toxizitätsstudien mit Cisplatin und A2780/A2780cis Zellen eine geringere Ausprägung der Chemoresistenz von A2780cis Zellen bei einer Zellzahl von 40.000 vorhanden war, welche sich im Resistenzfaktor von 1,3 widerspiegelt, trägt anhand der erhobenen Daten eine Adhäsion der cisplatinresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen an Kollagen zu keiner gesteigerten Chemoresistenz bei. Eine mögliche Modulation diverser Signalkaskaden (Kapitel 2.2.5) wie beispielsweise PI3K (229) oder MAPK (228), welche durch Adhäsion an Bestandteile der EZM angestoßen werden können, ist hierbei nicht auszuschließen. Jedoch ist ein Beitrag zur Chemoresistenz in A2780cis Zellen durch genannte Veränderungen potentieller Signalkaskaden eher auszuschließen. Zusammengefasst scheint eine zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz nicht eine der Mechanismen zu sein, welche die cisplatinresistenten A2780cis Zellen nutzen um der toxischen Wirkung des Zytostatikums entgegenzuwirken. Folglich scheinen andere Resistenzmechanismen in jenen Zellen präsent zu sein, auf welche Tinzaparin seinen chemosensitivierenden Einfluss ausüben kann.

Um auch auf dieser Ebene einen Vergleich zu den vorab vorgestellten W1 Ovarialkarzinomzellen vorzunehmen, erfolgten auch Zytotoxizitätsstudien im Kontext einer

5. Ergebnisse & Diskussion

zelladhäsionsvermittelten Chemoresistenz am W1/W1CR Zellpaar, welche ebenfalls auf Kollagen beschichteten Platten durchgeführt wurden. Aufgrund der fehlenden sensitivierenden Wirkung des Tinzaparins auf diese Zellen gegenüber einer Cisplatintoxizität werden grundsätzlich andere Mechanismen vermutet (Kapitel 5.3), welche letztlich den resistenten Phänotyp charakterisieren.

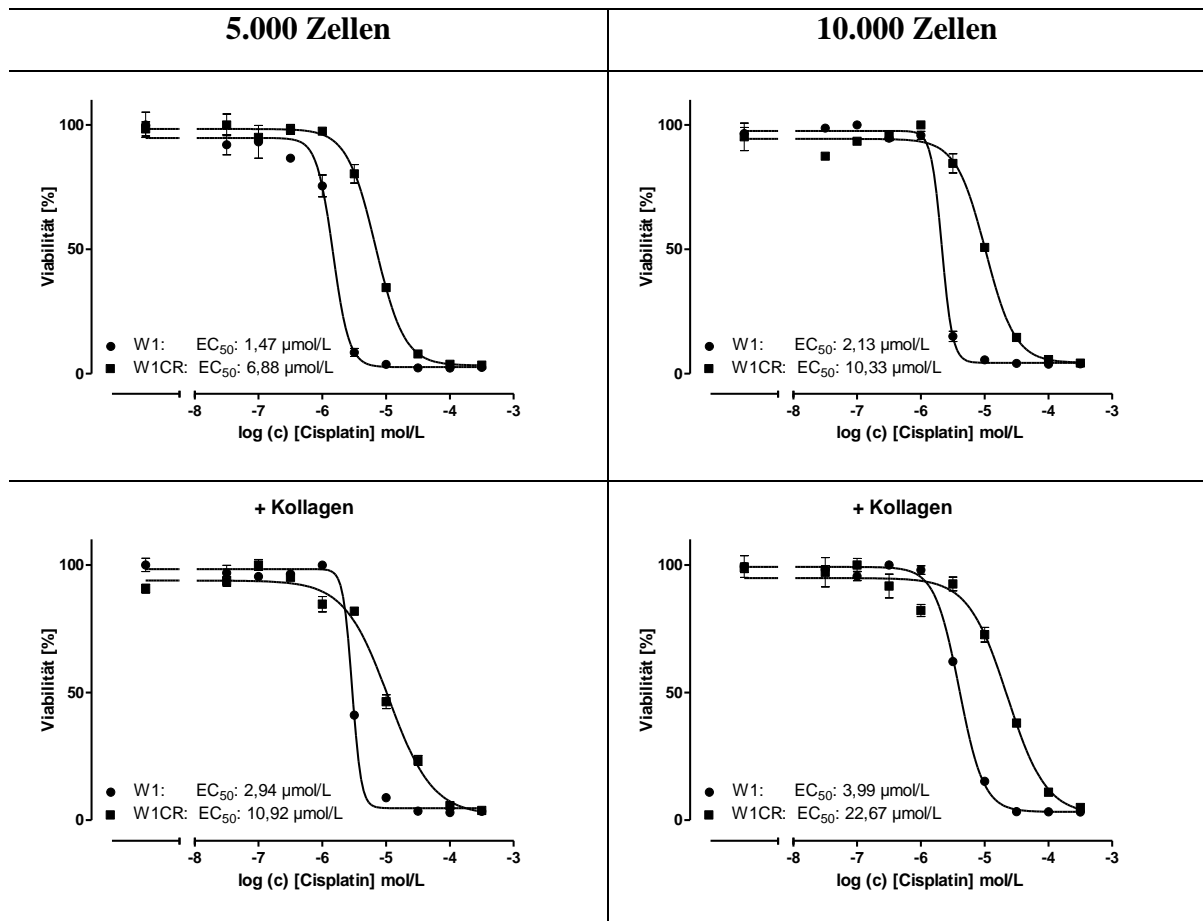


Abbildung 40: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Kultivierung auf Kollagen (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichteten Platten in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

Kultivierung auf Kollagen bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubationsansatz	Zellzahl/Well	W1			W1CR			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
/	Cisplatin	5.000	5,91	0,08	1,22	5,17	0,11	6,81	5,6
		10.000	5,76	0,16	1,73	4,95	0,14	11,34	6,5
24	Cisplatin + Kollagen	5.000	5,60	0,12	2,53	4,79	0,21	16,18	6,4
		10.000	5,35	0,30	4,49	4,53	0,21	29,30	6,5

Tabelle 25: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Kultivierung auf Kollagen (10 µg/cm²) beschichteten Platten in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).

Eine Kultivierung der W1 und W1CR Zellen auf Kollagen ging mit einer deutlichen Veränderung der Cisplatintoxizität einher. So führte eine Beschichtung mit Kollagen bei nicht-resistenten W1 Zellen zu einer Steigerung der EC₅₀-Werte, welche in der höheren Zellzahl noch stärker in Erscheinung trat (1,73 vs. 4,49 µmol/L bei W1; 10.000 Zellen). Besonders interessant ist jedoch die massive Steigerung der EC₅₀ von Cisplatin in W1CR Zellen, welche aus einer Kultivierung auf Kollagen resultierte und parallel mit den Ergebnissen der W1 Zellen in der höheren Zellzahl stärker zum Tragen kam (11,34 vs. 29,30 µmol/L bei W1CR; 10.000 Zellen). Hierbei sei erwähnt, dass die Minderung der toxischen Wirkung von Cisplatin in Relation zu nicht resistenten W1 Zellen nahezu identisch war, wodurch sich bei der höheren Zellzahl keine Änderung der Resistenzfaktoren ergaben (Rf: 6,5). Bei Betrachtung der absoluten EC₅₀-Werte fällt jedoch die bereits erwähnte stark reduzierte Toxizität des Zytostatikums bei W1CR Zellen infolge einer Kultivierung auf Kollagen auf. Diese Befunde sind im Vergleich zum A2780/A2780cis Zellsystem besonders interessant, da sich ein beachtlicher Unterschied in der Veränderung der Wirkung von Cisplatin durch Präsenz von Kollagen als Substanz der EZM ergibt. Während eine Kultivierung auf Kollagen bei A2780 Zellen mit einer leichten Sensitivierung einherging, rief dies bei cisplatinresistenten A2780cis Zellen nahezu keine Veränderung in der Cisplatintoxizität hervor (Tabelle 24). Dahingegen scheint die Gegenwart von Kollagen sowohl bei W1 als auch bei W1CR Zellen eine beachtliche Minderung der toxischen Wirkung des Zytostatikums zu bewirken. Dies deutet folglich auf grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen hin, mit denen beide Zellsysteme die toxische Wirkung von Cisplatin umgehen. Eine Überschneidung von bestimmten Mechanismen beider cisplatinresistenter Zellen, welche letztlich zu einer gesteigerten Resistenz beitragen, kann hierbei nicht ausgeschlossen werden. Für die Aufklärung dieser Unterschiede im Detail sind weiterführende Untersuchungen notwendig, jedoch scheint eine zelladhäsionsvermittelte

Chemoresistenz ein aktiv genutzter Mechanismus der W1CR Zellen zu sein. Diese Befunde zusammengenommen können ein Ansatz für die Erklärung der differenzierten Wirksamkeit vom niedermolekularen Heparin Tinzaparin im Kontext einer Chemoresistenz der A2780cis und W1CR Zellen darstellen. So ist es denkbar, dass die in A2780cis Zellen prävalenten Signalkaskaden inklusive der Mechanismen, welche letztlich den resistenten Phänotyp charakterisieren, durch Tinzaparin partiell antagonisiert werden, während in W1CR Zellen andere Mechanismen zur Ausübung einer Chemoresistenz zum Tragen kommen, in die das niedermolekulare Heparin nicht eingreifen kann. Hierzu bedarf es zusätzlicher Aufklärung um weitere Unterschiede von potentiell involvierten Signalkaskaden und Mechanismen beider Zelllinien herauszustellen. Im Verlauf dieser Arbeit wird dieser Aspekt erneut aufgegriffen.

5.6 Einfluss von Tinzaparin auf die Transkription in A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Die hauptsächliche Intention dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die verantwortlichen Mechanismen von Tinzaparin zu gewinnen, welche eine chemosensitivierende Wirkung in cisplatinresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen bewirken. In der Promotionsarbeit von Herrn Dr. Daniel Philipp Stölting erfolgte bereits die Darstellung der ersten Analyse eines *gene arrays* (9), welcher in gemeinsamer Kooperation von uns beiden mit Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer durchgeführt wurde, dem an dieser Stelle ein besonderer Dank gilt. Er führte die Analyse der isolierten RNA sowie die Auswertung der erhaltenen *gene array* Daten durch. Hierbei erfolgte der Vergleich von A2780cis Zellen, welche entweder unbehandelt oder mit Tinzaparin für 24 h vorinkubiert wurden. Die Auswertung der unterschiedlichen Intensitäten der mRNA Expressionen beider Behandlungsmethoden durch spezielle Programme ermöglichte anschließend die Identifikation der durch Tinzaparin beeinflussten Gene und der damit assoziierten biologischen Netzwerke. Die bereits aus vorangegangenen Arbeiten ermittelte Resistenzsignatur des A2780/A2780cis Zellsystems (406) diente ebenfalls als Vergleich, um den möglichen Einfluss des niedermolekularen Heparins auf Transkriptionsebene von Genen zu ermitteln, welche mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für die in A2780cis Zellen präsenten Chemoresistenz verantwortlich sind.

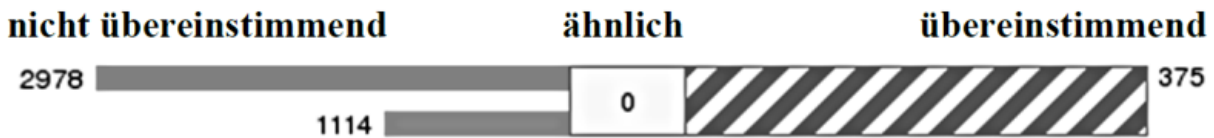


Abbildung 41: Durch Tinzaparin beeinflusste Gene in A2780cis Zellen (links oben). Gene der Resistenzsignatur (links unten). Teilweise übereinstimmende bei beiden Vergleichen regulierte Gene (mittig). Übereinstimmende bei beiden Vergleichen regulierte Gene (rechts). Diese Abbildung wurde zur Übersicht und Einleitung der folgenden Daten mit der Genehmigung von Herrn Dr. Daniel Philipp Stöltzing aus seiner Promotionsarbeit entnommen (9).

Bei der Analyse der mRNA Expression wurde deutlich, dass eine alleinige Behandlung mit dem niedermolekularen Heparin Tinzaparin mit einer massiven Deregulation auf Transkriptionsebene bei A2780cis Zellen einherging. Die hierbei hohe Anzahl an Genen ist in dieser Ausprägung zunächst überraschend, verdeutlicht jedoch das enorme Potential des Heparins, Einfluss auf eine Vielzahl biologischer Prozesse zu nehmen. Besonders interessant ist die Tatsache, dass 375 Gene, welche zur Resistenzsignatur gehören, auch durch Tinzaparin beeinflusst werden. Da die Gene der Resistenzsignatur mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für die Entfaltung der Chemoresistenz verantwortlich sind, lag es nahe, dass der chemosensitivierende Effekt von Tinzaparin zumindest anteilig auf die Deregulation dieser 375 Gene sowie der dadurch kodierten Proteine zurückzuführen ist.

5.6.1 Identifikation der in der Resistenzsignatur vorhandenen Gene von A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen und der durch Tinzaparin bedingte Einfluss auf die Transkription in A2780cis Zellen

Um einen detaillierten Überblick in die durch Tinzaparin veränderten mRNA Expressionsprofile und biologischen Netzwerke zu erhalten, wurde die Analyse des *gene arrays* in Kooperation mit Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer fortgesetzt, welcher eine tiefere Auswertung der bereits erhobenen Daten vornahm. Hierbei wurden zunächst jene 375 Gene näher untersucht, welche sowohl in der Resistenzsignatur vorkamen, als auch durch Tinzaparin moduliert wurden. Es wurde ersichtlich, dass eine Vielzahl *upregulierter* Gene in der Resistenzsignatur durch die Behandlung mit Tinzaparin *downreguliert* wurden. Ebenso trat der umgekehrte Fall ein, dass in der Resistenzsignatur *downregulierte* Gene durch Tinzaparin *upreguliert* wurden. Dies führte folglich zur Vermutung, dass die in A2780cis Zellen hochregulierten Gene einen entsprechenden Beitrag für die Präsenz der Chemoresistenz leisten, während jene mit reduzierter Expression eine Inhibition in der Entwicklung einer Resistenz fördern können. Der überraschende Befund, dass Tinzaparin dazu befähigt ist, eine Gegenregulation von Genen der Resistenzsignatur zu bewirken, führte schließlich zu

5. Ergebnisse & Diskussion

Literaturrecherchen in der PubMed Datenbank, um einen näheren Einblick in die biologischen Funktionen zu erhalten, welche mit diesen Genen assoziiert sind. Eine Auswahl bestimmter Gene ist folgend dargestellt.























Gensymbol	A2780cis + Tinzaparin	A2780cis	Biologische Funktion
ARMCX2	2,02 	-18,47 	Verminderte Expression in cisplatinresistenten Ovarialkarzinomzellen, evtl. Tumorsuppressor (407)
AMOTL2	2,15 	-3,61 	Identifiziert als Aktivator des Tumorsuppressors LATS2 (408)
BCL6	2,23 	-3,74 	BCL-6 Proteinexpression assoziiert mit verbesserter Überlebensrate in Lymphomen des ZNS (409)
CAPZA1	3,45 	-2,17 	Potentieller Marker für eine gute Prognose bei Tumoren des Magens (410)
FAM107B	2,31 	-6,42 	Expression in diversen Tumorarten downreguliert, evtl. Tumorsuppressor (411)
PCM1	2,58 	-3,12 	Verringerte Expression in primären Ovarialkarzinomen im Vergleich zu normalem Ovarialgewebe (412)
SOX4	3,68 	-4,16 	Erhöhte Expression in mehreren Tumorarten, miR-138 mindert Metastasierung von Ovarialkarzinomzellen u.a. durch <i>downregulation</i> von SOX4 (413)
TSC22D1	2,38 	-3,13 	Vermutlich Tumorsuppressor (414)
TPM1	2,01 	-2,26 	Vermutlich Tumorsuppressor in Brustkarzinomzellen (415)
UACA	2,44 	-9,31 	<i>Downreguliert</i> in Tumoren der Lunge, assoziiert mit einer Förderung der Apoptose (416)
WWOX	2,12 	-2,01 	Tumorsuppressor, sensitiviert Tumorzellen gegenüber Paclitaxel und Cisplatin (417,418)

Tabelle 26: Zusammenstellung ausgewählter Gene der Resistenzsignatur von A2780cis Zellen (blaue Balken), welche durch Tinzaparin *upreguliert* wurden (rote Balken). Dargestellt sind die Gene durch ihr entsprechendes Gensymbol mit Angabe der Änderung der mRNA Expression als Faktor bzw. Zahl. Zur Identifikation der mit dem Gen assoziierten biologischen Funktionen erfolgte eine Literaturrecherche für jedes Gen in der PubMed Datenbank. Die hierbei dargestellte Tabelle zeigt ausgewählte Gene, die durch Tinzaparin um mindestens Faktor 2 hochreguliert wurden und in der Literatur biologisch relevante Daten existieren.

Anhand der in der PubMed Datenbank befindlichen Literatur wurde deutlich, dass Gene, wie beispielsweise ARM CX2, FAM107B und WWOX (Tabelle 26), welche in cisplatinresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu nicht-resistenten A2780 Zellen beträchtlich *downreguliert* waren, häufig mit einer Funktion als Tumorsuppressor in Verbindung stehen. Die in den aufgezeigten Studien ermittelten Funktionen des jeweiligen Gens erfolgten hierbei nicht immer in Tumoren ovarialen Ursprungs und wurden nicht stets im Kontext einer Chemoresistenz untersucht. Folglich lassen diese Befunde eine limitierte Aussage über die

Funktionalität und Übertragbarkeit in cisplatinresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen zu. Dennoch unterstreichen sie eine potentielle antitumorale Wirkung des Tinzaparins und eine mögliche Involvierung in die vorherrschenden Mechanismen einer Chemoresistenz in benannten Zellen. Besonders interessant ist die beträchtliche Gegenregulation, die mit einer Inkubation mit dem niedermolekularen Heparin Tinzaparin einherging. Im Kontext einer Chemoresistenz treten vor allem die Gene UACA und WWOX in Erscheinung. Da Erstgenanntes in der Literatur mit der Förderung einer Apoptose assoziiert wird, kann vermutet werden, dass die enorm erniedrigte Expression (Faktor 9,31) in cisplatinresistenten A2780cis Zellen ein Beitrag zu einem Mechanismus der Umgehung einer Apoptose darstellt. Die beträchtliche Gegenregulation durch Tinzaparin könnte somit den Einfluss an entsprechenden Funktionen des Gens vergrößern, mit einer gesteigerten Tendenz zur Apoptose der Zellen als Konsequenz. Weiterhin sind die sensitivierenden Eigenschaften von WWOX gegenüber dem Zytostatikum Paclitaxel in Ovarialkarzinomzellen hervorzuheben (417), da dieses Gen in seiner Expression ebenfalls durch Tinzaparin hochreguliert wurde. Eine weitere Studie konnte eine Interaktion des Proteins WWOX mit einer bestimmten Isoform von p63 in Osteosarkomzellen zeigen, welches mit einer gesteigerten Chemosensitivität gegenüber Cisplatin einherging (418). Insbesondere der letzte Befund könnte auch als ein Mechanismus zur Entfaltung der Chemoresistenz in A2780cis Ovarialkarzinomzellen angesehen werden, welcher durch die erniedrigte Expression des Gens zum Ausdruck kommt. Die durch Tinzaparin eintretende Gegenregulation könnte somit einen Beitrag zur gesteigerten Toxizität des Zytostatikums beisteuern und unterstreicht erneut das chemosensitivierende Potential des niedermolekularen Heparins.

An dieser sei Stelle erwähnt, dass auch Gene durch Tinzaparin derart gegenreguliert wurden, dass eine Argumentation im Sinne einer antitumoral vermittelten Wirkung nicht zutrifft. Als Beispiel ist das Gen SOX4 genannt, welches ebenfalls durch Tinzaparin *upreguliert* wurde. Es konnte eine gesteigerte Expression des Gens in diversen Tumorarten festgestellt und eine Inhibition mitunter mit einer verminderten Metastasierung in Verbindung gebracht werden (413). Inwiefern solche der These entgegengesetzte Befunde bei der in A2780cis Zellen präsenten Chemoresistenz zum Tragen kommen, gilt es aufzuklären.

5. Ergebnisse & Diskussion























Gensymbol	A2780cis + Tinzaparin	A2780cis	Biologische Funktion
CD97	-2,16 	3,80 	Erhöhte Proteineexpression in rezidiven Ovarialtumoren im Vergleich zu entsprechenden Primärtumoren, <i>knockdown</i> geht mit einer reduzierten Chemoresistenz gegenüber Carboplatin einher (419)
CDC25B	-2,33 	2,50 	Proteinexpression assoziiert mit schlechter Prognose bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen (420)
DEF6	-2,71 	3,20 	Identifiziert als <i>target Gen</i> von p53, Überexpression des Proteins assoziiert mit einer reduzierten Cisplatin vermittelten Apoptose in Brustkarzinomzellen (421).
ETV4	-3,98 	2,07 	Rolle in Mechanismen einer Chemoresistenz, <i>upreguliert</i> in Ovarialtumoren mit adjuvanter Chemotherapeutikabehandlung im Vergleich zum unbehandelten vorherigen Zustand (422).
FGFR1	-3,00 	8,95 	Inhibition von FGFR1 steigert die Sensitivität von Cisplatin in Ovarialkarzinomzellen (423).
LGALS1	-2,96 	2,32 	Galektin-1 Überexpression fördert Progression und Chemoresistenz gegenüber Cisplatin in epithelialen Ovarialkarzinomen (424)
MT2A	-2,15 	4,92 	Rolle in Mechanismen einer Chemoresistenz, <i>upreguliert</i> in Ovarialtumoren mit adjuvanter Chemotherapeutikabehandlung im Vergleich zum unbehandelten vorherigen Zustand (422)
NFIB	-2,52 	3,65 	Gesteigerte Proteineexpression in oxaliplatinresistenten Karzinomzellen des Kolons und der Blase (425)
SGK3	-3,35 	5,65 	Hinweise auf eine AKT-unabhängige Involvierung in onkogene PI3K-Signalmechanismen (426)
TIMP1	-4,25 	4,89 	Steigert die Expression von Proteinen, die mit einer Chemoresistenz assoziiert werden und eine erhöhte Expression selbst vermittelt Chemoresistenz in Brustkarzinomzellen (427,428)
TYMP	-15,11 	2,07 	Marker für einen aggressiven Tumorphänotyp, welcher u.a. mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber Cisplatin assoziiert wird (429,430)

Tabelle 27: Zusammenstellung ausgewählter Gene der Resistenzsignatur von A2780cis Zellen (rote Balken), welche durch Tinzaparin *downreguliert* wurden (blaue Balken). Dargestellt sind die Gene durch ihr entsprechendes Gensymbol mit Angabe der Änderung der mRNA Expression als Faktor bzw. Zahl. Zur Identifikation der mit dem Gen assoziierten biologischen Funktionen erfolgte eine Literaturrecherche für jedes Gen in der PubMed Datenbank. Die hierbei dargestellte Tabelle zeigt ausgewählte Gene, die durch Tinzaparin um mindestens Faktor 2 runterreguliert wurden und in der Literatur biologisch relevante Daten existieren.

In Tabelle 27 sind ausgewählte Gene dargestellt, welche in A2780cis Zellen deutlich gesteigert exprimiert wurden im Vergleich zu nicht-resistenten A2780 Zellen. Laut Literaturrecherche lassen sich jene Gene mit onkogenen Eigenschaften in Verbindung bringen, welche den entsprechenden Tumor, bzw. Tumorzellen also sozusagen positiv in der Progression beeinflussen. So wird beispielsweise die Proteinexpression von CDC25B mit einer schlechten Prognose bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen assoziiert (420). Von besonderem Interesse hierbei ist jedoch die Korrelation einer gesteigerten Expression von einer Vielzahl dieser Gene mit einer dadurch assoziierten Förderung einer Chemoresistenz gegenüber platinhaltigen Zytostatika. So waren beispielsweise die Gene ETV4 und MT2A in cisplatinresistenten A2780cis Zellen deutlich hochreguliert (Faktor 2,07 bzw. 4,92). Die Tatsache, dass jene Gene ebenfalls in Ovarialtumoren nach adjuvanter Chemotherapie hochreguliert vorzufinden waren und bereits mit einer Rolle in Mechanismen einer Chemoresistenz in Verbindung gebracht wurden (422), legt Vermutungen über einen aktiven Gegenregulationsmechanismus des entsprechenden Tumors nahe, um die toxische Wirkung des Zytostatikums abzuschwächen. Die durch eine Tinzaparinbehandlung resultierende Gegenregulation sämtlicher präsentierter Gene fällt hierbei besonders auf und ist in diesem Ausmaß bemerkenswert. Den Ergebnissen zufolge ist das niedermolekulare Heparin dazu befähigt, die Expression von einem ausgeprägten Repertoire an Genen, welche in der Literatur mit einer Förderung einer Chemoresistenz in Verbindung gebracht werden, umzukehren. So wird die Expression des massiv hochregulierten Gens FGFR1 in A2780cis Zellen (Faktor 8,95) durch die Präsenz von Tinzaparin um ein Vielfaches reduziert. Die beschriebene Inhibition von FGFR1 mit einer resultierenden Steigerung der Cisplatinempfindlichkeit in Ovarialkarzinomzellen (423) könnte somit einen Anteil der sensitivierenden Mechanismen in A2780cis Zellen darstellen. Die hierbei stärkste Gegenregulation durch Tinzaparin wurde bei dem Gen TYMP festgestellt. Während dieses Gen in A2780cis Zellen um den Faktor 2,07 *upreguliert* war, konnte eine Inkubation mit dem Antikoagulans eine massive Deregulation induzieren. Da das Protein mit einer Steigerung einer Cisplatinresistenz assoziiert wird (429,430), stellt dies erneut einen potentiellen Mechanismus dar, welcher für eine Begründung des Heparin Effektes in A2780cis Zellen in Frage kommt.

Somit zeichnet sich ein ähnliches Gesamtbild wie bei der davor durch das Heparin hochregulierten Gene ab (Tabelle 26). Eine Inkubation mit Tinzaparin fördert demnach eine *upregulation* von Genen mit tumorsuppressiven Eigenschaften, während jene mit der Assoziation einer gesteigerten Chemoresistenz in ihrer Expression erniedrigt werden. Ob und wie viele dieser Befunde tatsächlich am letztlichen chemosensitivierenden Effekt des Tinzaparins beteiligt sind, gilt es aufzuklären, jedoch scheint das niedermolekulare Heparin

dazu befähigt, eine umfangreiche Reprogrammierung auf Transkriptionsebene in A2780cis Zellen zu initiieren, welche mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für die Resistenzminderung gegenüber Cisplatin verantwortlich ist.

5.6.2 Identifikation von deregulierten Signalnetzwerken und biologischen Prozessen durch Tinzaparin in A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Da es sich bei den dargestellten Tabellen um einzelne Gene der Resistenzsignatur handelt, fällt ein gemeinsamer Kontext hinsichtlich potentiell involvierter biologischer Prozesse schwer. Dementsprechend wird anhand der folgenden Analyse (Abbildung 42) ein umfangreicher Überblick in die durch Tinzaparin modulierten Prozesse gegeben, um spezifische Mechanismen zu identifizieren, welche am chemosensitivierenden Effekt beteiligt sein könnten. Diese Analyse wurde durch Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer vom Institut für Humangenetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

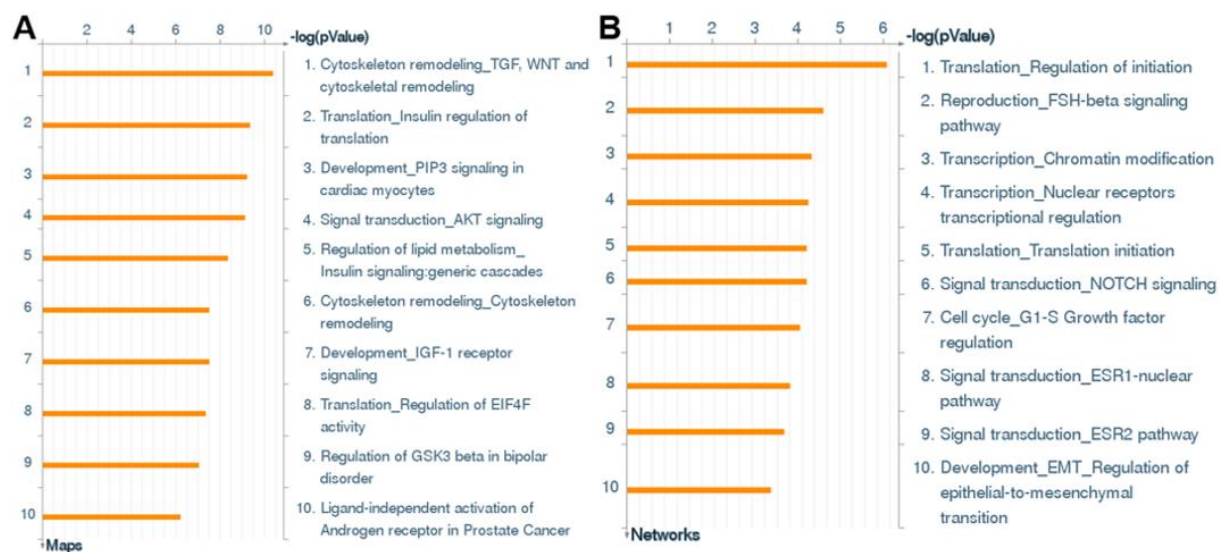


Abbildung 42: Darstellung der zehn signifikantesten deregulierten *pathway maps* (A) und *process networks* (B) in tinzaparinbehandelten cisplatinresistenten A2780cis Zellen. Die Abbildung wurde von Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer vom Institut für Humangenetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Den erhaltenen Ergebnissen aus Abbildung 42 zufolge beeinflusste das niedermolekulare Heparin besonders jene Gene, welche in mehrere *pathways* und biologische Prozesse involviert sind. Dazu zählen unter anderem Remodellierungen des Zytoskeletts, eine Insulin vermittelte Regulation einer Translation, AKT-*signaling* sowie Einflüsse auf den Lipidmetabolismus (Abbildung 42, A). Weiterhin werden besonders jene Gene in ihrer Expression durch eine Behandlung mit Tinzaparin beeinflusst, welche in Prozesse der Initiation einer Translation, Transkription und Chromatin-Modifikation sowie der Signaltransduktion involviert sind

(Abbildung 42, B). Dies bestätigt die bereits postulierte Theorie, dass das niedermolekulare Heparin dazu befähigt ist Signaltransduktionen zu initiieren, welche letztlich mit einer Veränderung auf Transkriptionsebene einhergehen. Die durch eine Behandlung mit Tinzaparin resultierende Veränderung der Translation diverser Proteine könnte somit ausschlaggebend für einen *switch* bestimmter Signalkaskaden sein, welche maßgeblich an der Reduktion der Chemoresistenz beteiligt sind. Die Identifikation entsprechender Signalkaskaden und deren Proteine war folglich Bestandteil der weiteren Untersuchungen.

5.7 Evaluation einer Beteiligung des PI3K-*pathways* an den Mechanismen der in A2780cis Zellen vorherrschenden Chemoresistenz

5.7.1 Einfluss des dualen Inhibitors Dactolisib (BEZ235) auf die Toxizität von Cisplatin in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Bei Betrachtung der durch Tinzaparin deregulierten *pathways* in cisplatinresistenten A2780cis Zellen (Abbildung 42, A) trat besonders das AKT-*signaling* hervor. Diese Signalkaskade wird wie in Kapitel 2.2.4 bereits beschrieben mit der Förderung einer Chemoresistenz gegenüber Cisplatin in Verbindung gebracht (161), welche folglich eine geringere Toxizität des Zytostatikums bedeuten würde. Somit stand zunächst eine funktionelle Überprüfung der Involvierung genannter Kaskade im Kontext einer reduzierten Cisplatintoxizität in A2780cis Zellen im Fokus. Zu diesem Zweck wurde der duale Inhibitor Dactolisib (BEZ235) verwendet, welcher sowohl den PI3K-*pathway*, als auch die mTOR-Kinase-Aktivität inhibieren kann (66).

