

# **Untersuchung der molekularen Mechanismen einer intrinsischen sowie Matrix-vermittelten Cisplatinresistenz in W1 Ovarialkarzinomzellen**

## **Dissertation**

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

vorgelegt von

**Ann Kathleen Wantoch von Rekowski**

aus Solingen

Bonn, Dezember 2020



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

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas  
Zweitgutachter: PD Dr. Ganna Staal geb. Kalayda  
Tag der Promotion: 26.05.2021  
Erscheinungsjahr: 2021



„Vor unseren Zellen haben wir keine Geheimnisse.  
Sie wissen mehr über uns als wir selbst.“

– Bill Bryson



# Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theorie</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Das Ovarialkarzinom</b>	<b>3</b>
2.1.1 Standardbehandlung für Ovarialkarzinome	4
<b>2.2 Cisplatin</b>	<b>6</b>
2.2.1 Entdeckung der Zytotoxizität	6
2.2.2 Struktur und Entwicklung	7
2.2.3 Pharmakokinetik und Bioaktivierung	8
2.2.4 Wirkmechanismus von Cisplatin	10
2.2.5 Identifizierung und Auswirkungen der DNA-Addukte	12
2.2.6 Weitere Targets für Cisplatin	14
2.2.7 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen	16
<b>2.3 Cisplatinresistenz</b>	<b>17</b>
2.3.1 <i>Pre-target</i> Resistenzen	19
2.3.2 <i>On-target</i> Resistenzen	22
2.3.3 <i>Post-target</i> Resistenzen	24
2.3.4 Off-target-Resistenzen	28
<b>2.4 Die extrazelluläre Matrix</b>	<b>31</b>
2.4.1 Collagen als ein Bestandteil der EZM	32
<b>2.5 Integrine</b>	<b>34</b>
2.5.1 Struktur	35
2.5.2 Regulierung der Integrin-Aktivierung	36
2.5.3 Signalwege der Integrine	36
<b>2.6 Discoidin-Domain-Rezeptor, DDR1</b>	<b>38</b>
2.6.1 Struktur	38
2.6.2 Regulierung der DDR1 Aktivierung	39
2.6.3 DDR1 Signalweg	40
<b>2.7 mTOR- signaling</b>	<b>41</b>
2.7.1 mTORC1-Struktur	41
2.7.2 mTOR-Signalweg	43
<b>2.8 HSP27-signaling</b>	<b>44</b>
2.8.1 Struktur	45
2.8.2 Aktivierung von HSP27	46
2.8.3 HSP27- Signalweg	46
<b>3 Ziele dieser Arbeit</b>	<b>48</b>
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>49</b>

<b>4.1</b>	<b>Verwendete Materialien</b>	<b>49</b>
4.1.1	Chemikalien und Ausgangsstoffe	49
4.1.2	Hergestellte Reagenzien	55
4.1.3	Verbrauchsmaterialien	61
4.1.4	Geräte	62
4.1.5	Software	64
<b>4.2</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>65</b>
4.2.1	Zelllinien	65
4.2.2	Inkulturnahme	65
4.2.3	Kultivierung	66
4.2.4	Lagerung	67
4.2.5	Zellzahlbestimmung	67
<b>4.3</b>	<b>Lentivirale Transduktion</b>	<b>67</b>
4.3.1	Ermittlung der Puromycin Konzentration	70
4.3.2	$\beta$ 1-Integrin-Transduktion der W1 und W1CR Zellen	71
<b>4.4</b>	<b><i>Small-interfering</i> RNA Transfektion</b>	<b>72</b>
4.4.1	HSP27 Transfektion von W1 und W1CR Zellen	74
<b>4.5</b>	<b>Collagen-Beschichtung</b>	<b>74</b>
<b>4.6</b>	<b>3D Model</b>	<b>75</b>
<b>4.7</b>	<b>Zytotoxizitäts-assays</b>	<b>76</b>
4.7.1	MTT-assay	76
4.7.2	AlamarBlue <sup>TM</sup> -assay	78
4.7.3	Auswertung und Statistik	79
<b>4.8</b>	<b>Proteinanalytik</b>	<b>80</b>
4.8.1	Lysatgewinnung	80
4.8.2	SDS-Gelelektrophorese	82
4.8.3	Western Blot	84
4.8.4	Auswertung und Statistik	86
4.8.5	Proteome Profiler Array	86
<b>4.9</b>	<b>Quantitative Platinbestimmung</b>	<b>87</b>
4.9.1	Grundlagen der AAS	87
4.9.2	Aufbau der AAS	88
4.9.3	Versuchsbedingungen zur Platinbestimmung	90
4.9.4	Intrazelluläre Platin Konzentration	91
<b>4.10</b>	<b>Glutathion-assay</b>	<b>91</b>
<b>4.11</b>	<b>Gen-array</b>	<b>92</b>
<b>5</b>	<b><i>Ergebnisse und Diskussion</i></b>	<b>93</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung der Cisplatinresistenz</b>	<b>93</b>



5.1.1	Cisplatintoxizität in W1 und resistenten W1CR Zellen	93
5.1.2	Morphologie der W1 und resistenten W1CR Zellen	94
5.1.3	mRNA Level der W1CR Zellen im Vergleich zu W1 Zellen	95
<b>5.2</b>	<b>Charakterisierung der CAM-DR</b>	<b>98</b>
5.2.1	Morphologie collagenkultivierter W1 und W1CR Zellen	99
5.2.2	mRNA Level der collagenbehandelten Zellen	101
<b>5.3</b>	<b>Zelluläre Aufnahme von Cisplatin</b>	<b>104</b>
5.3.1	Proteinexpression des Effluxtransporters MRP2	105
5.3.2	Proteinexpression des Influxtransporters CTR1	107
<b>5.4</b>	<b>Etablierung eines 3D Modells</b>	<b>109</b>
5.4.1	Morphologie agarosekultivierter W1 und resistenten W1CR Zellen	109
5.4.2	Viabilitäts-Messung des 3D Modells via AlamarBlue- <i>assay</i> <sup>TM</sup>	110
<b>5.5</b>	<b>Einfluss des <math>\beta</math>1-Integrins auf CAM-DR der W1 Zelllinien</b>	<b>112</b>
5.5.1	Auswirkung des $\beta$ 1-Integrin <i>knock-downs</i> in W1 Zellen	112
5.5.2	Untersuchungen der Integrin-vermittelten Signalwege	115
<b>5.6</b>	<b>Der PI3K/AKT-Signalweg</b>	<b>123</b>
5.6.1	Einfluss der PI3K auf die Cisplatinsensitivität beider W1 Zellen	123
5.6.2	Einfluss der PTEN auf die Cisplatinsensitivität beider W1 Zellen	126
5.6.3	Einfluss der AKT auf die Cisplatinsensitivität beider W1 Zellen	128
5.6.4	Einfluss von mTOR auf die Cisplatinsensitivität beider W1 Zellen	130
<b>5.7</b>	<b>Screening der Kinaseaktivitäten in W1 und W1CR Zellen</b>	<b>132</b>
<b>5.8</b>	<b>Der MAPK-Signalweg</b>	<b>135</b>
5.8.1	Auswirkung des DDR1-Rezeptors auf die Cisplatinresistenz	135
5.8.2	Aktivität des ERK Signalwegs in W1 Zellen	137
5.8.3	Aktivität des JNK Signalwegs in W1 Zellen	144
<b>5.9</b>	<b>HSP27 Signalweg</b>	<b>146</b>
5.9.1	Effekt auf die intrinsischen Caspasenkaskade	149
5.9.2	Analyse der Matrix-Metalloproteasen 2 und 9	151
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>155</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>158</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>194</b>
<b>8.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>194</b>
<b>8.2</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>200</b>
<b>8.3</b>	<b>Formelverzeichnis</b>	<b>200</b>
<b>8.4</b>	<b>Danksagung</b>	<b>201</b>
<b>8.5</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>203</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Das folgende Abkürzungsverzeichnis enthält Angaben über alle verwendeten Abkürzungen. Nicht aufgeführt werden Produktbezeichnungen und Rechtsformen. Ebenso werden als allgemein bekannt römische Ziffern, griechische Zahlen, internationale Abkürzungen für Aminosäuren sowie chemischen, mathematischen und physikalisch geläufigen Einheiten und Symbole vorausgesetzt. Englische Begriffe werden in *kursiv* kenntlich gemacht.

% (V/V)	Volumenprozent
®	<i>Registered Trade Mark</i>
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ABCC2	<i>ATP-binding cassette subfamily C member2</i>
ADMIDAS	benachbarte Metallionen-abhängige Bindungsstelle
ad	zu (Endvolumen)
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APAF-1	Apoptotischer Proteaseaktivierungsfaktor-1
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATOX1	<i>Antioxidant1CopperChaperone</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A	<i>Copper transporting ATPase 1, Synonym: MNK</i>
ATP7B	<i>Copper transporting ATPase 2, Synonym: WND</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3related protein, Synonym: FRP1</i>
Bad	<i>Bcl-2associated death promoter</i>
BAK	<i>Bcl-2homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2associated X protein</i>
BCA	<i>Bicinchinonic acid</i>
Bcl-2	<i>Apoptosis regulator BCL-2</i>
Bcl-XL	<i>BCL-2-like protein 1</i>
BRCA1/2	Brustkrebsgen 1/2
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM-DR	<i>cellular adhesion mediated drug resistance</i>
cAMPK	zyklische AMP-aktivierte Proteinkinase

## Abkürzungsverzeichnis

---

Caspasen	<i>Cysteine aspartate-specific protease</i>
CAV1	Caveolin-1
CCS	<i>copper chaperone for superoxide dismutase</i>
cDDP	Diammindichloridoplatin(II) /Cisplatin
Chk1/2	<i>checkpoint kinase 1/2</i>
c-MYC	<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
COL	Collagen
COX-2	Cyclooxygenase-2
CR	Cisplatinresistent
CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i>
CRISPR/CAS9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CT	C-terminus
CTR1	<i>Copper transporter 1, Synonym: SLC31A1</i>
CTSK	Cathepsin K
CTSS	Cathepsin S
CTSV	Cathepsin L2
CXXC	<i>CXXC-type zinc finger protein</i>
DCN	Decorin
DDR1/2	Discoidin Domain-Rezeptoren 1/2
DEPTOR	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline</i>
DS-Domäne	Discoidin-Domäne
EC <sub>50</sub>	<i>Half maximal effective concentration</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EJXM	extrazelluläre Juxtamembran
EMDR	<i>environment-mediated drug resistance</i>
EMT	<i>endothelial to 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>Mitogen-activated protein kinase</i>
ESGO	<i>European Society of Gynaecological Oncology</i>

---

et al.	<i>et alii</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
fAAS	<i>flameless atomic absorption spectroscopy</i>
FAK	Fokale Adhäsionskinase
Fas	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6</i>
FasL	<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6</i>
FAT	FRAP-, ATM- und TRRAP -Domäne
FATC	C-terminale FAT Domäne
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FKS	Fötale Kälberserum Albumin
FLIP	<i>fllice-like inhibitory protein</i>
FRB	FKBP12-Rapamycin-Bindungsdomäne
GADD45	<i>Growth Arrest and DNA Damage</i>
GAP	GTPase-aktiviendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GO	<i>Gene Ontology</i>
GOG	Gruppe für Gynäkologische Onkologie
GS	Glutathion-S-Konjugaten
GSH	Glutathion
GSK	<i>Glycogen synthase kinase</i>
GSSG	Glutathiondisulfid
HEAT	<i>Huntingtin, elongation factor 3 (EF3), protein phosphatase 2A (PP2A), and kinase TOR1</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HER-2	Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HR	<i>homologe Rekombination</i>
HMG1	<i>High Mobility Group-Box Proteine</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
IgG	Immunglobulin G
IJXM	intrazellulären Juxtamembran-Region
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JAK	Januskinase
JNK	<i>stress-activated protein kinase</i>
kd	<i>knock-down</i>
KD	intrazelluläre Kinase Domäne
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKAP-K1	ribosomale S6-Kinase; p70RSK
MAPKAPK2	<i>MAP kinase-activated protein kinase 2</i>
MDA	hepatischen Malondialdehyd
MDR1	p-Glykoprotein ( <i>multi drug resistance</i> )
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MIDAS	metallionen-abhängige Adhäsionsstelle
miRNA	MicroRNA
MKK	<i>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MLH1/2	<i>MutL homolog 1/2</i>
mLST8/GβL	<i>mammalian LST8/G-protein β-subunit like protein</i>
MMPs	Metalloproteinasen
MMR	<i>Mismatch Repair System</i>
MRD	<i>minimal residual disease</i>
m-RNA	<i>Messenger RNA</i>
MRP2	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NER	<i>Nucleotide Excision repair</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHE	<i>sodium-hydrogen antiporter</i>
NID1	Nidogen-2
p21	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
p38	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
p53	Tumorsuppressor p53
PAC	Puromycin-N-Acetyltransferase
PAH	p21-aktivierten Kinase

---

PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>Phosphate Bufferd Saline</i>
PD1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PDK1	3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase 1
PIDD	<i>protein with a death domain</i>
PIKK	<i>phosphatidylinositol-3-kinase-like kinase</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	<i>Proteinkinase A</i>
PKB	<i>Proteinkinase B</i>
PKD	<i>Proteinkinase D</i>
POLH	<i>DNA polymerase eta</i>
PRAS40	<i>Proline-rich AKT1 substrate 1 40 kDa; Synonym AKT1S1</i>
PSI	Plexin-Sempahorin-Integrin
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAD51	RAD51 Rekombinase
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAPTOR	<i>regulatory-associated protein of mTOR</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RECIST	<i>response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
REV3	<i>DNA polymerase zeta catalytic subunit</i>
RF	Resistenzfaktor
RHEB	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
sc	<i>scrambled control</i>
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

SFM-DR	<i>soluble factor-mediated drug resistance</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SPP1	Osteopontin
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TAK1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with tween20</i>
TLS	<i>translesion DNA synthesis</i>
TM	Transmembran
TNF	Tumornekrosefaktor
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
TSC1/2	<i>Tuberous Sclerosls Complex 1/2</i>
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
UV	Ultraviolett
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Wnt	<i>wingless-related integration site</i>
wt	<i>wildtype</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum group F- complementing protein</i>
YAP	<i>yes-associated protein 1</i>
ZAK	<i>Sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK</i>





# 1 Einleitung

Krebserkrankungen, die bereits erstmals ca. 1600 v. Chr. schriftlich dokumentiert wurden, sind bis ins heutige 21. Jahrhundert als eine der größten gesundheitlichen Herausforderungen in unserer Gesellschaft präsent [1]. Krebs stellt eine der komplexesten und zugleich meist gefürchtetsten Erkrankungen dar, die mit Hoffnungslosigkeit und Unheilbarkeit assoziiert wird. Zurückzuführen ist die Angst, die mit einer Krebsdiagnose einhergeht auf die damit verbundene Sterblichkeitsrate. Weltweit ist Krebs für den Tod von 9,5 Millionen Menschen allein im Jahr 2018 verantwortlich gewesen [2]. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist Krebs nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Europa und Nordamerika. Des Weiteren hat in den letzten Jahrzehnten die Zahl der Krebserkrankungen aufgrund der fortschreitenden Bevölkerungsalterung in diesen Bereichen immer stärker zugenommen. Aufgrund dessen ist der Bekämpfung von Krebs eine hohe Aufmerksamkeit gewidmet.