5. Ergebnisse & Diskussion

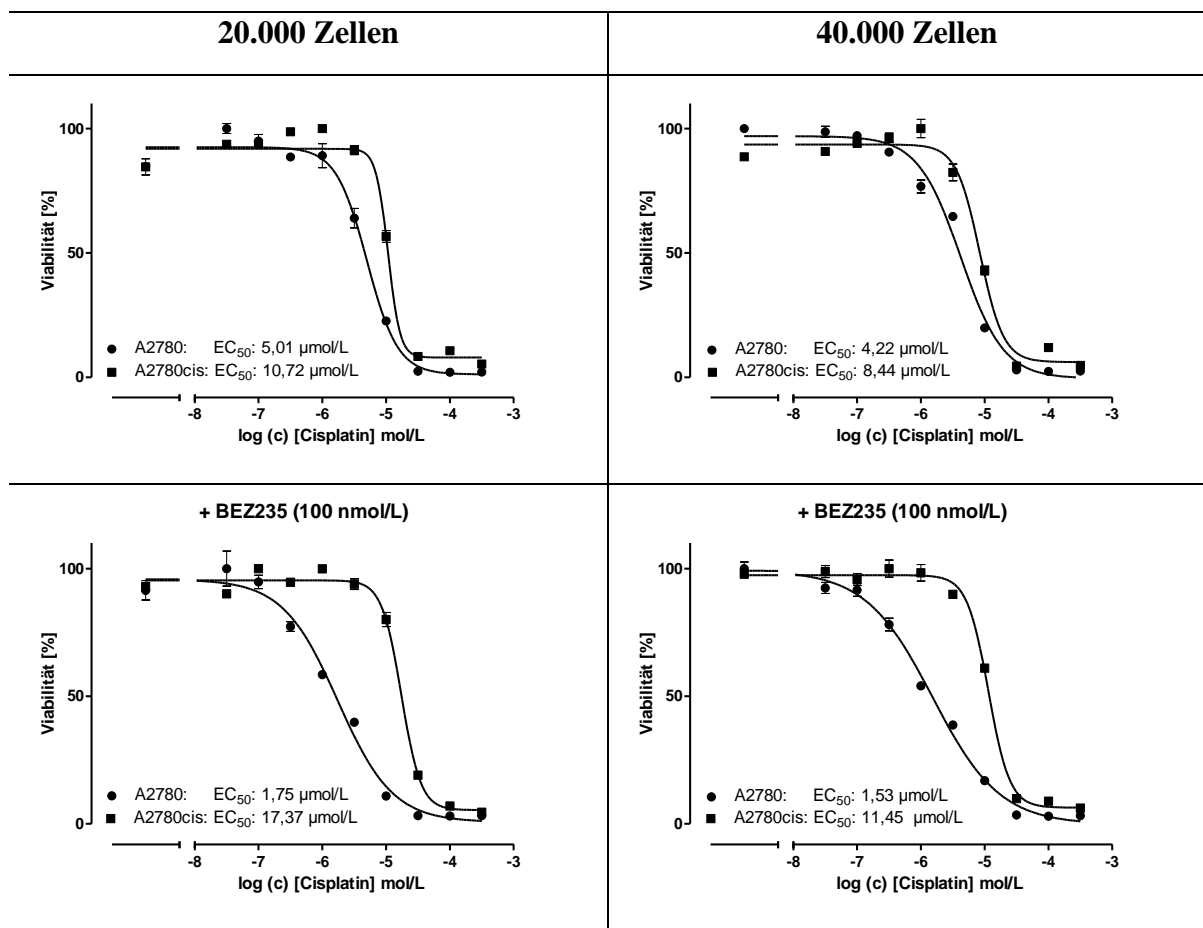


Abbildung 43: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 100 nmol/L BEZ235 in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

BEZ235-Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubations- ansatz	Zellzahl/ Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [μmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [μmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	20.000	5,44	0,18	3,64	5,04	0,10	9,06	2,5
		40.000	5,32	0,05	4,84	5,11	0,07	7,70	1,6
1,5	Cisplatin + 100 nmol/L BEZ235	20.000	5,74	0,03	1,82	4,83	0,09	14,89	8,2
		40.000	5,70	0,25	2,00	4,85	0,34	13,99	7,0

Tabelle 28: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 100 nmol/L BEZ235 (Dactolisib) in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 (n=2) und 40.000 Zellen (n=3) und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf).

Im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Cisplatin bewirkte eine zusätzliche Vorinkubation mit BEZ235 (Dactolisib) deutliche Veränderungen in den Toxizitäten des Zytostatikums in beiden Zelllinien. Nicht-resistente A2780 Zellen wurden durch Anwesenheit des Inhibitors deutlich sensitiver gegenüber Cisplatin, was sich bei beiden Zellzahlen durch erniedrigte EC₅₀-Werte ausdrückt (bspw. 4,84 vs. 2,00 µmol/L bei A2780; 40.000 Zellen). Folglich scheinen die inhibierten Komponenten in A2780 Ovarialkarzinomzellen in Mechanismen involviert zu sein, welche bei einer durch Cisplatin induzierten Toxizität eine funktionelle Rolle spielen. Zudem könnte hierbei vermutet werden, dass selbst die als nicht cisplatinresistent deklarierten A2780 Zellen den PI3K/mTOR-*pathway* nutzen, um der toxischen Wirkung des Zytostatikums entgegenzuwirken. Folglich könnte dieser Mechanismus als eine intrinsische Resistenz bezeichnet werden. Ein additiv toxischer Effekt von BEZ235 kann hierbei allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Besonders interessant ist der bei cisplatinresistenten A2780cis Zellen entgegengesetzte Effekt, welcher durch eine Vorinkubation mit dem Inhibitor eintrat. Demnach hatte eine Behandlung mit BEZ235 eine bedeutende Minderung der durch Cisplatin induzierten Toxizität bei beiden Zellzahlen zur Konsequenz (bspw. 7,70 vs. 13,99 µmol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen). Der ausgeprägte Unterschied der Resistenzfaktoren (bspw. 1,6 vs. 7,0 bei 40.000 Zellen) resultiert folglich sowohl aus dem chemosensitivierenden Effekt des Inhibitors bei A2780 Zellen, als auch aus der durch BEZ235 resultierenden Reduktion der Cisplatintoxizität bei A2780cis Zellen. Diese Befunde legen nahe, dass hinsichtlich der erworbenen Chemoresistenz gegenüber Cisplatin eine Umstrukturierung der Signalkaskaden und -netzwerke in A2780cis Zellen stattgefunden haben muss. Da die Familie der PI3-Kinasen in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert ist (426), sind konkrete Aussagen über potentiell beteiligte *pathways* an der in A2780cis Zellen vorherrschenden Chemoresistenz zu diesem Zeitpunkt schwer zu treffen. Da das AKT-*signaling* eines der bedeutendsten *downstream*-Effektoren vom PI3K-*signaling* darstellt (426), scheint eine Beteiligung der erwähnten Komponenten an potentiellen Mechanismen, welche bei der in cisplatinresistenten A2780cis Zellen präsenten Chemoresistenz zum Tragen kommen, unwahrscheinlich.

5.8 Evaluation einer Beteiligung des *Wnt-pathways* an den Mechanismen der in A2780cis Zellen vorherrschenden Chemoresistenz

5.8.1 Zytotoxizität des dualen Inhibitors FH535 in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Den erhobenen Daten zufolge scheinen andere Mechanismen in A2780cis Zellen für die reduzierte Toxizität des Cisplatin relevant zu sein. Bei den zehn am stärksten deregulierten *pathway maps* (Abbildung 42, A) fällt besonders das *Wnt-signaling* ins Auge. Da diese Kaskade in der Literatur bereits mit dem Auftreten von Chemoresistenzen in Verbindung gebracht werden konnte (371,431,432), war die Untersuchung dieses *signalings* in Aspekten einer in A2780cis Zellen vorherrschenden Chemoresistenz Bestandteil der weiteren Experimente. Zur Überprüfung der Relevanz dieser Kaskade in beiden Zelllinien wurden zunächst Zytotoxizitätsstudien mit dem sog. *small molecule* Inhibitor FH535 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen dualen Inhibitor des Wnt/ β -catenin- sowie des PPAR-*signalings* (433). Mehrere Studien konnten FH535 bereits inhibierende Eigenschaften auf das Wachstum diverser Tumorzellen zuweisen (434–436).

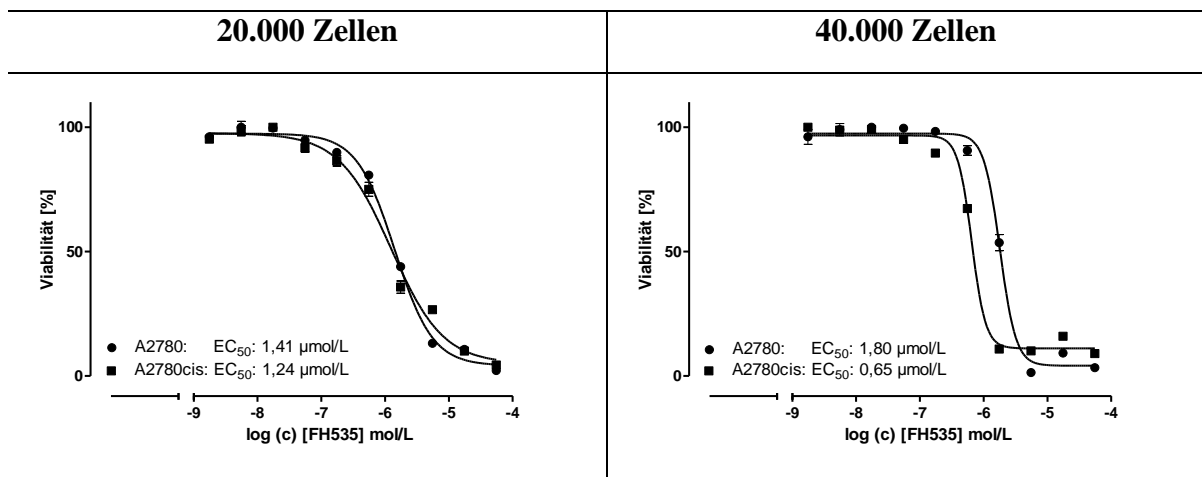


Abbildung 44: Zytotoxizität von FH535 in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

		A2780			A2780cis		
Inkubations- ansatz	Zellzahl/ Well	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]
		MW	Stabw		MW	Stabw	
FH535	20.000	5,69	0,22	2,04	5,93	0,14	1,17
	40.000	5,64	0,12	2,27	6,00	0,33	1,00

Tabelle 29: Übersicht der Zytotoxizität von FH535 in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen (n=3).

Eine Inkubation der A2780 und A2780cis Zellen mit FH535 ging mit einer ausgeprägten zytotoxischen Wirkung einher. Demzufolge ist die Toxizität dieser Substanz in beiden Zelllinien sogar größer als die des Cisplatin. Diese Tatsache fällt bei den resistenten A2780cis Zellen besonders ins Gewicht. Die Konfluenz der Zellen schien hier keinen Einfluss auf die Zytotoxizität beider Zelllinien nach sich zu ziehen (bspw. 2,04 vs. 2,27 µmol/L bei A2780). Von besonderem Interesse ist die erhöhte Zytotoxizität von FH535 in A2780cis Zellen im Vergleich zu nicht-resistenten A2780 Zellen, welche sich bei beiden Zellzahlen darstellte. So war der Inhibitor jeweils um etwa den Faktor 2 toxischer in cisplatinresistenten A2780cis Zellen im Vergleich zu A2780 Zellen (bspw. 2,27 µmol/L bei A2780 vs. 1,00 µmol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen). Zusammengefasst kann dem Inhibitor eine ausgeprägte toxische Wirkung zugesprochen werden, welche besonders in cisplatinresistenten Zellen zum Tragen kommt. Die Tatsache, dass eine durch die Substanz verursachte Inhibition des Wnt-Signalwegs mit einer deutlich erhöhten Toxizität in A2780cis Zellen einherging lässt vermuten, dass letztgenannte Zellen in einer ausgeprägteren Abhängigkeit zum Wnt-*pathway* stehen. Eine Beteiligung des Wnt-*pathways* in die Mechanismen der Chemoresistenz in A2780cis Zellen kann zwar zu diesem Zeitpunkt nicht abschließend geklärt werden, jedoch liefert die bereits erwähnte Assoziation der Signalkaskade mit Aspekten einer Chemoresistenz erstmalige Hinweise auf eine Involvierung genannter Kaskade in Mechanismen zur Reduktion einer Cisplatin-toxizität in A2780cis Zellen. Interessanterweise konnte eine andere Studie ähnliche Ergebnisse bei doxorubicinresistenten Osteosarkomzellen zeigen. Hier war die Behandlung mit FH535 für die doxorubicinresistenten Zellen ebenfalls toxischer im Vergleich zur entsprechenden nicht-resistenten Zelllinie (437).

5.8.2 Einfluss des dualen Inhibitors FH535 auf die Toxizität von Cisplatin in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Um Aussagen über eine potentielle Beteiligung des *Wnt-pathways* in das Phänomen der Chemoresistenz in A2780cis Zellen treffen zu können, wurde im Folgenden durch Einsatz einer subtoxischen Konzentration von FH535 untersucht, inwiefern sich eine Inhibition des *Wnt-pathways* auf die Toxizität von Cisplatin auswirkt.

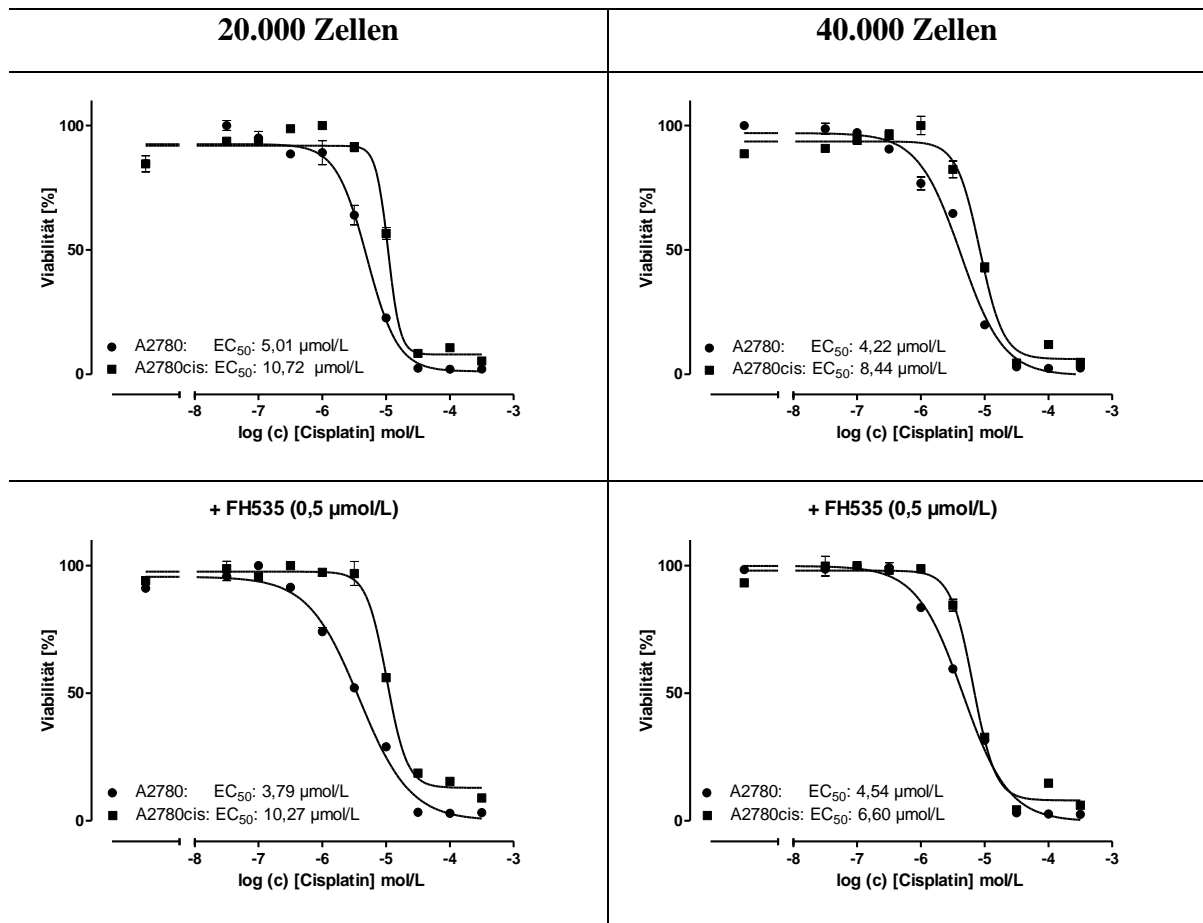


Abbildung 45: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 0,5 $\mu\text{mol/L}$ FH535 in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

FH535-Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubations- ansatz	Zellzahl/ Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	20.000	5,45	0,13	3,57	4,89	0,09	12,80	3,6
		40.000	5,37	0,05	4,23	5,07	0,10	8,59	2,0
1,5	Cisplatin + 0,5 µmol/L FH535	20.000	5,38	0,08	4,14	4,96	0,06	10,88	2,6
		40.000	5,37	0,05	4,26	5,18	0,15	6,60	1,5

Tabelle 30: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 0,5 µmol/L FH535 in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).

Der Einsatz einer FH535-Konzentration unterhalb der jeweiligen EC₅₀ der A2780 und A2780cis Zellen bewirkte in ersteren Zellen keinen Einfluss auf die Cisplatin-toxizität (bspw. 4,23 vs. 4,26 µmol/L bei A2780; 40.000 Zellen). Eine Vorinkubation des Inhibitors vor einer Cisplatinzugabe ging in cisplatinresistenten Zellen jedoch mit einer Reduktion der EC₅₀-Werte in beiden Zellzahlen einher (bspw. 8,59 vs. 6,60 µmol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen), welche sich ebenfalls in den erniedrigten Resistenzfaktoren widerspiegelt (bspw. 2,0 vs. 1,5 bei 40.000 Zellen). Der Unterschied in der Beeinflussung der Toxizität des Zytostatikums durch den Einsatz des Inhibitors liefert hierbei einen Einblick in die Relevanz der Signalkaskade im beschriebenen Kontext. Demzufolge ist es denkbar, dass der *Wnt-pathway* zumindest partiell an der in den A2780cis Zellen präsenten Chemoresistenz beteiligt ist. Zum einen, da ein Einsatz subtoxischer Konzentrationen des Inhibitors in einer gesteigerten Toxizität des Zytostatikums resultierte, zum anderen, da dieser Effekt in nicht-resistenten A2780 Zellen nicht eintrat. Eine additive toxische Wirkung durch Anwesenheit des Inhibitors als Ursache für den beschriebenen Effekt in A2780cis Zellen kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, scheint aufgrund des diskutierten Ausbleibens in A2780 Zellen jedoch eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. In der Literatur existierende Befunde, in denen die Inhibition des *Wnt-pathways* mit gesteigerten Sensitivitäten gegenüber Chemotherapeutika einhergeht (438,439), bekräftigen die hier postulierte Theorie einer durch *Wnt-signaling* anteilig vermittelten Chemoresistenz in A2780cis Ovarialkarzinomzellen. Das weiterhin beschriebene gesteigerte *Wnt-signaling* infolge einer Behandlung mit Chemotherapeutika (440,441) könnte darüber hinaus auch eine Erklärung für die erhöhte Toxizität des Inhibitors in A2780cis im Vergleich zu A2780 Zellen liefern. Dies würde außerdem zu der bereits genannten Studie an doxorubicinresistenten Osteosarkomzellen passen (437). Weitere Befunde über eine teilweise erhöhte Toxizität von FH535 gegenüber verschiedenen Tumorzellen mit gesteigerter *Wnt*-Aktivität untermauern

diese These (433). Für die Bestätigung der hier postulierten Theorie bedarf es weiterer Forschung. Allerdings scheint anhand der bisher erhobenen Daten sowie den mit in der Literatur befindlichen Erkenntnissen eine Involvierung des *Wnt-pathways* in die prävalenten Mechanismen der in A2780cis präsenten Chemoresistenz sehr wahrscheinlich.

5.8.3 Einfluss von 5-Aminosalicylsäure auf die Toxizität von Cisplatin in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Der genaue Wirkmechanismus der Wnt-Inhibition von FH535 ist bis heute nicht einheitlich aufgeklärt und es existieren mehrere mögliche Mechanismen (433,437). Da es sich aber wie bereits erwähnt um einen dualen Inhibitor handelt, der auch in der Lage ist PPAR γ und $-\delta$ zu antagonisieren (433), galt es zu untersuchen, ob der resistenzmindernde Effekt von FH535 alleine der *Wnt-pathway* Inhibition zuzuschreiben ist, bzw. inwiefern sich ein Antagonismus von PPAR γ auf die Cisplatintoxizität in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen auswirkt. Hierzu erfolgte eine Vorinkubation mit 5-Aminosalicylsäure, welches unter anderem als Induktor und Aktivator von PPAR γ beschrieben ist (442–444).

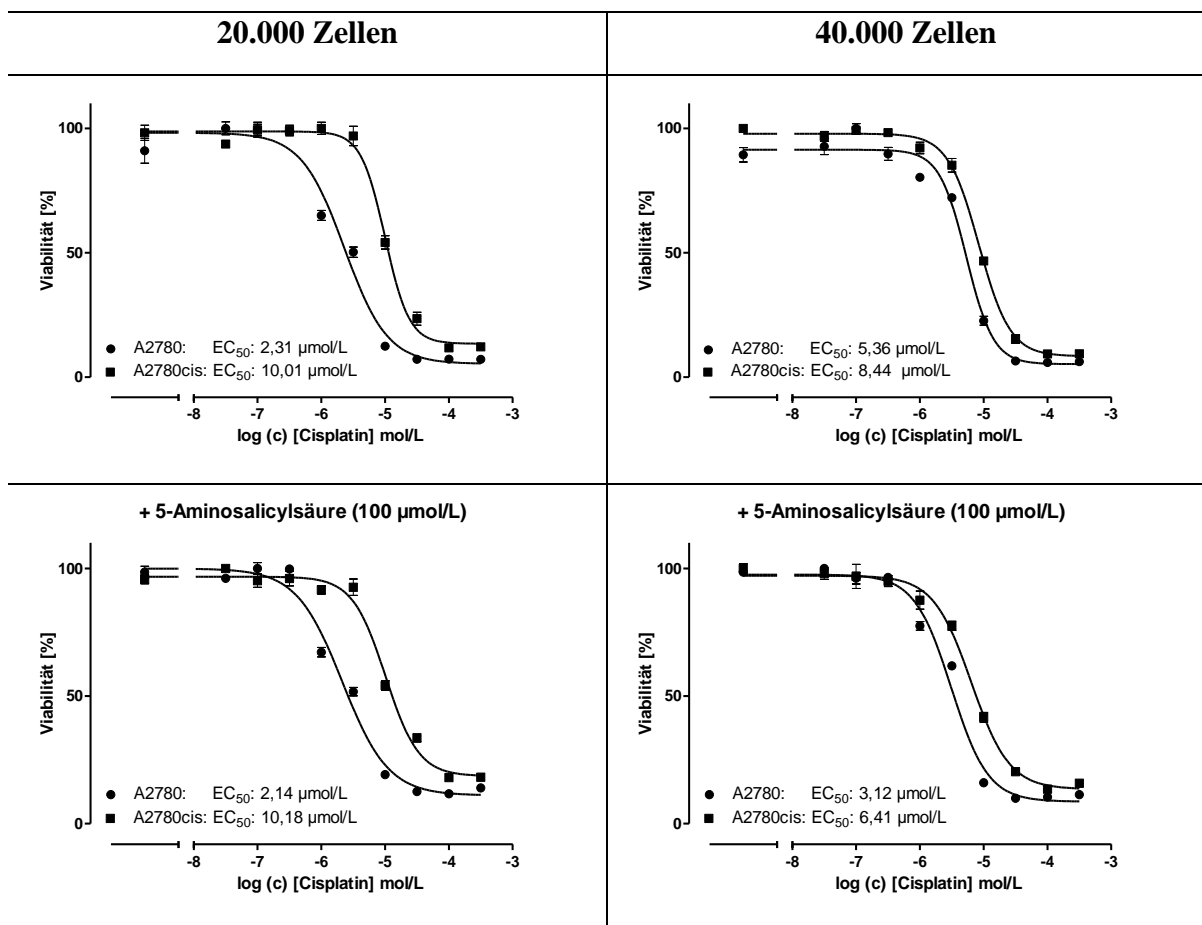


Abbildung 46: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 100 µmol/L 5-ASA in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

5-ASA Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubations- ansatz	Zellzahl/ Well	A2780			A2780cis			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	20.000	5,44	0,18	3,64	5,04	0,10	9,06	2,5
		40.000	5,32	0,05	4,84	5,11	0,07	7,70	1,6
1,5	Cisplatin + 100 µmol/L 5-ASA	20.000	5,48	0,17	3,31	5,10	0,11	8,00	2,4
		40.000	5,43	0,07	3,72	5,24	0,04	5,80	1,6

Tabelle 31: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 100 µmol/L 5-ASA in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).

Eine Vorinkubation der A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen mit 5-Aminosalicylsäure in einer Konzentration von 100 µmol/L resultierte in beiden Zelllinien in einer leichten Steigerung der Toxizität von Cisplatin (bspw. 7,70 vs. 5,80 µmol/L bei A2780cis; 40.000 Zellen), woraus sich folglich auch keine Änderung in den Resistenzfaktoren ergibt (bspw. 1,6 bei 40.000 Zellen). Die erhobenen Daten geben hierbei Aufschluss über eine potentielle Involvierung einer PPAR γ Antagonisierung hinsichtlich des resistenzmindernden Effektes durch FH535. Für den Fall, dass der besagte Effekt vom dualen Inhibitor der Wirkung auf PPAR γ zuzuschreiben war, wäre eine Steigerung der Chemosensitivität in A2780cis Ovarialkarzinomzellen durch Induktion und Aktivierung mithilfe von 5-Aminosalicylsäure die logische Schlussfolgerung. Da hierbei jedoch der entgegengesetzte Effekt eintrat, scheint der chemosensitivierende und toxische Effekt des FH535 unabhängig von PPAR γ zu sein. Dennoch kann dadurch eine Beteiligung von PPAR γ und δ nicht gänzlich ausgeschlossen werden, jedoch ist die Inhibition der Wnt-Signalkaskade durch FH535 der wahrscheinlich hauptverantwortliche Mechanismus der resistenzmindernden Wirkung in A2780cis Ovarialkarzinomzellen. Interessanterweise wurde die 5-Aminosalicylsäure in einer Studie als Inhibitor des Wnt/ β -catenin-*pathways* beschrieben (445) was eine Erklärung für die leicht sensitivierende Wirkung in cisplatinresistenten A2780cis Zellen darstellen könnte. Diese These kann an dieser Stelle jedoch nicht bestätigt werden.

5.9 Evaluation einer Beteiligung des *Wnt-pathways* an den Mechanismen der in W1CR Zellen vorherrschenden Chemoresistenz

5.9.1 Einfluss des dualen Inhibitors FH535 auf die Toxizität von Cisplatin in W1 und W1CR Ovarialkarzinomzellen

Da die bereits durchgeführten Toxizitätsstudien in Gegenwart von Kollagen als Substanz der EZM mögliche Unterschiede in den Resistenzmechanismen von A2780cis und W1CR Zellen aufzeigten (Kapitel 5.5), galt es nun zu untersuchen, inwieweit sich eine Inkubation mit dem *Wnt-pathway*-Inhibitor FH535 auf die Cisplatin-toxizität von W1 und cisplatinresistenten W1CR Zellen auswirkt. Daraus resultierende Erkenntnisse erlauben hierbei eine tiefere Charakterisierung des jeweiligen Resistenzprofils.

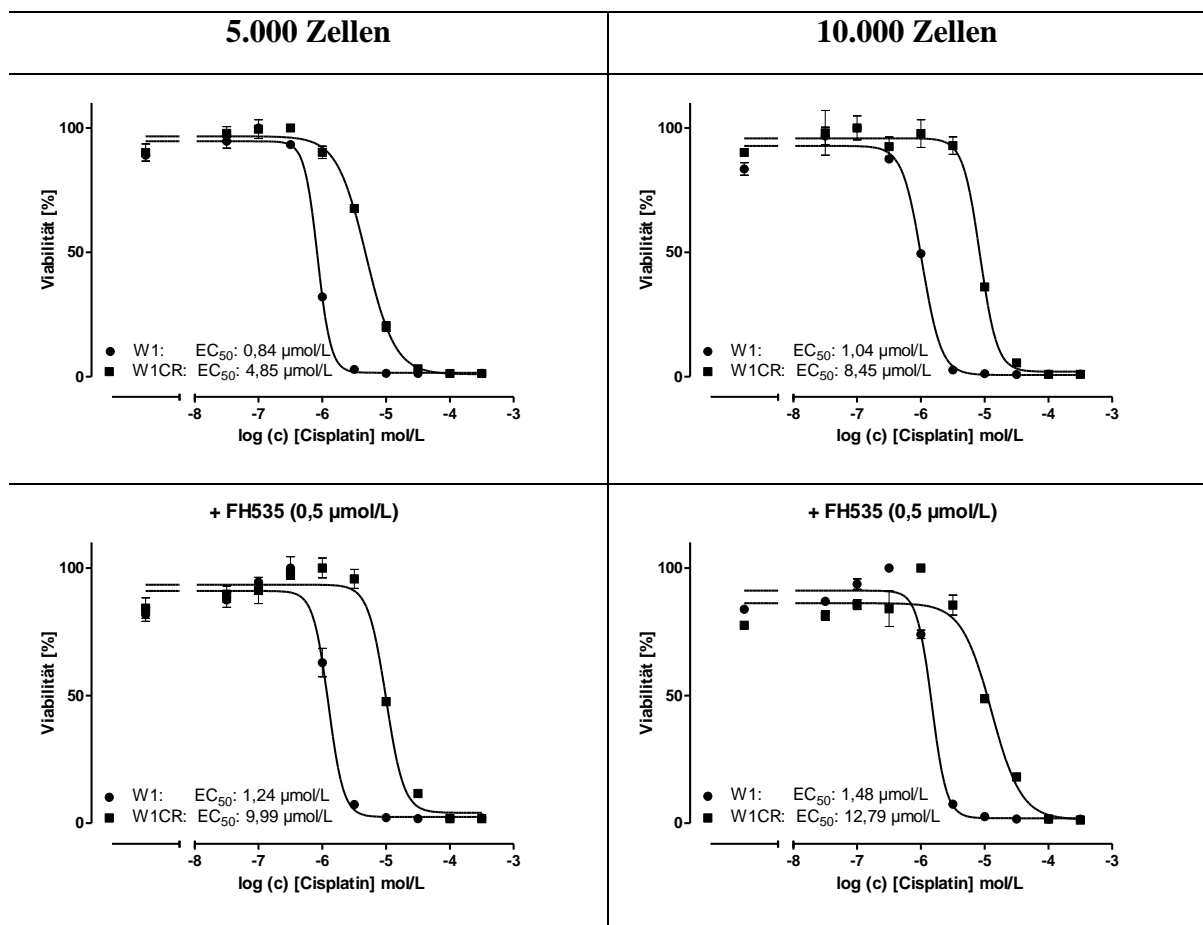


Abbildung 47: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 0,5 $\mu\text{mol/L}$ FH535 in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

FH535-Inkubation bevor Zugabe von Cisplatin [Stunden]	Inkubations- ansatz	Zellzahl/ Well	W1			W1CR			Rf
			pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [µmol/L]	
			MW	Stabw		MW	Stabw		
0	Cisplatin	5.000	5,97	0,10	1,08	5,36	0,08	4,34	4,0
		10.000	5,91	0,08	1,24	5,15	0,07	7,12	5,7
1,5	Cisplatin + 0,5 µmol/L FH535	5.000	5,62	0,26	2,41	5,13	0,13	7,38	3,1
		10.000	5,55	0,30	2,80	4,97	0,07	10,74	3,8

Tabelle 32: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 0,5 µmol/L FH535 in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).

Eine Vorinkubation mit FH535 bewirkte in beiden Zelllinien eine Reduktion der Cisplatintoxizität. Da sich besonders bei den nicht-resistenten W1 Zellen die EC₅₀ infolge einer Behandlung mit FH535 mehr als verdoppelte (bspw. 1,24 vs. 2,80 bei W1; 10.000 Zellen), waren die daraus erhaltenen Resistenzfaktoren nicht aussagekräftig und werden nicht berücksichtigt. Diese Ergebnisse stehen somit in Kontrast zu den Daten, welche unter gleichen experimentellen Bedingungen im A2780 Zellsystem gewonnen wurden. Während A2780 Zellen hinsichtlich der Cisplatintoxizität unbeeinflusst von der Präsenz des Inhibitors waren und cisplatinresistente A2780cis Zellen infolge einer Behandlung mit FH535 reduzierte EC₅₀-Werte verzeichneten, führte dies im Fall der W1/W1CR Zellen zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber dem Zytostatikum. Diese Befunde untermauern die Annahme, dass in beiden cisplatinresistenten Ovarialkarzinomzelllinien unterschiedliche Mechanismen einer Chemoresistenz zum Tragen kommen. Dies könnte somit erneut eine argumentative Grundlage für das Ausbleiben der chemosensitivierenden Wirkung des niedermolekularen Heparins Tinzaparin in W1CR Zellen darstellen. Die weitere Charakterisierung des Resistenzprofils letztgenannter Zellen ist folglich Gegenstand anderer Arbeiten.

5.10 Einfluss von Tinzaparin auf die Transkription Wnt-assoziierter Gene in A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Die bisher diskutierten Daten geben zusammengefasst einen fundierten Hinweis auf die Involvierung des Wnt-*pathways* in die zugrundeliegenden Mechanismen der Chemoresistenz in A2780cis Ovarialkarzinomzellen. Da durch die bisherigen Versuche gezeigt wurde, dass Tinzaparin eine enorme Deregulation der am Wnt-Signalweg beteiligten Komponenten induzieren kann (Abbildung 42, A), war die Identifikation jener deregulierten Elemente fortan

Gegenstand weiterer Untersuchungen. Hierzu erfolgte zunächst eine Datenanalyse des bereits durchgeführten *gene arrays* durch Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer, bei der diesmal der Fokus auf Genen lag, welche mit dem *Wnt-pathway* assoziiert sind. Die durch das niedermolekulare Heparin hervorgerufenen Veränderungen der mRNA-Level der unterschiedlichen *Wnt*-assoziierten Gene sollen hierbei einen ersten Einblick in die durch Tinazaprin induzierten funktionellen Mechanismen liefern. Die daraus anschließend interpretierten Erkenntnisse dienen hierbei u.a. als Grundlage für die weitere zielgerichtete Quantifizierung auf Proteinebene.

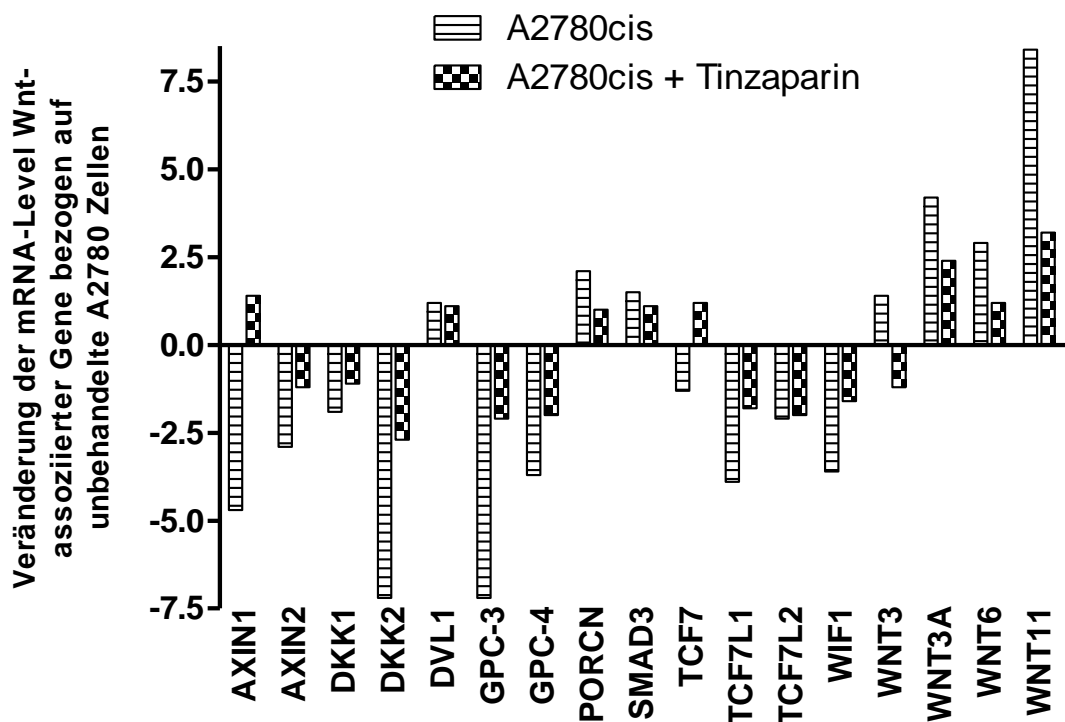


Abbildung 48: Quantifizierung der mRNA-Level von *Wnt*-assoziierten Genen in unbehandelten (Streifen) und mit Tinazaprin vorbehandelten (Quadrate) A2780cis Ovarialkarzinomzellen. Die Angabe der Änderung der mRNA Expression ist als Faktor bzw. Zahl dargestellt und wurde auf unbehandelte A2780 Zellen normalisiert (unbehandelte A2780 Zellen=0).

Aus dem Vergleich der mRNA Expression von *Wnt*-assoziierten Genen in unbehandelten A2780, A2780cis und mit Tinazaprin behandelten A2780cis Ovarialkarzinomzellen traten bedeutende Unterschiede hervor. So waren potentielle inhibitorische Komponenten der *Wnt*-Signalkaskade wie AXIN1 und -2, DKK1 und -2 sowie WIF-1 in unbehandelten A2780cis Zellen deutlich *downreguliert* im Vergleich zu unbehandelten nicht-resistenten A2780 Zellen. Weiterhin wurde eine bedeutende *upregulation* der analysierten mRNAs der *Wnt*-Proteine WNT3, WNT3A, WNT6 und WNT11 in unbehandelten A2780cis Zellen festgestellt im Vergleich zu unbehandelten A2780 Zellen. Auch wenn dies keine direkte Aussage über die Quantität der entsprechenden Proteine zulässt, scheint es plausibel, dass in jenen Zellen die

inhibitorische Aktivität auf den Wnt-Signalweg durch entsprechende Reduktion der Komponenten erniedrigt war. Zudem könnte dieser *pathway* durch den erhöhten Spiegel an Wnt-Liganden verstärkt induziert werden. Zusammengefasst stimmen diese Befunde mit vielen der bereits gewonnenen Daten überein und bekräftigen erneut die Annahme einer gesteigerten Aktivität des *Wnt-pathways* in cisplatinresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen. Besonders auffällig ist allerdings die durch Tinzaparin vermittelte Änderung der jeweiligen mRNA Expression in A2780cis Zellen. So wurde die bereits erwähnte *downregulation* von Komponenten mit inhibitorischen Eigenschaften auf den Wnt-Signalweg durch Gegenwart des Heparins antagonisiert und abgeschwächt. Hier fand durch Tinzaparin eine erneute Annäherung an das in unbehandelten A2780 Zellen präsenste mRNA-Niveau statt. Die Expression von AXIN1 war im Vergleich zu unbehandelten A2780 Zellen durch eine Vorinkubation mit dem niedermolekularen Heparin sogar gesteigert. Derselbe Effekt ist bei den mRNAs entsprechender Wnt-Proteine zu verzeichnen. Die Expression sämtlicher mRNAs wurde durch die Wirkung des niedermolekularen Heparins erniedrigt, welche bei WNT3 sogar unter das Niveau von unbehandelten A2780 Zellen fiel. Zusammengenommen lassen diese diskutierten Ergebnisse vermuten, dass Tinzaparin dazu befähigt ist, bedeutende Wnt-Komponenten derart in ihrer Expression zu verändern, dass daraus eine reduzierte Aktivität des *Wnt-pathways* resultiert. Dies stimmt ebenfalls mit der bereits erwähnten These überein, die besagt, dass die in A2780cis Zellen präsenste Chemoresistenz in gewissem Ausmaß durch *Wnt-signaling* vermittelt wird. Dieser wirkt dabei Tinzaparin entgegen, wodurch eine gesteigerte Toxizität von Cisplatin resultiert. Kontrovers zu dieser Theorie sind jedoch die mRNA-Level der Transkriptionsfaktoren TCF7 (TCF-1), TCF7L1 (TCF-3) und TCF7L2 (TCF-4), da diese in unbehandelten A2780cis Zellen im Vergleich zu unbehandelten A2780 Zellen *downreguliert* waren. Falls dieser Befund auch auf Proteinebene festzustellen ist, würde dies auf ein reduziertes *signaling* hindeuten. Weiterhin scheinen sich die erniedrigten mRNA Expressionen der Proteoglykane Glypikan-3 und -4 in unbehandelten A2780cis Zellen im Vergleich zu unbehandelten A2780 Zellen zunächst nicht in das erwähnte Gesamtbild einzufügen. Besonders Glypikan-3, welches in der Literatur als direkt am *Wnt-signaling* beteiligt beschrieben wird (446), könnte hier mit einer reduzierten Signalaktivität assoziiert werden. Ebenso eine durch Tinzaparinbehandlung induzierte Steigerung der mRNA Expressionen beider Proteoglykane erscheint zunächst kontrovers zur erwähnten Theorie. Als eine mögliche Erklärung für die durch Tinzaparin vermittelte partielle Steigerung der jeweiligen Expression könnte jedoch auch eine Art Gegenregulationsversuch der Zelle darstellen, um ein verstärktes *Wnt-signaling* aufrecht zu erhalten. Auf diese These wird später in dieser Arbeit unter Berücksichtigung

potentieller Wirkmechanismen des Heparins erneut eingegangen. Folglich rückte für die weitere Interpretation eine Proteinquantifizierung dieser Wnt-Komponenten in den Fokus der weiteren Experimente.

5.11 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression von Glypikan-3 und -4 in A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Zur fortführenden Interpretation der *gene array* Daten war wie bereits beschrieben eine Quantifizierung der diskutierten Proteine notwendig. Für die Aufklärung einer potentiellen Funktion der beiden Proteoglykane hinsichtlich des Wnt-*pathways* und der in A2780cis Zellen vorherrschenden Mechanismen der Chemoresistenz galt es zunächst zu untersuchen, inwiefern sich eine 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin auf die Expression der beiden Proteoglykane Glypikan-3 und -4 auswirkt. Die daraus erhaltenen Ergebnisse konnten zum einen Aufschluss über potentielle Unterschiede auf mRNA-Ebene verschaffen, zum anderen neue Erkenntnisse über die durch Tinzaparin induzierten Mechanismen liefern.

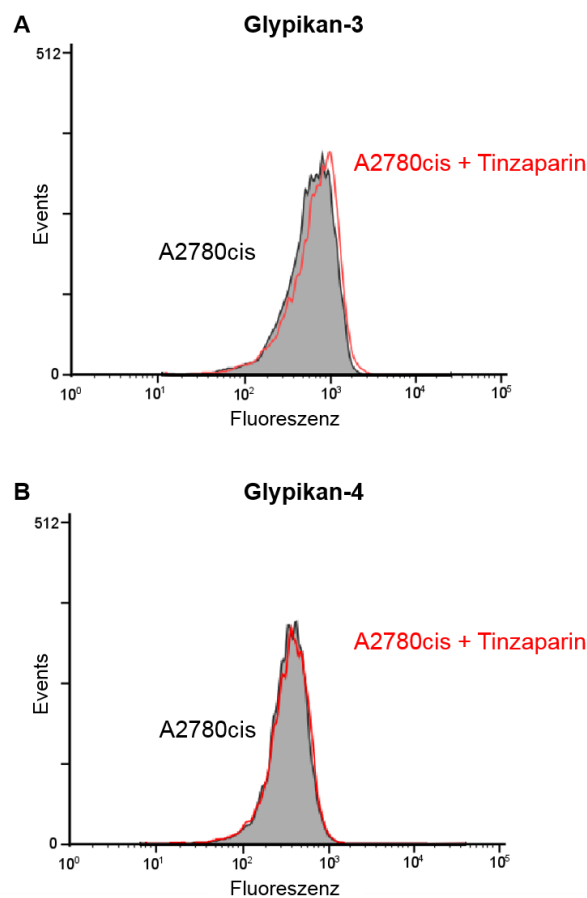


Abbildung 49: Analyse der Proteinexpression von Glypikan-3 (A) und -4 (B) in unbehandelten oder mit Tinzaparin (50 µg/mL) vorinkubierten (24 h) A2780cis Zellen. Die Expression wurde mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Experimente wurden in Triplikaten angesetzt.

Anhand der beiden Befunde wird ersichtlich, dass eine für den sensitivierenden Effekt notwendige Vorinkubation von 24 h mit Tinzaparin keine Änderungen in der Expression von Glypikan-3 (Abbildung 49, A) und Glypikan-4 (Abbildung 49, B) in cisplatinresistenten A2780cis Zellen nach sich zog. Die in den mRNA-Daten dargestellte deutliche Steigerung in der Expression beider Proteoglykane (Abbildung 48), welche sich durch eine Vorbehandlung mit Tinzaparin ergab, steht somit in Kontrast zu den Quantifizierungen auf Proteinebene. Eine Beteiligung jener Proteoglykane am *Wnt-signaling* sowie den Mechanismen der Chemosistenz bleibt hierbei offen. Da allerdings eine 24-stündige Vorinkubation mit Tinzaparin keine Auswirkungen auf die Expression der beiden Glypikane hatte, scheint eine potentielle Veränderung der Anzahl jener Moleküle, aus der folglich eine Veränderung der *signaling*-Intensität denkbar ist, nicht für den chemosensitivierenden Effekt verantwortlich. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass das niedermolekulare Heparin mit den auf der Zelle bereits präsenten Strukturen in einer Weise interagiert, aus denen sich letztlich eine Steigerung der Cisplatintoxizität ergibt.

Da in den durchgeführten Toxizitätsstudien die Resistenzüberwindung durch Tinzaparin 72 h nach der Zugabe von Cisplatin festgestellt wurde (9), zielten anschließende Untersuchungen darauf ab, inwiefern sich eine Behandlung gemäß den Vorgaben der Toxizitätsstudien auf die Expression von Glypikan-3 auswirkt. Sich hierbei ergebende Veränderungen könnten somit weiterhin Aufschluss über die zugrundeliegenden Mechanismen des niedermolekularen Heparins liefern.

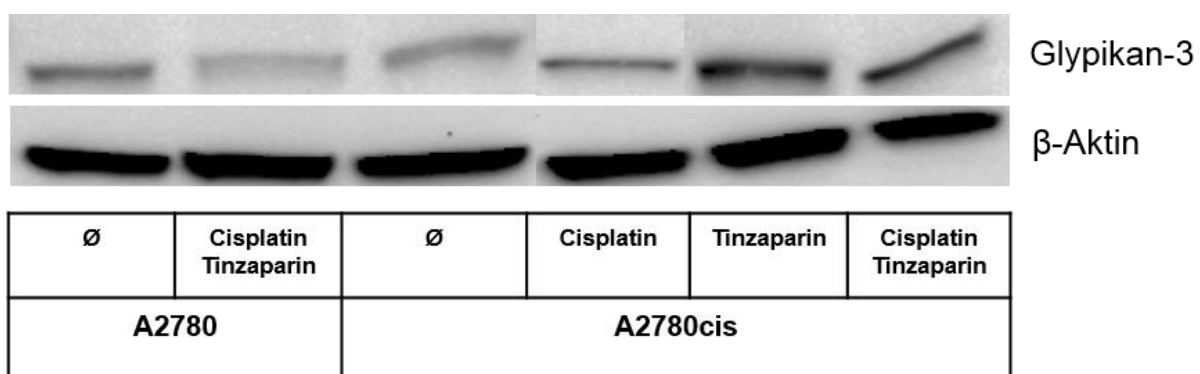


Abbildung 50: Proteinexpression von Glypikan-3 von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression von Glypikan-3 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte *blot* repräsentiert einen exemplarischen Versuch.

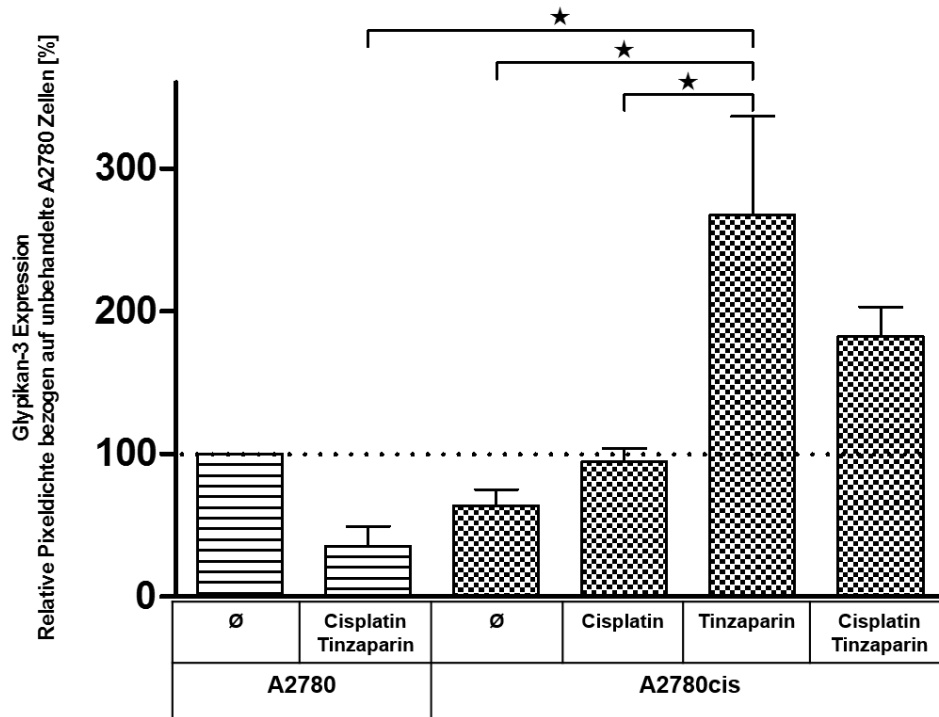


Abbildung 51: Relative Quantifizierung der Glypikan-3 Expression von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurde. Die Expression von Glypikan-3 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=2).

Eine mit den Toxizitätsstudien übereinstimmende längere Inkubationszeit der A2780cis Ovarialkarzinomzellen mit Tinzaparin als auch die Gegenwart von Cisplatin zog eine bedeutende Veränderung der Proteinexpression von Glypikan-3 im Vergleich zu einer 24 h Behandlung (Abbildung 49, A) nach sich. Die Quantität des Proteoglykans war in unbehandelten A2780cis Zellen hierbei im Vergleich zu unbehandelten A2780 Zellen erniedrigt (Abbildung 51, 1. vs. 3. Balken v.l.). Bemerkenswerterweise resultierte aus einer Kombination aus Cisplatin und Tinzaparin in A2780 Zellen eine deutlich niedrigere Proteinexpression von Glypikan-3 im Vergleich zu entsprechend unbehandelten Zellen (Abbildung 51, 1 vs. 2. Balken v.l.). Die letztliche Relevanz für eine mögliche Reduktion im *Wnt-signaling* bleibt zunächst ungeklärt, scheint jedoch aufgrund der diskutierten untergeordneten Rolle jener Kaskade im Kontext der Cisplatintoxizität in A2780 Zellen (Kapitel 5.8.2) von geringer Bedeutung. Besonders die in den cisplatinresistenten Zellen hervorgerufenen Veränderungen durch jeweils beide Substanzen liefern Erkenntnisse über mögliche Wirkmechanismen des Antikoagulans. Die Steigerung der Proteinexpression durch die alleinige Behandlung mit dem Zytostatikum (Abbildung 51, 4. Balken v.l.) könnte hierbei als eine aktive Gegenregulation der cisplatinresistenten Zelle interpretiert werden. Die vermutlich erhöhte Anzahl von Glypikan-3 auf der Zelloberfläche könnte mit einer größeren

Kapazität der Ligandbindung von Wnt-Proteinen einhergehen. Die Heparansulfat-Ketten des benannten Proteoglykans werden in der Literatur als direkte Interaktionspartner für Frizzled-Rezeptoren beschrieben. Demnach wäre Glypikan-3 dazu befähigt, die Affinität zwischen Wnt-Liganden und Frizzled-Rezeptoren zu erhöhen, was letztlich eine Steigerung des Wnt-*signalings* bedeuten könnte (446). So liegt die Vermutung nahe, dass eine durch Cisplatin gesteigerte Expression und einer daraus bedingten erhöhten Bindungskapazität mit einer Intensivierung der Wnt-Signalkaskade einhergeht. Dies könnte somit einen Mechanismus der A2780cis Zellen darstellen um der toxischen Wirkung von Cisplatin entgegenzuwirken. Die bereits beschriebenen Studien (Kapitel 5.8.2), bei denen infolge einer Behandlung mit Chemotherapeutika eine Steigerung des Wnt-*signalings* resultieren kann (440,441), bekräftigen diese Theorie. Überraschenderweise trat diese Tendenz bei einer alleinigen Behandlung mit dem niedermolekularen Heparin besonders in den Vordergrund. Im Vergleich zu unbehandelten A2780cis Zellen erfolgte eine massive Steigerung der Glypikan-3 Expression (Abbildung 51, 5. Balken v.l.). Dies könnte ebenfalls auf einen ähnlichen Gegenregulationsversuch der cisplatinresistenten Zelle schließen lassen, welcher in Gegenwart von Cisplatin postuliert wurde. Zusammen mit einer weiteren Erkenntnis aus der bereits erwähnten Studie, bei der Heparin die Bindung zwischen Glypikan-3 und einem Rezeptor der Frizzled-Familie inhibieren kann (446), lässt hierbei einen potentiellen Wirkmechanismus des niedermolekularen Heparins Tinzaparin vermuten. Eine mögliche Inhibition der Interaktion zwischen Glypikan-3 und Frizzled-Rezeptoren durch Tinzaparin könnte folglich eine verringerte Affinität zwischen Wnt-Liganden und entsprechenden Rezeptoren zur Konsequenz haben. Dies geht letztlich mit einer verringerten Aktivität des Wnt-*pathways* einher und resultiert in einer Reduktion der Chemoresistenz. Da die cisplatinresistenten Zellen in ausgeprägter Abhängigkeit von benannter Kaskade stehen, wie es bereits anhand der Toxizitätsdaten von FH535 aufgezeigt wurde (Kapitel 5.8.1), bekräftigt diese These, in der die A2780cis Zellen versuchen ihre wahrscheinlich erhöhte Wnt-*signaling*-Aktivität aufrecht zu erhalten, um somit möglicher zytotoxischer Einflüsse durch Cisplatin entgegenwirken zu können. Die benannte Möglichkeit der Gegenregulation der Zellen infolge einer Tinzaparinbehandlung könnte ebenfalls ihren Ursprung in einem weiteren potentiellen Mechanismus haben. So ist es ebenfalls denkbar, dass Heparin die im Extrazellularraum befindlichen Wnt-Liganden bindet und abfängt, woraus eine verringerte Zufuhr der Wnt-Proteine an Frizzled-Rezeptoren resultiert. Dies stellt zudem eine Erklärung für die erniedrigte mRNA Expression entsprechender Wnt-Proteine dar (Abbildung 48). Folglich versuchen die Zellen durch erhöhte Bereitstellung des Proteoglykans eine gesteigerte Wnt-Induktion zu ermöglichen.

Um zu überprüfen, inwiefern das niedermolekulare Heparin tatsächlich über Fähigkeiten für die Involvierung der erwähnten molekularen Mechanismen verfügt, ist Gegenstand zukünftiger Arbeiten. Zur weiteren Untersuchung des durch Tinzaparin induzierten Einflusses auf die Cisplatinresistenz der A2780cis Zellen war die Quantifizierung von am Signalnetzwerk beteiligten intrazellulären Proteinen sowie die Determinierung der tatsächlichen *Wnt-pathway*-Aktivität Gegenstand der folgenden Experimente, um die postulierten Mechanismen weiter zu prüfen.

5.12 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression von p-GSK-3 β in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Das Enzym GSK-3 β spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation im *canonical Wnt-pathway*. Es ist dazu befähigt, durch Phosphorylierung von β -Catenin dessen proteasomalen Abbau zu forcieren, welcher mit einer verminderten Transkription Wnt-assoziiierter Gene einhergeht (330,332). Die Aktivität der GSK-3 β selbst wird u.a. durch Phosphorylierung an verschiedenen Aminosäureresten reguliert. So hat eine entsprechende Modifikation an Ser-9 eine Inaktivierung des Enzyms zur Konsequenz (447), welche mit einem verminderten Abbau von β -Catenin und einer möglichen Steigerung des *Wnt-signalings* assoziiert werden kann (332). Jene Form der GSK-3 β wurde nachfolgend quantifiziert, um mögliche Auswirkungen der jeweiligen Behandlungsmethoden auf die Expression zu identifizieren.



Abbildung 52: Proteinexpression von p-GSK-3 β von unbehandelten, mit Cisplatin (2 μ mol/L) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 μ g/mL) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression von p-GSK-3 β wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte *blot* repräsentiert einen exemplarischen Versuch.

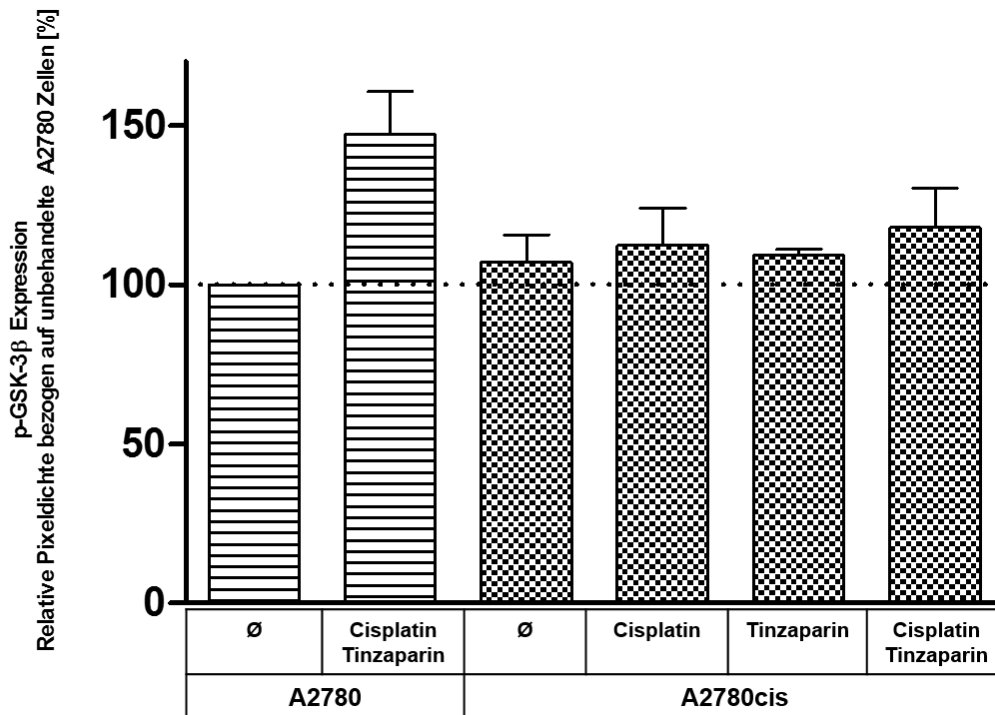


Abbildung 53: Relative Quantifizierung der p-GSK-3 β Expression von unbehandelten, mit Cisplatin (2 μ mol/L) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 μ g/mL) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurde. Die Expression von p-GSK-3 β wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=3).

Anhand der Proteinquantifizierung der inaktiven Form der GSK-3 β in unterschiedlich behandelten A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen ergaben sich im Vergleich zur Glypikan-3 Expression geringere Unterschiede innerhalb der jeweiligen Behandlungsschemata. Die bedeutendste Veränderung war bei einer Kombination aus Tinzaparin und Cisplatin in A2780 Zellen im Vergleich zu entsprechend unbehandelten Zellen zu verzeichnen (Abbildung 53, 1. vs. 2. Balken v.l.). Dieser Befund geht, wenn auch in entgegengesetzter Richtung, mit der Regulation der Glypikan-3 Expression in A2780 Zellen einher (Abbildung 51, 1 vs. 2. Balken v.l.) und kann hierbei aufgrund der angenommenen geringen Relevanz des Wnt-signalings im Kontext einer Cisplatintoxizität in jener Zelllinie nicht begründet werden. Eine leicht gesteigerte Expression der inaktiven Form des Enzyms ist in den cisplatinresistenten A2780cis Zellen im Vergleich zu unbehandelten A2780 Zellen ersichtlich (Abbildung 53, 1 vs. 3. Balken v.l.). Innerhalb der resistenten Zelllinie bewirkte die Gegenwart von Cisplatin eine Steigerung der Expression, während die alleinige Behandlung durch Tinzaparin diesen Effekt wieder zu reduzieren vermochte. Eine Kombination aus beiden Substanzen induzierte hingegen diese Expression am intensivsten. Es sei erwähnt, dass die beschriebenen Differenzen in den unterschiedlich behandelten A2780cis Zellen nur sehr gering ausgeprägt waren, was eine entsprechende Interpretation der Daten erschwert. So könnte die gesteigerte Expression des

Enzyms in unbehandelten A2780cis Zellen mit einer vermehrten Aktivität des *canonical* Wnt-*pathways* assoziiert werden, welche erneut durch Cisplatin als Versuch der Gegenregulation erhöht wird. Die durch das niedermolekulare Heparin bedingte reduzierte Expression würde sich in diesem Kontext mit einer leichten Reduktion der Aktivität des Signalweges assoziieren lassen. Die stärkste Expression der inaktiven Form des Enzyms, welche durch eine Kombination beider Substanzen resultierte, fügt sich demnach nicht in das Gesamtbild der eben beschriebenen Theorie ein und bleibt ungeklärt. Für die weitere Determinierung der am Tinzaparin Effekt beteiligten Relevanz des Enzyms bedarf es folglich weiterer Untersuchungen. Hierbei wäre zum Beispiel das Verhältnis der aktiven zur inaktiven Form des Enzyms interessant, welche sich durch entsprechende Inkubation der Substanzen verändern könnte. Weiterhin wäre die Analyse der jeweiligen Enzymaktivität in diesem Kontext von besonderer Bedeutung, da die Quantität des Proteins nicht zwangsläufig Aussagen über dessen Aktivität zulassen. Aufgrund der weiteren Tatsache, dass die GSK-3 β an der Regulation einer Vielzahl weiterer zellulärer Funktionen und *pathways* beteiligt ist (448), bleibt eine mögliche direkte Beteiligung des Enzyms an in dieser Arbeit diskutierten Thematik offen.

5.13 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression von Axin1 in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Die bereits in den mRNA-Daten diskutierte *downregulation* der inhibitorischen Komponente des Wnt-*pathways* Axin1 in unbehandelten A2780cis Zellen im Vergleich zu unbehandelten A2780 Zellen und dessen gesteigerte Expression nach einer Tinzaparinbehandlung wurde auch auf Proteinebene untersucht.

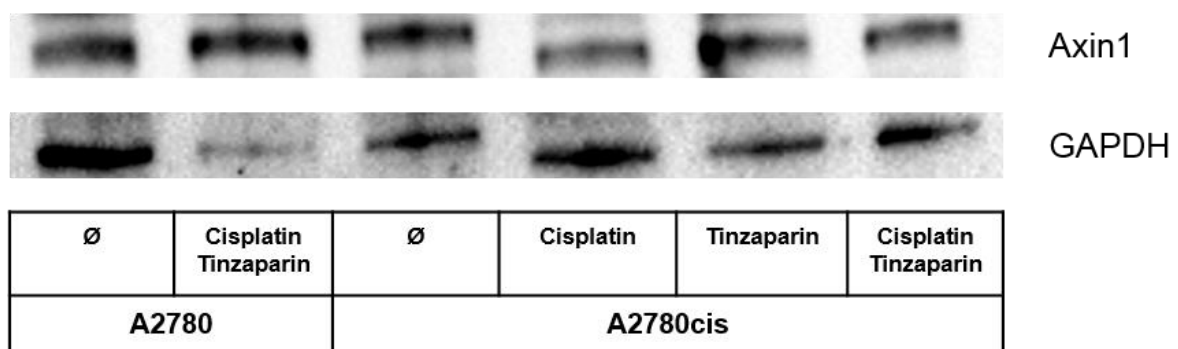


Abbildung 54: Proteinexpression von Axin1 von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression von Axin1 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte *blot* repräsentiert einen exemplarischen Versuch.