Krebs ist eine maligne Transformation von körpereigenen Zellen, die auf eine Veränderung von Genen zurückzuführen ist, deren Produkte (Proteine) an der Regulation des Zellwachstums und der Apoptose beteiligt sind. Neben verstärkter Proliferation und möglicher Umgehung der Apoptose trägt die Fähigkeit zur Metastasierung, d.h. eine Absiedlung von lebensfähigen Zellen des Primärtumors in ein anderes, räumlich getrenntes Gewebe des Körpers, entscheidend zur Malignität von Tumoren bei [3]. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass maligne Veränderungen trotz gleicher Krebsart in unterschiedlichen Patienten eine starke und dynamische Heterogenität aufweisen können [4,5], wodurch der individuellen Therapie der Patienten eine große Bedeutung zukommt. Obwohl durch die Forschung neuer stratifizierter Therapien und verbesserter diagnostischer Methoden eine Heilung bestimmter Krebsarten ermöglicht wird, bleibt eine Vielzahl an Krebsarten, beispielsweise das Ovarialkarzinom, in fortgeschrittenen Stadien nahezu unheilbar. Dies hängt sowohl mit der steigenden Anzahl an Neuerkrankungen als auch insbesondere mit einem verminderten Ansprechen vieler Tumore gegen die eingesetzten Chemotherapien und einer daraus resultierenden Chemoresistenz zusammen. Die Entwicklung von Arzneimittelresistenzen stellt eines der größten Hindernisse in der klinischen Behandlung von Krebspatienten dar. Das Ausmaß der Resistenzbildung ist bei den einzelnen Tumorentitäten unterschiedlich stark ausgeprägt und im Fall des Ovarialkarzinoms bspw. oftmals therapielimitierend.

Trotz der genannten individuellen Heterogenitäten werden Patientinnen mit Ovarialkarzinomen immer noch mit einem ähnlichen Ansatz behandelt, welcher aus einer zytoreduktiven Operation und einer anschließenden Platinbasierten Chemotherapie besteht [6]. Die Mehrheit der Patientinnen spricht anfänglich gut auf die Platinmedikamente an, allerdings weist das Ovarialkarzinom eine hohe Rezidivrate auf, die eine Fortsetzung der Behandlung erfordert, was oft mit einer Resistenzbildung einhergeht [7].

Vielfältige Mechanismen sind an der Cisplatinresistenz beteiligt. Die meisten Resistenzphänomene beruhen auf einer adaptiven genetischen Reprogrammierung der Tumorzellen unter zytotoxischer Therapie. Die molekularen Resistenzmechanismen sind vielseitig, und die funktionellen Konsequenzen auf zellulärer Ebene reichen von Mutationen in den Signalwegen zur Umgehung der Apoptose und zur Auslösung der Proliferation bis hin zu Veränderungen in der intrazellulären Verarbeitung der Medikamente. Die Entwicklung der Cisplatinresistenz ist ein komplexer, mehrteiliger Prozess, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist [8]. Neben diesen adaptiven, genetischen Mechanismen der Krebszellen gegen die Zytostatika hat in den letzten Jahren auch die Rolle der zellulären Mikroumgebung der Tumore in ihrem Einfluss auf die zytotoxische Wirksamkeit von Medikamenten eine hohe Bedeutung erlangt. Dabei sind allerdings die Mechanismen der *environmental mediated drug resistance* noch nahezu unverstanden.

Aufgrund dessen beschäftigt sich diese Arbeit insbesondere mit der Bindung von Tumorzellen an extrazelluläre Matrixkomponenten, die auch als zelladhäsionsvermittelte Arzneimittelresistenz (CAM-DR) bezeichnet wird. Dieser Prozess könnte als ein funktioneller Startpunkt der Tumorzellen angesehen werden, um zytotoxischem Stress auf nicht-genetischer Ebene rasch zu entkommen und somit eine Voraussetzung für spätere genetische Anpassungen darzustellen. In Anbetracht der Schlüsselrolle der CAM-DR als frühe Form der Resistenzbildung kann ein Einblick in die zugrundeliegenden molekularen Pfade neue Angriffspunkte für frühe pharmakologische Beeinflussung der Resistenzbildung bieten. Ein sehr gutes Modell zur Untersuchung dieser Resistenz-Phänomene stellt das Ovarialkarzinom dar. Mit dem Ziel, die Relevanz und die zugrundeliegenden Mechanismen der CAM-DR bei Eierstockkrebszellen aufzuklären, untersucht die vorliegende Arbeit die Rolle der Collagenbindung von W1 Ovarialkarzinomzellen im Hinblick auf die Cisplatinempfindlichkeit. Um herauszufinden, ob CAM-DR ein zusätzlicher unabhängiger Prozess oder ein integrativer Teil einer bereits bestehenden Cisplatinresistenz ist, verwenden wir außerdem einen Cisplatinresistenten Subtypen von W1-Zellen (W1CR).

## 2 Theorie

### 2.1 Das Ovarialkarzinom

Weltweit stellt das Ovarialkarzinom die Erkrankung mit der höchsten Morbidität unter den gynäkologischen Tumoren dar und rangiert unter den am häufigsten diagnostizierten Karzinomen bei Frauen auf Platz 7 [9,10]. Obwohl der Eierstockkrebs im Vergleich zu Brustkrebs eine niedrigere Prävalenz hat, führt ein Karzinom der Ovarien dreimal häufiger zu einem letalen Ausgang. Es wird sogar angenommen, dass die Sterblichkeitsrate dieser Krebsart bis zum Jahr 2040 ansteigen könnte [11,12]. Im Durchschnitt erkrankt etwa eine von 75 Frauen im Laufe ihres Lebens an Eierstockkrebs. Die Wahrscheinlichkeit infolge eines Ovarialkarzinoms zu sterben liegt bei 1 zu 100 [9]. Aufgrund fehlender Vorsorgeuntersuchungen mit hoher Sensitivität und Spezifität wird die Diagnose oftmals erst im Spätstadium gestellt (76 % im Stadium T3/T4). Die Symptome treten meist erst auf, nachdem die Krankheit Metastasen gebildet hat, infolgedessen ist die Erkrankung mit einer schlechten Prognose verbunden. Dementsprechend ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate mit nur 43 % sehr klein [13]. Eierstockkrebs im Spätstadium ist in der Mehrzahl der Fälle unheilbar.

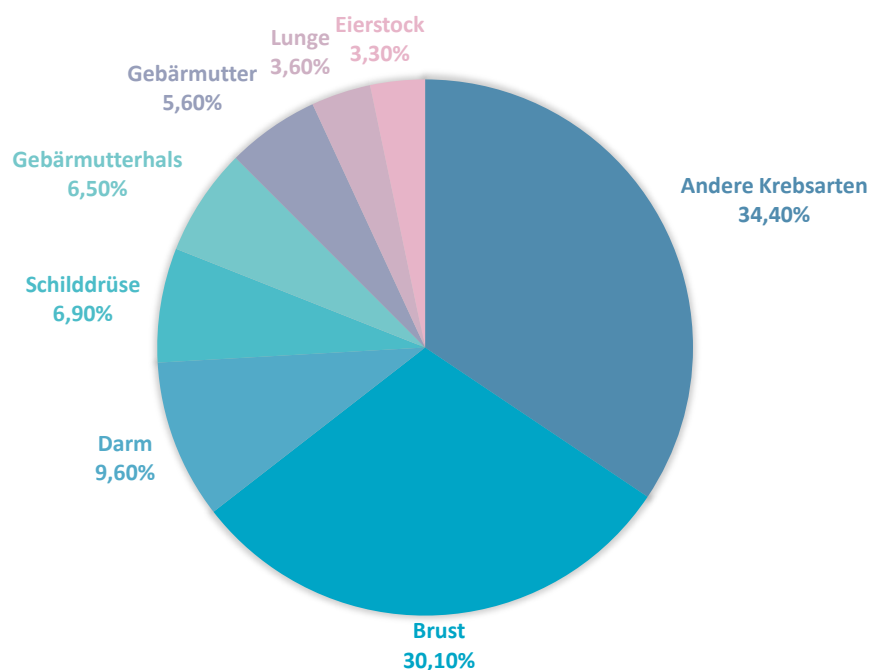


Abbildung 1: Statistiken zur weltweiten krebsbedingten Sterblichkeitsrate von Frauen aller Altersgruppen im Jahr 2018 [14].

Darüber hinaus wird die Behandlung des Ovarialkarzinoms durch die Heterogenität dieser Tumore verkompliziert. Verschiedene histologische Typen des epithelialen Ovarialkarzinoms besitzen einen unterschiedlichen zellulären Ursprung, ein vielfältiges Mutationsspektrum und

damit unterschiedliche Prognosen [15,16]. Selbst innerhalb eines histologischen Typs lassen sich verschiedenen molekulare Subtypen mit unterschiedlicher Prognose finden [17,18]. Um diese Probleme anzugehen, ist es notwendig, die Unterschiede besser zu charakterisieren, zuverlässige Biomarker zu finden und geeignete zielgerichtete Therapien zu entwickeln.

### **2.1.1 Standardbehandlung für Ovarialkarzinome**

Die Standardbehandlung für Eierstockkrebs ist die maximale zytoreduktiv chirurgische neoadjuvante Therapie, gefolgt von einer platinbasierten Chemotherapie. Sowohl die Diagnose als auch das Stadium der Erkrankung werden während der Operation bestimmt. Derzeit wird eine Skala verwendet, mit Ausnahme des endometrioiden Ovarialkarzinoms, bei dem eine dreigliedrige Einteilung (G1, G2 oder G3) verwendet wird [19]. Die Beurteilung der Stadien-Skalierung sollte nach den aktuellen FIGO-Empfehlungen erfolgen [20]. Gemäß der Gruppe für Gynäkologische Onkologie (GOG) wurde die optimale Zytoreduktion bisher als Resttumorknötchen mit einem maximalen Durchmesser von jeweils 1 cm oder weniger definiert. Eine groß angelegte Studie zeigte jedoch eine Verbesserung des Gesamtüberlebens für die Gruppe der Patientinnen mit vollständiger Resektion im Vergleich zu den Gruppen mit der sogenannten optimalen (zwischen 0,1 und 1 cm) und suboptimalen Zytoreduktion ( $p < 0,0001$ ) [21]. So ist nach den ESGO-Richtlinien für die Ovarialkarzinom-Operation das Ziel der Primäroperation eine vollständige Resektion der makroskopischen Residuen der Tumormanifestationen [22,23].

Nach der Operation werden die Patientinnen alle 21 Tage über sechs Zyklen mit dem intravenösen Platin/Taxan-Regime behandelt (First-Line Chemotherapie). Bei Patientinnen im Stadium IA /G1-Tumoren kann die Chemotherapie entfallen [24]. In fortgeschrittenen Stadien (III/IV) ist eine vollständige Zytoreduktion oftmals nicht möglich. Die häufigste Ursache ist der Befall des Dünndarm-Mesenteriums und die Läsionen im Leberhilum. Patientinnen mit inoperablen Läsionen oder schlechten Ergebnissen werden zunächst mit einer Induktions-Chemotherapie (neoadjuvant) behandelt. Nach drei Zyklen der Chemotherapie kann bei Ansprechen auf die Behandlung die Intervall-Debulking-Chirurgie (IDS) durchgeführt werden, danach wird die Chemotherapie bis zu sechs Zyklen fortgesetzt [24].

Der Behandlungserfolg wird nach Abschluss der First-Line-Chemotherapie beurteilt. Die Prüfung des Ansprechens auf die Chemotherapie erfolgt auf Grundlage der bildgebenden Verfahren und nach den Kriterien von RECIST 1.1 (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) [25]. Die Mehrheit der Patientinnen spricht gut auf die First-Line-Chemotherapie an,

wobei von einem vollständigen Ansprechen (complete response; CR) gesprochen wird. Jedoch entwickeln viele Patientinnen ein Rezidiv. Bei Behandelten mit einer Resterkrankung  $< 1$  cm wird das Risiko für ein Rezidiv auf 60-70 % geschätzt; bei Frauen mit einer großvolumigen Resterkrankung liegt das Risiko sogar bei 80-85 % [7]. Deshalb sollten Patientinnen mit CR periodisch kontrolliert werden.

Zur Behandlung haben sich bis heute platinhaltige Zytostatika als einzelne Wirkstoffkomponenten oder in Kombination etabliert, welche im nächsten Kapitel detaillierter besprochen werden [24]. Gegenwärtig werden viele neue Medikamente entwickelt und in laufenden klinischen Studien getestet, die ihre Wirksamkeit bei der Behandlung von Eierstockkrebs bewähren sollen. Neue Arzneimittel richten sich meist gegen molekulare Ziele und Signalwege, die von essenzieller Bedeutung für die Proliferation der Krebszellen sind und für die Regulierung der Apoptose verantwortlich sein können, sowie eine bessere Erkennung und Verstärkung des Immunsystems fördern. Dies sind z.B. antiangiogene Faktoren, Inhibierungsfaktoren des Wachstumsfaktorsignals, PolyADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitoren oder Folatezeptorinhibitoren. Darüber hinaus gibt es viele getestete immuntherapeutische Ansätze. Bisher konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass diese neuen Wirkstoffe und therapeutischen Ansätze den Eierstockkrebs heilen können, aber sie können die Therapie verbessern und zu einer Verzögerung des Wiederauftretens oder einer Stabilisierung des Krankheitsbildes führen. Aufgrund dessen ist es notwendig, andere, stärker auf die individuellen histologischen und biologischen Merkmale zugeschnittene Therapien zu entwickeln. Je nach spezifischen Mutationsmerkmalen dieser Subtypen könnten gezielte Protein-Inhibitoren zum Einsatz kommen. Eine bessere molekulare und genetische Charakterisierung der verschiedenen Subtypen des Ovarialkarzinoms ist erforderlich, wenn über eine personalisierte Behandlung nachgedacht werden soll.

Das Ovarialkarzinom ist für Studien über die Ursachen einer Chemoresistenz gegenüber Platinkomplexen besonders interessant, da die Behandlung vergleichsweise gut erforscht und das Wissen über potentielle Mechanismen umfangreicher ist, als es bei neuartigen Therapieformen der Fall ist. Der potenzielle Erfolg der Behandlung von Ovarialkarzinomen hängt von einem besseren Verständnis der Mikroumgebung des Tumors und der dominanten Resistenz-bildenden *pathways*, sowie von der Suche nach zuverlässigen Biomarkern ab.

## 2.2 Cisplatin

Cisplatin gehört zur Arzneimittelgruppe der Zytostatika, die für eine unspezifische Hemmung des Zellwachstums bzw. der Zellteilung verantwortlich sind. Insbesondere das Wachstum von sich schnell proliferierenden Zellen wird unterdrückt, somit wird es vor allem als Chemotherapeutikum gegen unterschiedliche Krebsarten eingesetzt. Dabei ist das Indikationsgebiet der cisplatinbasierten Chemotherapie sehr breit aufgestellt, unter anderem werden folgende solide Krebsarten auf diese Weise behandelt: Ovarial-, Hoden-, Bronchial-, Blasen-, Zervixkarzinome, außerdem Karzinome im Kopf- und Halsbereich [26–32]. Cisplatin steht als essenzieller Bestandteil des Gesundheitssystems auf der Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der WHO, da es als sicheres und wirksames Arzneimittel eingestuft wird [33–35].

### 2.2.1 Entdeckung der Zytotoxizität

Zufallsentdeckungen führten immer wieder zu Meilensteinen in der Forschung. Das wohl bekannteste Beispiel einer so genannten Serendipität stellt das Medikament Penicillin dar, aber auch Cisplatin ging aus einer ähnlichen zufälligen Beobachtung hervor. Zunächst wurde die Verbindung  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$  im Jahre 1845 von Michele Peyrone synthetisiert und deshalb als Peyrone-Salz bezeichnet [36]. Erst 50 Jahre später leitete Alfred Werner schließlich die Struktur ab [37]. Die zytostatische Eigenschaft von Platinverbindungen wurde erst viel später im Jahre 1965 per Zufalls entdeckt. Anlässlich einer falschen Hypothese glaubte der Biophysiker Barnett Rosenberg von der Michigan State University, dass magnetische Felder die Zellproliferation hemmen. Die Zellteilung von *Escherichia coli* wurde durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an das Nährmedium mithilfe von Platinelektroden verhindert. Prognostiziert hatte er damals, dass nach Abstellen des Stroms die Bakterien weiterhin wachsen würden, dies traf allerdings nicht zu. So hatte er schlussendlich erkannt, dass durch die Elektrolyse von Platinelektroden und die Einwirkung von Ammoniumsalzen sowie Licht ein löslicher Platinkomplex erzeugt wird, der für die zytostatische Wirkung verantwortlich ist. Hinzukommend stellten Rosenberg et al. fest, dass die Bakterien starken morphologischen Veränderungen ausgesetzt waren und in die Länge wuchsen, was darauf hindeutete, dass die Zellen zwar wuchsen, die Zellteilung allerdings gehemmt wurde [38].

Sie kamen zu dem Schluss, dass Verbindungen, die in der Lage sind, die Teilung von *E. coli* zu hemmen, auch für die Behandlung von Krebs geeignet sein könnten. Dieser neue Befund führte zu weiteren Experimenten in denen bewiesen wurde, dass ein planarer Komplex, der  $\text{Pt}^{2+}$  Ionen mit *cis*-Konfiguration – später als Cisplatin bekannt – enthielt, sehr wirksam Sarkom- und

Leukämiezellen hemmt, indes das *trans*-Isomer kaum einen zytostatischen Effekt vermitteln kann [39]. Diese Erkenntnisse in ein nützliches kommerzielles Medikament umzusetzen war zu dieser Zeit keine leichte Aufgabe. Bis dato waren hauptsächlich organische Verbindungen zur Behandlung von Krebs zugelassen. Fast alles, was Schwermetalle enthielt, wurde als toxische Verbindung eingestuft. Die Bestätigung der zytotoxischen Aktivität und die Erweiterung der Prüfung auf andere Tumorzelllinien brachte schließlich die Grundlage für die klinische Entwicklung und Zulassung von Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin (II), cDDP, Abb. 2) und den Anstoß für eine medizinische Anwendung [39,40]. 1971 begann das National Cancer Institute mit Studien und innerhalb der nächsten sieben Jahren wurde das Molekül Cisplatin für die Behandlung von Hoden- und Ovarialkrebs von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) am 19. Dezember 1978 zugelassen [41–43].

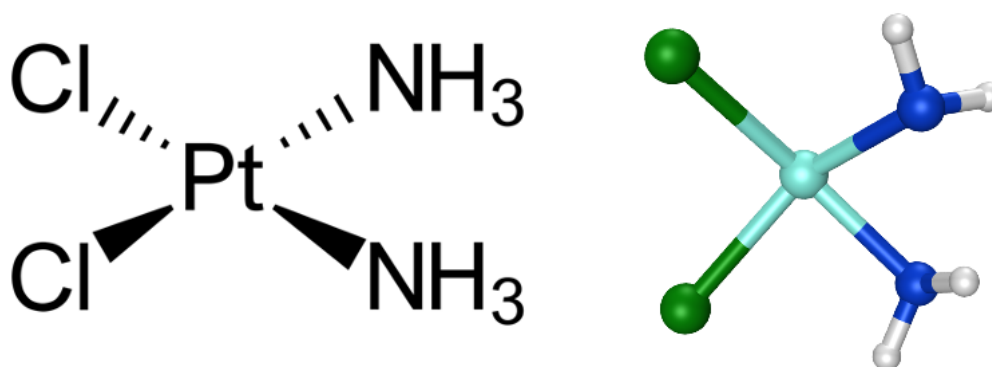


Abbildung 2: Struktur von Cisplatin ([SP-4-2]-Komplex) als Keilstrichformel (links) und als 3D Model (rechts).

## 2.2.2 Struktur und Entwicklung

In der zytostatischen Verbindung *cis*-Diammindichloridoplatin(II) bindet Platin einen stabilen anorganischen, quadratisch planaren low spin  $d^8$ -Komplex. Dieser Diammin-Komplex des Platindichlorids besitzt in *cis*-Position zwei Ammoniakliganden (Abb. 2). Das Molekül ist ungeladen, was auf den Ladungsausgleich der beiden negativ geladenen Chloridionen mit dem zweifach positiv geladenen Platinatom zurückzuführen ist. Die Chloridionen sind dabei weniger stark an das Platin gebunden und fungieren als Abgangsgruppe. Der Aggregatzustand von Cisplatin ist bei Raumtemperatur fest, es ist ein kristallines gelbliches Pulver, welches sich schwer in Wasser lösen lässt [44].

Nach jahrelanger Anwendung von Cisplatin als Goldstandard in der Chemotherapie von Eierstockkrebs steht nun die Kombination von Carboplatin und Paclitaxel für die klinische Anwendung im Vordergrund, welches eine vergleichbare Wirkung wie Cisplatin besitzt, sich

allerdings durch ein verbessertes Nebenwirkungsprofil auszeichnet [24,45]. Diese Kombination ermöglicht eine geringere Nephrotoxizität, Otoxizität, periphere Neurotoxizität sowie emetogene Aktivität. Ein großer Nachteil des Carboplatins stellt allerdings die Myelosuppression dar, welche dazu führt, dass die Blutzellen- und Thrombozytenproduktion des Knochenmarks im Körper drastisch abnimmt. Dieser Wert kann auf bis zu 10 % der üblichen Produktionsmenge fallen [46]. Cisplatin verfügt über einen schnelleren Wirkungseintritt als Carboplatin. Begründet wird dieser Effekt durch die höhere Stabilität der spiroförmigen Dicarboxylat-Ringstruktur des Carboplatins im Vergleich zum Dichlorid des Cisplatins. Damit verbunden ist die Hydrolysierbarkeit bei dem zuletzt genannten Molekül und somit ist die Voraussetzung der Bildung eines aktiven Aquakomplexes vereinfacht. Das Wirkungsmaximum von Cisplatin tritt bereits nach 6-12 h auf, während bei Carboplatin das Maximum erst nach 12-18 h erreicht wird [44,47,48]. Der klinische Standard der Carboplatin Dosierung liegt im Durchschnitt bei einem Verhältnis von 4:1 im Vergleich zum Cisplatin. Das bedeutet, dass für eine Dosis, die normalerweise eine bestimmte Dosis Cisplatin erfordert, viermal mehr Carboplatin notwendig ist, um die gleiche Wirksamkeit zu gewährleisten. Die stabile Eigenschaft des Carboplatins hat auch eine weitere Kehrseite, denn die Halbwertszeit ist im Vergleich zum Cisplatin länger. Diese Trägheit führt dazu, dass bis zu 90 % des verabreichten Carboplatins im Urin zurück gewonnen werden kann [49]. Da demnach mit Carboplatin höhere Konzentrationen und eine längere Inkubationszeit für den gleichen Effekt erforderlich sind und die Bildung von DNA-Addukten langsamer verläuft als mit Cisplatin, wird Cisplatin bevorzugt in in-vitro Studien eingesetzt.

### **2.2.3 Pharmakokinetik und Bioaktivierung**

Cisplatin wird intravenös als Kurzinfusion mit einer sterilen Kochsalzlösung als Trägerlösung verabreicht [26]. Als neutrales Prodrug wird es im Blutplasma und in der extrazellulären Flüssigkeit durch die dort vorhandene hohe Chloridionenkonzentration (ca. 100 mM) stabilisiert [50,51]. Über den Blutkreislauf verteilt sich das unveränderte Zytostatikum im Körper, wobei die Distribution des Chemotherapeutikums erhöhte Konzentrationen in Organen wie Niere, Leber, Keimdrüsen, Milz, Prostata, Harnblase, Bauchspeicheldrüse und Nebennierenrinde aufweist. Bisherige Daten zeigen, dass ca. 65-95 % des Zytostatikums während der ersten 24 h nach Injektion an Serumproteine, wie Albumin binden können. Dieser Effekt führt indes dazu, dass ein nicht unerheblicher Teil des Cisplatins deaktiviert wird [52,53].



Als ungeladenes Molekül kann die Platinverbindung durch passive Diffusion die Zellmembranen überwinden und in das Zytosol gelangen [50,51,54]. Die zelluläre Resorption des Platinkomplexes wird von unterschiedlichen Faktoren wie dem pH-Wert, der Natrium- und Kaliumkonzentration und der Präsenz von reduzierenden Stoffen beeinflusst. Aber auch Influxtransporter wie der Kupfertransporter CTR1 sind in der Lage Cisplatin in die Zelle zu schleusen [55]. Dieses Transmembranprotein besitzt eine extrazelluläre Domäne, die reich an Methionin- und Histidinresten ist. Tumorzellen mit einer gesteigerten Expression von CTR1 weisen eine erhöhte Cisplatin-Akkumulation und damit verbunden eine verstärkte Sensitivität gegenüber dem Zytostatikum auf [28]. Im Zytoplasma der Zelle entfaltet der Platinkomplex seine zytostatische Aktivität. Aufgrund der geringen intrazellulären Chloridkonzentration (ca. 4-20 mM) kommt es zu einer spontanen Substitution der Chloridliganden (Abb. 3) mit einem oder zwei Wassermolekülen. Resultat dieser zweistufigen Hydrolyse sind elektrophile Aquakomplexe, entweder einfach positiv geladene Chlorido-Aqua-Komplexe oder zweifach positiv geladene Diaqua-Komplexe [44]. Es ist nachgewiesen, dass die Monoaqua-Komplexe reaktiver sind als die Diaqua-Komplexe [56]. Die hochreaktiven Aquakomplexe interagieren mit einigen zytoplasmatischen Substraten, insbesondere mit Nukleophilen wie reduziertem Glutathion (GSH), Methionin, Metallothioneinen und Proteinen mit einem hohen Anteil an Cystein [57].

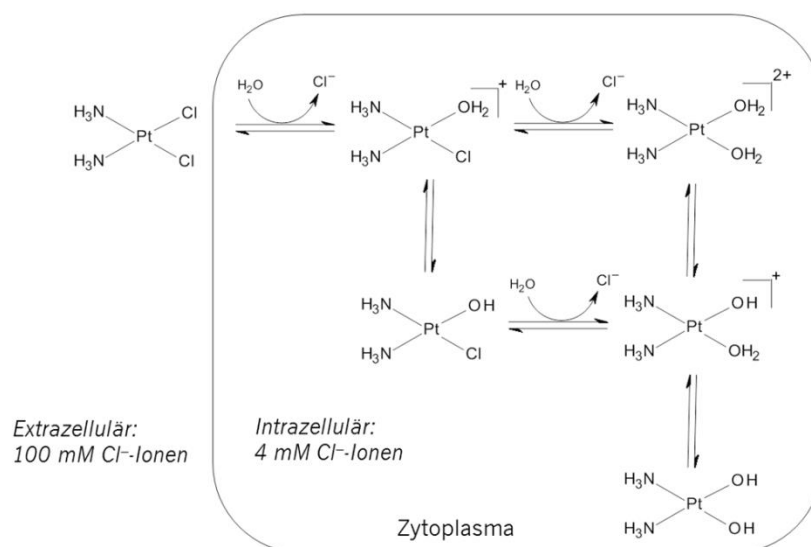


Abbildung 3: Bioaktivierung von Cisplatin; modifiziert nach YOTSUYANAGI et al.[58].

## 2.2.4 Wirkmechanismus von Cisplatin

Die mono- oder dihydratisierten Platinkomplexe stellen die bioaktiven Wirkformen des Cisplatin dar und sind hochreaktive Moleküle, die bevorzugt nukleophile Strukturen in der Zelle angreifen. Die Reaktion dieser Komplexe verläuft über einen bimolekularen Verdrängungsmechanismus, dem sogenannten  $SN^2$ - Mechanismus, unter Konfigurationserhalt ab. Cisplatin interferiert auf diese Weise mit der DNA-Replikation, diese Hauptwirkung wird durch eine kovalente Bindung von Cisplatin mit den DNA-Basen vermittelt [59].