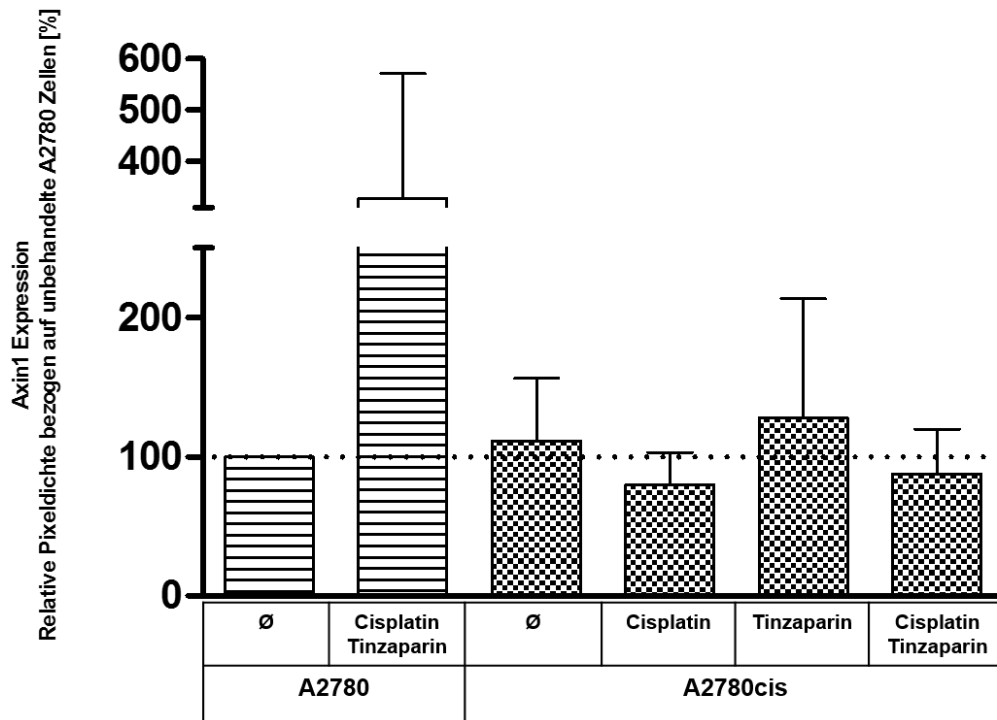


Abbildung 55: Relative Quantifizierung der Axin1 Expression von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurde. Die Expression von Axin1 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=4).

Bei Betrachtung der erhobenen Daten fällt die enorme Steigerung der Expression von Axin1 auf, welche durch eine Kombination von Tinzaparin und Cisplatin in den A2780 Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen hervorgerufen wurde (Abbildung 55, 1. vs. 2. Balken v.l.). Hiermit wird bereits die dritte merkliche Deregulation neben Glypikan-3 und p-GSK-3 β ersichtlich, welche durch die Kombination beider Substanzen induziert wurde. Erneut ergibt sich im Kontext einer *Wnt-pathway*-Aktivität, welche in Mechanismen einer Chemoresistenz involviert zu sein scheint, kein begründeter Zusammenhang. Zum einen, da diese ausgeprägten Deregulationen in A2780 Zellen eintraten, welche sich nicht durch eine Resistenz gegenüber Cisplatin charakterisieren lassen, zum anderen da die bereits dargestellten FH535-Studien keinen Einfluss auf die Toxizität des Zytostatikums vermuten lassen. Es ist denkbar, dass die kombinatorische Behandlung von Tinzaparin mit Cisplatin in diesen Zellen darüber hinaus noch weitere Komponenten des *Wnt*-Signalwegs in ähnlichem Ausmaß in deren Expression verändert, aufgrund der nicht vorhandenen Relevanz jener Kaskade in diesem Kontext jedoch nicht zum Tragen kommt. Auf diese Vermutung wird in einem folgenden Abschnitt in dieser Arbeit erneut eingegangen.

Die Expression von Axin1 unterscheidet sich den weiteren Daten zufolge nur geringfügig zwischen unbehandelten A2780 und A2780cis Zellen. Hierbei war eine minimale Steigerung

in Letzteren zu verzeichnen (Abbildung 55, 1. vs. 3. Balken v.l.). Dieser Befund geht somit nicht mit der mRNA-Quantifizierung einher, bei welcher eine deutlich geringere Expression in A2780cis Zellen offensichtlich wurde (Abbildung 48). Der jeweilige Vergleich innerhalb der cisplatinresistenten Zellen fügt sich allerdings in die Interpretation der mRNA-Daten ein. So resultierte aus der Gegenwart von Tinzaparin eine Steigerung der Expression, welche sogar über dem Niveau von unbehandelten Zellen lag (Abbildung 55, 3. vs. 5. Balken v.l.). Diese Tatsache bekräftigt erneut die durch Heparin induzierte Bereitstellung inhibitorischer Komponenten mit der möglichen Reduktion der Wnt-Signalkaskade als Konsequenz. Die durch das Zytostatikum bewirkte geringere Expression passt argumentativ wiederum zu einem Mechanismus der Chemoresistenz von A2780cis Zellen, welche mit einer Steigerung des *Wnt-signalings* und einer damit einhergehenden Entgegnung der Toxizität interpretieren werden könnten. Die leicht verminderte Expression, die aus einer Kombination beider Substanzen resultierte (Abbildung 55, 6. Balken v.l.), scheint sich nicht vollständig in diese Theorie einzufügen und bleibt ungeklärt. Aufgrund der jeweils starken Standardabweichung können diese Daten jedoch lediglich als Hinweis dienen, was die entsprechende Interpretation hinsichtlich ihrer Aussagekraft stark limitiert.

Zusammengefasst kann dem niedermolekularen Heparin auch auf Proteinebene ein enormer Einfluss auf die Expression analysierter Komponenten des *Wnt-pathways* attestiert werden. Ein großer Anteil der hier erhobenen Daten stimmt bezüglich seiner Tendenz mit den analysierten mRNA-Befunden überein. Jedoch treten auch diverse, teilweise kontroverse Befunde auf, welche sich nicht mit der postulierten Wirkung des Tinzaparins im Einklang befinden. Inwiefern sich aus den dargestellten Expressionsänderungen durch das Heparin entsprechende Aktivitätsänderungen ergaben und somit den *Wnt-pathway* auf funktioneller Ebene beeinflussten, kann basierend auf der Datenlage nur vermutet werden. Daher war es folgend von besonderem Interesse, die tatsächlichen Unterschiede der Aktivität beider Zelllinien inklusive der unterschiedlichen Behandlungsmethoden zu analysieren. Die daraus erhaltenen Erkenntnisse dienen letztlich für die Evaluierung der postulierten Mechanismen des niedermolekularen Heparins und somit der Relevanz der Kaskade hinsichtlich der in A2780cis Zellen vorherrschenden Chemoresistenz.

5.14 Einfluss von Tinzaparin auf die Aktivität des Wnt-pathways in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Zur Quantifizierung der Wnt-Signalaktivität auf Transkriptionsebene erfolgte eine Transfektion der A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen mit einem geeigneten Vektor (Kapitel 4.14), damit die TCF/LEF Transkriptionsaktivität detektiert werden konnte. Nach anschließender Selektion erfolgreich transfizierter Zellen wurde zunächst durch Toxizitätsstudien untersucht, ob die stabil transfizierten Zelllinien eine immer noch vergleichbare Toxizität gegenüber Cisplatin aufweisen und somit weiterhin zur Untersuchung in Aspekten der Chemoresistenz geeignet waren.

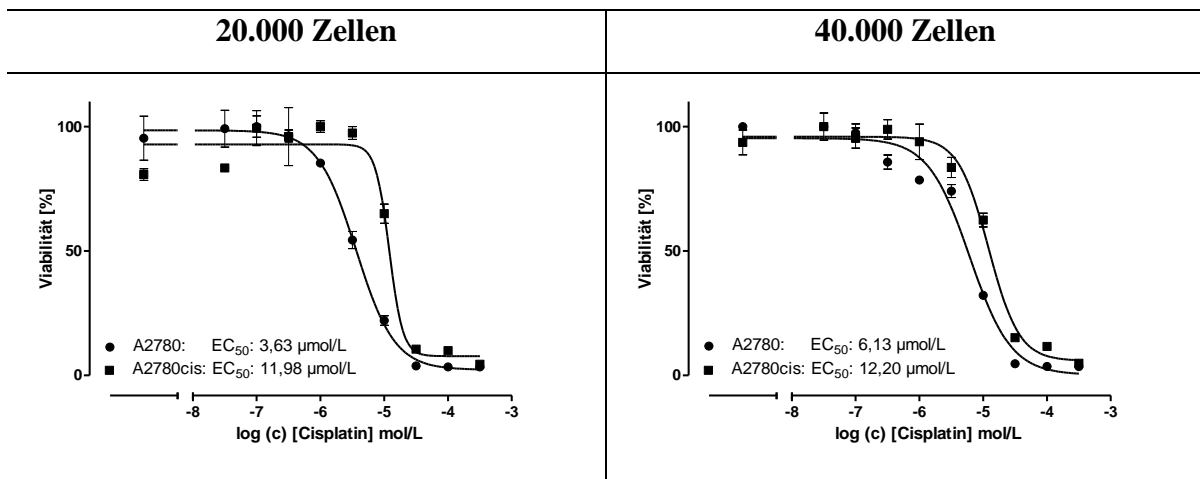


Abbildung 56: Zytotoxizität von Cisplatin in mit dem pGL4.49[luc2P/TCF-LEF/Hygro] Vektor transfizierten A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

Inkubations- ansatz	Zellzahl/ Well	A2780			A2780cis			Rf
		pEC ₅₀		EC ₅₀ [μmol/L]	pEC ₅₀		EC ₅₀ [μmol/L]	
		MW	Stabw		MW	Stabw		
Cisplatin	20.000	5,46	0,03	3,48	4,95	0,04	11,21	3,2
	40.000	5,20	0,02	6,35	4,99	0,11	10,17	1,6

Tabelle 33: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin in mit dem pGL4.49[luc2P/TCF-LEF/Hygro] Vektor transfizierten A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=2).

Den erhobenen Daten zufolge ist auch nach der Generierung stabil transfizierter Zelllinien ein ausgeprägter Unterschied in den EC_{50} -Werten der A2780 im Vergleich zu cisplatinresistenten A2780cis Zellen zu verzeichnen (bspw. 6,35 vs. 10,17 $\mu\text{mol/L}$ bei 40.000 Zellen). Dieser äußerte sich in beiden Zellzahlen und wird auch anhand der Resistenzfaktoren ersichtlich. Demnach hatte die durchgeführte Transfektion beider Zelllinien keinen Einfluss auf die Eigenschaften hinsichtlich der Toxizität gegenüber dem Zytostatikum. Dieses Zellpaar wurde daher als geeignet betrachtet, um die Analyse der Wnt-Signalaktivität auf Transkriptionsebene hinsichtlich möglicher Aussagen über die in A2780cis Zellen präsenten Chemoresistenz zu ermöglichen.

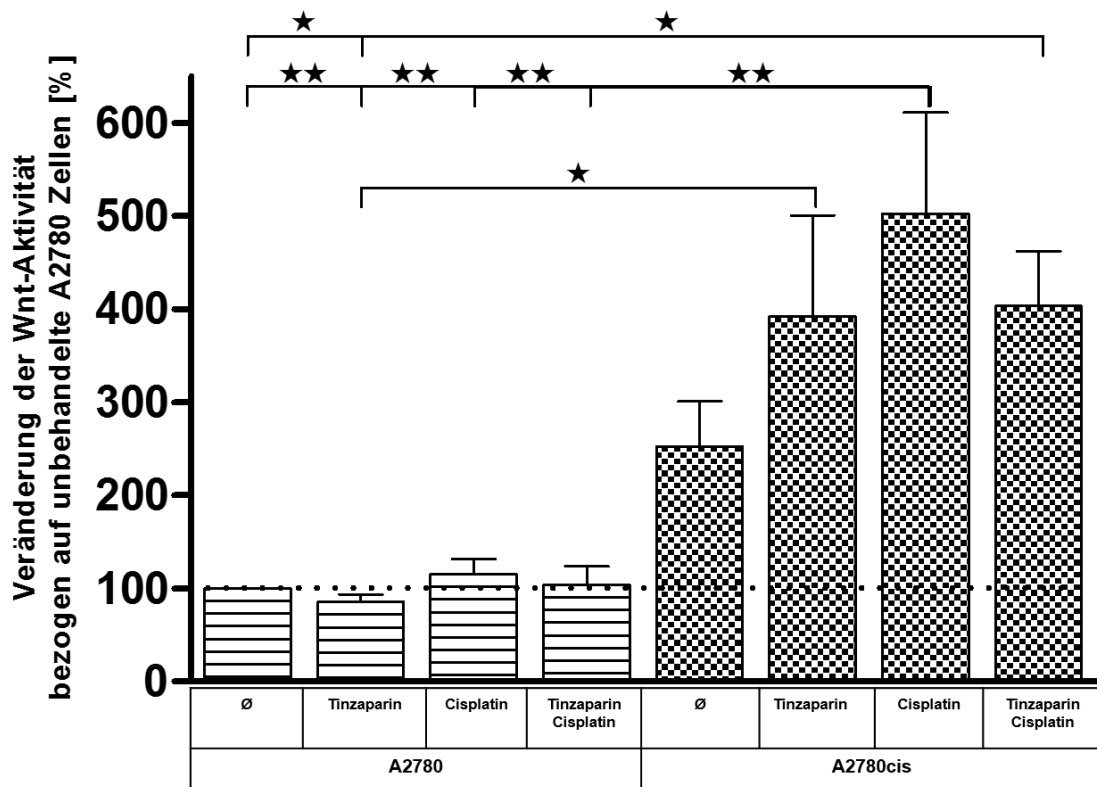


Abbildung 57: Analyse der Wnt-Signalaktivität auf Transkriptionsebene von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Luciferaseaktivität, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurde. Die Luciferaseaktivität wurde durch Quantifizierung der Lumineszenz 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert und auf die jeweilige Proteinkonzentration normalisiert (n=3).

Eine Behandlung mit Tinzaparin, Cisplatin sowie eine Kombination aus beidem zog nahezu keine Veränderung der Aktivität in A2780 Zellen nach sich (Abbildung 57, gestreifte Balken). Dieser Befund deckt sich mit den vorherigen Daten, in denen dem Wnt-pathway in diesen Zellen eine geringe Relevanz in diskutiertem Kontext infolge einer Behandlung mit jenen Substanzen zugesprochen wurde. So scheinen die bereits diskutierten Änderungen

ausgewählter Komponenten des *Wnt-pathways* auf Proteinebene, welche aus einer Kombination beider Substanzen in A2780 Zellen resultierte, auf Signalebene nicht zum Tragen zu kommen. Eine Behandlung mit Tinzaparin ging zudem in den beschriebenen Toxizitätsstudien nach 72 h Behandlung mit Cisplatin mit keiner Änderung der EC_{50} von A2780 Zellen einher (9). Ebenso konnte in jenen Zellen eine subtoxische Anwesenheit von FH535 keine Steigerung der Cisplatintoxizität induzieren (Tabelle 30). Zusammengefasst bekräftigen die hier analysierten Aktivitäten des *pathways* somit die in dieser Arbeit postulierten Aussagen über eine geringe Relevanz der Wnt-Signalkaskade im Kontext einer Cisplatintoxizität in A2780 Ovarialkarzinomzellen.

Beachtlich ist jedoch der massive Aktivitätsanstieg in unbehandelten cisplatinresistenten A2780cis Zellen im Vergleich zu unbehandelten A2780 Zellen (Abbildung 57, 1. vs. 5. Balken v.l.). Erneut untermauert dies die bereits formulierten Thesen über eine Involvierung dieser Kaskade in Mechanismen der in A2780cis Zellen präsenten Chemoresistenz. Die Intensivierung des *Wnt-signalings* als Mechanismus jener Resistenz ist demnach sehr wahrscheinlich und liefert eine weitere Begründung für die gesteigerte Toxizität des *Wnt-pathway*-Inhibitors FH535 in A2780cis Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zur nicht-resistenten Zelllinie. In das Gesamtbild der bereits formulierten Hypothese passt ebenso die deutliche Steigerung des Wnt-Signalwegs infolge einer alleinigen Behandlung mit Cisplatin (Abbildung 57, 5. vs. 7. Balken v.l.). Dieser Befund unterstreicht weitergehend die Annahme einer aktiven Gegenregulation der Zelle, um der toxischen Wirkung des Zytostatikums entgegenzuwirken. Die Kombination von Tinzaparin und Cisplatin liefert hierbei ebenfalls wichtige Erkenntnisse über eine mögliche Involvierung des Heparins in die Aktivität des *pathways*. So führte eine Kombination beider Substanzen zu einer Reduktion des *Wnt-signalings* im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit dem Zytostatikum (Abbildung 57, 7. vs. 8. Balken v.l.). Diese reduzierte Aktivität verdeutlicht somit die Fähigkeit des Heparins, den Wnt-Signalweg partiell zu inhibieren. Auch wenn dieser Effekt nur in Kombination mit Cisplatin zum Tragen kam, kann vermutet werden, dass eine durch Tinzaparin bedingte Minderung der Chemoresistenz anteilig der beschriebenen Reduktion der Wnt-Signalkaskade zuzuschreiben ist. Die Tatsache, dass eine alleinige Behandlung mit Tinzaparin ebenso mit einer erhöhten Aktivität des Wnt-Signalwegs einherging, stimmt argumentativ mit dem Befund aus den Daten der Glypikan-3 Quantifizierung überein (Abbildung 51). Daher liegt auch hier die Vermutung nahe, dass die Zelle die durch Tinzaparin bedingte mögliche Inhibition des *pathways* antagonisiert und gegenreguliert, um die Wnt-Signalintensität beizubehalten, bzw. darüber hinaus zu verstärken. Die letztliche Induktion der Transkription kann hierbei durch die

vier verschiedenen Transkriptionsfaktoren des *Wnt-pathways* angestoßen werden (349). So galt es zu untersuchen, inwiefern sich eine Behandlung mit dem niedermolekularen Heparin auf die Expression eines dieser Faktoren und damit assoziierter funktioneller Veränderungen auswirkt.

5.15 Einfluss von Tinzaparin auf die Proteinexpression von TCF-4 in A2780 und A2780cis Ovarialkarzinomzellen

Ein u.a. durch TCF-4 bedingtes *Wnt-signaling* mit einer einhergehenden gesteigerten Expression von Genen wie c-MYC und Cyclin D1 wurde bereits mit der Proliferation und Genese von Tumorzellen assoziiert (449–452). Zusammengenommen mit dem Befund aus einer Studie, in der eine Suppression von TCF-4 mit einer Sensitivierung gegenüber Oxaliplatin in Tumorzellen des Kolons assoziiert wird (453), gaben Anlass zur Quantifizierung des Transkriptionsfaktors in beiden Zelllinien, um einen Einblick in die Abhängigkeit der zuvor analysierten Wnt-Aktivität auf Transkriptionsebene von diesem Faktor zu erhalten.

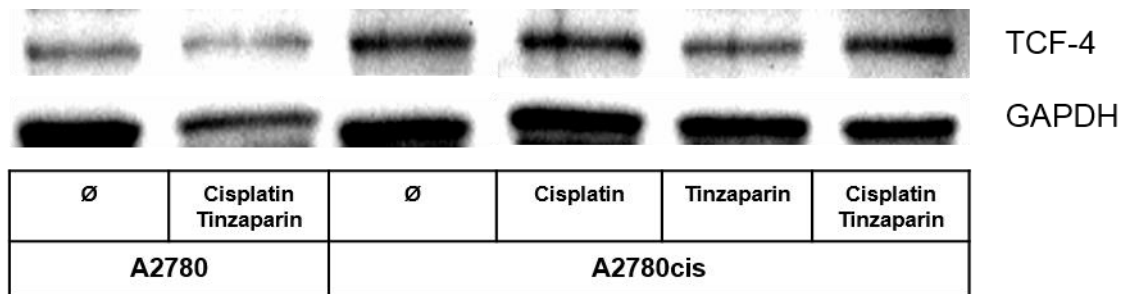


Abbildung 58: Proteinexpression von TCF-4 von unbehandelten, mit Cisplatin (2 µmol/L) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 µg/mL) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression von TCF-4 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte *blot* repräsentiert einen exemplarischen Versuch.

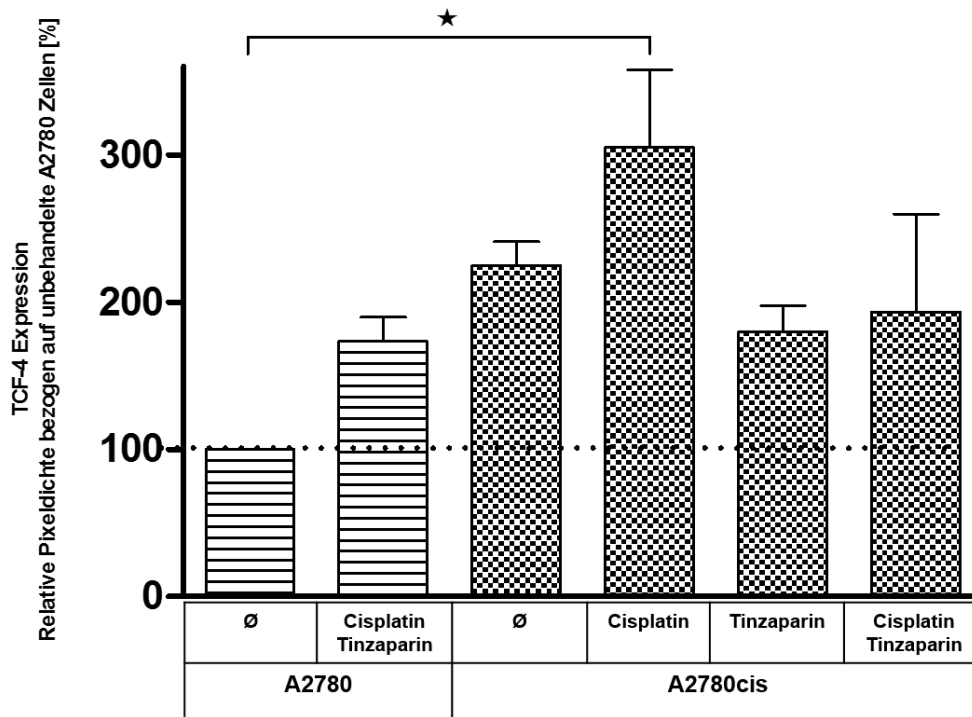


Abbildung 59: Relative Quantifizierung der TCF-4 Expression von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurde. Die Expression von TCF-4 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=3).

Die Proteinquantifizierung offenbarte massive Unterschiede in der Expression von TCF-4 in beiden Zelllinien. So war in unbehandelten A2780cis Zellen eine enorm gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors im Vergleich zu unbehandelten A2780 Zellen zu verzeichnen (Abbildung 59, 1. vs. 3. Balken v.l.). Dieser Befund befindet sich in Übereinstimmung mit den zuvor erhobenen Daten, gemäß derer A2780cis Zellen eine deutlich gesteigerte *Wnt-signaling*-Aktivität aufweisen (Abbildung 57). Die gesteigerte Expression in A2780 Zellen, welche aus einer Kombination aus Tinzaparin und Cisplatin resultierte, ist erneut bemerkenswert, zog aber keine Veränderung der Signalaktivität nach sich und reiht sich argumentativ ebenfalls in die bereits zuvor vermutete These ein, bei welcher der *Wnt*-Signalkaskade eine geringe Relevanz im Kontext einer Cisplatintoxizität in A2780 Zellen zugewiesen wird. Eine alleinige Behandlung der A2780cis Zellen mit Cisplatin zog eine bedeutende Steigerung der TCF-4 Expression im Vergleich zu entsprechend unbehandelten Zellen nach sich (Abbildung 59, 3. vs. 4. Balken v.l.). Diese Steigerung kann erneut als ein potentieller Mechanismus der in A2780cis Zellen präsenten Chemoresistenz angesehen werden, um der toxischen Wirkung des Zytostatikums entgegenzuwirken. Besonders interessant ist die Tatsache, dass aus der alleinigen Inkubation mit Tinzaparin eine deutlich reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors im Vergleich zur Cisplatinbehandlung resultierte, welche sich sogar unter

dem Niveau von unbehandelten A2780cis Zellen befand (Abbildung 59, 3. vs. 4. vs. 5. Balken v.l.). Ein ähnliches Ergebnis war in abgeschwächter Ausprägung bei einer Kombination beider Substanzen vorzufinden (Abbildung 59, 6. Balken v.l.). Vor allem die durch das Heparin vermittelte Reduktion der TCF-4 Expression liefert aufschlussreiche Informationen über die Funktionalität des Faktors hinsichtlich seiner Bedeutung im Aspekt einer Chemoresistenz, welche nachfolgend beschrieben werden.

So ist es denkbar, dass die Gegenwart von Tinzaparin eine partielle Inhibition der *Wnt-pathway*-Aktivität nach sich zieht. Diese Reduktion könnte auf jenes *signaling* limitiert sein, welches durch den Transkriptionsfaktor TCF-4 vermittelt wird. Aufgrund der erwähnten Inhibition unternimmt die cisplatinresistente A2780cis Zelllinie eine aktive Gegenregulation durch Deregulation mehrerer bereits beschriebener *Wnt*-Komponenten, um die Aktivität der Kaskade zu erhalten bzw. zu verstärken. Dies spiegelt sich u.a. in der zunächst konträr erscheinenden gesteigerten *pathway*-Aktivität wider. Eine zugrundeliegende Erklärung könnte eine gesteigerte Expression der anderen Transkriptionsfaktoren darstellen, um die Reduktion von TCF-4 vermitteltem *signaling* zu kompensieren. Das Resultat dieser Kompensation kommt allerdings bei der durch TCF-4 möglichen vermittelten Resistenz gegenüber Cisplatin nicht zum Tragen, was letztlich eine gesteigerte Toxizität des Zytostatikums bedeuten kann. Die bereits erwähnte Studie, in der eine Suppression von TCF-4 mit einer Sensitivierung gegenüber Oxaliplatin in Tumorzellen des Kolons assoziiert wurde (453), bekräftigt die gerade diskutierte Hypothese und wird weiterhin durch eine weitere Studie unterstützt, in der eine Deletion des Transkriptionsfaktors mit einer gesteigerten Inhibitionsrate von Kolonkarzinomzellen infolge einer Behandlung mit Chemotherapeutika einherging (454).

Inwiefern ein TCF-4 bedingtes *Wnt-signaling* tatsächlich Auswirkungen auf die Chemoresistenz von A2780cis Ovarialkarzinomzellen hat, gilt es aufzuklären. So könnte eine Überprüfung jener These durch *knockdown* des Transkriptionsfaktors mit anschließenden Toxizitätsstudien erfolgen. Andere Signalnetzwerke abseits dieser erwähnten Kaskade können hierbei an der Beteiligung des Phänomens der Chemoresistenz in A2780cis Zellen nicht ausgeschlossen werden, jedoch hat der *Wnt-pathway* mit hoher Wahrscheinlichkeit eine bedeutende Funktion an der in A2780cis vorherrschenden Chemoresistenz. Weiterhin scheint diese Kaskade ein *target* des niedermolekularen Heparins Tinzaparin durch entsprechende Deregulation darzustellen, welche letztlich eine Reduktion von TCF-4 zur Konsequenz hat. Weitere durch das Heparin induzierte mögliche Wirkmechanismen können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Jedoch erscheint eine partielle Inhibition des *Wnt-pathways* als eine der Hauptursachen für die Resistenzminderung durch Tinzaparin.

5.16 Generierung von A2780 und A2780cis Tumormodellen *in vivo* zur Charakterisierung der Chemoresistenz sowie Untersuchung einer potentiellen Einflussnahme durch Tinzaparin

Um eine mögliche Übertragbarkeit der bisher generierten *in vitro* Daten über den chemosensitivierenden Effekt von Tinzaparin auf *in vivo* Ebene zu untersuchen, erfolgten Experimente an Nacktmäusen. Diese Studien zielten darauf ab, einen Einblick in die Effizienz einer antitumoralen Therapie mit Cisplatin und einem potentiellen Einfluss durch eine alleinige oder gleichzeitige Behandlung mit Tinzaparin auf das Tumorwachstum zu untersuchen. Hierzu erfolgte die Etablierung von A2780 und A2780cis Xenograft-Tumoren in den Tieren.

Nach der Aufteilung der Mäuse in vier Gruppen unter den in Kapitel 4.12 und Mueller et al. (389) beschriebenen Kriterien erfolgte nach entsprechenden Behandlungsschemata (Kapitel 4.12.1) die Analyse des Tumorwachstums unter Einfluss einer Gabe von Cisplatin, Tinzaparin sowie einer Kombination beider Substanzen. Die Gabe von Natriumchlorid diente hierbei als Kontrolle. Die folgend dargestellten *in vivo* Experimente wurden alle unter Leitung von Herrn Dr. Thomas Mueller am Universitätsklinikum Halle (Saale) koordiniert und durchgeführt. An dieser Stelle gilt Herrn Dr. Thomas Mueller sowie Frau Franziska Reipsch ein besonderer Dank für die Kooperation und Bereitstellung der Daten.

5.16.1 Vergleich der Tumormodelle und Verifizierung des Resistenzmodells *in vivo*

Nach der Etablierung entsprechender Xenograft-Modelle war zunächst der Vergleich der unterschiedlichen A2780 und A2780cis Tumormodelle hinsichtlich grundsätzlicher Wachstumsraten sowie der Effekt einer Cisplatingabe von besonderem Interesse, welcher im folgenden Graph dargestellt ist.

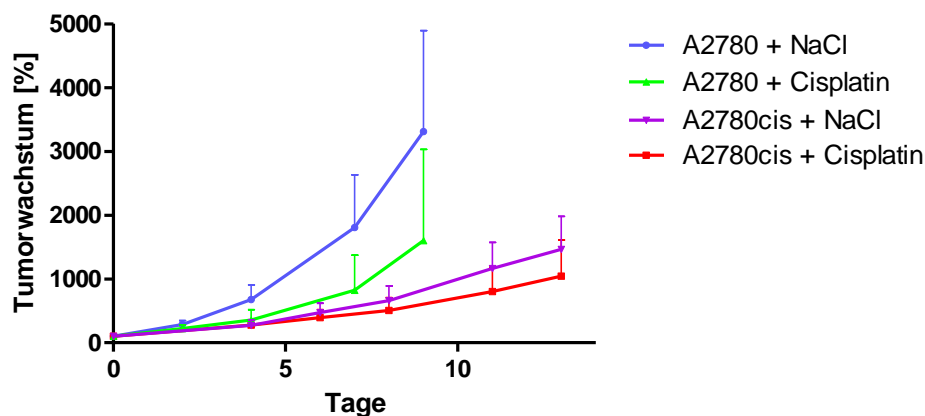


Abbildung 60: Vergleich der A2780 und A2780cis Tumormodelle hinsichtlich Wachstumsrate sowie Auswirkung einer Behandlung mit Cisplatin. Dargestellt ist die Zunahme des durchschnittlichen Tumordvolumens der einzelnen Gruppen ($n=8$) \pm Standardabweichung. Die Daten wurden auf den Behandlungsbeginn an Tag 0 normalisiert. Die Behandlung und Untersuchung der A2780 NaCl Kontrollgruppe wurde an Tag neun unterbrochen, nachdem vier Mäuse das maximal akzeptable Tumordvolumen erreicht hatten. Die Mäuse der A2780 Cisplatingruppe wurden für einen weiteren Zeitraum untersucht, welcher hier nicht abgebildet ist. Die Untersuchung der A2780cis Kontrollgruppe wurde an Tag 15 unterbrochen, da sechs Mäuse das maximal akzeptable Tumordvolumen erreicht hatten, wohingegen die A2780cis Cisplatingruppe für einen weiteren Zeitraum untersucht wurde. Der hier dargestellte Graph stellt einen Ausschnitt an erhobenen Ergebnissen dar. Die kompletten Daten werden in den Abbildungen 61 und 62 dargestellt. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Mueller zur Verfügung gestellt, welche zugleich Bestandteil unserer gemeinsamen Veröffentlichung waren (389).

Aus den in Abbildung 60 veranschaulichten Daten wurde eine ausgeprägte Diskrepanz in der Wachstumsrate zwischen den A2780 und A2780cis Modellen ersichtlich. Hierbei zeigten die A2780 Tumore eine deutlich gesteigerte Wachstumsrate, welche mit dem schnelleren Erreichen des maximal akzeptablen Tumordvolumens einherging. Eine Behandlung mit Cisplatin hatte in beiden Tumormodellen eine Reduktion des Tumordwachstums zur Konsequenz im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe (Abbildung 60, blaue vs. grüne bzw. violette vs. rote Kurve). Jene erniedrigte Wachstumsrate war in A2780cis Modellen jedoch abgeschwächt vorzufinden. Die *in vitro* Daten über die Resistenz gegenüber Cisplatin können somit zumindest anteilig auf das A2780/A2780cis Tumormodell übertragen werden und bestätigen somit die generierten Tumormodelle zur Charakterisierung einer Chemoresistenz *in vivo*. Die Unterschiede in den Wachstumsraten beider Tumormodelle könnten u.a. durch die morphologischen Unterschiede zwischen den A2780 und A2780cis Tumoren begründet werden, welche in Mueller et al. abgebildet und diskutiert werden (389).

5.16.2 Einfluss von Tinzaparin auf das Tumorstwachstum sowie auf Auswirkungen einer Behandlung mit Cisplatin *in vivo*

Nach der Verifizierung und Charakterisierung der Tumormodelle standen potentielle Auswirkungen durch alleinige Behandlung mit Tinzaparin oder einer Kombination des Antikoagulans mit Cisplatin auf das Wachstum der A2780 und A2780cis Tumore im Vordergrund, welche folgend dargestellt werden. Die täglichen Tinzaparin-Injektionen (10 mg/kg Körpergewicht) wurden von den Versuchstieren gut vertragen, sodass keine Gewichtsverluste oder Blutungskomplikationen festzustellen waren.

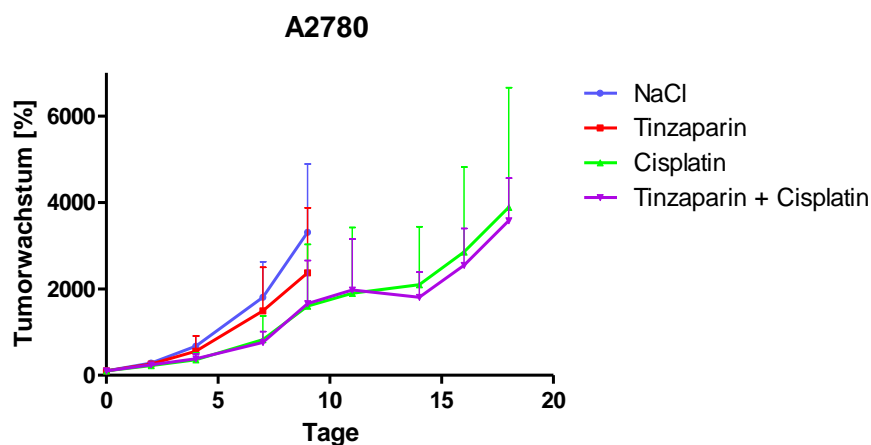


Abbildung 61: Analyse der Wachstumsinhibition im A2780 Tumormodell. Dargestellt ist die Zunahme des durchschnittlichen Tumorstwachstums der einzelnen Gruppen ($n=8$) \pm Standardabweichung. Die Daten wurden auf den Behandlungsbeginn an Tag 0 normalisiert. Tinzaparin wurde täglich injiziert (10 mg/kg Körpergewicht). Cisplatin wurde über einen Zeitraum von zwei Wochen einmal pro Woche verabreicht (6 mg/kg Körpergewicht). Aufgrund einer unvollständigen Erholung der Mäuse hinsichtlich des Körpergewichts nach der zweiten Cisplatininjektion wurde eine dritte Gabe ausgelassen. Die Behandlung und Untersuchung der Kontroll- und Tinzaparingruppe wurde an Tag neun unterbrochen, da vier Mäuse das maximal akzeptable Tumorstwachstum erreicht hatten. An Tag elf erreichten jeweils zwei Tumore der Cisplatin- und Cisplatin/Tinzaparingruppe das maximal akzeptable Tumorstwachstum, woraufhin jene Mäuse aus der Studie entfernt wurden. Weiterhin wurden an Tag 14 zwei Mäuse jeder Gruppe entfernt, wobei die restlichen vier Mäuse beider Gruppen bis Tag 18 untersucht wurden. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Mueller zur Verfügung gestellt, welche zugleich Bestandteil unserer gemeinsamen Veröffentlichung waren (389).

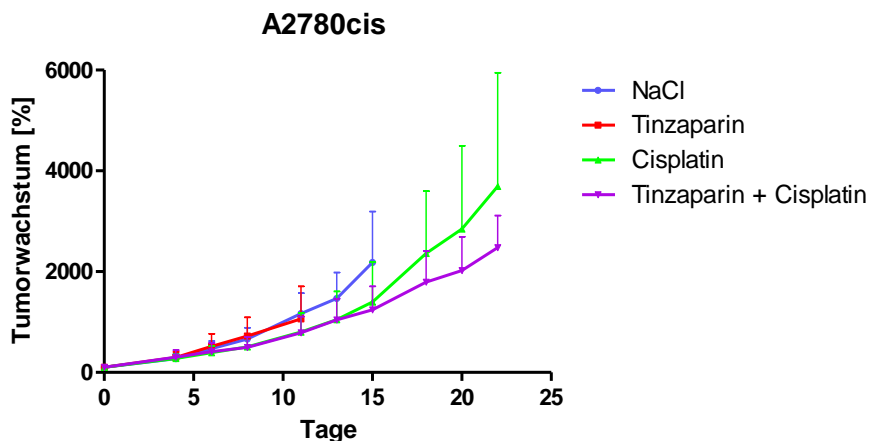


Abbildung 62: Analyse der Wachstumsinhibition im A2780cis Tumormodell. Dargestellt ist die Zunahme des durchschnittlichen Tumolvolumens der einzelnen Gruppen ($n=8$) \pm Standardabweichung. Die Daten wurden auf den Behandlungsbeginn an Tag 0 normalisiert. Tinzaparin wurde täglich injiziert (10 mg/kg Körpergewicht). Cisplatin wurde über einen Zeitraum von drei Wochen einmal pro Woche verabreicht (6 mg/kg Körpergewicht). Die Behandlung und Untersuchung der Tinzaparingruppe wurde an Tag elf unterbrochen, da vier Mäuse das maximal akzeptable Tumolvolumen erreicht hatten. Die Untersuchung der Kontrollgruppe wurde bis Tag 15 fortgeführt als sechs Mäuse das maximal akzeptable Tumolvolumen erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt erreichten ebenfalls jeweils fünf Tumore der Cisplatin- und Cisplatin/Tinzaparingruppe jenes Volumen, woraufhin jene Mäuse aus der Studie entfernt wurden. Die restlichen drei Mäuse beider Gruppen wurden bis Tag 22 untersucht. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Mueller zur Verfügung gestellt, welche zugleich Bestandteil unserer gemeinsamen Veröffentlichung waren (389).

Beim Vergleich der Wachstumskurven in den A2780 und A2780cis Tumormodellen wurde ersichtlich, dass eine alleinige Behandlung mit Tinzaparin zunächst ausschließlich bei A2780 Tumoren mit einer Reduktion der Wachstumsrate einherging (Abbildung 61), während die Kontroll- und Tinzaparingruppe in A2780cis Tumoren ein ähnliches Tumorwachstum aufwiesen (Abbildung 62). Hier sei erwähnt, dass bei detaillierter Analyse der entsprechenden Daten einzelner Mäuse eine ausgeprägte Heterogenität des Tumorwachstums innerhalb der Tinzaparingruppe im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle gegenwärtig war, welche vor allem in A2780 Tumormodellen ausgeprägt war. So schien eine Behandlung mit Tinzaparin in solchen A2780 Tumoren mit kleinem Initialvolumen inhibierend auf das Wachstum zu wirken, was folglich die gesamte Reduktion der Tumorwachstumsrate erklärt. Innerhalb der ersten 15 Tage waren in beiden Tumormodellen keine Änderungen des Tumorwachstums durch eine Kombination von Cisplatin und Tinzaparin im jeweiligen Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem Zytostatikum ersichtlich (Abbildung 61, 62, jeweils grüne vs. violette Kurve). Für den weiteren Zeitraum wurde in den jeweiligen Behandlungsgruppen eine reduzierte Anzahl Mäuse beobachtet, da bereits einige das maximal akzeptable Tumolvolumen erreicht hatten und daher aus der Studie entfernt werden mussten. Die in der Studie weiterhin beobachteten Mäuse (jeweils vier in beiden A2780 bzw. drei in beiden A2780cis Gruppen) offenbarten schließlich Unterschiede zwischen dem A2780 und A2780cis Tumormodell. Während eine Kombination aus Cisplatin und dem niedermolekularen Heparin mit einer ausgeprägteren

Wachstumshemmung der A2780cis Tumoren im Vergleich zur alleinigen Zytostatikabehandlung einherging (Abbildung 62, grüne vs. violette Kurve), blieb ein solcher Effekt in A2780 Tumoren aus (Abbildung 61, grüne vs. violette Kurve). Da dieser inhibierende Effekt vermutlich vorzugsweise Tumoren mit anfänglich kleinen Volumina zuzuschreiben war, erfolgte ein Vergleich beider Behandlungsgruppen, in denen nur Tumore mit den kleinsten anfänglichen Volumina (jeweils drei) analysiert wurden.

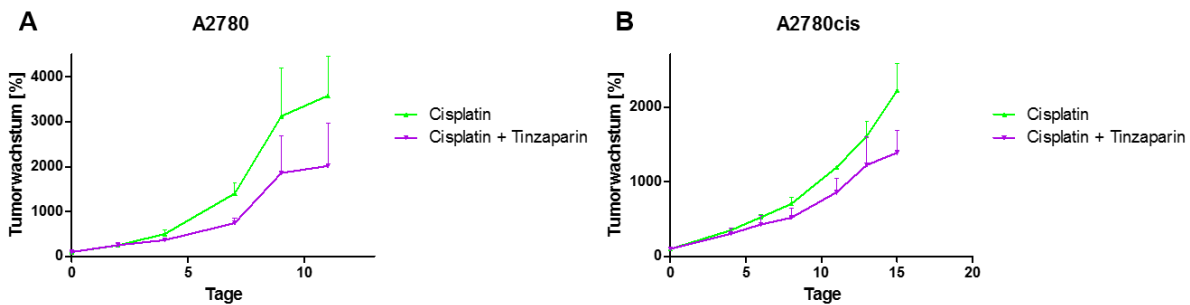


Abbildung 63: Einfluss von Tinzaparin auf eine Cisplatinbehandlung von A2780 (A) und A2780cis (B) Xenograft-Tumoren mit kleinem Initialvolumen. Dargestellt ist die Zunahme des durchschnittlichen Tumorstadiums der einzelnen Gruppen ($n=3$) \pm Standardabweichung. Die Daten wurden auf den Behandlungsbeginn an Tag 0 normalisiert. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Mueller zur Verfügung gestellt, welche zugleich Bestandteil unserer gemeinsamen Veröffentlichung waren (389).

Bei der Analyse der anfänglich kleinsten Tumore konnte in beiden Tumormodellen eine Reduktion des Wachstums unter zusätzlicher Tinzaparingabe im Vergleich zur entsprechenden alleinigen Behandlung mit Cisplatin festgestellt werden (Abbildung 63, jeweils grüne vs. violette Kurve), welche aufgrund der jeweiligen Gesamtheit der Daten bemerkenswert ist. Zu berücksichtigen ist allerdings die deutlich größere Schwankung der Werte in den A2780 Tumoren. Eine entsprechende Begründung für den inhibierenden Effekt auf das Tumorstadium durch eine Kombination beider Substanzen ist basierend auf der Datenlage schwierig. Daher erfolgte eine Quantifizierung der intratumoralen Platin-Akkumulation der jeweiligen Tumore. Sich daraus ergebende Erkenntnisse könnten somit einen Einblick in die durch Tinzaparin vermittelten Effekte liefern.

5.16.3 Einfluss von Tinzaparin auf den Platin *uptake in vivo*

Um zu untersuchen, ob die jeweilige Reduktion des Tumorwachstums in A2780 und A2780cis Xenograft-Modellen durch eine Kombination von Cisplatin und Tinzaparin mit einer Änderung der Konzentration des Zytostatikums begründet werden kann, erfolgte die Quantifizierung der intratumoralen Platinkonzentrationen. Hierzu wurden die Tumore zu jeweils zwei unterschiedlichen Zeitpunkten nach der letzten Gabe von Cisplatin entnommen und durch Herrn Dr. Thomas Mueller in Trockeneis an unser Institut versendet, wo schließlich die Analyse des Plattingehaltes stattfand.

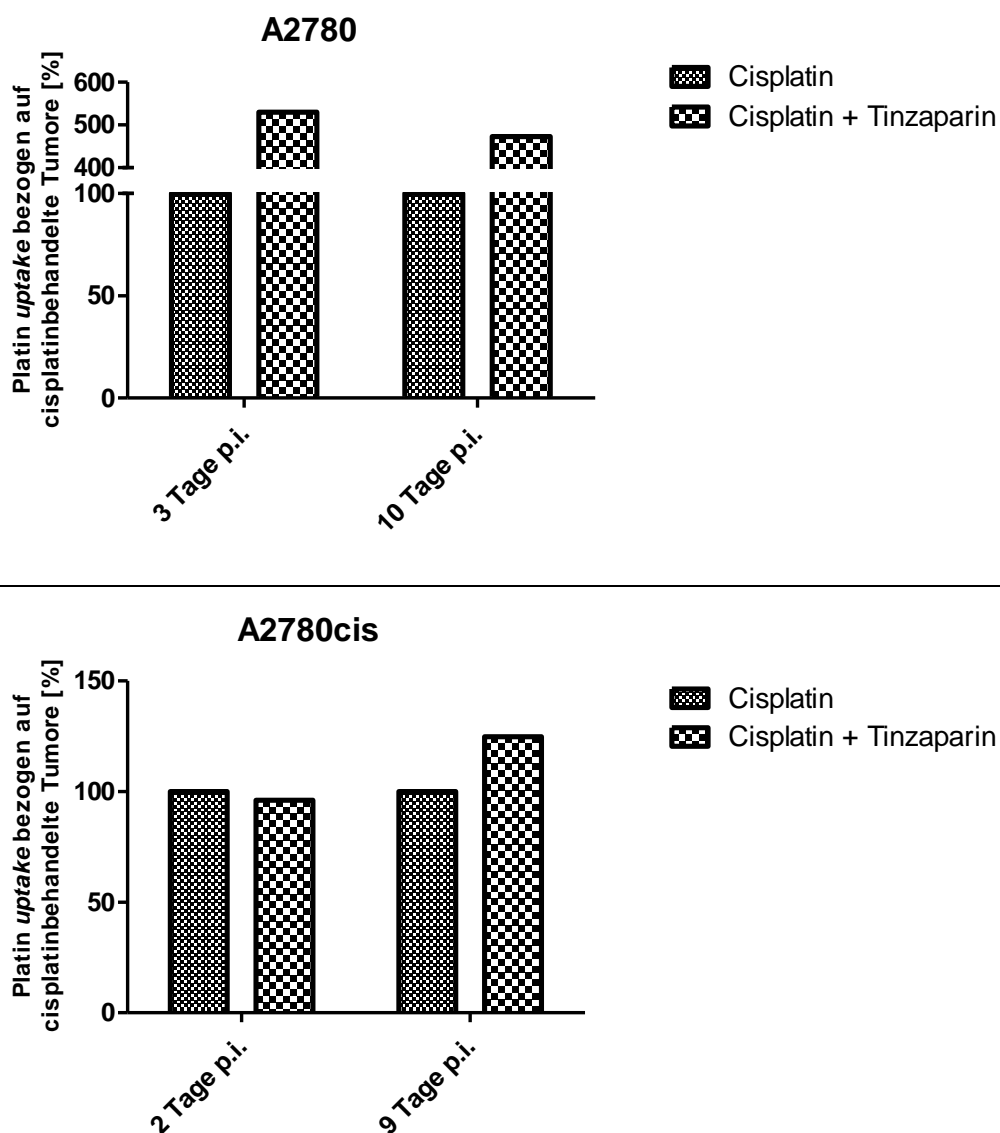


Abbildung 64: Quantifizierung der intratumoralen Platin-Akkumulation in A2780 (oben) und A2780cis (unten) Xenograft-Tumoren von Nacktmäusen. Die Tumorproben wurden nach drei und zehn (A2780) bzw. zwei und neun Tagen (A2780cis) nach der letzten Cisplatininjektion entnommen. Die Platinkonzentration der nur mit Cisplatin behandelten Tumore wurde jeweils als 100 % festgelegt und die mit Tinzaparin behandelten Tumore wurden darauf normalisiert.

Eine tägliche Behandlung der Xenograft-Nacktmäuse mit Tinzaparin ging zu beiden Zeitpunkten, also sowohl drei, als auch zehn Tage nach der letzten Cisplatingabe mit einer enormen Steigerung der Platinkonzentrationen in den analysierten A2780 Tumoren einher (Abbildung 64, oben). Dieser Befund war besonders in diesem Ausmaß erstaunlich. Auch wenn keine Aussagen über die Lokalisation des Zytostatikums innerhalb des Tumors getroffen werden können, steht dies in Kontrast zu den *in vitro* Daten, bei denen eine Behandlung mit dem Antikoagulans keine Auswirkungen auf den Platin *uptake* in A2780 Zellen nach sich zog (10). Die bedeutend erhöhte Platinkonzentration schien hierbei jedoch nicht mit einer gesteigerten Toxizität einherzugehen, da sich das Ausmaß des Tumorwachstums nicht von der alleinigen Behandlung mit dem Zytostatikum unterschied (Abbildung 61).

Die aus den A2780cis Tumoren quantifizierten Platinkonzentrationen offenbarten einen deutlichen Unterschied im *uptake* zwischen beiden Tumormodellen. Während zwei Tage nach der letzten Dosis des Zytostatikums keine Steigerung der Platinmenge durch die tägliche Injektion des Antikoagulans resultierte, konnte ein leichter Anstieg nach neun Tagen detektiert werden, welcher allerdings im Vergleich zum A2780 Modell deutlich geringer ausgeprägt war (Abbildung 64, unten). Diese Tatsache deutet daraufhin, dass die reduzierte Wachstumsrate der A2780cis Tumore bedingt durch eine Kombination beider Substanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht Ursache einer erhöhten intratumoralen Akkumulation von Cisplatin ist.

Zusammengefasst konnte mithilfe der dargestellten *in vivo* Studien eine erste Übertragung der Chemoresistenz der A2780cis Zellen im Vergleich zu A2780 Zellen auf *in vivo* Ebene durch Generierung von Xenograft-Nacktmäusen etabliert werden. Die letztliche Präsenz jener Resistenz kann zwar nicht eindeutig belegt werden, scheint jedoch aufgrund der durch Cisplatin bedingten Reduktion der Tumorwachstumsrate in unterschiedlichem Ausmaß (Abbildung 60) als wahrscheinlich. Hierbei offenbaren sich sowohl Unterschiede in der grundsätzlichen Geschwindigkeit des Tumorwachstums beider Modelle, als auch morphologische Unterschiede der A2780 und A2780cis Tumore (389), wodurch ein Vergleich einer durch Cisplatin induzierten Toxizität schwer fällt. Ebenso wird dadurch ersichtlich, dass eine direkte Übertragung der Erkenntnisse, welche aus einer zweidimensionalen Kultivierung von Tumorzellen *in vitro* erhoben wurden, auf ein weitaus komplexeres, dreidimensionales Tumorgewebe unter *in vivo* Bedingungen limitiert ist. Die Tatsache, dass eine Kombination aus dem Zytostatikum und dem Antikoagulans eine leichte Verlangsamung des Tumorwachstums nach 15 Tagen im A2780cis Modell bewirkte, könnte ein mögliches Resultat einer durch Tinzaparin vermittelten Steigerung der Cisplatintoxizität beschreiben. Die geringfügige

Steigerung der Platinkonzentration in A2780cis Tumoren (Abbildung 64, unten) sowie das Ausbleiben einer Auswirkung auf dessen Wachstumsrate bei alleiniger Behandlung mit dem Antikoagulans (Abbildung 62) stützen diese Theorie. Da ebenfalls solche A2780 Tumore mit den kleinsten Initialvolumina in ihrer Wachstumsrate durch eine Kombination aus Cisplatin und Tinzaparin inhibiert wurden im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem Zytostatikum (Abbildung 63 A), lässt unterschiedliche Ursachen für die gesteigerte Toxizität des Zytostatikums in beiden Modellen vermuten, da hier die durch Tinzaparin bedingte massive Erhöhung der Platinkonzentration (Abbildung 64, oben) ein primärer Mechanismus für die erniedrigte Wachstumsrate sein kann. Ein Beitrag, der seinen Ursprung in einem intrinsischen Effekt des Antikoagulans selbst hat (Abbildung 61), ist hierbei allerdings nicht auszuschließen.

Da bevorzugt kleinere Tumore von der gleichzeitigen Behandlung mit Tinzaparin profitierten (Abbildung 63), könnte man vermuten, dass dem niedermolekularen Heparin eine größere Zugänglichkeit und Interaktionsfläche mit dem entsprechenden Tumorgewebe zur Verfügung stand, welche bei vergleichsweise kleineren Tumoren durch die entsprechend verhältnismäßig größere Oberfläche gegenwärtig war. Da wie bereits beschrieben davon ausgegangen wurde, dass Tinzaparin aufgrund seiner Größe und mehrfach negativen Ladung seine chemosensitivierende Wirkung von extrazellulärer Seite aus vermittelt, unterstützen diese Befunde argumentativ diese Hypothese.

Für den Versuch einer Quantifizierung des niedermolekularen Heparins wurden Versuche mithilfe des Heparin-Red[®] Ultra-*assays* durchgeführt, welcher uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Roland Krämer der Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt wurde, dem an dieser Stelle ein besonderer Dank gilt. Leider gelang diese Art der Quantifizierung in dem wie in Kapitel 4.12.4 beschriebenen experimentellem Vorgehen nicht, sodass Aussagen über die tatsächliche Lokalisierung und Quantifizierung des Antikoagulans in den Xenograft-Tumoren nicht möglich sind. Eine solche Detektion stellt somit einen wichtigen Aspekt für die zukünftige Aufklärung der durch Tinzaparin vermittelten antitumoralen Effekte dar.

6. Zusammenfassung

Die im Zuge dieser Promotionsarbeit erhobenen Daten führen die vorangegangenen Arbeiten von Herrn Dr. Daniel Philipp Stölting fort, um einen funktionalen Einblick in die durch das niedermolekulare Heparin Tinzaparin bedingten Mechanismen zu erhalten, welche für den chemosensitivierenden Effekt in cisplatinresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen verantwortlich sind. Weiterhin wurde durch Einsatz mehrerer Heparinderivate überprüft, inwiefern dieser Effekt von bestimmten strukturellen Eigenschaften des Heparins abhängig ist. Anhand der generierten Daten zeigt sich, dass eine Minderung der in A2780cis Zellen vorherrschenden Chemoresistenz vorwiegend durch eine bestimmte Kettenlänge der Heparinstruktur vermittelt wird. Eine Inkubation mit UFH, sowie einem strukturell modifizierten Derivat ähnlicher Molekularmasse, als auch mit dem Pentasaccharid Fondaparinux bewirkt keine Reduktion der Chemoresistenz. Da eine entsprechende Behandlung mit einem weiteren Vertreter aus der Gruppe der niedermolekularen Heparine, dem Enoxaparin, eine leichte Sensitivierung induziert, scheint dieser Effekt auf jene Gruppe limitiert zu sein. Dieser durch Enoxaparin induzierte Effekt äußert sich im Vergleich zum Tinzaparin allerdings deutlich abgeschwächt, sodass eine genaue Aussage über die Struktur-Wirkungsbeziehung nicht möglich ist. Weiterhin geht eine geringere Dosierung von Tinzaparin über einen deutlich verlängerten Zeitraum nicht mit einer Sensitivierung einher, was sich im Einklang mit den bereits mehrfach erwähnten Daten aus vorangegangenen Arbeiten befindet, innerhalb derer eine Mindestdosis des Heparins Voraussetzung ist. Da u.a. UFH sogar entgegengesetzte Effekte bewirkt, scheint Tinzaparin spezifische Signalkaskaden von extrazellulärer Seite aus anzustoßen, welche eine gesteigerte Toxizität des Zytostatikums begünstigen.

Den enormen Einfluss, den Tinzaparin auf Transkriptionsebene von A2780cis Zellen besitzt, offenbart die Vielseitigkeit, in der dieses Molekül Einfluss auf eine Vielzahl biologischer Prozesse nimmt, welche zumindest partiell eine weitere Grundlage für die in der Literatur bereits beschriebenen antitumoralen Effekte darstellt. Diese gehen ganz offensichtlich weit über die antikoagulatorischen Mechanismen für die klinisch etablierte antithrombotische Therapie hinaus. Hierbei rückt der Wnt-Signalweg hinsichtlich der in cisplatinresistenten A2780cis Zellen vorherrschenden Chemoresistenz in den Fokus, da dieser ebenfalls durch das NMH dereguliert wird. Cisplatinresistente A2780cis Zellen scheinen den Ergebnissen zufolge in einer ausgeprägteren Abhängigkeit von jener Kaskade zu stehen, als dies bei entsprechenden nicht-resistenten Zellen der Fall ist. Da eine Inhibition des *Wnt-pathways* eine Steigerung der

Cisplatintoxizität bewirkt, ist eine Beteiligung jener Kaskade in den Mechanismen einer Chemoresistenz in A2780cis Zellen sehr wahrscheinlich. Die deutlich höhere Abhängigkeit von diesem Signalweg wird außerdem sowohl durch die Proteinexpression bestimmter Komponenten dieser Kaskade, als auch durch die deutlich gesteigerte *Wnt-pathway*-Aktivität in A2780cis Zellen verdeutlicht. Die aufgezeigten erhöht exprimierten Komponenten wie bspw. Glypikan-3 oder TCF-4 sowie die gesteigerte Aktivität der Kaskade, welche durch eine alleinige Behandlung mit Tinzaparin resultieren, könnten hierbei als ein Gegenregulationsmechanismus der cisplatinresistenten Zelle interpretiert werden, um das benötigte *Wnt-signaling* aufrecht zu erhalten. Die Tatsache, dass die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors TCF-4 durch alleinige Gegenwart von Tinzaparin als auch in Kombination mit Cisplatin *downreguliert* ist, lässt darin schließlich den Mechanismus für den chemosensitivierenden Effekt durch das NMH vermuten. Hierbei wird davon ausgegangen, dass zumindest Anteile der Chemoresistenz durch TCF-4 vermitteltes *signaling* bedingt sind, welche folglich durch Gegenwart von Tinzaparin inhibiert werden. Die Tatsache, dass eine alleinige Behandlung mit Cisplatin mit einer Steigerung der TCF-4 Expression einhergeht, unterstreicht zudem die Theorie einer dadurch vermittelten Chemoresistenz. Der gegenregulatorische Versuch der resistenten Zelle, durch Steigerung des *signalings* unter möglicher Zuhilfenahme der weiteren Transkriptionsfaktoren kann jene Eigenschaften von TCF-4 allerdings nicht kompensieren, was letztlich die Reduktion der Chemoresistenz zur Konsequenz hat. Unter Berücksichtigung dieser Befunde werden folgend mögliche molekularen Mechanismen formuliert, welche für den chemosensitivierenden Effekt verantwortlich sein könnten.

So ist es denkbar, dass das NMH die für das *Wnt-signaling* benötigten Wnt-Proteine auf extrazellulärer Seite abfängt, bevor eine Bindung an die Frizzled-Rezeptoren erfolgt. Ebenso könnte die beschriebene Interaktion zwischen dem Proteoglykan Glypikan-3 und Frizzled durch Tinzaparin unterbrochen bzw. gestört werden, sodass eine verminderte Zuleitung entsprechender Wnt-Proteine zu jenen Rezeptoren erfolgt. Beide Szenarien können eine verminderte Induktion der Wnt-Signalkaskade als Konsequenz haben, welche die resistente Zelle versucht zu kompensieren. Das durch Tinzaparin vermutlich ausbleibende bzw. verminderte TCF-4 bedingte *signaling* führt schließlich zur Reduktion der Chemoresistenz. Weitere an der Resistenz beteiligte Mechanismen und *pathways* in A2780cis Zellen und deren durch Tinzaparin bedingten Einfluss können nicht ausgeschlossen werden und sind somit Gegenstand zukünftiger Forschung.

Die Erkenntnisse aus den *in vivo* Studien zeigen hierbei, dass unter bestimmten Voraussetzungen auch hier das NMH eine Inhibition des Tumorwachstums induzieren kann. Inwiefern dies allerdings einer möglichen Reduktion der Chemoresistenz zuzuordnen ist, bleibt offen und gilt es aufzuklären. Zudem verdeutlichen diese Daten, wie herausfordernd eine Übertragung von *in vitro* Erkenntnissen auf ein weitaus komplexeres, dreidimensionales Gewebe ist, in dem eine Vielzahl zusätzlicher Faktoren zum Tragen kommt.

Weiterhin unterstreichen die gewonnenen Daten aus dem W1/W1CR Zellpaar die Vielfältigkeit einer Chemoresistenz. Demnach nutzen beide resistenten Zellen abweichende Mechanismen um der toxischen Wirkung des Zytostatikums zu entgehen, obwohl es sich um die gleiche Tumorentität handelt. Für die Übertragung der hier durch Tinzaparin beschriebenen und postulierten Effekte in A2780cis Zellen auf klinischer Ebene wäre es folglich von besonderem Interesse, eine der Behandlung vorhergehende Charakterisierung des entsprechenden Tumors zu ermöglichen. Würde dies gelingen, könnte durch eine begleitende antithrombotische Therapie mithilfe von Tinzaparin in einer bestimmten Zielgruppe von Tumorpatienten ein möglicher Benefit resultieren.

Weiterhin offenbaren diese Erkenntnisse das Potential von niedermolekularen Heparinen in einer begleitenden Behandlung in der Onkologie, von der Patienten profitieren könnten. Dies könnte in Konsequenz ein Alleinstellungsmerkmal dieser Substanzklasse darstellen, wodurch eine Abgrenzung zu oralen Antikoagulanzen hinsichtlich einer entsprechenden Indikation möglich wäre, um eine unter bestimmten Gesichtspunkten andauernde Therapie mit NMH anstelle von oralen Antikoagulanzen zu rechtfertigen.

7. Literaturverzeichnis

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* März 2015;65(2):87–108.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 1. Januar 2015;65(1):5–29.
3. Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, Lisowska KM. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* Januar 2018;81(1):17–38.
4. Kurman RJ, Shih I-M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol.* März 2010;34(3):433–43.
5. Coleman RL, Monk BJ, Sood AK, Herzog TJ. Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* April 2013;10(4):211–24.
6. Kurman RJ, Shih I-M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol.* Juli 2011;42(7):918–31.
7. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft, t e.V. und Deutschen Krebshilfe. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren [Internet]. 2016. Verfügbar unter: http://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/LL_Ovarialkarzinom_Langversion_2.0.pdf
8. European Medicines Agency, 2017. Avastin : EPAR - Summary for the public [Internet]. 2017 [zitiert 9. Januar 2018]. Verfügbar unter: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000582/WC500029260.pdf
9. Dr. Daniel Philipp Stölting. Beitrag zur Aufklärung der Cisplatinresistenz von Ovarialkarzinomzellen und deren Überwindung durch Liposomen oder niedermolekulares Heparin; urn:nbn:de:hbz:5n-42961 [Internet]. 2015 [zitiert 13. November 2017]. Verfügbar unter: <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2016/4296/4296.pdf>
10. Pfankuchen DB, Stölting DP, Schlesinger M, Royer H-D, Bendas G. Low molecular weight heparin tinzaparin antagonizes cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 15. September 2015;97(2):147–57.
11. Peyrone M. Ueber die Einwirkung von Ammoniak auf Platinchlorür. *Ann Chem Pharm.* 1845;55(2):205–13.
12. Kauffman GB, Pentimalli R, Doldi S, Hall MD. Michele Peyrone (1813-1883), Discoverer of Cisplatin. *Platin Met Rev.* 1. Oktober 2010;54(4):250–6.
13. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. *Nature.* 13. Februar 1965;205:698–9.

14. Rosenberg B, Vancamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*. 26. April 1969;222(5191):385–6.
15. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 5. Oktober 2014;740:364–78.
16. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. August 2007;7(8):573–84.
17. Koster R, van Vugt M a. TM, Timmer-Bosscha H, Gietema JA, de Jong S. Unravelling mechanisms of cisplatin sensitivity and resistance in testicular cancer. *Expert Rev Mol Med*. 30. September 2013;15:e12.
18. Hanna NH, Einhorn LH. Testicular cancer--discoveries and updates. *N Engl J Med*. 20. November 2014;371(21):2005–16.
19. Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med*. 22. Januar 2004;350(4):379–92.
20. Zatloukal P, Petruzelka L, Zemanová M, Kolek V, Skricková J, Pesek M, u. a. Gemcitabine plus cisplatin vs. gemcitabine plus carboplatin in stage IIIb and IV non-small cell lung cancer: a phase III randomized trial. *Lung Cancer Amst Neth*. September 2003;41(3):321–31.
21. Lazarević T, Rilak A, Bugarčić ŽD. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem*. 18. April 2017;
22. MacDonald SM, Rapalino O, Sherry NA, Cohen AB, Ebb DH, Tarbell NJ, u. a. Case 32-2016. A 20-Year-Old Man with Gynecomastia. *N Engl J Med*. 20 2016;375(16):1567–79.
23. Zhu S, Pabla N, Tang C, He L, Dong Z. DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Arch Toxicol*. Dezember 2015;89(12):2197–205.
24. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med*. 18. November 1993;329(21):1550–9.
25. Waissbluth S, Daniel SJ. Cisplatin-induced ototoxicity: transporters playing a role in cisplatin toxicity. *Hear Res*. Mai 2013;299:37–45.
26. Lévi F, Metzger G, Massari C, Milano G. Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. *Clin Pharmacokinet*. Januar 2000;38(1):1–21.
27. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, u. a. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 3. Juni 2004;350(23):2343–51.
28. Machover D, Diaz-Rubio E, de Gramont A, Schilf A, Gastiburu JJ, Brienza S, u. a. Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Januar 1996;7(1):95–8.