Durch die Bindung von Cisplatin an die DNA kommt es zu DNA-Quervernetzungen (sog. *crosslinks*). Die potenziellen Bindungsstellen an den Basen der DNA sind in Abb. 4 dargestellt. Durch die *cis*-Anordnung der beiden Chloridliganden finden Intrastrang-Quervernetzungen (*intrastrand adducts*) mit Verknüpfung zweier Nukleobasen eines DNA-Strangs am häufigsten statt. Weiterhin werden durch den Platinkomplex auch Quervernetzungen zwischen zwei unterschiedlichen DNA-Strängen (*interstrand adducts*) verursacht. Zu einem verhältnismäßig kleinen Anteil können Monoaddukte entstehen, bei denen nur eine reaktive Gruppe mit der DNA verbunden wird, beispielsweise Vernetzungen der DNA mit Proteinen [59].

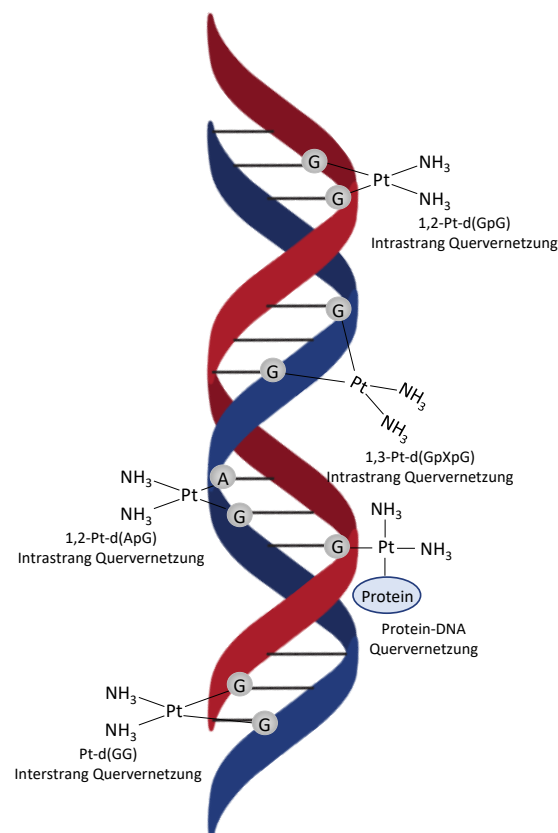


Abbildung 4: Übersicht der möglichen Platin-DNA-Addukte; modifiziert nach Esteban-Fernández et al. [59].

Obwohl der Angriff an allen DNA-Basen erfolgen kann, greift Cisplatin bevorzugt an die N7-Position der Purinbasen Guanin und Adenin an. Dies ist bedingt durch die hohe Nukleophilie des Imidazolrings. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine starke Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Wasserstoff des Amins am Platin und der Oxogruppe an der N6-Position des Guanins eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Platin-Guanin-Addukts im Vergleich zum Platin-Adenin-Addukt spielt [60]. Für den zytotoxischen Effekt von Cisplatin werden insbesondere die 1,2-GG-intrastrand *crosslinks* verantwortlich gemacht [45,60–62]. Ein Grund für diese Sequenzspezifität könnte die benachbarte Lage der Guanidine liefern, die ein relativ großes negatives elektrostatisches Potential aufweisen und auf die positiv geladenen Cisplatin-Aquakomplexe eine stärkere Anziehungskraft ausüben [63]. Schätzungsweise machen die Intrastrang-Quervernetzungen 90-95 % der Gesamtheit aus, wobei 60-65 % auf 1,2-d(GpG) und 20-25 % auf 1,2-d(ApG) zurückzuführen sind [45]. Die dabei entstehenden Platin-DNA-Addukte führen zu einer Deformation der DNA-Doppelhelix und infolge dessen zu einer Destabilisierung der DNA [64]. Die Verbiegung der DNA zur Furche hin liegt bei den Intrastrang-Quervernetzungen bei ca. 32-35 °, während die Abweichung für 1,2-d(ApG) und 1,2-d(GpG) Quervernetzungen 13 ° beträgt und die für 1,2-d(GpXpG) Quervernetzungen bei 23 ° liegt [65]. *Crosslinks* zwischen beiden DNA Strängen verursachen eine statische Änderung im Baukonstrukt, indem eine Biegung von 20-40 ° der Helixachse in Richtung der großen Furche und ca. 80 ° Abwicklung provoziert wird [61,66]. Es wird darüber debattiert, welche der Cisplatin-Addukte für die Einleitung der Apoptose am wichtigsten ist. Die Mehrheit geht davon aus, dass 1,2-Intrastrang Addukte eine höhere Zytotoxizität induzieren als 1,3-Intrastrang Addukte [28,64,67]. Zusätzlich wird berichtet, dass DNA-Reparatur-Enzyme 1,3-Intrastrang Addukte wirksamer von der DNA entfernen können als 1,2 Intrastrang Addukte [50]. Unter anderem können einige Proteine der Hochmobilitätsgruppe (HMG1) diese 1,2-Intrastrang Platin-DNA-Quervernetzungen spezifisch erkennen [67].

Das Ergebnis der veränderten DNA-Struktur führt direkt durch Hemmung von Replikation und Transkription und indirekt durch das Auslösen komplizierter intrazellulärer Signalkaskaden zum programmierten Zelltod. Es kommt zunächst zu einem Zellzyklusarrest, wodurch ausreichend Zeit für Reparaturmechanismen zur Verfügung steht, um die Läsionen zu entfernen. Die Schäden, die durch Cisplatin entstehen, sind in der Regel so schwerwiegend, dass eine Reparatur nicht möglich ist und somit die Induktion pro-apoptotischer Signale folgt [68].

### 2.2.5 Identifizierung und Auswirkungen der DNA-Addukte

Nach Platin-Bindung an die DNA-Helix ist das zentrale nachgeschaltete Ereignis die Apoptose. Jeder Fehler, der die superhelikale Struktur der DNA stört, birgt das Potential in sich, die genetische Stabilität und damit die Genomintegrität einer Zelle zu beeinträchtigen. Somit sind die meisten der wichtigsten DNA-Reparatursysteme an der Beseitigung Cisplatin induzierter DNA Schäden beteiligt [68]. Mehrere Proteine wie die HMG-Proteine (*High Mobility Group-Box Proteine*) können diese Addukt Strukturen leicht erkennen. Insbesondere das HMG1-Protein, welches selektiv an das 1,2-Cisplatin-DNA-Addukt bindet, ist in der Lage, diese Gebilde vor einer Reparatur abzuschirmen und zu schützen [69,70]. Die mit der DNA-Reparatur assoziierten Proteine sind vor allem NER (*Nucleotide Excision repair*) und MMR (*Mismatch Repair System*). Das NER-System besteht aus 17 verschiedenen Proteinen, die Platin-Intrastrang-Quervernetzungen registrieren und im Anschluss die lädierte DNA-Sequenzen von bis zu 20-29 Basenpaaren ausschneiden. Zurück bleibt die unbeschädigte einzelsträngige DNA, diese wird von der DNA-Polymerase als Vorlage verwendet, um die kurze komplementäre Sequenz zu synthetisieren. Zum Schluss erfolgt die Ligation durch die DNA-Ligase [71,72]. Auf ähnliche Weise zielt das MMR-System ebenfalls auf eine fehlerhafte Watson und Crick Struktur ab. Dieses Protein repariert strangspezifisch den Schaden, indem es die verursachte Deformation erkennt und den vorliegenden Strang mit seiner Vorlage abgleicht. Die falsch inkorporierte Base wird im weiteren Verlauf herausgeschnitten und durch das richtige Nukleotid ersetzt. Der Reparaturprozess umfasst mehr als nur das fehlangepasste Nukleotid selbst. Einige wenige oder bis zu Hunderte Basenpaare des neu synthetisierten DNA-Strangs können entfernt werden [51,73]. Wenn es diesen beiden Systemen nicht gelingt die Schäden zu beseitigen, werden pro-apoptotische Signale eingeleitet.

Der Zelltod kann auch über den Cisplatin verursachten Zellzyklusarrest (G1-, S- und G2-Phase) vermittelt werden [74]. Diese Arretierung verschafft genügend Zeit für Reparaturen beschädigter DNA-Sequenzen vor Synthesebeginn. Das Zytostatikum aktiviert die Kontrollpunktinasen Chk1 und Chk2, die für den Stillstand der G- und S-Phase verantwortlich sind [75]. Bleibt die Stagnation aus, kann diese zum Tod der Krebszelle führen, indem diese gezwungen wird, angesichts der irreparablen DNA Läsionen vorzeitig die Zellapoptose einzuleiten [76]. Das kurzlebige Tumorsuppressorprotein p53 spielt ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Cisplatin bedingten Apoptose. Das Protein wird durch zwei verschiedene Kinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated protein*) und ATR (*ATM and RAD3-related protein*) stimuliert. Sie werden auch als „Sensoren“-Proteine bezeichnet und gehören zur Familie der

PIKKs (*phosphatidylinositol-3-kinase-like kinase*) [77,78]. Während die ATM-Kinase in erster Linie durch doppelsträngige DNA-Brüche getriggert wird und eine Reihe von Substraten phosphoryliert, ist die ATR Kinase für das Überleben proliferierender Zellen unerlässlich, da sie das Fortschreiten der Replikationsgabel überwacht und auf ein breites Spektrum von DNA Schäden - unter anderem auch Einzelstrangbrüche - reagiert [79]. Zunächst aktiviert Cisplatin die ATR-Kinase, die im Anschluss p53 durch Phosphorylierung an Serin-15 stimuliert [80,81]. Dadurch werden die Gene p21, Mdm2 und GADD45 aktiviert, diese sind für den Zellzyklusarrest verantwortlich und können über den DNA-Reparatursignalweg zur Apoptose führen [51]. Das Protein p53 kann allerdings auch durch verschiedene Mechanismen die Apoptose direkt einleiten z.B. durch den Abbau von FLIP (*fllice-like inhibitory protein*), die direkte Bindung und durch Entgegenwirken der antiapoptotischen Funktion von Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra-large*) und über Expression von PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) [44,82]. Ebenfalls aktiviert p53 PUMA, PIDD und die MAPK-Signalkaskaden, die ebenfalls für die Apoptose verantwortlich sind [44,83,84]. Außerdem kann es über den mitochondrialen Weg Bax, welches im Zytosol vorhanden ist, aktivieren [85]. Darüber hinaus wird auch berichtet, dass p53 Fas/FasL aktiviert, die wiederum über Caspase 8 und Caspase 3 ebenfalls zur Apoptose führen [86].

Das koordinierte Zusammenspiel dieser verschiedenen Wege leiten aber auch entsprechende Gegenreaktionen ein. In der Chemotherapie übersteigt allerdings die Zahl der Schäden durch Cisplatin die Reparaturkapazität der Zelle. Neben der Inhibition der DNA-Synthese und der Transkription kommt es daher im weiteren Verlauf bei sich teilenden Zellen zu einer Zellzykluspause bzw. zur Apoptose. Diese Prozesse spielen eine entscheidende Rolle für die zytotoxische Wirkung von Cisplatin, aber auch für die Resistenzentwicklung [68]. Der verstärkte DNA Reparaturprozess gilt als das wichtigste Merkmal bei Cisplatin resistenten Zellen, mit Ausnahme der MMR, deren Mangel zu einer Resistenz führt [87,88]. Selbst wenn jeder DNA Reparaturweg durch spezifische Schäden aktiviert wird, besteht eine gewisse Redundanz zwischen den verschiedenen Pfaden. Das Fehlen eines bestimmten Proteins kann mit der Hochregulierung eines anderen in Verbindung gebracht werden. Aber selbst wenn die Zellen mit einem spezifischen DNA Reparaturdefekt versuchen, die DNA-Läsionen mit den verbliebenden Mechanismen zu reparieren, werden nichts desto trotz die meisten dieser Zellen extrem empfindlich auf Agenzien reagieren, die DNA Modifikationen verursachen [89].

### 2.2.6 Weitere Targets für Cisplatin

Das Haupttarget von Cisplatin stellt die DNA dar, aber tatsächlich bindet nur ein sehr kleiner Teil ca. 1 % der intrazellulären Cisplatinkonzentration an nukleäre DNA [90]. Darüber hinaus stehen weitere zelluläre Strukturen in Diskussion, die in die zytotoxische Wirkung mit involviert sind [91]. Wie bereits erwähnt, ist Cisplatin ein elektrophiles Molekül, das sich durch seine Fähigkeit auszeichnet, kovalente Bindungen mit nukleophilen Resten zu binden. Da eine Vielzahl zellulärer Moleküle diese Strukturen aufweisen, sind Platinkomplexe imstande, mit verschiedenen zellulären Komponenten zu interagieren.

Der Platinkomplex zerstört unter anderem Lysosomen, was die Freisetzung lysosomaler Proteasen induziert, baut das endoplasmatische Retikulum ab, was zur Deregulierung der Calciumspeicherung führt und greift die Mitochondrien an, wodurch die Produktion von ROS ausgelöst wird [92]. Durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung entweicht das Calcium aus den Mitochondrien und es erfolgt eine Erhöhung des intrazellulären Calciums [93]. Die Folge ist eine gestörte Calciumhomöostase und Beeinträchtigung der Zellfunktion. Glutathion ist für die Permeabilität der Mitochondrienmembran substantiell. Die intrazelluläre Redox-Homöostase wird durch die Thiolgruppen enthaltenen Moleküle aufrechterhalten. Unter bestimmten Umständen kann eine SH-Gruppe zur Bindung von Thiylradikalen führen, die ihrerseits mit Sauerstoff interagieren können und so reaktive Sauerstoffspezies erzeugen [94]. Cisplatin induzierte Toxizität, speziell die Nephrotoxizität steht mit der verringerten Menge der intrazellulären Glutathion Konzentration in Verbindung. Des Weiteren wird das Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, welches für die Stabilität der SH-Gruppe verantwortlich ist, durch den Platinkomplex gehemmt. Dadurch kommt es zu einer Hemmung der Dehydrogenase, was wiederum zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und zum oxidativen Stress führt. Dieser Prozess ist autolytisch und verursacht signifikante Veränderungen an der Mitochondrienmembran [95].

Neben der DNA in den Mitochondrien greift Cisplatin auch andere Organellen an, in dem es Addukte mit funktionellen Gruppen an Proteinen bindet, bevorzugt mit dem Schwefelatom in Cystein und Methionin. Weitere Zielstrukturen bilden Ribosomen, Spleißosomen und die RNA Telomerase [96,97]. Galluzi et al. schlugen neben den genannten Strukturen als weiteres potenzielle Targets die Zellmembran vor [98].

Das membrangebundene  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austauscherprotein (NHE) ist eines dieser nicht-DNA-Targets von Cisplatin. Der Natrium-Protonen Austauscher ist ein an der Zellmembran

lokalisiertes Transportsystem, das für die Regulierung des intrazellulären pH-Wertes und des osmotischen Drucks verantwortlich ist. Wenn das Zytostatikum an dieses Protein bindet, verursacht es intrazelluläre Azidose, erhöht die Fluidität der Membran durch Förderung von Lipidrafts und die Induktion der Apoptose über den Fas Signalweg [99].

Zinkfingerproteine, die die DNA binden und die Genexpression regulieren, sind ebenfalls Targets des Cisplatins. So greift Cisplatin beispielsweise die DNA-Bindungsdomäne des Enzyms DNA-Polymerase- $\alpha$  an. Vier Thiolat-Gruppen aus Cysteinresten koordinieren das Zinkatom im Zinkfingerprotein. Der Platinkomplex reagiert schrittweise mit dem  $Zn^{2+}$ -Ion, um es zu ersetzen und verändert so die Struktur der DNA-Polymerase- $\alpha$ . Dies könnte ein Teil des Mechanismus erklären, durch den der Wirkstoff die DNA-Replikation blockiert und die Apoptose aktiviert [100].

Die Thioredoxin-Reduktase (TrxR) besitzt Selenocysteinreste am C-Terminus, die damit ein geeignetes Ziel für Platinkomplexe darstellen. Das Enzym wird irreversibel gehemmt. Da ein großer Teil des Cisplatins in der Zelle durch GSH zu GS-Platin inaktiviert wird, fanden Forscher heraus, dass GS-Platin auch TrxR inaktivieren kann. Die Zellen produzieren in Gegenwart von Cisplatin einen erhöhten Anteil an Stressreaktionen und DNA-bindenden Proteinen [101].

Des Weiteren ist die RNA ein Molekül, das als potenzieller Kandidat für die Cisplatinbindung weitgehend unbeachtet blieb. Studien haben gezeigt, dass im Vergleich zur DNA 4- bis 20-mal mehr Platin an RNA bindet [102].

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Cisplatin weit mehr Wirkungen auf Tumorzellen zeigen kann als nur durch seine Interaktionen mit der DNA. Dabei kann es nicht nur proapoptische Signale induzieren, sondern auch eine adaptive Antwort einschließlich Autophagie und Proteinkaskaden auslösen, während es Organellen und Proteine im Zytoplasma stört [103–105].

### 2.2.7 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Die klinische Verwendung von Cisplatin wird jedoch von zahlreichen, teilweise schwerwiegenden und damit dosislimitierenden Nebenwirkungen begleitet. Zurückzuführen sind diese Effekte auf die geringe Selektivität zwischen Krebszelle und gesunder Zelle des Zytostatikums. Zu den charakteristischsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen zählen die Nephro-, Oto-, Neuro-, Hepatotoxizität sowie gastrointestinale Störungen.

Auch wenn die meisten Zytostatika unspezifisch die Zellteilung hemmen und somit auch das Wachstum sich schnell teilender Zellen, wie der Schleimhautzellen im Magen- und Darmbereich blockieren, so ist doch das emetogene Potential des Cisplatins besonders stark ausgeprägt. Aufgrund dessen erhalten die Patienten bereits supportiv unter einer Cisplatintherapie Antiemetika wie Ondansetron oder Granisetron, meist in Kombination mit Kortikosteroiden. Für gewöhnlich wird die Kombination von Aprepitant, Ondansetron und Dexamethason bei starker Nausea und Emesis bevorzugt verabreicht [26].

Die Niere akkumuliert Cisplatin in größeren Mengen als andere Organe und ist für die Ausscheidung der Platinverbindung verantwortlich. Diese unverhältnismäßig hohe Anreicherung im Nierengewebe trägt zur Cisplatin bedingten Nephrotoxizität bei, wobei der zugrundeliegende Mechanismus bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Mit Hilfe einer ausreichenden Hydratation durch physiologische Kochsalzlösung und Glucose kann die Nephro- und Ototoxizität vermindert werden. Zusätzlich kann eine Vorbehandlung durch den Wirkstoff Amifostin erfolgen. Dabei handelt es sich um ein Prodrug, welches durch alkalische Phosphatasen in gesunden Zellen zum aktiven Thiol-Metaboliten dephosphoryliert wird und in dieser Form das gesunde Gewebe vor dem Platinkomplex schützen kann. Jedoch bringt auch das Amifostin Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Blutdruckabfall mit sich [26,47,106].

Neben der Niere stellt auch die Leber ein entscheidendes Detoxifizierungs- und Ausscheidungsorgan dar, weshalb es auch zu einer Anreicherung des Zytostatikums in der Leber kommt. Hepatotoxizität wird vorwiegend durch oxidativen Stress induziert, die möglicherweise auf die Absenz von reduziertem Glutathion GSH zurückzuführen ist [107]. Zudem berichten einige Studien über eine bedeutungsvolle Steigerung des hepatischen Malondialdehyds (MDA) und eine Verringerung der Konzentration an antioxidativen Enzymen [108]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Hepatotoxizität durch eine verstärkte Expression des Enzyms Cytochrom P450-2E1 stimuliert wird [109]. Die Verwendung hoher



Dosen von Selen und Vitamin E kann den Effekt der Lebertoxizität verringern [110].

Eine weitere Problematik stellt die Neurotoxizität dar. Während der Behandlung mit Cisplatin treten bei den Patienten auch Seh- und Hörstörungen auf [111]. Neuere Studien konnten zeigen, dass Cisplatin in der Lage ist das in Kapitel 2.2.6 genannte membrangebundene NHE nicht-kompetitiv zu hemmen. Dieses Protein kommt unter anderem auf der Zelloberfläche des peripheren Nervensystems vor, die besonders häufig in der Nähe der okulären und auralen Reizeempfangszentren aggregiert vorliegen [112].

Die Therapiemöglichkeiten sind somit aufgrund der eben genannten unerwünschten Arzneimittelwirkungen deutlich limitiert. Ein weitaus größeres Hindernis bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms stellt allerdings die Resistenzentwicklungen dar, die aufgrund dessen nachfolgend ausführlicher besprochen wird. Darauf basierend erhalten die essentiellen Platinverbindungen viel Aufmerksamkeit im Bereich der Forschung und Weiterentwicklung, um mehr Kenntnisse über die noch bis heute unvollständige Aufklärung der Resistenzmechanismen zu gewinnen.

## **2.3 Cisplatinresistenz**

Der Therapieerfolg von antineoplastisch wirksamen Substanzen wird durch Auftreten von Wirkstoffresistenzen stark eingeschränkt. Die Problematik bei der Behandlung mit Zytostatika besteht darin, dass bei vielen Patienten der Tumor bereits nach kurzer Therapiedauer nicht mehr bzw. unzureichend auf die Behandlung anspricht. Die geringe Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber dem Chemotherapeutikum stellt eine große Herausforderung im Therapieverlauf dar, zumal die Dosierung aufgrund des ausgeprägten Nebenwirkungsprofils stark limitiert ist.

Grundsätzlich wird unter Chemoresistenz die verminderte Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber einem Zytostatikum im Vergleich zu einer normalen Zelle verstanden. Unterschieden werden zwei Formen der Chemoresistenz. Spricht der maligne Tumor schon zu Beginn nicht auf die zytostatische Therapie an, bezeichnet man dies als intrinsische oder primäre Resistenz. Diese Art von Resistenz entwickelt sich nicht während der Behandlungszyklen, sondern besteht bereits a priori. Die Ursache ist nicht mehr ersichtlich, da sie überwiegend genetisch bedingt ausgelöst wird, z.B. durch Mutationen. Die zweite Gruppe charakterisiert Krebszellen, die wiederum zunächst auf das Medikament ansprechen und erst im Laufe der Chemotherapie eine Gegenabwehr entwickeln. Diese Form wird als erworbene oder sekundäre Resistenz bezeichnet [113]. Demzufolge kann der aus einer Behandlung

resultierende Selektionsdruck dazu beitragen, dass wirksame Chemotherapeutika, wie z.B. Platinkomplexe, durch das Auftreten von Resistenzen in ihrer Wirksamkeit reduziert werden können. Dieses Tumorgewebe lässt sich oftmals auch nicht durch alternative Behandlungsarten, z.B. noch nicht angewendete Zytostatika behandeln.

Chemoresistenzen sind komplexe Vorgänge, die in Folge intrazellulärer Veränderungen entstehen. Sie verhindern entweder, dass es zu einer Interaktion von Cisplatin mit dem Target kommt (*pre-target*) oder betreffen direkt die DNA-Addukte (*on-target*) z.B. in Form von Reparaturmechanismen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Modifizierung von Signalwegen, die durch Cisplatin Läsionen initiiert werden (*post-target*). Außerdem können auch weitere molekulare Strukturen betroffen sein, die andere physiologische Vorgänge adressieren und somit nicht direkt mit einer Cisplatin bedingten Änderung in Verbindung stehen (*off-target*) [8].

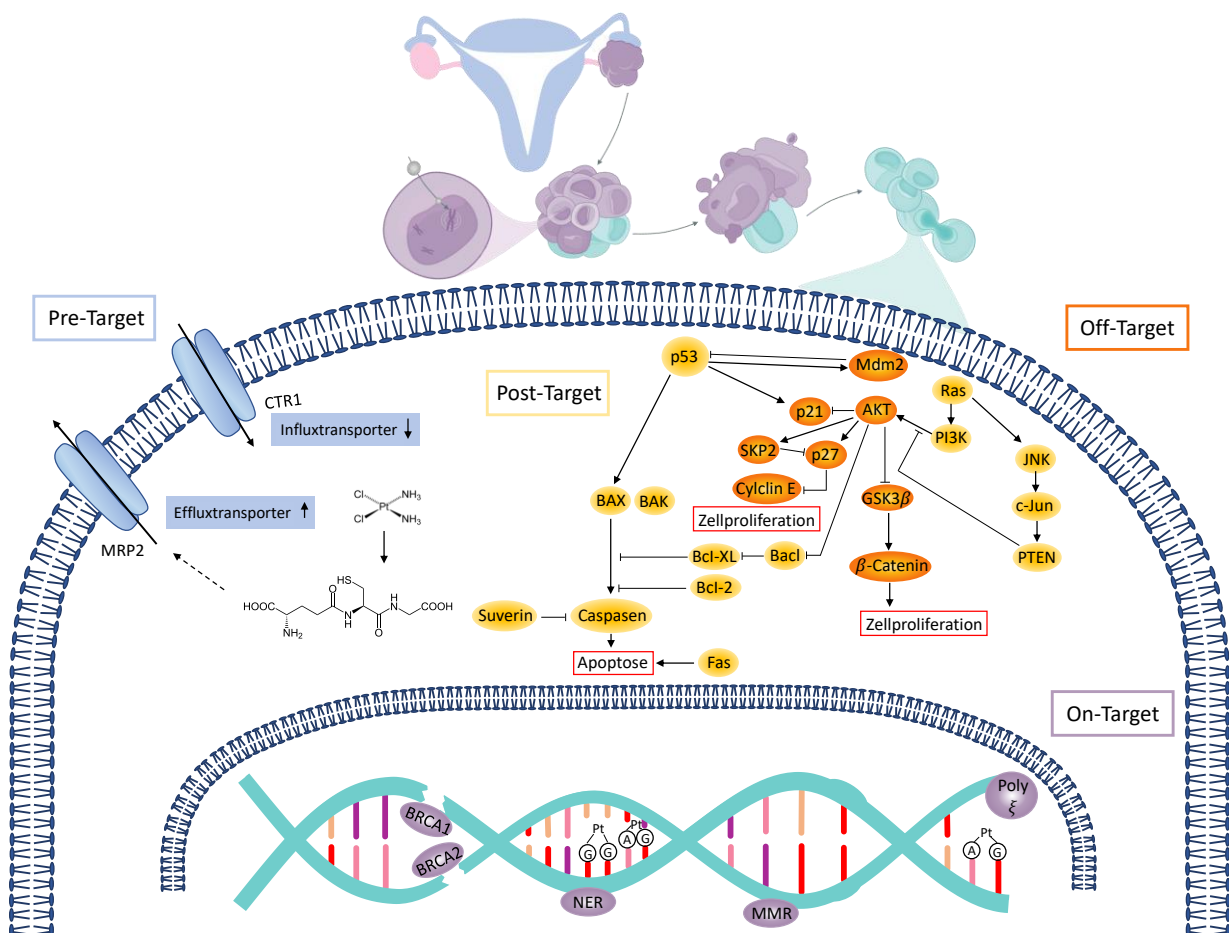


Abbildung 5: Übersicht der Cisplatinresistenzen unterteilt in *pre-target*, *on-target*, *post-target* und *off-target*.

### 2.3.1 *Pre-target* Resistenzen

*Pre-target* Resistenzen stehen im direkten Zusammenhang mit einer verminderten Platinkonzentration im Zytoplasma der Zelle. Sie können ihrerseits noch einmal in drei Kategorien unterteilt werden. Als erstes wäre die Downregulierung der Aufnahme des Wirkstoffes in die Zelle zu nennen, gefolgt von einer erhöhten Inaktivierung über Konjugation mit nukleophilen Molekülen sowie weiterhin die verstärkte Expression von Efflux-Transportern.