29. Lokich J, Zipoli T, Greene R, Paul S, Sonnenborn H, Moore C. Protracted low-dose cisplatin infusion in advanced colorectal cancer. *Cancer Treat Rep.* April 1986;70(4):523–4.
30. Jehn CF, Boulikas T, Kourvetaris A, Kofla G, Possinger K, Lüftner D. First safety and response results of a randomized phase III study with liposomal platinum in the treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Anticancer Res.* Dezember 2008;28(6B):3961–4.
31. Feng B, Zhou F, Lu W, Wang D, Wang T, Luo C, u. a. Phospholipid-mimic oxaliplatin prodrug liposome for treatment of the metastatic triple negative breast cancer. *Biomater Sci.* 25. Juli 2017;5(8):1522–5.
32. Ferreira JA, Peixoto A, Neves M, Gaiteiro C, Reis CA, Assaraf YG, u. a. Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: Adding glycosylation to the equation. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* Januar 2016;24:34–54.
33. Kachalaki S, Ebrahimi M, Mohamed Khosroshahi L, Mohammadinejad S, Baradaran B. Cancer chemoresistance; biochemical and molecular aspects: a brief overview. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 30. Juni 2016;89:20–30.
34. Yotsuyanagi T, Usami M, Noda Y, Nagata M. Computational consideration of cisplatin hydrolysis and acid dissociation in aqueous media: effect of total drug concentrations. *Int J Pharm.* 10. Oktober 2002;246(1–2):95–104.
35. el-Khateeb M, Appleton TG, Gahan LR, Charles BG, Berners-Price SJ, Bolton AM. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. *J Inorg Biochem.* Oktober 1999;77(1–2):13–21.
36. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev.* 8. September 1999;99(9):2467–98.
37. Gale GR, Morris CR, Atkins LM, Smith AB. Binding of an antitumor platinum compound to cells as influenced by physical factors and pharmacologically active agents. *Cancer Res.* April 1973;33(4):813–8.
38. Cepeda V, Fuertes M, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez J. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem.* 1. Januar 2007;7(1):3–18.
39. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer.* Juni 1993;67(6):1171–6.
40. Dornish JM, Pettersen EO. Protection from cis-dichlorodiammineplatinum-induced cell inactivation by aldehydes involves cell membrane amino groups. *Cancer Lett.* Dezember 1985;29(3):235–43.
41. Dornish JM, Pettersen EO, Oftebro R. Modifying effect of cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives on cell inactivation and cellular uptake of cis-diamminedichloroplatinum(II) in human NHIK 3025 cells. *Cancer Res.* 15. Juli 1989;49(14):3917–21.

42. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29. Oktober 2002;99(22):14298–302.
43. More SS, Akil O, Ianculescu AG, Geier EG, Lustig LR, Giacomini KM. Role of the copper transporter, CTR1, in platinum-induced ototoxicity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 14. Juli 2010;30(28):9500–9.
44. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 20. Oktober 2003;22(47):7265–79.
45. Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther*. 1987;34(2):155–66.
46. Pinto AL, Lippard SJ. Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochim Biophys Acta*. 1985;780(3):167–80.
47. Pinto AL, Lippard SJ. Sequence-dependent termination of in vitro DNA synthesis by cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II). *Proc Natl Acad Sci U S A*. Juli 1985;82(14):4616–9.
48. Kelland LR. New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol*. Dezember 1993;15(3):191–219.
49. Bellon SF, Coleman JH, Lippard SJ. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry (Mosc)*. 13. August 1991;30(32):8026–35.
50. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol*. April 2001;59(4):657–63.
51. Vaisman A, Varchenko M, Said I, Chaney SG. Cell cycle changes associated with formation of Pt-DNA adducts in human ovarian carcinoma cells with different cisplatin sensitivity. *Cytometry*. 1. Januar 1997;27(1):54–64.
52. Burger H, Nooter K, Boersma AW, Kortland CJ, Stoter G. Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer*. 14. November 1997;73(4):592–9.
53. Sorenson CM, Eastman A. Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*. 1. Dezember 1988;48(23):6703–7.
54. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 14. März 2003;278(11):9100–6.
55. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. April 2005;4(4):307–20.
56. Huang JC, Zamble DB, Reardon JT, Lippard SJ, Sancar A. HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin

- by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25. Oktober 1994;91(22):10394–8.
57. Treiber DK, Zhai X, Jantzen HM, Essigmann JM. Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the ribosomal RNA transcription factor hUBF (human upstream binding factor). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7. Juni 1994;91(12):5672–6.
 58. Vichi P, Coin F, Renaud JP, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Moras D, u. a. Cisplatin- and UV-damaged DNA lure the basal transcription factor TFIID/TBP. *EMBO J*. 15. Dezember 1997;16(24):7444–56.
 59. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci CMLS*. August 2000;57(8–9):1229–35.
 60. Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, u. a. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*. 2. Juni 1995;81(5):727–36.
 61. Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*. 12. April 2004;23(16):2934–49.
 62. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. Juli 2002;2(7):489–501.
 63. Fraser M, Leung BM, Yan X, Dan HC, Cheng JQ, Tsang BK. p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 1. November 2003;63(21):7081–8.
 64. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 15. November 1999;13(22):2905–27.
 65. Shi H, Pu J, Zhou X-L, Ning Y-Y, Bai C. Silencing long non-coding RNA ROR improves sensitivity of non-small-cell lung cancer to cisplatin resistance by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. Mai 2017;39(5):1010428317697568.
 66. Brachmann SM, Hofmann I, Schnell C, Fritsch C, Wee S, Lane H, u. a. Specific apoptosis induction by the dual PI3K/mTor inhibitor NVP-BEZ235 in HER2 amplified and PIK3CA mutant breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29. Dezember 2009;106(52):22299–304.
 67. Maira S-M, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, u. a. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther*. 1. Juli 2008;7(7):1851–63.
 68. Fazio N, Buzzoni R, Baudin E, Antonuzzo L, Hubner RA, Lahner H, u. a. A Phase II Study of BEZ235 in Patients with Everolimus-resistant, Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumours. *Anticancer Res*. Februar 2016;36(2):713–9.
 69. Bendell JC, Kurkjian C, Infante JR, Bauer TM, Burris HA, Greco FA, u. a. A phase 1 study of the sachet formulation of the oral dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 given

- twice daily (BID) in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. April 2015;33(2):463–71.
70. Vogelstein B. Cancer. A deadly inheritance. *Nature*. 20. Dezember 1990;348(6303):681–2.
71. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 5. Juli 1991;253(5015):49–53.
72. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 7. Februar 1997;88(3):323–31.
73. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*. April 2003;10(4):431–42.
74. Delmastro DA, Li J, Vaisman A, Solle M, Chaney SG. DNA damage inducible-gene expression following platinum treatment in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1997;39(3):245–53.
75. McKay BC, Ljungman M, Rainbow AJ. Potential roles for p53 in nucleotide excision repair. *Carcinogenesis*. August 1999;20(8):1389–96.
76. Adimoolam S, Ford JM. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. Oktober 2002;99(20):12985–90.
77. Dutta A, Ruppert JM, Aster JC, Winchester E. Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature*. 2. September 1993;365(6441):79–82.
78. Vekris A, Meynard D, Haaz M-C, Bayssas M, Bonnet J, Robert J. Molecular determinants of the cytotoxicity of platinum compounds: the contribution of in silico research. *Cancer Res*. 1. Januar 2004;64(1):356–62.
79. Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan Z-M, Bondaruk J, Suzuki F, u. a. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet*. Januar 2004;36(1):55–62.
80. Zamble DB, Jacks T, Lippard SJ. p53-Dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26. Mai 1998;95(11):6163–8.
81. Pestell KE, Hobbs SM, Titley JC, Kelland LR, Walton MI. Effect of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line. *Mol Pharmacol*. März 2000;57(3):503–11.
82. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 15. Dezember 2000;275(50):39435–43.
83. Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 15. August 1999;55(10):1230–54.

84. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* Januar 1999;79(1):143–80.
85. Sluss HK, Barrett T, Dérijard B, Davis RJ. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol.* Dezember 1994;14(12):8376–84.
86. Olson JM, Hallahan AR. p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends Mol Med.* März 2004;10(3):125–9.
87. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, u. a. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science.* 12. August 1994;265(5174):966–70.
88. Gajate C, Santos-Beneit A, Modolell M, Mollinedo F. Involvement of c-Jun NH₂-terminal kinase activation and c-Jun in the induction of apoptosis by the ether phospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *Mol Pharmacol.* April 1998;53(4):602–12.
89. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, u. a. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* 3. Januar 1997;275(5296):90–4.
90. Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999;71(3–4):479–500.
91. Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin CA, u. a. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J.* 2. Juni 2003;22(11):2788–97.
92. Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC. The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J.* 1. September 1999;18(17):4779–93.
93. Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* 15. April 1997;16(8):1909–20.
94. Wang D, Lippard SJ. Cisplatin-induced post-translational modification of histones H3 and H4. *J Biol Chem.* 14. Mai 2004;279(20):20622–5.
95. Hernández Losa J, Parada Cobo C, Guinea Viniegra J, Sánchez-Arevalo Lobo VJ, Ramón y Cajal S, Sánchez-Prieto R. Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. *Oncogene.* 26. Juni 2003;22(26):3998–4006.
96. Persons DL, Yazlovitskaya EM, Cui W, Pelling JC. Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* Mai 1999;5(5):1007–14.
97. Yeh PY, Chuang S-E, Yeh K-H, Song YC, Ea C-K, Cheng A-L. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to

- ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochem Pharmacol.* 15. April 2002;63(8):1423–30.
98. Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang Q, Tian L, Wang Y, u. a. 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.* 23. Mai 2003;278(21):19245–56.
99. Levresse V, Marek L, Blumberg D, Heasley LE. Regulation of platinum-compound cytotoxicity by the c-Jun N-terminal kinase and c-Jun signaling pathway in small-cell lung cancer cells. *Mol Pharmacol.* September 2002;62(3):689–97.
100. Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene.* 20. Dezember 1999;18(55):7883–99.
101. Sorenson CM, Eastman A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 15. August 1988;48(16):4484–8.
102. Kanno S, Hyodo M, Suzuki K, Ohkido M. Effect of DNA-damaging agents on DNA replication and cell-cycle progression of cultured mouse mammary carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res Gann.* April 1985;76(4):289–96.
103. Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, u. a. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet.* Dezember 1998;20(4):398–400.
104. Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, u. a. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 15. Januar 1999;13(2):152–7.
105. Damia G, Filiberti L, Vikhanskaya F, Carrassa L, Taya Y, D'incalci M, u. a. Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia N Y N.* Februar 2001;3(1):10–6.
106. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 31. Oktober 1997;91(3):325–34.
107. Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* 1. Februar 2000;14(3):289–300.
108. Zhang Y, Ma W-Y, Kaji A, Bode AM, Dong Z. Requirement of ATM in UVA-induced signaling and apoptosis. *J Biol Chem.* 1. Februar 2002;277(5):3124–31.
109. Costa RMA, Chiganças V, Galhardo R da S, Carvalho H, Menck CFM. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.* November 2003;85(11):1083–99.
110. Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell.* Februar 1985;40(2):359–69.

111. Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*. 23. Oktober 1987;51(2):241–9.
112. Nospikel T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci CMLS*. März 2009;66(6):994–1009.
113. Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, u. a. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*. August 1998;2(2):223–32.
114. van der Horst GTJ, Meira L, Gorgels TGMF, de Wit J, Velasco-Miguel S, Richardson JA, u. a. UVB radiation-induced cancer predisposition in Cockayne syndrome group A (Csa) mutant mice. *DNA Repair*. 28. Februar 2002;1(2):143–57.
115. Troelstra C, van Gool A, de Wit J, Vermeulen W, Bootsma D, Hoeijmakers JH. ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell*. 11. Dezember 1992;71(6):939–53.
116. Iyama T, Wilson DM. Elements That Regulate the DNA Damage Response of Proteins Defective in Cockayne Syndrome. *J Mol Biol*. 16. Januar 2016;428(1):62–78.
117. Hanawalt PC. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*. 16. Dezember 2002;21(58):8949–56.
118. Nospikel T, Hanawalt PC. Terminally differentiated human neurons repair transcribed genes but display attenuated global DNA repair and modulation of repair gene expression. *Mol Cell Biol*. März 2000;20(5):1562–70.
119. Welsh C, Day R, McGurk C, Masters JRW, Wood RD, Köberle B. Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer*. 20. Juni 2004;110(3):352–61.
120. Köberle B, Masters JR, Hartley JA, Wood RD. Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol CB*. 11. März 1999;9(5):273–6.
121. Bellacosa A. Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins. *Cell Death Differ*. November 2001;8(11):1076–92.
122. Duckett DR, Bronstein SM, Taya Y, Modrich P. hMutSalpha- and hMutLalpha-dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26. Oktober 1999;96(22):12384–8.
123. Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG, Levrero M, u. a. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*. 24. Juni 1999;399(6738):806–9.
124. Golstein P, Ojcius DM, Young JD. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev*. Juni 1991;121:29–65.

125. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 15. Mai 1997;57(10):1835–40.
126. Nguewa PA, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Pharmacological modulation of Poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death: exploitation in cancer chemotherapy. *Mol Pharmacol.* November 2003;64(5):1007–14.
127. Martin DS, Bertino JR, Koutcher JA. ATP depletion + pyrimidine depletion can markedly enhance cancer therapy: fresh insight for a new approach. *Cancer Res.* 15. Dezember 2000;60(24):6776–83.
128. de Murcia G, Ménissier de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci.* April 1994;19(4):172–6.
129. Berger NA. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res.* Januar 1985;101(1):4–15.
130. Fernandes-Alnemri T, Takahashi A, Armstrong R, Krebs J, Fritz L, Tomaselli KJ, u. a. Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res.* 15. Dezember 1995;55(24):6045–52.
131. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, u. a. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 26. Juli 1991;66(2):233–43.
132. Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, u. a. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther.* Dezember 2000;88(3):333–47.
133. Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, u. a. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. April 1995;154(8):3806–13.
134. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, u. a. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. Februar 1992;148(4):1274–9.
135. Ware CF, VanArsdale S, VanArsdale TL. Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem.* Januar 1996;60(1):47–55.
136. Tartaglia LA, Goeddel DV. Tumor necrosis factor receptor signaling. A dominant negative mutation suppresses the activation of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Biol Chem.* 5. März 1992;267(7):4304–7.
137. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, u. a. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 15. Mai 1997;16(10):2794–804.
138. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, u. a. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 15. November 1995;14(22):5579–88.

139. Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem.* 31. Januar 1997;272(5):2952–6.
140. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10. Dezember 1996;93(25):14486–91.
141. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 15. August 1997;326 (Pt 1):1–16.
142. Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.* 1. November 1989;49(21):5870–8.
143. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, u. a. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 14. November 1997;91(4):479–89.
144. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* Juni 1998;1(7):949–57.
145. Del Bello B, Valentini MA, Zunino F, Comporti M, Maellaro E. Cleavage of Bcl-2 in oxidant- and cisplatin-induced apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene.* 27. Juli 2001;20(33):4591–5.
146. Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, u. a. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science.* 12. Dezember 1997;278(5345):1966–8.
147. Fulda S, Los M, Friesen C, Debatin KM. Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int J Cancer.* 30. März 1998;76(1):105–14.
148. Kojima H, Endo K, Moriyama H, Tanaka Y, Alnemri ES, Slapak CA, u. a. Abrogation of mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. *J Biol Chem.* 3. Juli 1998;273(27):16647–50.
149. Omura G, Blessing JA, Ehrlich CE, Miller A, Yordan E, Creasman WT, u. a. A randomized trial of cyclophosphamide and doxorubicin with or without cisplatin in advanced ovarian carcinoma. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer.* 1. Mai 1986;57(9):1725–30.
150. Hainsworth JD, Grosh WW, Burnett LS, Jones HW, Wolff SN, Greco FA. Advanced ovarian cancer: long-term results of treatment with intensive cisplatin-based chemotherapy of brief duration. *Ann Intern Med.* Februar 1988;108(2):165–70.
151. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: an overview of randomised clinical trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists Group. *BMJ.* 12. Oktober 1991;303(6807):884–93.
152. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med.* 9. Dezember 2004;351(24):2519–29.

153. Markman M. „Recurrence within 6 months of platinum therapy“: an adequate definition of „platinum-refractory“ ovarian cancer? *Gynecol Oncol*. Mai 1998;69(2):91–2.
154. Giaccone G. Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*. 2000;59 Suppl 4:9-17; discussion 37-38.
155. Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. Dezember 2010;1806(2):172–82.
156. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res*. 1. Juli 2001;478(1–2):23–43.
157. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*. Februar 2007;33(1):9–23.
158. Dimanche-Boitrel MT, Pelletier H, Genne P, Petit JM, Le Grimellec C, Canal P, u. a. Confluence-dependent resistance in human colon cancer cells: role of reduced drug accumulation and low intrinsic chemosensitivity of resting cells. *Int J Cancer*. 12. März 1992;50(5):677–82.
159. Zeng-Rong N, Paterson J, Alpert L, Tsao MS, Viallet J, Alaoui-Jamali MA. Elevated DNA repair capacity is associated with intrinsic resistance of lung cancer to chemotherapy. *Cancer Res*. 1. November 1995;55(21):4760–4.
160. Godwin AK, Meister A, O’Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. April 1992;89(7):3070–4.
161. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, u. a. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 12. April 2012;31(15):1869–83.
162. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. Januar 2008;9(1):105–27.
163. Molnár J, Engi H, Hohmann J, Molnár P, Deli J, Wesolowska O, u. a. Reversal of multidrug resistance by natural substances from plants. *Curr Top Med Chem*. 2010;10(17):1757–68.
164. Smith CD, Carmeli S, Moore RE, Patterson GM. Scytophycins, novel microfilament-depolymerizing agents which circumvent P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res*. 15. März 1993;53(6):1343–7.
165. Wada H, Saikawa Y, Niida Y, Nishimura R, Noguchi T, Matsukawa H, u. a. Selectively induced high MRP gene expression in multidrug-resistant human HL60 leukemia cells. *Exp Hematol*. Januar 1999;27(1):99–109.
166. Loh SY, Mistry P, Kelland LR, Abel G, Harrap KR. Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum (II) and (IV) ammine/amine complexes. *Br J Cancer*. Dezember 1992;66(6):1109–15.

167. Mellish KJ, Kelland LR, Harrap KR. In vitro platinum drug chemosensitivity of human cervical squamous cell carcinoma cell lines with intrinsic and acquired resistance to cisplatin. *Br J Cancer*. August 1993;68(2):240–50.
168. Ishida S, McCormick F, Smith-McCune K, Hanahan D. Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. *Cancer Cell*. 15. Juni 2010;17(6):574–83.
169. Holzer AK, Howell SB. The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Res*. 15. November 2006;66(22):10944–52.
170. Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, u. a. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res*. 15. November 2002;62(22):6559–65.
171. Safaei R, Holzer AK, Katano K, Samimi G, Howell SB. The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *J Inorg Biochem*. Oktober 2004;98(10):1607–13.
172. Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, u. a. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15. Juli 2004;10(14):4661–9.
173. Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T, u. a. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res*. 1. März 2000;60(5):1312–6.
174. Sun S, Cai J, Yang Q, Zhao S, Wang Z. The association between copper transporters and the prognosis of cancer patients undergoing chemotherapy: a meta-analysis of literatures and datasets. *Oncotarget*. 12. Dezember 2016;8(9):16036–51.
175. Jia Y, Zhang C, Zhou L, Xu H, Shi Y, Tong Z. Micheliolide overcomes KLF4-mediated cisplatin resistance in breast cancer cells by downregulating glutathione. *OncoTargets Ther*. 2015;8:2319–27.
176. Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, u. a. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res*. 15. Juni 1991;51(12):3237–42.
177. Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem*. 25. September 1993;268(27):20116–25.
178. Ishikawa T, Wright CD, Ishizuka H. GS-X pump is functionally overexpressed in cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation. *J Biol Chem*. 18. November 1994;269(46):29085–93.
179. Lewis AD, Hayes JD, Wolf CR. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of

- drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis*. Juli 1988;9(7):1283–7.
180. Li Q, Yu JJ, Mu C, Yunbham MK, Slavsky D, Cross CL, u. a. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res*. April 2000;20(2A):645–52.
181. Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest*. August 1994;94(2):703–8.
182. Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Lenz HJ, Hayashi K, u. a. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. Januar 1998;16(1):309–16.
183. Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M, Cecere FL, Albiol S, Guillem V, u. a. Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. März 2007;18(3):522–8.
184. Dabholkar M, Bostick-Bruton F, Weber C, Bohr VA, Egwuagu C, Reed E. ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 7. Oktober 1992;84(19):1512–7.
185. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, u. a. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 7. September 2006;355(10):983–91.
186. Zhen W, Link CJ, O'Connor PM, Reed E, Parker R, Howell SB, u. a. Increased gene-specific repair of cisplatin interstrand cross-links in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *Mol Cell Biol*. September 1992;12(9):3689–98.
187. Bramson J, Panasci LC. Effect of ERCC-1 overexpression on sensitivity of Chinese hamster ovary cells to DNA damaging agents. *Cancer Res*. 15. Juli 1993;53(14):3237–40.
188. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, u. a. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res*. 1. Juli 1996;56(13):3087–90.
189. Drummond JT, Anthony A, Brown R, Modrich P. Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutL α and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *J Biol Chem*. 16. August 1996;271(33):19645–8.
190. Brown R, Hirst GL, Gallagher WM, McIlwrath AJ, Margison GP, van der Zee AG, u. a. hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene*. 3. Juli 1997;15(1):45–52.
191. Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, u. a. The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance:

- correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res.* 15. August 1998;58(16):3579–85.
192. Shachar S, Ziv O, Avkin S, Adar S, Wittschieben J, Reissner T, u. a. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J.* 18. Februar 2009;28(4):383–93.
193. Wang H, Zhang S-Y, Wang S, Lu J, Wu W, Weng L, u. a. REV3L confers chemoresistance to cisplatin in human gliomas: the potential of its RNAi for synergistic therapy. *Neuro-Oncol.* Dezember 2009;11(6):790–802.
194. Ceppi P, Novello S, Cambieri A, Longo M, Monica V, Lo Iacono M, u. a. Polymerase eta mRNA expression predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1. Februar 2009;15(3):1039–45.
195. Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res.* 2010;108:73–112.
196. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, u. a. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 14. April 2005;434(7035):917–21.
197. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer.* September 2004;4(9):665–76.
198. Yang Z, Schumaker LM, Egorin MJ, Zuhowski EG, Guo Z, Cullen KJ. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1. Oktober 2006;12(19):5817–25.
199. Tajeddine N, Galluzzi L, Kepp O, Hangen E, Morselli E, Senovilla L, u. a. Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death. *Oncogene.* 10. Juli 2008;27(30):4221–32.
200. Xie X, Lozano G, Siddik ZH. Heterozygous p53(V172F) mutation in cisplatin-resistant human tumor cells promotes MDM4 recruitment and decreases stability and transactivity of p53. *Oncogene.* 8. September 2016;35(36):4798–806.
201. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, u. a. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science.* 4. November 1994;266(5186):807–10.
202. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* September 1998;16(9):3158–68.
203. O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, u. a. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* 1. Oktober 1997;57(19):4285–300.

204. Spierings DCJ, de Vries EGE, Vellenga E, de Jong S. Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ.* Juli 2003;10(7):808–22.
205. Han J-Y, Hong EK, Choi BG, Park JN, Kim KW, Kang JH, u. a. Death receptor 5 and Bcl-2 protein expression as predictors of tumor response to gemcitabine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* 2003;20(4):355–62.
206. Williams J, Lucas PC, Griffith KA, Choi M, Fogoros S, Hu YY, u. a. Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. *Gynecol Oncol.* Februar 2005;96(2):287–95.
207. Michaud WA, Nichols AC, Mroz EA, Faquin WC, Clark JR, Begum S, u. a. Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1. März 2009;15(5):1645–54.
208. Xu L, Fu Y, Li Y, Han X. Cisplatin induces expression of drug resistance-related genes through c-jun N-terminal kinase pathway in human lung cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* August 2017;80(2):235–42.
209. Ikeguchi M, Kaibara N. Changes in survivin messenger RNA level during cisplatin treatment in gastric cancer. *Int J Mol Med.* Dezember 2001;8(6):661–6.
210. Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, u. a. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer.* 20. März 2001;95(2):92–5.
211. Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Yagihashi A, Hirata K, u. a. Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients. *Cancer Sci.* Januar 2004;95(1):44–51.
212. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, u. a. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature.* 2. Juni 2005;435(7042):677–81.
213. Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev.* November 2009;35(7):553–62.
214. Ueno T, Uehara S, Nakahata K, Okuyama H. Survivin selective inhibitor YM155 promotes cisplatin-induced apoptosis in embryonal rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol.* Mai 2016;48(5):1847–54.
215. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, u. a. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 12. Mai 1989;244(4905):707–12.
216. Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res.* 15. Juli 2002;62(14):4132–41.

217. Ignatoski KM, Maehama T, Markwart SM, Dixon JE, Livant DL, Ethier SP. ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br J Cancer*. Februar 2000;82(3):666–74.
218. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*. März 2001;3(3):245–52.
219. Fijołek J, Wiatr E, Rowińska-Zakrzewska E, Giedronowicz D, Langfort R, Chabowski M, u. a. p53 and HER2/neu expression in relation to chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers*. Juni 2006;21(2):81–7.
220. Lee K, Deng X, Friedman E. Mirk protein kinase is a mitogen-activated protein kinase substrate that mediates survival of colon cancer cells. *Cancer Res*. 1. Juli 2000;60(13):3631–7.
221. Deng X, Ewton DZ, Friedman E. Mirk/Dyrk1B maintains the viability of quiescent pancreatic cancer cells by reducing levels of reactive oxygen species. *Cancer Res*. 15. April 2009;69(8):3317–24.
222. Hu J, Friedman E. Depleting Mirk Kinase Increases Cisplatin Toxicity in Ovarian Cancer Cells. *Genes Cancer*. 1. August 2010;1(8):803–11.
223. Gao J, Zheng Z, Rawal B, Schell MJ, Bepler G, Haura EB. Mirk/Dyrk1B, a novel therapeutic target, mediates cell survival in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther*. September 2009;8(17):1671–9.
224. Ren J-H, He W-S, Nong L, Zhu Q-Y, Hu K, Zhang R-G, u. a. Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy. *Cancer Biother Radiopharm*. Februar 2010;25(1):75–80.
225. Yu H, Su J, Xu Y, Kang J, Li H, Zhang L, u. a. p62/SQSTM1 involved in cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by clearing ubiquitinated proteins. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. Juli 2011;47(10):1585–94.
226. Dickreuter E, Cordes N. The cancer cell adhesion resistome: mechanisms, targeting and translational approaches. *Biol Chem*. 27. Juni 2017;398(7):721–35.
227. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 3. April 1992;69(1):11–25.
228. Lin TH, Aplin AE, Shen Y, Chen Q, Schaller M, Romer L, u. a. Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts. *J Cell Biol*. 24. März 1997;136(6):1385–95.
229. Meng F, Lowell CA. A beta 1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *EMBO J*. 3. August 1998;17(15):4391–403.
230. King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tschlis PN, Brugge JS. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol*. August 1997;17(8):4406–18.

231. Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene*. 7. September 2000;19:4319–27.
232. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, u. a. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med*. Juni 1999;5(6):662–8.
233. Alban S. From heparins to factor Xa inhibitors and beyond. *Eur J Clin Invest*. März 2005;35 Suppl 1:12–20.
234. Casu B, Naggi A, Torri G. Re-visiting the structure of heparin. *Carbohydr Res*. 11. Februar 2015;403:60–8.
235. Bangham DR, Mussett MV. The Second International Standard for heparin. *Bull World Health Organ*. 1959;20:1201–8.
236. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. S3-Leitlinie Prophylaxe der venösen Thromboembolie (VTE), 2. komplett überarbeitete Auflage - 003-0011_S3_VTE-Prophylaxe_2015-12.pdf AWMF Leitlinien -Register Nr. 003/001 Stand: 15.10.2015 [Internet]. Verfügbar unter: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/003-0011_S3_VTE-Prophylaxe_2015-12.pdf
237. Mutschler E, Herausgeber. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie ; mit 349 Abbildungen, 257 Tabellen und 1417 Strukturformeln. 10., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: WVG, Wiss. Verl.-Ges; 2013. 1197 S.
238. Lindahl U, Thunberg L, Bäckström G, Riesenfeld J, Nordling K, Björk I. Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. *J Biol Chem*. 25. Oktober 1984;259(20):12368–76.
239. Petitou M, Casu B, Lindahl U. 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. *Biochimie*. Februar 2003;85(1–2):83–9.
240. Messmore HL, Wehrmacher WH, Coyne E, Fareed J. Heparin to pentasaccharide and beyond: the end is not in sight. *Semin Thromb Hemost*. Februar 2004;30 Suppl 1:81–8.
241. Jacques LB. Heparin: an old drug with a new paradigm. *Science*. 2. November 1979;206(4418):528–33.
242. Mulloy B, Hogwood J, Gray E, Lever R, Page CP. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. *Pharmacol Rev*. Januar 2016;68(1):76–141.
243. Muramatsu T, Muramatsu H. Glycosaminoglycan-binding cytokines as tumor markers. *Proteomics*. August 2008;8(16):3350–9.
244. Rider CC, Mulloy B. Heparin, Heparan Sulphate and the TGF- β Cytokine Superfamily. *Mol Basel Switz*. 29. April 2017;22(5).

245. Kuschert GS, Coulin F, Power CA, Proudfoot AE, Hubbard RE, Hoogewerf AJ, u. a. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry (Mosc)*. 28. September 1999;38(39):12959–68.
246. Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, Proudfoot AE. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:385–410.
247. Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19. März 2013;110(12):4563–8.
248. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest*. 1998;101(4):877–89.
249. Zhao G, Seng J, Beagle J, Syrkina O, Hales CA. Heparin reduces overcirculation-induced pulmonary artery remodeling through p38 MAPK in piglet. *Ann Thorac Surg*. Mai 2015;99(5):1677–84.
250. Makino-Okamura C, Niki Y, Takeuchi S, Nishigori C, Declercq L, Yaroch DB, u. a. Heparin inhibits melanosome uptake and inflammatory response coupled with phagocytosis through blocking PI3k/Akt and MEK/ERK signaling pathways in human epidermal keratinocytes. *Pigment Cell Melanoma Res*. November 2014;27(6):1063–74.
251. Connors JM. Prophylaxis against venous thromboembolism in ambulatory patients with cancer. *N Engl J Med*. 26. Juni 2014;370(26):2515–9.
252. Zacharski LR, Ornstein DL. Heparin and cancer. *Thromb Haemost*. Juli 1998;80(1):10–23.
253. Zacharski LR, Ornstein DL, Mamourian AC. Low-molecular-weight heparin and cancer. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26 Suppl 1:69–77.
254. Lebeau B, Chastang C, Brechot JM, Capron F, Dautzenberg B, Delaisements C, u. a. Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. „Petites Cellules“ Group. *Cancer*. 1. Juli 1994;74(1):38–45.
255. Kakkar A, Hedges R, Williamson R, Kakkar V. Perioperative heparin-therapy inhibits late death from metastatic cancer. *Int J Oncol*. April 1995;6(4):885–8.
256. Kingston RD, Fielding JW, Palmer MK. Peri-operative heparin: a possible adjuvant to surgery in colo-rectal cancer? *Int J Colorectal Dis*. Juli 1993;8(2):111–5.
257. Akl EA, van Doormaal FF, Barba M, Kamath G, Kim SY, Kuipers S, u. a. Parenteral anticoagulation may prolong the survival of patients with limited small cell lung cancer: a Cochrane systematic review. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 15. Mai 2008;27:4.
258. Kuderer NM, Khorana AA, Lyman GH, Francis CW. A meta-analysis and systematic review of the efficacy and safety of anticoagulants as cancer treatment: impact on survival and bleeding complications. *Cancer*. 1. September 2007;110(5):1149–61.

259. Sanford D, Naidu A, Alizadeh N, Lazo-Langner A. The effect of low molecular weight heparin on survival in cancer patients: an updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Thromb Haemost JTH*. Juli 2014;12(7):1076–85.
260. Macbeth F, Noble S, Evans J, Ahmed S, Cohen D, Hood K, u. a. Randomized Phase III Trial of Standard Therapy Plus Low Molecular Weight Heparin in Patients With Lung Cancer: FRAGMATIC Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10. Februar 2016;34(5):488–94.
261. Mousa SA, Linhardt R, Francis JL, Amirkhosravi A. Anti-metastatic effect of a non-anticoagulant low-molecular-weight heparin versus the standard low-molecular-weight heparin, enoxaparin. *Thromb Haemost*. 2006;96(6):816–21.
262. Stevenson JL, Choi SH, Varki A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins--correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1. Oktober 2005;11(19 Pt 1):7003–11.
263. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13. März 2001;98(6):3352–7.
264. Amirkhosravi A, Meyer T, Amaya M, Davila M, Mousa SA, Robson T, u. a. The role of tissue factor pathway inhibitor in tumor growth and metastasis. *Semin Thromb Hemost*. Oktober 2007;33(7):643–52.
265. Engelberg H. Actions of heparin that may affect the malignant process. *Cancer*. 15. Januar 1999;85(2):257–72.
266. Vlodavsky I, Ishai-Michaeli R, Mohsen M, Bar-Shavit R, Catane R, Ekre HP, u. a. Modulation of neovascularization and metastasis by species of heparin. *Adv Exp Med Biol*. 1992;313:317–27.
267. Lapierre F, Holme K, Lam L, Tressler RJ, Storm N, Wee J, u. a. Chemical modifications of heparin that diminish its anticoagulant but preserve its heparanase-inhibitory, angiostatic, anti-tumor and anti-metastatic properties. *Glycobiology*. April 1996;6(3):355–66.
268. Altinbas M, Coskun HS, Er O, Ozkan M, Eser B, Unal A, u. a. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. *J Thromb Haemost JTH*. 2004;2(8):1266–71.
269. Icli F, Akbulut H, Utkan G, Yalcin B, Dincol D, Isikdogan A, u. a. Low molecular weight heparin (LMWH) increases the efficacy of cisplatin plus gemcitabine combination in advanced pancreatic cancer. *J Surg Oncol*. 1. Mai 2007;95(6):507–12.
270. Lebeau B, Baud M, Masanes M-J, Febvre M, Mokhtari T, Chouaid C. Optimization of small-cell lung cancer chemotherapy with heparin: a comprehensive retrospective study of 239 patients treated in a single specialized center. *Chemotherapy*. 2011;57(3):253–8.
271. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Juli 2011;3(7).

-
272. Iozzo RV. Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J Clin Invest.* 2001;108(2):165–7.
273. Hull EE, Montgomery MR, Leyva KJ. Epigenetic Regulation of the Biosynthesis & Enzymatic Modification of Heparan Sulfate Proteoglycans: Implications for Tumorigenesis and Cancer Biomarkers. *Int J Mol Sci.* 26. Juni 2017;18(7).
274. Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:443–75.
275. Almeida R, Levery SB, Mandel U, Kresse H, Schwientek T, Bennett EP, u. a. Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family. *J Biol Chem.* 10. September 1999;274(37):26165–71.
276. Venkatesan N, Barré L, Benani A, Netter P, Magdalou J, Fournel-Gigleux S, u. a. Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-I gene delivery: a strategy to promote cartilage repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28. Dezember 2004;101(52):18087–92.
277. Bai X, Zhou D, Brown JR, Crawford BE, Hennes T, Esko JD. Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans: cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1,3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6). *J Biol Chem.* 21. Dezember 2001;276(51):48189–95.
278. Kitagawa H, Shimakawa H, Sugahara K. The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate. *J Biol Chem.* 14. Mai 1999;274(20):13933–7.
279. McCormick C, Duncan G, Goutsos KT, Tufaro F. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18. Januar 2000;97(2):668–73.
280. Sheng J, Xu Y, Dulaney SB, Huang X, Liu J. Uncovering biphasic catalytic mode of C5-epimerase in heparan sulfate biosynthesis. *J Biol Chem.* 15. Juni 2012;287(25):20996–1002.
281. Blackhall FH, Merry CL, Davies EJ, Jayson GC. Heparan sulfate proteoglycans and cancer. *Br J Cancer.* 19. Oktober 2001;85(8):1094–8.
282. Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, u. a. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:729–77.
283. Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans. *Genome Biol.* 2008;9(5):224.
284. Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest.* August 2001;108(4):497–501.
285. Iozzo RV, Zoeller JJ, Nyström A. Basement membrane proteoglycans: modulators Par Excellence of cancer growth and angiogenesis. *Mol Cells.* 31. Mai 2009;27(5):503–13.

286. Korpetinou A, Skandalis SS, Labropoulou VT, Smirlaki G, Noulas A, Karamanos NK, u. a. Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy. *Front Oncol.* 13. Januar 2014;3:327.
287. Couchman JR, Pataki CA. An introduction to proteoglycans and their localization. *J Histochem Cytochem.* Dezember 2012;60:885–97.
288. Kato M, Wang H, Bernfield M, Gallagher JT, Turnbull JE. Cell surface syndecan-1 on distinct cell types differs in fine structure and ligand binding of its heparan sulfate chains. *J Biol Chem.* 22. Juli 1994;269(29):18881–90.
289. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature.* 2007;446:1030–7.
290. Elfenbein A, Lanahan A, Zhou TX, Yamasaki A, Tkachenko E, Matsuda M, u. a. Syndecan 4 regulates FGFR1 signaling in endothelial cells by directing macropinocytosis. *Sci Signal.* 8. Mai 2012;5(223):ra36.
291. Williams KJ, Fuki IV. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans: dynamic molecules mediating ligand catabolism. *Curr Opin Lipidol.* Oktober 1997;8(5):253–62.
292. Christianson HC, Belting M. Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* April 2014;35:51–5.
293. Soares MA, Teixeira FCOB, Fontes M, Arêas AL, Leal MG, Pavão MSG, u. a. Heparan Sulfate Proteoglycans May Promote or Inhibit Cancer Progression by Interacting with Integrins and Affecting Cell Migration. *BioMed Res Int.* 2015;2015:453801.
294. Wang H, Jin H, Beauvais DM, Rapraeger AC. Cytoplasmic domain interactions of syndecan-1 and syndecan-4 with $\alpha 6\beta 4$ integrin mediate human epidermal growth factor receptor (HER1 and HER2)-dependent motility and survival. *J Biol Chem.* 31. Oktober 2014;289(44):30318–32.
295. Afratis NA, Nikitovic D, Mulhaupt HAB, Theocharis AD, Couchman JR, Karamanos NK. Syndecans - key regulators of cell signaling and biological functions. *FEBS J.* Januar 2017;284(1):27–41.
296. Leivonen M, Lundin J, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C. Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer. *Oncology.* 2004;67(1):11–8.
297. Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, u. a. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer.* 1. August 2003;98(3):474–83.
298. Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, Lincecum J, Becker KA, Cumberland S, u. a. Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet.* Juli 2000;25(3):329–32.
299. Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, Kohgo Y. Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int J Cancer.* 21. Oktober 1997;74(5):482–91.

-
300. Baghy K, Tátrai P, Regós E, Kovalszky I. Proteoglycans in liver cancer. *World J Gastroenterol.* 7. Januar 2016;22(1):379–93.
 301. Labropoulou VT, Skandalis SS, Ravazoula P, Perimenis P, Karamanos NK, Kalofonos HP, u. a. Expression of syndecan-4 and correlation with metastatic potential in testicular germ cell tumours. *BioMed Res Int.* 2013;2013:214864.
 302. Beauvais DM, Rapraeger AC. Syndecan-1-mediated cell spreading requires signaling by alphavbeta3 integrins in human breast carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 10. Juni 2003;286(2):219–32.
 303. O’Connell MP, Fiori JL, Kershner EK, Frank BP, Indig FE, Taub DD, u. a. Heparan sulfate proteoglycan modulation of Wnt5A signal transduction in metastatic melanoma cells. *J Biol Chem.* 16. Oktober 2009;284(42):28704–12.
 304. Llovet JM, Villanueva A, Lachenmayer A, Finn RS. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nat Rev Clin Oncol.* Juli 2015;12(7):408–24.
 305. Cartier F, Indersie E, Lesjean S, Charpentier J, Hooks KB, Ghousein A, u. a. New tumor suppressor microRNAs target glypican-3 in human liver cancer. *Oncotarget.* 20. Juni 2017;8(25):41211–26.
 306. Sawey ET, Chanrion M, Cai C, Wu G, Zhang J, Zender L, u. a. Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening. *Cancer Cell.* 8. März 2011;19(3):347–58.
 307. Lachenmayer A, Alsinet C, Savic R, Cabellos L, Toffanin S, Hoshida Y, u. a. Wnt-pathway activation in two molecular classes of hepatocellular carcinoma and experimental modulation by sorafenib. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15. September 2012;18(18):4997–5007.
 308. Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S, u. a. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* August 2009;100(8):1403–7.
 309. Lanzi C, Zaffaroni N, Cassinelli G. Targeting Heparan Sulfate Proteoglycans and their Modifying Enzymes to Enhance Anticancer Chemotherapy Efficacy and Overcome Drug Resistance. *Curr Med Chem.* 2017;24(26):2860–86.
 310. Rosen SD, Lemjabbar-Alaoui H. Sulf-2: an extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate. *Expert Opin Ther Targets.* September 2010;14(9):935–49.
 311. Lai J-P, Sandhu DS, Yu C, Han T, Moser CD, Jackson KK, u. a. Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Baltim Md.* April 2008;47(4):1211–22.
 312. Lai J-P, Oseini AM, Moser CD, Yu C, Elswa SF, Hu C, u. a. The oncogenic effect of sulfatase 2 in human hepatocellular carcinoma is mediated in part by glypican 3-dependent Wnt activation. *Hepatology Baltim Md.* November 2010;52(5):1680–9.

313. Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(12):2018–39.
314. McKenzie EA. Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation. *Br J Pharmacol.* Mai 2007;151(1):1–14.
315. Ramani VC, Zhan F, He J, Barbieri P, Nosedà A, Tricot G, u. a. Targeting heparanase overcomes chemoresistance and diminishes relapse in myeloma. *Oncotarget.* 12. Januar 2016;7(2):1598–607.
316. Vlodavsky I, Elkin M, Abboud-Jarrous G, Levi-Adam F, Fuks L, Shafat I, u. a. Heparanase: one molecule with multiple functions in cancer progression. *Connect Tissue Res.* 2008;49(3):207–10.
317. Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med.* Juli 1999;5(7):803–9.
318. Bar-Ner M, Eldor A, Wasserman L, Matzner Y, Cohen IR, Fuks Z, u. a. Inhibition of heparanase-mediated degradation of extracellular matrix heparan sulfate by non-anticoagulant heparin species. *Blood.* August 1987;70(2):551–7.
319. Naggi A, Casu B, Perez M, Torri G, Cassinelli G, Penco S, u. a. Modulation of the heparanase-inhibiting activity of heparin through selective desulfation, graded N-acetylation, and glycol splitting. *J Biol Chem.* 2005;280(13):12103–13.
320. Pala D, Rivara S, Mor M, Milazzo FM, Roscilli G, Pavoni E, u. a. Kinetic analysis and molecular modeling of the inhibition mechanism of roneparstat (SST0001) on human heparanase. *Glycobiology.* Juni 2016;26(6):640–54.
321. Ritchie JP, Ramani VC, Ren Y, Naggi A, Torri G, Casu B, u. a. SST0001, a chemically modified heparin, inhibits myeloma growth and angiogenesis via disruption of the heparanase/syndecan-1 axis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15. März 2011;17(6):1382–93.
322. Shafat I, Ben-Arush MW, Issakov J, Meller I, Naroditsky I, Tortoreto M, u. a. Pre-clinical and clinical significance of heparanase in Ewing’s sarcoma. *J Cell Mol Med.* September 2011;15(9):1857–64.
323. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* November 1982;31(1):99–109.
324. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 8. Juni 2012;149(6):1192–205.
325. Sharma, R.P. wingless - a new mutant in *D. melanogaster*. [Internet]. *Drosoph Inf Serv* 1973; 50:134; 1973 [zitiert 17. Oktober 2017]. Verfügbar unter: <http://www.ou.edu/journals/dis/DIS50/Sharma%20134.pdf>
326. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 30. Oktober 1980;287(5785):795–801.

327. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*. 14. August 1987;50(4):649–57.
328. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, u. a. A new nomenclature for *int-1* and related genes: the Wnt gene family. *Cell*. 25. Januar 1991;64(2):231.
329. Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, Costa R, Leite CA, Barroso-Sousa R, u. a. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 5. Mai 2017;10(1):101.
330. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 1. Juni 2017;169(6):985–99.
331. Niehrs C, Acebron SP. Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J*. 13. Juni 2012;31(12):2705–13.
332. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. März 2017;36(11):1461–73.
333. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781–810.
334. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*. 15. Dezember 1997;11(24):3286–305.
335. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Dezember 2012;13(12):767–79.
336. Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, u. a. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell*. Dezember 2006;11(6):791–801.
337. Bartscherer K, Pelte N, Ingelfinger D, Boutros M. Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell*. 5. Mai 2006;125(3):523–33.
338. Bänziger C, Soldini D, Schütt C, Zipperlen P, Hausmann G, Basler K. Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell*. 5. Mai 2006;125(3):509–22.
339. Yu J, Chia J, Canning CA, Jones CM, Bard FA, Virshup DM. WLS retrograde transport to the endoplasmic reticulum during Wnt secretion. *Dev Cell*. 12. Mai 2014;29(3):277–91.
340. Mulligan KA, Fuerer C, Ching W, Fish M, Willert K, Nusse R. Secreted Wingless-interacting molecule (Swim) promotes long-range signaling by maintaining Wingless solubility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10. Januar 2012;109(2):370–7.
341. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*. Oktober 2012;14(10):1036–45.

342. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, u. a. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*. 18. Juli 1996;382(6588):225–30.
343. Hsieh JC, Rattner A, Smallwood PM, Nathans J. Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30. März 1999;96(7):3546–51.
344. Janda CY, Dang LT, You C, Chang J, de Lau W, Zhong ZA, u. a. Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and β -catenin signalling. *Nature*. 11 2017;545(7653):234–7.
345. Latres E, Chiaur DS, Pagano M. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene*. 28. Januar 1999;18(4):849–54.
346. Metcalfe C, Mendoza-Topaz C, Mieszczanek J, Bienz M. Stability elements in the LRP6 cytoplasmic tail confer efficient signalling upon DIX-dependent polymerization. *J Cell Sci*. 1. Mai 2010;123(Pt 9):1588–99.
347. Lien W-H, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev*. 15. Juli 2014;28(14):1517–32.
348. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. Juli 2009;17(1):9–26.
349. Cadigan KM, Waterman ML. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1. November 2012;4(11).
350. Masuda T, Ishitani T. Context-dependent regulation of the β -catenin transcriptional complex supports diverse functions of Wnt/ β -catenin signaling. *J Biochem (Tokyo)*. Januar 2017;161(1):9–17.
351. Wöhrle S, Wallmen B, Hecht A. Differential control of Wnt target genes involves epigenetic mechanisms and selective promoter occupancy by T-cell factors. *Mol Cell Biol*. Dezember 2007;27(23):8164–77.
352. Wallmen B, Schrempp M, Hecht A. Intrinsic properties of Tcf1 and Tcf4 splice variants determine cell-type-specific Wnt/ β -catenin target gene expression. *Nucleic Acids Res*. Oktober 2012;40(19):9455–69.
353. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 29. März 2013;339(6127):1546–58.
354. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, u. a. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*. 14. Januar 2010;463(7278):191–6.
355. Clements WM, Wang J, Sarnaik A, Kim OJ, MacDonald J, Fenoglio-Preiser C, u. a. beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res*. 15. Juni 2002;62(12):3503–6.

356. Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene*. 4. Dezember 2006;25(57):7531–7.
357. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, u. a. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*. März 2000;24(3):245–50.
358. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, u. a. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*. 9. August 1991;253(5020):665–9.
359. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, u. a. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*. 9. August 1991;253(5020):661–5.
360. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 18. Oktober 1996;87(2):159–70.
361. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, u. a. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*. 21. März 1997;275(5307):1784–7.
362. Bartkova J, Lukas J, Müller H, Lützhøft D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer*. 1. Mai 1994;57(3):353–61.
363. Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, u. a. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11. April 2000;97(8):4262–6.
364. Liu C-C, Prior J, Piwnica-Worms D, Bu G. LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16. März 2010;107(11):5136–41.
365. Yang L, Wu X, Wang Y, Zhang K, Wu J, Yuan Y-C, u. a. FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer. *Oncogene*. 27. Oktober 2011;30(43):4437–46.
366. Klarmann GJ, Decker A, Farrar WL. Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer. *Epigenetics*. April 2008;3(2):59–63.
367. Arend RC, Londoño-Joshi AI, Straughn JM, Buchsbaum DJ. The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: a review. *Gynecol Oncol*. Dezember 2013;131(3):772–9.
368. Jacob F, Ukegini K, Nixdorf S, Ford CE, Olivier J, Caduff R, u. a. Loss of secreted frizzled-related protein 4 correlates with an aggressive phenotype and predicts poor outcome in ovarian cancer patients. *PLoS One*. 2012;7(2):e31885.
369. Badiglian Filho L, Oshima CTF, De Oliveira Lima F, De Oliveira Costa H, De Sousa Damião R, Gomes TS, u. a. Canonical and noncanonical Wnt pathway: a comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. *Oncol Rep*. Februar 2009;21(2):313–20.

370. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*. Dezember 2005;5(12):921–9.
371. Huang L, Jin Y, Feng S, Zou Y, Xu S, Qiu S, u. a. Role of Wnt/ β -catenin, Wnt/c-Jun N-terminal kinase and Wnt/Ca²⁺ pathways in cisplatin-induced chemoresistance in ovarian cancer. *Exp Ther Med*. Dezember 2016;12(6):3851–8.
372. Januchowski R, Zawierucha P, Ruciński M, Zabel M. Microarray-based detection and expression analysis of extracellular matrix proteins in drug-resistant ovarian cancer cell lines. *Oncol Rep*. November 2014;32(5):1981–90.
373. OMNI Life Science GmbH & Co. KG. CASY Cell Counter and Analyzer-Label-free cell status monitoring, instantly. [Internet]. Copyright © 2016 OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG.; [zitiert 29. Mai 2017]. Verfügbar unter: http://cellcounting.de/wp-content/uploads/2014/06/CASY_CellCounter-Analyzer_OLS.pdf
374. Kubista M, Akerman B, Nordén B. Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry (Mosc)*. 14. Juli 1987;26(14):4545–53.
375. Skoog DA, Leary JJ. Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen. 1996. Aufl. Berlin: Springer; 1996. 900 S.
376. Varian Analytical Instruments. Varian SpectrAA 220/880 Zeeman [Internet]. © Varian Australia Pty Ltd Part number 8510161900; [zitiert 30. Mai 2017]. Verfügbar unter: <http://web.colby.edu/ch332public/files/2012/02/Varian-Zeeman-Effect.pdf>
377. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation [Internet]. 2001 [zitiert 31. Mai 2017]. Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>
378. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, u. a. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. Oktober 1985;150(1):76–85.
379. Noble JE, Bailey MJA. Quantitation of protein. *Methods Enzymol*. 2009;463:73–95.
380. Thermo Fisher Scientific Inc. Pierce™ BCA Protein Assay Kit, User Guide [Internet]. © 2013 Thermo Fisher Scientific Inc.; [zitiert 7. Juni 2017]. Verfügbar unter: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
381. Lottspeich F, Engels JW, Herausgeber. Bioanalytik. 3., [aktualisierte und erw.] Aufl. Berlin: Springer Spektrum; 2012. 1201 S.
382. Sigma Aldrich®. Sample Buffer, Laemmli 2× Concentrate, Produktbeschreibung [Internet]. [zitiert 13. Juni 2017]. Verfügbar unter: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3401?lang=de®ion=DE&gclid=CMvSzP7lutQCFQoW0wodRe4PIw>

-
383. Bio-Rad Laboratories, Inc., Laboratories, Inc. Clarity™ and Clarity Max™ Western ECL Substrates, Instruction Manual [Internet]. Verfügbar unter: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/D085075.pdf>
384. Leong MM, Milstein C, Pannell R. Luminescent detection method for immunodot, Western, and Southern blots. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* Dezember 1986;34(12):1645–50.
385. Kurien BT, Scofield RH. Protein blotting: a review. *J Immunol Methods.* 1. März 2003;274(1–2):1–15.
386. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 16. Dezember 1983;65(1–2):55–63.
387. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127–52.
388. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* Juni 1993;303(2):474–82.
389. Mueller T, Pfankuchen DB, Wantoch von Rekowski K, Schlesinger M, Reipsch F, Bendas G. The Impact of the Low Molecular Weight Heparin Tinzaparin on the Sensitization of Cisplatin-Resistant Ovarian Cancers-Preclinical In Vivo Evaluation in Xenograft Tumor Models. *Mol Basel Switz.* 3. Mai 2017;22(5).
390. Rappold M, Warttinger U, Krämer R. A Fluorescent Probe for Glycosaminoglycans Applied to the Detection of Dermatan Sulfate by a Mix-and-Read Assay. *Molecules.* 9. Mai 2017;22(5):768.
391. Warttinger U, Krämer R. Quantification of heparin in complex matrices (including urine) using a mix-and-read fluorescence assay. *ArXiv161102482 Q-Bio* [Internet]. 8. November 2016 [zitiert 12. Juli 2017]; Verfügbar unter: <http://arxiv.org/abs/1611.02482>
392. QIAGEN. RNeasy Plus Mini Handbook [Internet]. © 2005–2014 QIAGEN; [zitiert 12. Juni 2017]. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c8cdc6bf-5bbf-4e3b-a0f4-476da9215012&lang=en>
393. Royer-Pokora B, Busch M, Beier M, Duhme C, de Torres C, Mora J, u. a. Wilms tumor cells with WT1 mutations have characteristic features of mesenchymal stem cells and express molecular markers of paraxial mesoderm. *Hum Mol Genet.* 1. Mai 2010;19(9):1651–68.
394. Fan F, Wood KV. Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol.* Februar 2007;5(1):127–36.
395. Promega Corporation. pGL4.49[luc2P/TCF-LEF/Hygro] Vector Protocol [Internet]. © 2012, 2016 Promega Corporation; [zitiert 2. Juni 2017]. Verfügbar unter:

<https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/a/pgl4-49-luc2p-tcf-lef-hygro-vector-protocol.pdf>

396. Promega Corporation. ONE-Glo™ Luciferase Assay System, Technical Manual [Internet]. © 2007, 2011, 2012, 2014, 2016 Promega Corporation; [zitiert 2. Juni 2017]. Verfügbar unter: <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/one-glo-luciferase-assay-system-protocol.pdf?la=de-de>
397. Fachinformation zu Heparin-Natrium Braun 25.000 I.E./5 ml, Injektions-/Infusionslösung; Stand der Information: März 2015 [Internet]. [zitiert 9. November 2017]. Verfügbar unter: <https://www.fachinfo.de/pdf/005314#view=FitH&pagemode=none&toolbar=1&statusbar=0&messages=0&navpanes=0>
398. Cassinelli G, Naggi A. Old and new applications of non-anticoagulant heparin. *Int J Cardiol.* Juni 2016;212 Suppl 1:S14-21.
399. Perlin AS. Glycol-cleavage oxidation. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2006;60:183–250.
400. Islam T, Butler M, Sikkander SA, Toida T, Linhardt RJ. Further evidence that periodate cleavage of heparin occurs primarily through the antithrombin binding site. *Carbohydr Res.* 19. November 2002;337(21–23):2239–43.
401. Nader HB, Dietrich CP, Buonassisi V, Colburn P. Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Juni 1987;84(11):3565–9.
402. Yang Y, MacLeod V, Dai Y, Khotskaya-Sample Y, Shriver Z, Venkataraman G, u. a. The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. *Blood.* 15. September 2007;110(6):2041–8.
403. Liu D, Shriver Z, Venkataraman G, El Shabrawi Y, Sasisekharan R. Tumor cell surface heparan sulfate as cryptic promoters or inhibitors of tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22. Januar 2002;99(2):568–73.
404. Pfankuchen DB, Baltes F, Batool T, Li J-P, Schlesinger M, Bendas G. Heparin antagonizes cisplatin resistance of A2780 ovarian cancer cells by affecting the Wnt signaling pathway. *Oncotarget.* 28. Juni 2017;
405. Khurana A, Beleford D, He X, Chien J, Shridhar V. Role of heparan sulfatases in ovarian and breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2013;3(1):34–45.
406. Koch M, Krieger ML, Stölting D, Brenner N, Beier M, Jaehde U, u. a. Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling. *Biochem Pharmacol.* 15. April 2013;85(8):1077–90.
407. Zeller C, Dai W, Steele NL, Siddiq A, Walley AJ, Wilhelm-Benartzi CSM, u. a. Candidate DNA methylation drivers of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer identified by methylome and expression profiling. *Oncogene.* 18. Oktober 2012;31(42):4567–76.

408. Paramasivam M, Sarkeshik A, Yates JR, Fernandes MJG, McCollum D. Angiomin family proteins are novel activators of the LATS2 kinase tumor suppressor. *Mol Biol Cell*. Oktober 2011;22(19):3725–33.
409. Lossos C, Bayraktar S, Weinzierl E, Younes SF, Hosein PJ, Tibshirani RJ, u. a. LMO2 and BCL6 are associated with improved survival in primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol*. Juni 2014;165(5):640–8.
410. Lee Y-J, Jeong S-H, Hong S-C, Cho B-I, Ha W-S, Park S-T, u. a. Prognostic value of CAPZA1 overexpression in gastric cancer. *Int J Oncol*. Mai 2013;42(5):1569–77.
411. Nakajima H, Koizumi K, Tanaka T, Ishigaki Y, Yoshitake Y, Yonekura H, u. a. Loss of HITS (FAM107B) expression in cancers of multiple organs: tissue microarray analysis. *Int J Oncol*. Oktober 2012;41(4):1347–57.
412. Pils D, Horak P, Gleiss A, Sax C, Fabjani G, Moebus VJ, u. a. Five genes from chromosomal band 8p22 are significantly down-regulated in ovarian carcinoma: N33 and EFA6R have a potential impact on overall survival. *Cancer*. 1. Dezember 2005;104(11):2417–29.
413. Yeh Y-M, Chuang C-M, Chao K-C, Wang L-H. MicroRNA-138 suppresses ovarian cancer cell invasion and metastasis by targeting SOX4 and HIF-1 α . *Int J Cancer*. 15. August 2013;133(4):867–78.
414. Wu X, Yamada-Mabuchi M, Morris EJ, Tanwar PS, Dobens L, Gluderer S, u. a. The *Drosophila* homolog of human tumor suppressor TSC-22 promotes cellular growth, proliferation, and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8. April 2008;105(14):5414–9.
415. Mahadev K, Raval G, Bharadwaj S, Willingham MC, Lange EM, Vonderhaar B, u. a. Suppression of the transformed phenotype of breast cancer by tropomyosin-1. *Exp Cell Res*. 10. September 2002;279(1):40–51.
416. Moravcikova E, Krepela E, Prochazka J, Rousalova I, Cermak J, Benkova K. Down-regulated expression of apoptosis-associated genes AIP1 and UACA in non-small cell lung carcinoma. *Int J Oncol*. Juni 2012;40(6):2111–21.
417. Janczar S, Nautiyal J, Xiao Y, Curry E, Sun M, Zanini E, u. a. WWOX sensitises ovarian cancer cells to paclitaxel via modulation of the ER stress response. *Cell Death Dis*. 27. Juli 2017;8(7):e2955.
418. Salah Z, Bar-mag T, Kohn Y, Pichiorri F, Palumbo T, Melino G, u. a. Tumor suppressor WWOX binds to Δ Np63 α and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *Cell Death Dis*. 31. Januar 2013;4:e480.
419. Jinawath N, Vasoontara C, Jinawath A, Fang X, Zhao K, Yap K-L, u. a. Oncoproteomic analysis reveals co-upregulation of RELA and STAT5 in carboplatin resistant ovarian carcinoma. *PloS One*. 18. Juni 2010;5(6):e11198.
420. Broggin M, Buraggi G, Brenna A, Riva L, Codegoni AM, Torri V, u. a. Cell cycle-related phosphatases CDC25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients. *Anticancer Res*. Dezember 2000;20(6C):4835–40.

421. Yang M, Yuan F, Li P, Chen Z, Chen A, Li S, u. a. Interferon regulatory factor 4 binding protein is a novel p53 target gene and suppresses cisplatin-induced apoptosis of breast cancer cells. *Mol Cancer*. 13. August 2012;11:54.
422. L'Espérance S, Popa I, Bachvarova M, Plante M, Patten N, Wu L, u. a. Gene expression profiling of paired ovarian tumors obtained prior to and following adjuvant chemotherapy: molecular signatures of chemoresistant tumors. *Int J Oncol*. Juli 2006;29(1):5–24.
423. Cole C, Lau S, Backen A, Clamp A, Rushton G, Dive C, u. a. Inhibition of FGFR2 and FGFR1 increases cisplatin sensitivity in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*. 1. September 2010;10(5):495–504.
424. Zhang P, Zhang P, Shi B, Zhou M, Jiang H, Zhang H, u. a. Galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis*. 9. Januar 2014;5:e991.
425. Kashiwagi E, Izumi H, Yasuniwa Y, Baba R, Doi Y, Kidani A, u. a. Enhanced expression of nuclear factor I/B in oxaliplatin-resistant human cancer cell lines. *Cancer Sci*. Februar 2011;102(2):382–6.
426. Bruhn MA, Pearson RB, Hannan RD, Sheppard KE. AKT-independent PI3-K signaling in cancer - emerging role for SGK3. *Cancer Manag Res*. 2013;5:281–92.
427. Hekmat O, Munk S, Fogh L, Yadav R, Francavilla C, Horn H, u. a. TIMP-1 increases expression and phosphorylation of proteins associated with drug resistance in breast cancer cells. *J Proteome Res*. 6. September 2013;12(9):4136–51.
428. Bjerre C, Vinther L, Belling KC, Würtz SØ, Yadav R, Lademann U, u. a. TIMP1 overexpression mediates resistance of MCF-7 human breast cancer cells to fulvestrant and down-regulates progesterone receptor expression. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. Dezember 2013;34(6):3839–51.
429. Weng S-H, Tseng S-C, Huang Y-C, Chen H-J, Lin Y-W. Inhibition of thymidine phosphorylase expression by using an HSP90 inhibitor potentiates the cytotoxic effect of cisplatin in non-small-cell lung cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 1. Juli 2012;84(1):126–36.
430. Ikeda R, Furukawa T, Mitsuo R, Noguchi T, Kitazono M, Okumura H, u. a. Thymidine phosphorylase inhibits apoptosis induced by cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun*. 7. Februar 2003;301(2):358–63.
431. Rosanò L, Cianfrocca R, Tocci P, Spinella F, Di Castro V, Caprara V, u. a. Endothelin A receptor/ β -arrestin signaling to the Wnt pathway renders ovarian cancer cells resistant to chemotherapy. *Cancer Res*. 15. Dezember 2014;74(24):7453–64.
432. Su H-Y, Lai H-C, Lin Y-W, Liu C-Y, Chen C-K, Chou Y-C, u. a. Epigenetic silencing of SFRP5 is related to malignant phenotype and chemoresistance of ovarian cancer through Wnt signaling pathway. *Int J Cancer*. 1. August 2010;127(3):555–67.
433. Handeli S, Simon JA. A small-molecule inhibitor of Tcf/ β -catenin signaling down-regulates PPAR γ and PPAR δ activities. *Mol Cancer Ther*. 3. Januar 2008;7(3):521–9.