#### 2.3.1.1 Influx Regulationen

Hauptsächlich gelangt das Cisplatin über passive Diffusion in die Zelle. Der Einfluss von aktiven Transportern erlangte in letzter Zeit immer mehr Aufmerksamkeit. Wie in Kapitel 2.2.3 bereits erwähnt, scheint der CTR1 Transporter für den Influx von Cisplatin eine wichtige Rolle einzunehmen. Normalerweise ist dieses Protein am Einstrom von Kupferionen in die Zelle beteiligt, es kann aber auch von Cisplatin verwendet werden. Tumorzellen mit einer gesteigerten Expression von CTR1 weisen eine erhöhte Cisplatinakkumulation und damit verbunden eine verstärkte Sensitivität gegenüber dem Zytostatikum auf. Durch einen *knock-down* des CTR1-Gens konnte in Hefezellen eine verringerte intrazelluläre Anreicherung von Cisplatin und eine damit einhergehende Resistenz nachgewiesen werden [55,114]. Weiterhin ist bekannt, dass hCTR1 durch intrazelluläre Kupfer- oder Cisplatinkonzentrationen herunterreguliert wird [115]. Über Makropinozytose und einen proteasomalen Abbau kommt es zu einem Verlust von hCTR1 in Eierstockkrebszellen [116]. Darüber hinaus belegen Studien, dass der Kupferchelator Ammoniumtetrathiomolybdat die Aufnahme von Cisplatin in Krebszellen entscheidend steigern kann, was mit einer Verstärkung der Toxizität einhergeht [117]. Interessanterweise können der Proteasom-Inhibitor Bortezomib sowie der Naturstoff  $\beta$ -Elemene den Abbau von CTR1 inhibieren [118,119]. Allerdings ist es bisweilen umstritten, ob die Regulierung der CTR1 Expression überhaupt die Sensitivität der Tumorzelle gegenüber Cisplatin beeinflusst. So wurden beispielsweise in einer weiteren Arbeit CTR1, CTR2, ATOX1 und CCS mit Hilfe von CRISPR-Cas9 Genom-Editing entfernt. Die anschließenden Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass der Verlust dieser Transporter die Cisplatinempfindlichkeit weder bei HEK-293T- noch bei OVCAR8-Zellen des Ovarialkarzinoms beeinflusst [120]. Es hat sich gezeigt, dass der Platinkomplex nach Internalisierung mit dem CTR1-Transporter wechselwirkt und einen Abbau des CTR1 auslöst. Somit wird die intrazelluläre Cisplatinkonzentration herabreguliert, worüber wiederum eine Resistenz entstehen kann [90,114].

CTR2 ist ebenfalls ein Kupfertransporter, der sich durch eine erweiterte N-terminale Domäne und einer verringerten Cisplatinaffinität von CTR1 unterscheidet [121]. Er findet sich bevorzugt in Endosomen und Lysosomen, wobei CTR2 auch auf der Plasmamembran lokalisiert werden konnte [122]. Sowohl mRNA- als auch Proteinexpressionen von hCTR2 deuten auf eine signifikante Korrelation mit der Sensitivität von Cisplatin hin. Die Hemmung von CRT2 erhöht hierbei die zelluläre Akkumulation von Cisplatin, während eine Überexpression des gleichen Transporters zu einer Verringerung der Cisplatinempfindlichkeit führt. Hierbei wird die Akkumulation des Platinkomplexes durch einen Effekt auf die Makropinozytose von CTR2 reguliert und nicht wie bei CTR1 durch eine Veränderung des Effluxes [123–125]. Hinzukommend kann CTR2 mit CTR1 über die Stimulierung der CTR1-Ektodomänenspaltung interagieren, was wiederum zu einer geringeren Cisplatinkonzentration in der Zelle führt [126].

### 2.3.1.2 Efflux Regulationen

Des Weiteren kann die intrazelluläre Cisplatinkonzentration auch über einen verstärkten Efflux reduziert werden. Zwei bekannte Efflux-Transporter sind die - ebenfalls an der Kupferhomöostase beteiligten - ATP7A und ATP7B P-Typ ATPasen [127]. Sobald der Platinkomplex im Zytoplasma der Zelle angekommen ist, kann er an die CXXC-Einheit von ATP7A/B binden, der dabei entstehende Komplex gelangt in ein Vesikel durch eine ATP abhängige Verknüpfung mit dem Kupfer des Chaperons ATOX1 [128,129]. Unter normalen Bedingungen befinden sich die beiden Transporter im trans-Golgi Apparat, in cisplatinresistenten Zellen hingegen sind die Vesikel eher in peripheren Bereichen des Zytosols lokalisiert. Diese Lokalisationsänderung kann durch ein reduziertes lysosomales Kompartiment hervorgerufen werden und trägt zur Platinsekretion bei [130,131]. Sobald ATP7A verstärkt exprimiert wird kann beobachtet werden, dass die zelluläre Cisplatinintensität kleiner ausfällt und ihr *target* nicht erreicht [132]. Auch ATP7B trägt zur Chemoresistenz bei und dient als prognostischer Faktor. Bei Patienten mit einem niedrigen mRNA Expressionsniveau für ATP7B konnte eine Verbesserung im Therapieverlauf beobachtet werden [133]. Der Kupferchelator Ammoniumtetrathiomolybdat kann auch hier - wie bei den CTR1 Transportern - die Empfindlichkeit gegenüber dem Zytostatikum wiederherstellen, indem es die Dimerisierung der metallbindenden Domäne von ATP7B einleitet [134].

Ein weiterer sehr wichtiger und bekannter Efflux-Transporter für Cisplatin ist das *multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2 oder ABCC2), welches ein Mitglied der Superfamilie der ABC-Transporter und somit ebenfalls ATP-abhängig ist. MRP2 ist eine einseitig gerichtete

Effluxpumpe für anionische amphiphile Verbindungen [135,136]. Diese Transporter fördern den Ausstrom von endogenen Molekülen, physiologischen Substanzen und Medikamenten [137]. Dabei ist insbesondere MRP2 als hoch spezifischer Effluxtransporter des Cisplatin-GSH-Konjugats bekannt [138,139]. Eine hohe Dichte von MRP2 ist mit einer intrinsischen Cisplatinresistenz bei Ovarialkarzinomen assoziiert [140–142].

### 2.3.1.3 Entgiftungs Regulationen

In die letzte Gruppe der *pre-target* Resistenzen sind die Entgiftungsmechanismen einzuordnen, die dazu beitragen, dass Cisplatin abgefangen wird, bevor es die DNA erreichen kann. Dies geschieht in Form einer Konjugation mit nukleophilen Molekülen im Zytoplasma der Tumorzelle, wie dem Glutathion (GSH) und Metallothioninen.

Eine besonders hohe Relevanz wird dem GSH zuteil, da die aktive SH-Gruppe von GSH eine hohe Affinität zu Platin aufweist, was GSH zu einem leichten, nicht DNA bezogenen Ziel macht [143]. Infolge von Glutathion-S-Konjugaten (GS) und deren Abtransport über die MRP2 Effluxpumpe kommt es zu einer Absenkung der Cisplatinkonzentration innerhalb der Zelle [144–146]. Lewis et al. haben an zwei Zelllinien ovarialer Adenokarzinome, die von einer Patientin sowohl vor als auch nach dem Auftreten von Resistenzen entnommen wurden, bestätigen können, dass eine Steigerung von GSH sowie signifikante Unterschiede in GSH abhängigen Enzymkonzentrationen als potentieller Mechanismus für eine stärkere Chemoresistenz verantwortlich sind [147]. Weitere Studien in Ovarialkarzinomen konnten den Zusammenhang zwischen einer deutlich erhöhten Glutathion Synthese und einer damit verbundenen Cisplatinresistenz belegen [148]. Die Glutathion-S-Transferase katalysiert den GS-Cisplatin-Komplex, sowohl die verstärkte Expression dieses Enzyms, also auch die Konzentration von GSH konnten häufig in resistenten Zellen nachgewiesen werden [149,150].

Ein wichtiger Angriffspunkt, um der Inaktivierung von Cisplatin zu entgehen, kann somit durch Beeinflussung der GSH Synthese erfolgen. Nimmt die Reaktion der GS-Cisplatin Komplexe ab, kann die Chemoresistenz wirksam überwunden werden. Eine Option ist die Nutzung kompetitiver Inhibitoren von GSH [151]. Eine andere Möglichkeit ist die Störung der Synthese von GSH. Die GSH Produktion verläuft über zwei Enzyme,  $\gamma$ -Glutamylcystein-Ligase und GSH-Synthetase. Im ersten Schritt katalysiert  $\gamma$ -Glutamylcystein-Ligase Glutamat und Cystein unter Bildung von  $\gamma$ -Glutamylcystein. Anschließend katalysiert GSH-Synthetase im nächsten Schritt das eben genannte Produkt und Glycin so, dass GSH gebildet werden kann [152]. Bluthioniumsulfoximin hemmt die Aktivität von Glutamylcystein-Ligasen und kann dadurch

die Resistenzen im malignem Gliom verringern [153]. Eine unspezifische GSH Abnahme ist allerdings nicht praktikabel, da es in gesundem Gewebe irreversible Schäden verursachen kann. Cystin wird üblicherweise wegen der chemischen Instabilität von Cystein als Ausgangsstoff für die GSH-Synthese verwendet. Der intrazelluläre Cystein/Cystin-Spiegel wird durch das Xc(-) System aufrechterhalten. Sulfasalazin und Salubrinal können beide stark inhibitorisch in das Xc(-) Systems einschreiten [154,155]. Auch epigenetische Interaktionen sind an der Regulation der GSH-Synthese beteiligt. Beispielsweise reguliert miRNA-27a negativ das Xc(-) [156]. Darüber hinaus ist die lincRNA H19 an der Produktion und Regeneration von GSH beim hochgradigen serösen Ovariakarzinom beteiligt [157]. Auch G9a, ein transkriptioneller Corepressor, der die Histon-3-Lysin-9-Dimethylierung katalysiert, kann die katalytische Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase transkriptionell aktivieren und führt dadurch zu einer Erhöhung des GSH-Spiegels beim Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses [158].

Ein weiterer wichtiger Ansatz findet sich in dem GSH-Redox-Zyklus der ebenfalls Cisplatinresistenzen steuern kann. Durch GSH-Peroxidase wird GSH als Substrat zu GSSG oxidiert, während GSSG durch GSSG-Reduktase unter Einbeziehung von NADPH als Cofaktor wieder zu GSH reduziert werden kann. Diese Reaktion erklärt, weshalb ein hoher Proteingehalt von Glutathion-Reduktase bei gleichzeitig geringer Konzentration von reaktiver ROS zur Platinresistenz beitragen kann [159,160].

Neben dem GSH ist noch das Metallothionein zu nennen, welches über einen außergewöhnlich hohen Anteil an thiolhaltigen Cysteinresten verfügt, die dazu fähig sind über eine Chelatbildung Cisplatin zu binden und zu inaktivieren [161–163]. Tariban et al. konnten zudem nachweisen, dass der Gehalt an Metallothionein nicht nur in den Krebszellen, sondern auch im Serum der Krebspatienten erhöht ist [164].

### **2.3.2 *On-target* Resistenzen**

Nach Bildung der Cisplatin-Addukte können sogenannte *On-target* Resistenzen auftreten, diese lassen sich ebenfalls grob in drei Gruppen strukturieren. Die Erste umfasst leistungsfähigere Reparaturmechanismen, die nächste Gruppe zeichnet sich durch eine ausgeprägte Akzeptanz gegenüber den Addukten aus, und die letzte Gruppe umfasst eine forcierte Stimulation der Addukt Entfernung.

In Kapitel 2.2.5 wurde die Bedeutung der Bildung und Resistenz von DNA-Addukten als ein wesentlicher Induktionsmechanismus für die Apoptose umrissen. Daraus folgt, dass eine verstärkte Reparatur der DNA-Läsionen den apoptotischen Prozess abschwächt. Platin-DNA-Addukte werden in erster Linie über das bereits erwähnte NER System repariert (siehe Kapitel 2.2.5). Eine erhöhte NER Kapazität wird häufig in Verbindung mit Chemoresistenzen gebracht [165–169]. Die am NER-Komplex beteiligten Proteine ERCC1 und XPF werden besonders in Ovarialkarzinomzellen verstärkt exprimiert. Die folglich gestiegene Endonukleaseaktivität korreliert durch vermehrte Entfernung der Addukte mit der Entwicklung einer Chemoresistenz [168].

Eine gesteigerte DNA-Reparatur kann ebenfalls über die homologe Rekombination (HR) durch veränderte BRCA1-, BRCA2- und RAD51-Gene erfolgen. Diese Proteine sind für die Instandsetzung von cisplatininduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen während oder direkt nach der S-Phase verantwortlich. Eine Veränderung in den kodierenden Abschnitten dieser Gene kann zu Chemoresistenzen führen [8,170–176]. Darüber hinaus weisen Tumore mit dieser Mutation eine einzigartige Auffälligkeit auf, denn die Sensitivität scheint durch Inhibitoren des PARP1 (Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1), einem weiteren wichtigen Regulationsparameter der DNA-Reparatur, beeinflusst zu werden [177–180]. Olaparib ist ein solcher PARP-Inhibitor, der zur Hemmung der Replikationsgabeln führt, die üblicherweise durch BRCA behoben werden. Ist BRCA jedoch verändert, verliert es seine Funktion und die Inhibierung führt zur Apoptose [181]. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Platinempfindlichkeit in Ovarialzellen mit der Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren korreliert, da für die Reparatur von Platinaddukten eine homologe Rekombination erforderlich ist [182,183].

RAD51 verläuft wiederum über einen etwas anderen Wirkmechanismus. In diesem Fall wird von einem gesteigerten replikativen *Bypass* gesprochen. Darunter wird ein Prozess verstanden, in dem Basenfehlpaarungen nicht registriert werden. Infolgedessen kann der fehlerhafte DNA-Strang überbrückend repliziert werden [171,176]. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass ein geringes Level an RAD51 letztendlich mit einer gesteigerten Platinresistenz einhergeht [184]. Ein Grund hierfür könnte sein, dass RAD51 Veränderungen mit einer erhöhten Rate der Transläsions-Synthese (TLS) verbunden sind, die eine DNA-Resynthese trotz Addukt-Bildung ermöglicht und deshalb mit Cisplatinresistenzen verbunden werden [171]. Bei diesem Prozess wird die beschädigte DNA von der Polymerase  $\zeta$  (REV3) repliziert. Weitere TLS-Polymerasen, die an einem replikativen *Bypass* involviert sein können, sind POLH ( $\eta$ ) und REV7 ( $\zeta$ ) [8,185,186].

Somit kann auch eine erhöhte Toleranz gegenüber DNA-Schäden zu Resistenzmechanismen führen. Ein weiteres sehr bekanntes Beispiel dafür sind Fehler im MMR System, die insbesondere GpG-Interstrang Addukte erkennen. Diese tragen durch eine Herunterregulierung oder Mutation der MMR-Proteine (MLH1 und MLH2) dazu bei, dass ebenfalls DNA-Läsionen verstärkt übersehen werden [187–189]. Im Fall von MLH1 werden Mutationen in diesem Protein auch mit einem erhöhten TLS assoziiert und können somit über einen replikativen *Bypass* Addukte tolerieren und den Zellzyklus fortsetzen [190,191].