-
434. Iida J, Dorchak J, Lehman JR, Clancy R, Luo C, Chen Y, u. a. FH535 inhibited migration and growth of breast cancer cells. *PloS One*. 2012;7(9):e44418.
435. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N. FH535 suppresses the proliferation and motility of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol*. Januar 2016;48(1):110–4.
436. Chen Y, Rao X, Huang K, Jiang X, Wang H, Teng L. FH535 Inhibits Proliferation and Motility of Colon Cancer Cells by Targeting Wnt/ β -catenin Signaling Pathway. *J Cancer*. 2017;8(16):3142–53.
437. Gustafson CT, Mamo T, Shogren KL, Maran A, Yaszemski MJ. FH535 Suppresses Osteosarcoma Growth In Vitro and Inhibits Wnt Signaling through Tankyrases. *Front Pharmacol*. 2017;8:285.
438. Dieudonné F-X, Marion A, Marie PJ, Modrowski D. Targeted inhibition of T-cell factor activity promotes syndecan-2 expression and sensitization to doxorubicin in osteosarcoma cells and bone tumors in mice. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. Oktober 2012;27(10):2118–29.
439. Wickström M, Dyberg C, Milosevic J, Einvik C, Calero R, Sveinbjörnsson B, u. a. Wnt/ β -catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance. *Nat Commun*. 25. November 2015;6:8904.
440. Martins-Neves SR, Paiva-Oliveira DI, Wijers-Koster PM, Abrunhosa AJ, Fontes-Ribeiro C, Bovée JVMG, u. a. Chemotherapy induces stemness in osteosarcoma cells through activation of Wnt/ β -catenin signaling. *Cancer Lett*. 28. Januar 2016;370(2):286–95.
441. Alakhova DY, Zhao Y, Li S, Kabanov AV. Effect of doxorubicin/pluronic SP1049C on tumorigenicity, aggressiveness, DNA methylation and stem cell markers in murine leukemia. *PloS One*. 2013;8(8):e72238.
442. Rousseaux C, El-Jamal N, Fumery M, Dubuquoy C, Romano O, Chatelain D, u. a. The 5-aminosalicylic acid antineoplastic effect in the intestine is mediated by PPAR γ . *Carcinogenesis*. November 2013;34(11):2580–6.
443. Schwab M, Reynders V, Loitsch S, Shastri YM, Steinhilber D, Schröder O, u. a. PPAR γ is involved in mesalazine-mediated induction of apoptosis and inhibition of cell growth in colon cancer cells. *Carcinogenesis*. Juli 2008;29(7):1407–14.
444. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, u. a. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J Exp Med*. 18. April 2005;201(8):1205–15.
445. Bos CL, Diks SH, Hardwick JCH, Walburg KV, Peppelenbosch MP, Richel DJ. Protein phosphatase 2A is required for mesalazine-dependent inhibition of Wnt/ β -catenin pathway activity. *Carcinogenesis*. Dezember 2006;27(12):2371–82.
446. Capurro M, Martin T, Shi W, Filmus J. Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling. *J Cell Sci*. 1. April 2014;127(Pt 7):1565–75.

447. Sutherland C, Leighton IA, Cohen P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J.* 15. November 1993;296 (Pt 1):15–9.
448. Walz A, Ugolkov A, Chandra S, Kozikowski A, Carneiro BA, O'Halloran TV, u. a. Molecular Pathways: Revisiting Glycogen Synthase Kinase-3 β as a Target for the Treatment of Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 2017;23(8):1891–7.
449. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, u. a. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 4. September 1998;281(5382):1509–12.
450. Wang X, Xia Y. microRNA-328 inhibits cervical cancer cell proliferation and tumorigenesis by targeting TCF7L2. *Biochem Biophys Res Commun.* 24. Juni 2016;475(2):169–75.
451. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature.* 1. April 1999;398(6726):422–6.
452. Yue W, Sun Q, Dacic S, Landreneau RJ, Siegfried JM, Yu J, u. a. Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis.* Januar 2008;29(1):84–92.
453. Gheidari F, Bakhshandeh B, Teimoori-Toolabi L, Mehrtash A, Ghadir M, Zeinali S. TCF4 silencing sensitizes the colon cancer cell line to oxaliplatin as a common chemotherapeutic drug. *Anticancer Drugs.* September 2014;25(8):908–16.
454. Han P, Li J-W, Zhang B-M, Lv J-C, Li Y-M, Gu X-Y, u. a. The lncRNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation and chemoresistance via miR-181a-5p-mediated regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cancer.* 13. Januar 2017;16(1):9.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von (SP-4-2)-Diammindichloridoplatin(II).....	5
Abbildung 2: Hydrolyse von Cisplatin und Protolyseverhalten der Aquakomplexe in wässrigem Milieu. Modifiziert nach el-Khateeb et al. (35).....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme von Cisplatin und Hydrolyse sowie Bindung der reaktiven Aquakomplexe an die Zielstrukturen der DNA. Modifiziert nach More et al. (43).....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der gebildeten Addukte durch Bindung von Cisplatin an die DNA. Interstrang- (a), 1,2-Intrastrang- (b), 1,3-Intrastrang- (c) und Protein-DNA-Quervernetzung (d). Modifiziert nach Gonzalez et al. (50).....	8
Abbildung 5: Cisplatin induzierte Möglichkeiten des Zelltodes. Modifiziert nach Wang & Lippard (55).....	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Tumorzelle und deren potentielle pre-target Resistenzmechanismen am Beispiel von Cisplatin. Modifiziert nach Kelland (16).	17
Abbildung 7: Schematischer Überblick über die unterschiedlichen potentiellen Mechanismen, die zur Inhibition einer durch Cisplatin induzierten Apoptose beitragen können. Modifiziert nach Siddik (44).	22
Abbildung 8: (A) Schematische Darstellung der hauptsächlich vorkommenden, sich wiederholenden dreifach-sulfatierten Disaccharid-Einheiten des Heparins. (B) Hexasaccharid-Sequenz des Heparins mit darin enthaltener Bindungsregion von Antithrombin in Form einer Pentasaccharidstruktur. Die markierten Sulfatreste sind essentiell für eine sog. high-affinity Bindung zum Antithrombin.(238,239). Modifiziert nach Casu, B. et al. (234).....	23
Abbildung 9: Strukturelle Darstellung des niedermolekularen Heparins Tinzaparin.	24
Abbildung 10: Ausschnitt der Studienergebnisse von Icli et al., in welcher der Einfluss von niedermolekularem Heparin (LMWH) auf eine Kombinationstherapie bestehend aus Cisplatin und Gemcitabin (CDDP + GEM) bei einer Anzahl Tumorpatienten (N) mit Pankreaskrebs untersucht wurde (269). (A) Tabellarische Übersicht der Studienergebnisse. (B) Kurven der insgesamt Überlebensraten beider Behandlungsmethoden entsprechend des Prinzips des „intent-to-treat“	26
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Zelloberflächen mit potentiellen Heparansulfat-Proteoglykanen: Syndekan und Glypikan mit möglicher Modifikation der Heparansulfat-Ketten durch die extrazellulären Enzyme Heparanase und Sulfatase- 1/2 (Sulf-1/2) inklusive einer potentiellen Freisetzung von Liganden und Weiterleitung an Rezeptoren mit der Möglichkeit einer Signalinduktion. Modifiziert nach Lanzi et al. (309).	29
Abbildung 12: Schematisch stark vereinfachte Darstellung des canonical Wnt-pathways im inaktiven Zustand (links) und aktiven Zustand mit anschließender Transkription der entsprechenden Gene (rechts). Modifiziert nach Zhan et al. (332).	32
Abbildung 13: Struktur des violetten BCA-Komplexes.....	62
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Pipettierschemas bei der Proteinbestimmung in einer 96-Well Platte mit einem Endvolumen von 220 µL/Well.	62

Abbildung 15: Darstellung der durch die horseradish peroxidase katalysierten Luminolreaktion.	65
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Pipettierschemas zur Durchführung des MTT-assays in 96-Well Platten. Die abgebildeten Konzentrationen repräsentieren die Konzentrationen der Verdünnungsreihe von Cisplatin ($10^{-7.5}$ - $10^{-3.5}$ mol/L). Falls anstelle mit FH535 beimpft wurde, betragen die Konzentrationen $10^{-8.26}$ - $10^{-4.26}$ mol/L. Die Zellzahl/Well betrug 20.000 bzw. 40.000 bei A2780 und A2780cis Zellen, sowie 5.000 bzw. 10.000 bei W1 und W1CR Zellen. Das finale Volumen/Well betrug 100 μ L.	67
Abbildung 17: Reduktion des MTT zu Formazan durch den in lebenden Zellen vorhandenen mitochondrialen Dehydrogenasen, NADH und NADPH.	69
Abbildung 18: Struktur des Fluorophors Heparin-Red [®]	73
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Pipettierschemas bei der Quantifizierung von Tinzaparin in einer 96-Well Platte mit einem Endvolumen von 185 μ L/Well.	74
Abbildung 20: Darstellung der durch die Firefly Luciferase katalysierten Monooxygenierung von 5'-Fluoroluciferin zu Oxyfluoroluciferin unter Emission von Licht. Mit freundlicher Genehmigung der Promega Corp./Courtesy of Promega Corp (396).	77
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Pipettierschemas bei der Bestimmung der Wnt-pathway-Aktivität in einer weißen 96-Well Platte mit einem Endvolumen nach dem Aussäen der Zellen von 100 μ L/Well.	78
Abbildung 22: (A) Zytotoxizität von Cisplatin allein und nach Vorinkubation mit 50 μ g/mL Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 40.000 Zellen. (B) Zusammenfassung der Zytotoxizität von Cisplatin allein oder mit einer Vorinkubation (24 h) von 25 bzw. 50 μ g/mL Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 24, 48 und 72 h Inkubationszeit mit 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren. Die Abbildungen wurden zum Zweck der Übersicht aus der gemeinsamen Veröffentlichung mit Dr. Daniel Philipp Stölting entnommen, welche zugleich Bestandteil seiner Dissertation sind (10).....	81
Abbildung 23: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer fünftägigen Vorinkubation von 10 bzw. 20 μ g/mL Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.	82
Abbildung 24: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer zehntägigen Vorinkubation von 10 bzw. 20 μ g/mL Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.	84
Abbildung 25: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von unfraktioniertem Heparin (entspricht einer Dosierung von etwa 4.200 I.E.) in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.	86
Abbildung 26: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von unfraktioniertem Heparin (entspricht einer Dosierung von etwa 34800 I.E.) in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.	87
Abbildung 27: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 μ g/mL RO-Heparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.	89

- Abbildung 28: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 µg/mL Fondaparinux in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten..... 91
- Abbildung 29: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 µg/mL Enoxaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten..... 93
- Abbildung 30: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 µg/mL Tinzaparin in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten. 95
- Abbildung 31: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 10 mU/mL Heparitinase I in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten..... 97
- Abbildung 32: Proteinexpression der Heparanase von unbehandelten, mit Cisplatin (2 µmol/L) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 µg/mL) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression der Heparanase wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte blot repräsentiert einen exemplarischen Versuch. ... 99
- Abbildung 33: Relative Quantifizierung der Heparanase Expression von unbehandelten, mit Cisplatin (2 µmol/L) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 µg/mL) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurden. Die Expression der Heparanase wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=3)..... 99
- Abbildung 34: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 5 bzw. 10 µmol/L Roneparstat in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten..... 101
- Abbildung 35: Charakterisierung der molekularen Struktur von Glykosaminoglykanen in A2780 und A2780cis Zellen. Metabolisch markierte Glykosaminoglykane wurden aus A2780 und A2780cis Zellen (A, C) sowie aus deren Kulturmedien (B, D) isoliert und analysiert. (A, B) Analyse der ³⁵S-markierten Proben durch Größenausschlusschromatographie. (C, D) Ionenaustauschchromatographie zur Analyse der ³⁵S-markierten Proben, welche durch einen linearen NaCl Gradienten (0,25-2 mol/L) (dargestellt als graue Linie) eluiert wurden. Das Verhältnis von Heparansulfat (HS) zu Chondroitinsulfat (CS) in A2780 und A2780cis Zellen und in deren Medien ist in Tabelle (E) angegeben. Die Daten repräsentieren das Mittel aus zwei Versuchen (n=2). Die genaue methodische Vorgehensweise ist in Pfankuchen et al. (404) beschrieben. 104
- Abbildung 36: Proteinexpression der Sulfatase-2 von unbehandelten, mit Cisplatin (2 µmol/L) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 µg/mL) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression der Sulfatase-2 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte blot repräsentiert einen exemplarischen Versuch. 106
- Abbildung 37: Relative Quantifizierung der Sulfatase-2 Expression von unbehandelten, mit Cisplatin (2 µmol/L) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 µg/mL) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurden. Die Expression der Sulfatase-2 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=3)..... 106
- Abbildung 38: Analyse der Proteinexpression von Syndekan-1 (links) und -4 (rechts) in unbehandelten oder mit Tinzaparin (50 µg/mL) vorinkubierten (24 h) A2780 (A,C) und A2780cis Zellen (B,D). Die Expression wurde mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Experimente wurden in Triplikaten angesetzt. 108

- Abbildung 39: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Kultivierung auf Kollagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichteten Platten in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten..... 109
- Abbildung 40: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Kultivierung auf Kollagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichteten Platten in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten. 111
- Abbildung 41: Durch Tinzaparin beeinflusste Gene in A2780cis Zellen (links oben). Gene der Resistenzsignatur (links unten). Teilweise übereinstimmende bei beiden Vergleichen regulierte Gene (mittig). Übereinstimmende bei beiden Vergleichen regulierte Gene (rechts). Diese Abbildung wurde zur Übersicht und Einleitung der folgenden Daten mit der Genehmigung von Herrn Dr. Daniel Philipp Stölting aus seiner Promotionsarbeit entnommen (9)..... 114
- Abbildung 42: Darstellung der zehn signifikantesten deregulierten pathway maps (A) und process networks (B) in tinzaparinbehandelten cisplatinresistenten A2780cis Zellen. Die Abbildung wurde von Herrn PD Dr. Hans-Dieter Royer vom Institut für Humangenetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt..... 119
- Abbildung 43: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 100 nmol/L BEZ235 in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten..... 121
- Abbildung 44: Zytotoxizität von FH535 in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten. 123
- Abbildung 45: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von $0,5 \mu\text{mol/L}$ FH535 in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten..... 125
- Abbildung 46: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von $100 \mu\text{mol/L}$ 5-ASA in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten. 127
- Abbildung 47: Alleinige Zytotoxizität von Cisplatin oder in Kombination mit einer Vorinkubation von $0,5 \mu\text{mol/L}$ FH535 in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten. 129
- Abbildung 48: Quantifizierung der mRNA-Level von Wnt-assoziierten Genen in unbehandelten (Streifen) und mit Tinzaparin vorbehandelten (Quadrate) A2780cis Ovariakarzinomzellen. Die Angabe der Änderung der mRNA Expression ist als Faktor bzw. Zahl dargestellt und wurde auf unbehandelte A2780 Zellen normalisiert (unbehandelte A2780 Zellen=0). 131
- Abbildung 49: Analyse der Proteinexpression von Glypikan-3 (A) und -4 (B) in unbehandelten oder mit Tinzaparin ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) vorinkubierten (24 h) A2780cis Zellen. Die Expression wurde mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Experimente wurden in Triplikaten angesetzt. 133
- Abbildung 50: Proteinexpression von Glypikan-3 von unbehandelten, mit Cisplatin ($2 \mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression von Glypikan-3 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte blot repräsentiert einen exemplarischen Versuch. . 134
- Abbildung 51: Relative Quantifizierung der Glypikan-3 Expression von unbehandelten, mit Cisplatin ($2 \mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurde. Die Expression von Glypikan-3 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=2). 135

- Abbildung 52: Proteinexpression von p-GSK-3 β von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression von p-GSK-3 β wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte blot repräsentiert einen exemplarischen Versuch. 137
- Abbildung 53: Relative Quantifizierung der p-GSK-3 β Expression von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurde. Die Expression von p-GSK-3 β wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=3). 138
- Abbildung 54: Proteinexpression von Axin1 von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression von Axin1 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte blot repräsentiert einen exemplarischen Versuch. 139
- Abbildung 55: Relative Quantifizierung der Axin1 Expression von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurde. Die Expression von Axin1 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=4). 140
- Abbildung 56: Zytotoxizität von Cisplatin in mit dem pGL4.49[luc2P/TCF-LEF/Hygro] Vektor transfizierten A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen. Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten. 142
- Abbildung 57: Analyse der Wnt-Signalaktivität auf Transkriptionsebene von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Luciferaseaktivität, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurde. Die Luciferaseaktivität wurde durch Quantifizierung der Lumineszenz 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert und auf die jeweilige Proteinkonzentration normalisiert (n=3). 143
- Abbildung 58: Proteinexpression von TCF-4 von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen. Die Expression von TCF-4 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert. Der dargestellte blot repräsentiert einen exemplarischen Versuch. 145
- Abbildung 59: Relative Quantifizierung der TCF-4 Expression von unbehandelten, mit Cisplatin (2 $\mu\text{mol/L}$) oder einer 24 h Vorinkubation mit Tinzaparin (50 $\mu\text{g/mL}$) oder in Kombination mit beidem behandelten A2780 und A2780cis Zellen durch Determinierung der Pixeldichte, wobei die der unbehandelten A2780 Zellen als 100 % festgelegt wurde. Die Expression von TCF-4 wurde 72 h nach der Cisplatinbehandlung analysiert (n=3). 146

Abbildung 60: Vergleich der A2780 und A2780cis Tumormodelle hinsichtlich Wachstumsrate sowie Auswirkung einer Behandlung mit Cisplatin. Dargestellt ist die Zunahme des durchschnittlichen Tumolvolumens der einzelnen Gruppen ($n=8$) \pm Standardabweichung. Die Daten wurden auf den Behandlungsbeginn an Tag 0 normalisiert. Die Behandlung und Untersuchung der A2780 NaCl Kontrollgruppe wurde an Tag neun unterbrochen, nachdem vier Mäuse das maximal akzeptable Tumolvolumen erreicht hatten. Die Mäuse der A2780 Cisplatingruppe wurden für einen weiteren Zeitraum untersucht, welcher hier nicht abgebildet ist. Die Untersuchung der A2780cis Kontrollgruppe wurde an Tag 15 unterbrochen, da sechs Mäuse das maximal akzeptable Tumolvolumen erreicht hatten, wohingegen die A2780cis Cisplatingruppe für einen weiteren Zeitraum untersucht wurde. Der hier dargestellte Graph stellt einen Ausschnitt an erhobenen Ergebnissen dar. Die kompletten Daten werden in den Abbildungen 61 und 62 dargestellt. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Mueller zur Verfügung gestellt, welche zugleich Bestandteil unserer gemeinsamen Veröffentlichung waren (389)..... 149

Abbildung 61: Analyse der Wachstumsinhibition im A2780 Tumormodell. Dargestellt ist die Zunahme des durchschnittlichen Tumolvolumens der einzelnen Gruppen ($n=8$) \pm Standardabweichung. Die Daten wurden auf den Behandlungsbeginn an Tag 0 normalisiert. Tinzaparin wurde täglich injiziert (10 mg/kg Körpergewicht). Cisplatin wurde über einen Zeitraum von zwei Wochen einmal pro Woche verabreicht (6 mg/kg Körpergewicht). Aufgrund einer unvollständigen Erholung der Mäuse hinsichtlich des Körpergewichts nach der zweiten Cisplatininjektion wurde eine dritte Gabe ausgelassen. Die Behandlung und Untersuchung der Kontroll- und Tinzaparingruppe wurde an Tag neun unterbrochen, da vier Mäuse das maximal akzeptable Tumolvolumen erreicht hatten. An Tag elf erreichten jeweils zwei Tumore der Cisplatin- und Cisplatin/Tinzaparingruppe das maximal akzeptable Tumolvolumen, woraufhin jene Mäuse aus der Studie entfernt wurden. Weiterhin wurden an Tag 14 zwei Mäuse jeder Gruppe entfernt, wobei die restlichen vier Mäuse beider Gruppen bis Tag 18 untersucht wurden. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Mueller zur Verfügung gestellt, welche zugleich Bestandteil unserer gemeinsamen Veröffentlichung waren (389)..... 150

Abbildung 62: Analyse der Wachstumsinhibition im A2780cis Tumormodell. Dargestellt ist die Zunahme des durchschnittlichen Tumolvolumens der einzelnen Gruppen ($n=8$) \pm Standardabweichung. Die Daten wurden auf den Behandlungsbeginn an Tag 0 normalisiert. Tinzaparin wurde täglich injiziert (10 mg/kg Körpergewicht). Cisplatin wurde über einen Zeitraum von drei Wochen einmal pro Woche verabreicht (6 mg/kg Körpergewicht). Die Behandlung und Untersuchung der Tinzaparingruppe wurde an Tag elf unterbrochen, da vier Mäuse das maximal akzeptable Tumolvolumen erreicht hatten. Die Untersuchung der Kontrollgruppe wurde bis Tag 15 fortgeführt als sechs Mäuse das maximal akzeptable Tumolvolumen erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt erreichten ebenfalls jeweils fünf Tumore der Cisplatin- und Cisplatin/Tinzaparingruppe jenes Volumen, woraufhin jene Mäuse aus der Studie entfernt wurden. Die restlichen drei Mäuse beider Gruppen wurden bis Tag 22 untersucht. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Mueller zur Verfügung gestellt, welche zugleich Bestandteil unserer gemeinsamen Veröffentlichung waren (389). 151

Abbildung 63: Einfluss von Tinzaparin auf eine Cisplatinbehandlung von A2780 (A) und A2780cis (B) Xenograft-Tumoren mit kleinem Initialvolumen. Dargestellt ist die Zunahme des durchschnittlichen Tumolvolumens der einzelnen Gruppen ($n=3$) \pm Standardabweichung. Die Daten wurden auf den Behandlungsbeginn an Tag 0 normalisiert. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Mueller zur Verfügung gestellt, welche zugleich Bestandteil unserer gemeinsamen Veröffentlichung waren (389). 152

Abbildung 64: Quantifizierung der intratumoralen Platin-Akkumulation in A2780 (oben) und A2780cis (unten) Xenograft-Tumoren von Nacktmäusen. Die Tumorstübe wurden nach drei und zehn (A2780) bzw. zwei und neun Tagen (A2780cis) nach der letzten Cisplatininjektion entnommen. Die Platinkonzentration der nur mit Cisplatin behandelten Tumore wurde jeweils als 100 % festgelegt und die mit Tinzaparin behandelten Tumore wurden darauf normalisiert. 153

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Informationen zu den verwendeten Chemikalien.....	35
Tabelle 2: Informationen zu den verwendeten primären Antikörpern.	39
Tabelle 3: Informationen zu den verwendeten sekundären Antikörpern.	40
Tabelle 4: Informationen zu den verwendeten Fertigarzneimitteln.	41
Tabelle 5: Informationen zu den hergestellten Antikörperverdünnungen.....	42
Tabelle 6: Informationen zu den verwendeten Substanzlösungen.	44
Tabelle 7: Informationen zu den hergestellten Puffern und Lösungen.	46
Tabelle 8: Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	49
Tabelle 9: Informationen zu den verwendeten Geräten.	51
Tabelle 10: Informationen zur verwendeten Software.	55
Tabelle 11: Zyklus einer Messung am Spektrometer SpectrAA® Zeeman 220.	60
Tabelle 12: Informationen zu den Inkubationsansätzen für die Analysen der Proteinexpressionen von A2780 und A2780cis Zellen.	63
Tabelle 13: Informationen zu den im MTT-assay verwendeten Substanzen.	67
Tabelle 14: Informationen zu den Inkubationsansätzen zur Analyse von Proteoglykanen von A2780 und A2780cis Zellen.	71
Tabelle 15: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer fünftägigen Vorinkubation von 10 bzw. 20 µg/mL Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=2).....	83
Tabelle 16: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer zehntägigen Vorinkubation von 10 bzw. 20 µg/mL Tinzaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).....	85
Tabelle 17: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von unfraktioniertem Heparin (entspricht einer Dosierung von etwa 34800 I.E.) in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).	88
Tabelle 18: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 µg/mL RO-Heparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).....	90
Tabelle 19: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 µg/mL Fondaparinux in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).....	92

Tabelle 20: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 µg/mL Enoxaparin in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=2).	93
Tabelle 21: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 50 µg/mL Tinzaparin in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).	95
Tabelle 22: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 10 mU/mL Heparitinase I in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=4).	97
Tabelle 23: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 5 bzw. 10 µmol/L Ronaparstat in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).	102
Tabelle 24: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Kultivierung auf Kollagen (10 µg/cm ²) beschichteten Platten in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).	110
Tabelle 25: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Kultivierung auf Kollagen (10 µg/cm ²) beschichteten Platten in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).	112
Tabelle 26: Zusammenstellung ausgewählter Gene der Resistenzsignatur von A2780cis Zellen (blaue Balken), welche durch Tinzaparin upreguliert wurden (rote Balken). Dargestellt sind die Gene durch ihr entsprechendes Gensymbol mit Angabe der Änderung der mRNA Expression als Faktor bzw. Zahl. Zur Identifikation der mit dem Gen assoziierten biologischen Funktionen erfolgte eine Literaturrecherche für jedes Gen in der PubMed Datenbank. Die hierbei dargestellte Tabelle zeigt ausgewählte Gene, die durch Tinzaparin um mindestens Faktor 2 hochreguliert wurden und in der Literatur biologisch relevante Daten existieren.	115
Tabelle 27: Zusammenstellung ausgewählter Gene der Resistenzsignatur von A2780cis Zellen (rote Balken), welche durch Tinzaparin downreguliert wurden (blaue Balken). Dargestellt sind die Gene durch ihr entsprechendes Gensymbol mit Angabe der Änderung der mRNA Expression als Faktor bzw. Zahl. Zur Identifikation der mit dem Gen assoziierten biologischen Funktionen erfolgte eine Literaturrecherche für jedes Gen in der PubMed Datenbank. Die hierbei dargestellte Tabelle zeigt ausgewählte Gene, die durch Tinzaparin um mindestens Faktor 2 runterreguliert wurden und in der Literatur biologisch relevante Daten existieren.	117
Tabelle 28: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 100 nmol/L BEZ235 (Dactolisib) in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 (n=2) und 40.000 Zellen (n=3) und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf).	121
Tabelle 29: Übersicht der Zytotoxizität von FH535 in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen (n=3).	124
Tabelle 30: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 0,5 µmol/L FH535 in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3).	126

Tabelle 31: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 100 $\mu\text{mol/L}$ 5-ASA in A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3). 128

Tabelle 32: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin alleine oder in Kombination mit einer Vorinkubation von 0,5 $\mu\text{mol/L}$ FH535 in W1 und W1CR Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 5.000 und 10.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=3). 130

Tabelle 33: Übersicht der Zytotoxizität von Cisplatin in mit dem pGL4.49[luc2P/TCF-LEF/Hygro] Vektor transfizierten A2780 und A2780cis Zellen nach 72 h Inkubationszeit mit 20.000 und 40.000 Zellen und den daraus ermittelten Resistenzfaktoren (Rf) (n=2). 142

8.3 Publikationsliste

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Pfankuchen, D.B., Baltes, F., Batool, T., Li, J-P., Schlesinger, M., Bendas, G.

Heparin antagonizes cisplatin resistance of A2780 ovarian cancer cells by affecting the Wnt signaling pathway.

Oncotarget. 8(40):67553-67566. (Juni 2017)

Mueller, T., Pfankuchen, D.B., Wantoch von Rekowski, K., Schlesinger, M., Reipsch, F., Bendas, G.

The Impact of the Low Molecular Weight Heparin Tinzaparin on the Sensitization of Cisplatin-Resistant Ovarian Cancers-Preclinical In Vivo Evaluation in Xenograft Tumor Models.

Molecules. 22(5), 728. (Mai 2017)

Pfankuchen, D.B.*, Stölting, D.P.*, Schlesinger, M., Royer, H.-D., Bendas, G.

Low molecular weight heparin tinzaparin antagonizes cisplatin resistance of ovarian cancer cells.

Biochem Pharmacol. 97(2):147-57. (September 2015).

(*gleichberechtigte Erstautoren)

Posterbeiträge

Pfankuchen, D. B., Stölting, D. P., Jakubzig, B., Royer, H.-D., Bendas, G.

Low molecular weight heparin can overcome cisplatin resistance in ovarian cancer cells- is the wnt-pathway the crucial target of heparin?

Wnt meeting 2016, EMBO Conference, Brünn (Tschechien), September 2016

Pfankuchen, D. B., Stölting, D. P., Bendas, G.

Chemosensitizing effects of low molecular weight heparin on cisplatin-resistant ovarian cancer cells

9TH International Conference of Anticancer Research, Porto Carras (Griechenland), Oktober 2014

Pfankuchen, D. B., Stölting, D. P., Bendas, G.

Chemosensitizing effects of low molecular weight heparin on cisplatin-resistant ovarian cancer cells

DPhG Jahrestagung, Frankfurt, September 2014

Pfankuchen, D. B., Stölting, D. P., Bendas, G.

Chemosensitizing effects of low molecular weight heparin on cisplatin-resistant ovarian cancer cells

CESAR Jahrestagung, Bonn, Juni 2014

Stölting, D. P., Koch, M., Pfankuchen, D. B., Royer, H.-D., Bendas, G.

Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway: Molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling

DPhG Jahrestagung, Freiburg, Oktober 2013

8.4 Danksagung

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerd Bendas für die mir zur Verfügung gestellte Möglichkeit der Promotion in einem sehr interessanten Forschungsgebiet. Seine stets professionelle, kommunikative und hilfsbereite Arbeitsweise sowie die ständige Bereitschaft zur Diskussion hat diese Arbeit sehr gefördert und erleichtert. Generell bin ich für das ausgesprochen harmonische Arbeitsumfeld sehr dankbar, da es mir zusätzliche Freude an meiner Arbeit bereitet hat.

Prof. Dr. Ulrich Jaehde möchte ich für das Interesse sowie die Übernahme der Tätigkeit als Zweitgutachter danken. Weiterhin bin ich dankbar für die freundliche Kommunikation mit ihm sowie ehemaligen und aktuellen Mitgliedern aus seinem Arbeitskreis.

Prof. Dr. Gabriele König und Prof. Dr. Rainer Manthey möchte ich für die freundliche Kommunikation und die Übernahme der Funktion als Mitglied in der Prüfungskommission danken.

PD Dr. Hans-Dieter Royer gilt ein besonderer Dank für die Leitung, Durchführung, Auswertung und Bereitstellung der *gene array* Daten. Die Treffen, die stetige Bereitschaft zur Diskussion sowie die sehr freundliche Kommunikation haben meine Arbeit sehr gefördert und mir darüber hinaus viel Freude bereitet.

Dr. Thomas Müller möchte ich für die Leitung und Durchführung der *in vivo* Experimente, sowie der Auswertung und Bereitstellung der Daten danken. Seine sehr freundliche Art und engagierte Arbeitsweise hatte einen großen Anteil an der erfolgreichen Kooperation.

Prof. Jin-ping Li, Fabian Baltes und Tahira Batool möchte ich für die Durchführung der Radioligandbindungsstudien danken. Die erfolgreiche Kooperation ist besonders der professionellen und engagierten Arbeitsweise dieser Personen zu verdanken.

Dr. Radoslaw Januchowski gilt ein besonderer Dank für die freundliche und engagierte Kommunikation sowie für die Bereitstellung der W1 und W1CR Ovarialkarzinomzellen. Der Firma Sigma-Tau Research möchte ich für die Bereitstellung des Heparanase-Inhibitors Roneparstat danken.

Der Dr. Hilmer Stiftung zur Förderung der Forschung auf pharmazeutischem Gebiet möchte ich für das zur Verfügung gestellte Promotionsstipendium danken. Die finanzielle Unterstützung hat mir einen großen Abschnitt der Promotion ermöglicht.

Der Bonner *International Graduate School of Drug Sciences* möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken, welche mir im Rahmen des Programms „International promovieren in Deutschland - *for all*“ die Teilnahme an der Konferenz 2016 in Brünn, Tschechien ermöglicht hat.

PD Dr. Anke Schiedel und Dr. Frank Umbach danke ich für das Engagement in Ihrer Funktion als Praktikumsleiter des 1. Semesters. Mit Ihnen und den weiteren Assistenten des 1. Semesters, denen ich hiermit ebenfalls danke, hatten ich eine schöne und unterhaltsame Zeit während der Betreuung der Studenten.

Dr. Martin Schlesinger möchte ich für sein stetiges Engagement und seine Hilfsbereitschaft danken, sowie Ann Kathleen Wantoch von Rekowski für ihre freundliche und engagierte Art, welche den Zeitraum während der Betreuung ihrer Masterarbeit sehr angenehm gestaltete. Mein Dank richtet sich auch an die ehemaligen und aktuellen Mitglieder der Arbeitsgruppe Bendas für eine freundschaftliche und schöne Zeit.

Mein ganz persönlicher Dank gilt besonders meiner Mutter Marion Pfankuchen. Sie hat mich in jeder Situation stets unterstützt und ermutigt. Ich habe ihr sehr viel zu verdanken.

Ein ebenfalls persönlicher Dank richtet sich an meinen Vorgänger und zugleich besten Freund Dr. Daniel Philipp Stölting. Zum einen für den unkomplizierten Austausch der Daten unserer aufeinander aufbauenden Themen sowie für das Korrekturlesen. Zum anderen für die stetige Unterstützung in allen Lebenslagen. Abschließend möchte ich meiner Freundin Hedda Ortman für die Unterstützung danken.