### **2.3.3 *Post-target* Resistenzen**

Bei der *Post-target*-Resistenz sind viele Proteine beteiligt, die durch Cisplatininduktion den komplexen Signalweg der Apoptose auslösen. Zwei Hauptwege des programmierten Zelltodes sind bekannt: Der extrinsische und der intrinsische Signalweg. Für diese Signalvermittlung besonders relevant ist eine Familie von Cysteinproteasen, die sogenannten Caspasen. Der extrinsische Weg wird aktiviert, nachdem Liganden an TNF $\alpha$ -Rezeptoren gebunden haben, und führt über Oligomerisierung und Rekrutierung von Procaspase-8 zur Selbstaktivierung der Initiator Caspase-8. Der intrinsische Signalweg wird durch zellulären Stress, wie beispielsweise Cisplatin initiiert und durch ein Ungleichgewicht zwischen proapoptotischen (Bax, Bak) und antiapoptotischen (Bcl-2, Bcl-XL) Proteinen vermittelt. Bei Aktivierung führt die proapoptotische Signalübertragung zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen äußeren Membran, wodurch im Anschluss Cytochrom C freigesetzt wird. Parallel löst sich Apaf-1 von den Zellmembranen der Mitochondrien und wird von Cytochrom C aktiviert. Gemeinsam bilden diese Proteine schließlich das Apoptosom und setzen eine serielle Caspasenkaskade in Gang. Der Komplex selbst stellt die aktive Form von Caspase-9 dar, welcher wiederum Caspase-3 stimuliert und damit Zielproteine schneidet, um somit die Apoptose zu induzieren. Gegen cisplatinresistente Zellen besitzen generell einen höheren Schwellenwert für die Apoptoseinduktion, was meist auf eine Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen oder auf einen Defekt der mitochondrialen Signalübertragung zurückzuführen ist. Somit können Veränderungen proapoptotischer und antiapoptotischer Signalwege und der Signaltransduktion der zellulären Antwort auf DNA-Fehler eine potentielle Ursache für Cisplatinresistenzen darstellen. Dementsprechend werden Hochregulationen der antiapoptotischen Proteine der Bcl2-Familie (Bcl2, Bcl-XL) sowie eine Downregulation proapoptotischer Proteine z.B. Bax und Bak vielfach in Verbindung mit einem verminderten Ansprechen auf eine platinbasierende Therapie gebracht.



### 2.3.3.1 Proteine des MAPK-Signalwegs

Vor allem der MAPK-Signalweg (*mitogen-activated protein*) ist dafür bekannt, dass Überexpressionen oder Hochregulierungen von Proteinen, die an der Kaskade beteiligt sind, zu resistenten Tumorzellen führen. Der MAP-Kinase Weg ist ein mehrstufiger Signaltransduktionsweg, der das Zellwachstum und Überleben der Zelle kontrolliert und sich in drei Gruppen einteilen lässt. Die entscheidenden Proteine für den jeweiligen *Pathway* sind: die *Extracellular-Signal Regulated Kinase* (ERK), die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und die p38 mitogen -aktivierte Proteinkinase (p38-MAPK) [192,193].

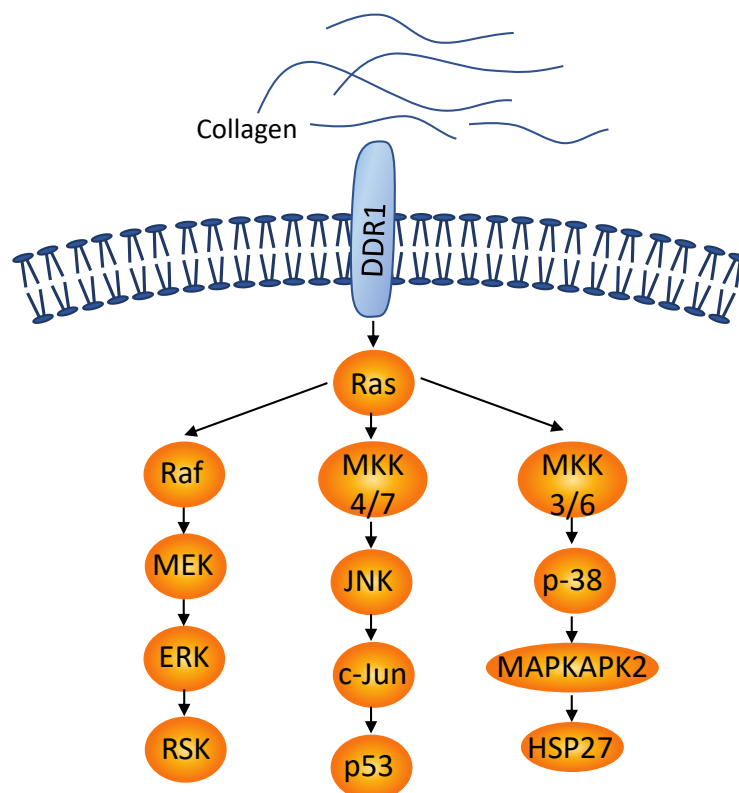


Abbildung 6: Schematisch stark vereinfachte Darstellung der MAPK- Signalwege.

Cisplatin ist imstande ERK in Krebszellen verstärkt zu aktivieren, deren proliferierende Anregung zu einer erhöhten Überlebenschance der Zellen führt [194,195], obwohl es auch Kontroversen darüber gibt, ob die Phosphorylierung von ERK den durch Zytostatika induzierten Zelltod eher verhindert oder stärker dazu beiträgt [196–199].

Auch JNK wird stressbedingt, DNA-Schäden miteingeschlossen, aktiviert. Die cisplatinaktivierte JNK bildet einen Komplex mit p73, einem proapoptotischen Mitglied von p53, wodurch im Normalfall die Apoptose eingeleitet wird. In Krebszellen erhält JNK die Expression von Pro-Überlebensproteinen aufrecht, wodurch die Resistenz gegen die Behandlung mit Cisplatin erhöht wird [200,201]. Dabei scheint die JNK Signalübertragung

besonders wichtig für den Erhalt von Krebsstammzellen zu sein, darunter auch Eierstockkrebs [202]. Speziell in dieser Krebsart konnte beobachtet werden, dass der Mechanismus durch eine Hochregulierung von Survivin gesteuert wird, einem antiapoptotischen Protein, das die Lebensfähigkeit der Stammzellen schützt [203]. JNK und ihr vorgeschalteter Aktivator MAPKKKK TAK1 steigerten synergistisch die Wirksamkeit von MEK-Inhibitoren, was darauf hindeutet, dass JNK auch eng in die Koordinierung der internen Zellstressreaktionen mit der Reaktion auf Krebsmedikamente involviert ist [204]. Ein interessanter Befund zeigt, dass JNK unter anderem auf nicht gefalteten Proteinstress reagiert, der bei Krebszellen aufgrund ihrer hohen Proteinsynthese häufiger beobachtet wird [205,206]. Eventuell könnte hier auch ein Signal zu HSP27 vermittelt werden.

Ebenso tragen Änderungen innerhalb der proapoptotischen Signalwege der MAP-Kinasen über eine verminderte Aktivierung von p38-MAPK- $\alpha$  zu einer unzureichend vermittelten Aktivierung der Apoptose über Fas/FasL bei [207]. Lungenkrebszellen übernehmen teilweise Eigenschaften der Krebsstammzellen, um so eine Cisplatinresistenz durch eine p38 vermittelte Aktivierung des zytoprotektiven Hitzeschockproteins HSP27 einzuleiten [208]. Die janusköpfige Rolle von p38 bei Krebsarten ist besonders ausgeprägt. Da p38 Apoptose-Wege effizient auslösen kann, ist es naheliegend, dass es auch in der Lage ist die Wirkung von Zytostatika zu verstärken [209,210]. Ein Apoptose fördernder Mechanismus ist die Produktion von ROS als Reaktion auf die Onkogenaktivierung, die eine p38-vermittelte proapoptotische Signalgebung und den Zelltod beginnender Tumorzellen induziert [211]. Darüber hinaus zeigt eine weitere Studie, dass die Hemmung von p38 die Lebensfähigkeit von primären Ovarialkarzinomzellen erhöhte, was darauf hindeutet, dass das grundlegende p38-Signal die Apoptose induziert. Daher könnte p38 das Überleben der Krebszellen und die Arzneimittelresistenz beeinflussen, indem es andere Signalwege moduliert [212]. Interessanterweise wird in Tiermodellen durch einen dualen PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) und mTOR-Inhibitor das Tumorwachstums von Ovarialkarziomen zunächst gehemmt, allerdings tritt aufgrund der Hochregulation der Transkriptionsregulatoren c-MYC und YAP nachfolgend eine Resistenz auf. Diese Hochregulation erfordert ERK-Aktivität und die Hemmung von p38 [213].

### **2.3.3.2 Proteine des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs**

Auch eine erhöhte Aktivität der bekannten PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktion ist sowohl für die Tumorentstehung und -progression als auch für Cisplatinresistenzen beschrieben [68,214–219].

Durch Cisplatin werden PI3K-abhängige Mechanismen angestoßen, die mit einer gesteigerten Expression von Survivin einhergehen, einem Caspasen-Inhibitor, welcher für viele cisplatinresistente Tumorzellen beschrieben wird [220,221]. Ein Enzym, das PI3K entgegenwirkt, ist die Phosphatase PTEN, die PIP3 inaktiviert, indem sie davon eine Phosphatgruppe abspaltet. PTEN ist ein typischer Tumorsuppressor und wird durch Mutationen in vielen Tumorklonen inaktiviert. Solche Tumorzellen mit einem Funktionsverlust bei PTEN und einer daraus resultierenden überaktiven AKT sind proliferative Tumore mit häufiger Resistenz gegen Chemotherapeutika [222–224]. Aufgrund der essenziellen Bedeutung dieser Signalkaskade wurden einige Studien zur Untersuchung der Interaktion zwischen PI3K- oder mTOR-Inhibitoren und Cisplatin durchgeführt, die in der Tat eine synergistische antitumorale Wirkung auf resistente Krebszellen, z.B. Melanom-, Brust-, Lungen-, und Nasen-Rachen-Karzinomen, aufwiesen [225–227]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der AKT-Inhibitor MK-2206 über eine Herunterregulierung des Pro-Überlebensproteins Bcl-2 die Zytotoxizität von Cisplatin in SK-OV-3-Ovarialkarzinomzellen erhöhte [228]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die cisplatininduzierte Phosphorylierung von Bad Ser-112 MEK-abhängig ist, während die cisplatininduzierte Phosphorylierung von Bad Ser-136 von einer PI3K/AKT Abhängigkeit zeugt. Weiterhin ist die cisplatininduzierte Phosphorylierung sowohl von Bad Ser-112 als auch von Ser-136 an der Aufrechterhaltung der Zellviabilität nach der Cisplatinbehandlung beteiligt. All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Signalkaskaden ERK und PI3K/AKT bei Bad zusammenlaufen, um den apoptotischen Effekt von Bad zu unterdrücken [229].

### **2.3.3.3 Tumorsupressorprotein p53**

Im Zusammenhang mit post-target Resistenzen werden oft Mutationen im Tumorsuppressorprotein p53 genannt. Das Protein stellt einen der stärksten deregulierten Vorgänge in einer Vielzahl von Krebsarten dar. Ungefähr die Hälfte aller Tumorarten weisen eine Hochregulierung von p53 auf und führen zu einer verminderten Ansprechbarkeit gegenüber der Cisplatintherapie [230–232]. Besonders interessant im Zusammenhang mit p53 ist die Arbeit von Hernandez-Valencia et al., die in cisplatinresistenten MCF-7 Zellen mit Hilfe von Resveratrol die Phosphorylierung von Serin20 in p53 induzierten, um auf diese Weise die Aktivität der p53-Zielgene wie PUMA und Bax wiederherzustellen [233].

### 2.3.4 Off-target-Resistenzen

Molekulare Änderungen, die nicht direkt durch eine Therapie mit Cisplatin ausgelöst werden, können die platinvermittelte Zytotoxizität ebenfalls reduzieren. Hierbei handelt es sich zumeist um Veränderungen in der Expression oder Aktivierung von Proteinen, die das Überleben der Zelle durch eine Inangangsetzung von Signalkaskaden sichert.

So ist mittlerweile bekannt, dass auch die Umgebung der Tumorzellen einen Einfluss auf die Wirkung von Medikamenten nehmen kann. Insbesondere Adhäsionsmoleküle und Membranrezeptoren sind dazu prädestiniert, Resistenzen über die Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) auszubilden, in dem ein entsprechend nachgeschalteter Signalweg aktiviert wird. Dieser Vorgang wird auch als zelladhäsionsvermittelte Arzneimittelresistenz (CAM-DR) bezeichnet [234–236]. Durch eine verstärkte Aktivierung von Rezeptoren, die mit EZM Bestandteilen wie z.B. Collagen interagieren, kann eine solche CAM-DR vermittelt werden [237–240]. Ein bekanntes Beispiel hierfür sind Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) wie der *Discoidin Domain Receptor* (DDR), welcher in der Lage ist, Proteine in ihren nachgeschalteten Signalwegen, wie MAPK und PI3K/AKT verstärkt zu induzieren [241–243]. Transmembranäre Rezeptoren ohne Kinaseaktivität, wie beispielsweise Integrine werden vor allem über die zuletzt genannten Signalwege mit Resistenzen in Verbindung gebracht [240,244–250]. Auf den genauen Mechanismus der integrinvermittelten Resistenzbildung wird in Kapitel 2.5.2 noch intensiver eingegangen. Auch das HER-2 Protoonkogen ERBB2 ist in resistenten Ovarialkarzinomen überexprimiert. Der Rezeptor induziert in einem AKT-abhängigen Signalweg eine p21 Phosphorylierung, wodurch die nukleare Transaktivierung von p21 Genen gehemmt wird. Dieser Mechanismus hat eine erhöhte Proliferation zur Folge [216,251,252].

Schließlich wurden mehrere relativ unspezifische adaptive Reaktionen auf Stress mit Cisplatinresistenzen assoziiert. Das Zytostatikum induziert, wie in Kapitel 2.2.6 erwähnt, auch Stress im endoplasmatischen Retikulum und kernunabhängig Apoptose induzierende Signale [253]. Zu solchen allgemeinen Reaktionen gehört auch die Makroautophagie und die so genannte Hitzeschockreaktion. Darunter wird die Anpassungen von Zellen auf induzierten Stress verstanden, die eine Proteinfaltung begünstigt [254]. So beeinträchtigen verschiedene Komponenten des autophagen Mechanismus und mehrere Chaperone aus der Familie der Hitzeschockproteine (HSP) die zytostatische Reaktion von unterschiedlichen Tumorzellen unter Cisplatinbehandlung [255–258]. HSP60 wurde sowohl im menschlichen Zervix- als auch im Leberkarzinom signifikant hochreguliert vorgefunden [259]. Ebenso konnte nachgewiesen

werden, dass eine Hochregulation von HSP27, HSP70, HSP72, GRP78 und HSP90 bei cisplatinresistenten Ovarialkarzinomen [260,261], Brustkrebs [262], Dickdarmkrebs [263], HeLa-Zellen des Gebärmutterhalses [264] und Zellen des Kehlkopfkarcinoms [265] aufzufinden sind.

Da Arzneimittelresistenzen unter anderem das größte Hindernis in der Krebstherapie darstellen, kommt ihnen in der Forschung eine hohe Aufmerksamkeit zuteil. Ein großes Ziel der Krebsforschung besteht darin, resistente Zellen wieder zugänglich für die zur Verfügung stehende Chemotherapie zu machen oder eine Entwicklung der Resistenz zu verhindern. Die Resistenzmechanismen beziehen sich häufig auch auf andere Chemotherapeutika, weshalb es oft zu Ausbildungen von problematischen Kreuzresistenzen kommt. Darüber hinaus beeinflussen und regulieren sich die Signalwege gegenseitig, um möglichst ein gesundes Gleichgewicht in der Zelle zu erhalten [266]. Generell ist die Resistenzausbildung multifunktional, d.h. mehrere Mechanismen treten gleichzeitig in derselben Krebszelle auf [267]. Die Deregulierung eines oder mehrerer Pfade ist ein komplexes und immer wiederkehrendes Phänomen der Tumorzellresistenz [266]. Die Chemoresistenz als therapeutische Strategie zu umgehen ist aufgrund dessen ein besonders schwieriges Unterfangen. Mithilfe der Identifizierung entscheidender molekularer Signalwege in der Tumorgenese des Ovarialkarzinoms und einer darauf basierenden Hemmung bestimmter Transkriptionsfaktoren oder Funktionsmolekülen der Resistenzausbildung geben hierbei Aussicht auf neue Therapiemöglichkeiten.

#### **2.3.4.1 Extrinsische Resistenz**

Für diese Arbeit ist insbesondere die extrinsische Resistenz von entscheidender Relevanz. Diese Form der Resistenz ist auf die Mikroumgebung der Zelle zurückzuführen und schützt die Zelle durch Abschirmung vor den ersten Auswirkungen verschiedener Therapien. Diese Art der Resistenzausbildung wird als *Environment-mediated drug resistance* (EMDR) bezeichnet [268,269]. Der EMDR-Phänotyp tritt dabei nur vorübergehend auf, d.h. nur wenn die Zelle im direkten Kontakt mit ihrer Mikroumgebung steht. Die Empfindlichkeit kehrt zurück, sobald sich die Zellen aus der Mikroumgebung entfernen [270]. Diese Form der Arzneimittelresistenz wird durch Faktoren in der unmittelbaren Tumorumgebung ausgelöst und lässt sich in zwei Kategorien unterteilen (Abb. 7): *soluble factor-mediated drug resistance* (SFM-DR), eine über lösliche Faktoren, wie z.B. Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren vermittelte Arzneimittelresistenz, sowie andererseits die bereits in Kapitel 2.3.4 erwähnte *cell adhesion-mediated drug resistance* (CAM-DR), welche wiederum durch Adhäsion von Integrinen an

Komponenten der EZM, wie Collagen, Fibronektin und Laminin vermittelt wird. Die SFM-DR wird hauptsächlich durch Einleitung der Gentranskription verursacht, während die CAM-DR weitergehend durch nicht-transkriptionelle Mechanismen vermittelt wird [271–274].

Die Population überlebender Zellen nach einer Therapie wird als minimale Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) bezeichnet. Diese Zellen sind dazu prädestiniert, sich in der schützenden Mikroumgebung zurückzuziehen und dort Schutz zu suchen. Die überlebenden Zellen der Resterkrankung können daraufhin als Reaktion auf den selektiven Therapiedruck eine komplexe und dauerhaft erworbene Resistenz entwickeln [271].

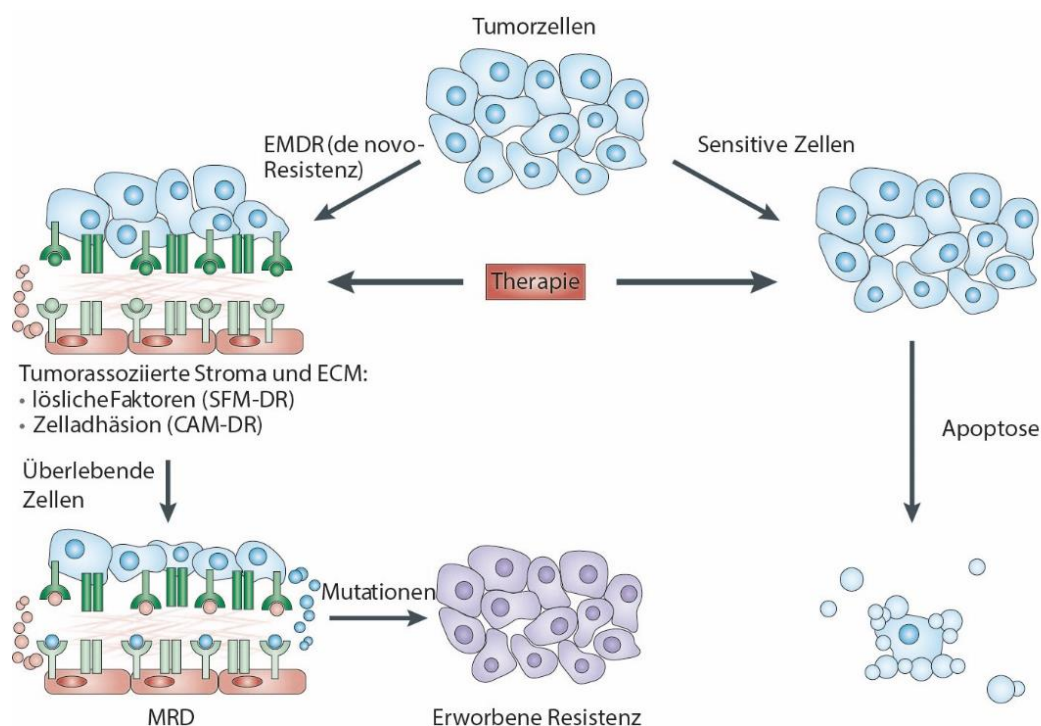


Abbildung 7: Übersicht einer EMDR im Kontext der MRD; modifiziert nach Meads et al. [271].

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von Patientenproben sowohl aus hämatopoetischen [275,276] als auch epithelialen [277] Tumorzellen an immobilisierte EZM Komponenten CAM-DR induziert. Dazu passend veranschaulichen weitere Arbeiten, dass eine erhöhte Integrin-Expression durch Krebszellen sowohl bei soliden als auch bei hämatopoetischen Tumoren mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [278–280]. Ferner korreliert auch die Expression von EZM Proteinen in der Mikroumgebung epithelialer Tumore in vivo mit Resistenzen [281,282], sowie die Expression der Integrin abhängigen *focal adhesion kinase* (FAK) in Tumorzellen [283]. Park et al. illustrierten mit Hilfe eines Xenotransplantat-Modells, dass die Inhibierung der  $\beta 1$  Integrinbindung das Tumolvolumen reduzierte und den

Erfolg der Therapie steigerte [284,285]. Diese Ergebnisse zeigen, dass Integrin vermittelte Interaktionen mit Mikroumweltkomponenten zu Therapieresistenzen führen. Zusammengekommen verknüpfen diese Ergebnisse CAM-DR mit MRD und verbinden EMDR mit der Entwicklung erworbener sekundärer Chemoresistenzen [271].

## 2.4 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) umfasst das gesamte Gewebe im Interzellularraum. Die Zusammensetzung ist äußerst heterogen und lässt sich schemenhaft in faserbildende Komponenten und Grundsubstanz gruppieren. Ebenso kann diese Heterogenität funktionell erfasst werden, da sie sowohl zur Formgebung, Elastizität, als auch Zugfestigkeit von Gewebe und zur Signaltransduktion beitragen kann. Die EZM bildet einerseits ein mechanisches Gerüst über Makromoleküle, das der Zelle Stabilität verleiht. Andererseits steht sie in einer wechselseitigen Beziehung mit den Zellen über verschiedene Signalmoleküle. Die Zelle selbst formt und moduliert wiederum die Struktur der EZM ständig neu, um auf diese Weise Bewegung, Proliferation und Differenzierung zu gewährleisten [286–290].

Am physiologischen Ab- und Umbau der EZM sind insbesondere Matrix-Metalloproteasen (MMP) beteiligt. Hohe Konzentrationen von MMP-2 und MMP-9 korrelieren bekanntlich mit einer Metastasierung des Tumorgewebes und führen dadurch zu einer ungünstigen Prognose bei multiplen Krebsarten [291–294]. Insgesamt bilden die wechselseitige Kommunikation zwischen den EZM Molekülen und der Zelle die Grundlage der Ontogenese, Wundheilung und Gewebemöostase [295].

Diese Prozesse sind jedoch bei einer Reihe von Krankheiten gestört. Veränderungen der EZM können über verschiedene Prozesse eingeleitet werden z.B. durch eine veränderte Expression von Matrixkomponenten wie Collagen und Fibronectin, durch veränderte posttranslationale Modifikationen der Collagenvernetzung und durch einen proteolytischen Matrixabbau [296–298]. Des Weiteren äußern sich Strukturveränderungen der EZM in tumorösen Geweben unter anderem über eine erhöhte Steifheit, die auf einer quervernetzten Collagenstruktur beruht und es den Zellen ermöglicht, stärker zu proliferieren [299]. Bei Krebserkrankungen zeichnet sich die EZM durch eine Barriere für uneingeschränktes Wachstum von Zellen aus und beeinflusst auf diese Weise Zellinvasion und Metastasierungen. Ebenso verändert die EZM die zelluläre Resistenz gegenüber zytostatischen Wirkstoffen, wenn viele Matrixproteine an der Zelle haften [300].

EZM-Komponenten dienen als Liganden für Zelloberflächenrezeptoren, die eine Reihe von Signalwegen aktivieren. Nicht zu vergessen ist, dass zusätzlich zur absoluten Menge der EZM-Komponenten - welche die Aktivierung der Signalwege beeinflusst - auch das Verhältnis der verschiedenen EZM-Komponenten zueinander entscheidend für die Zellantwort ist. Dies kann wiederum über eine komplexe reziproke Rückkopplungs- und Reaktionsschleife erfolgen, welche in vielen Signalnetzwerken auftreten. Daher müssen die Zellen mehrere nicht binäre Signale in einen Entscheidungsprozess integrieren, um eine Reaktion zu bewirken. Dies ist wichtig, nicht nur wegen der unterschiedlichen Aktivierung von Rezeptoren, wenn sich die Verhältnisse der EZM-Komponenten ändern, sondern auch, weil mit der Veränderung der EZM-Komponenten die gesamte 3D-EZM-Organisation betroffen ist und sich somit die räumliche Topologie der Zellen und des umliegenden Gewebe verändert [301]. Der Prozess der EZM vermittelten extrazellulär-intrazellulären Signalregulation erfolgt typischerweise durch transmembranäre Proteine wie den Integrinen und kann zur Lokalisierung und Kompartimentierung intrazellulärer Signale beitragen [302,303].

#### **2.4.1 Collagen als ein Bestandteil der EZM**

Die vorherrschende Proteinfamilie in der EZM bilden die Collagene. Sie werden in 28 verschiedene Familienmitglieder unterteilt. Darüber hinaus gibt es rund zehn weitere Proteine, deren strukturelle Merkmale mit den unterschiedlichen Collagentypen zum Teil übereinstimmen und daher als collagenähnliche Proteine zusammengefasst werden. Die in Bindegeweben anzutreffenden Collagene werden als Typ I, II, III, V, XI Collagene klassifiziert, wobei Typ I als Hauptbestandteil von Haut und Knochen mit Abstand das am häufigsten vorkommende Collagen darstellt [304]. Synthetisiert werden die Polypeptidketten des Collagens in membrangebundenen Ribosomen. Durch den Einbau zusätzlicher Aminosäuren kommt es zur Sekretion in die EZM, wo anschließend die überschüssigen Aminosäuren proteolytisch abgespalten werden, damit ihre Assoziation im extrazellulären Bereich erfolgen kann [305,306].

Typischerweise besteht ein Collagenmolekül aus einer langen, unbeweglichen Helikalstruktur, in der drei Collagenpeptidketten ( $\alpha$ -Ketten) zu einer rechtsgängigen Superhelix ineinander verdrillt sind (siehe Abb. 8). Die Polypeptidketten können identisch (Homotrimer-Collagene) oder unterschiedlich (Heterotrimer-Collagene) sein. Diese Tripelhelix stellt die tertiäre Proteinstruktur dar. Fibrilläre Collagene können schließlich assoziieren und Mikrofibrillen bilden, welche die Quartärstruktur darstellen [307]. Die Besonderheit des Moleküls ist die



regelmäßige Anordnung der Aminosäuren, die zu einem großen Teil aus Glycin, Prolin und Hydroxyprolin aufgebaut sind. Diese Aminosäuren bilden das charakteristische Wiederholungsmuster Gly-Pro-X oder Gly-X-Hyp, wobei X eine beliebige andere Aminosäure sein kann. Glycin als kleinste Aminosäure ohne Seitenkette kommt am häufigsten in der Struktur vor. Aufgrund mangelnder Größe passt das Glycin als einzige Aminosäure in das kompakte Zentrum der Tripelhelix mit ihren sehr engen Windungen. Wasserstoffbrückenbindungen helfen hierbei, die drei Ketten zusammenzuhalten. Aus Platzgründen müssen die Ringe von Prolin und Hydroxyprolin nach außen zeigen. Prolin hilft wegen eben dieser starren Ringstruktur bei der Ausbildung von engen Windungen. So ermöglicht es die Ausbildung der helikalen Struktur. Hydroxyprolin ist überwiegend an dritter Stelle zu finden und stabilisiert die Tripelhelix über Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Polypeptidketten und den sie umgebenden Wassermolekülen [308]. Die Aminosäurestruktur wiederum wird translatiert und zu einer linksgängigen  $\alpha$ -Helix gefaltet und bildet damit die Sekundärstruktur. Die unterschiedlichen Isoformen der  $\alpha$ -Ketten definieren den Collagentypus. Um eine weitere Variabilität zu erzeugen kann jede Isoform gespleißt werden oder alternative Promotoren verwenden [304].

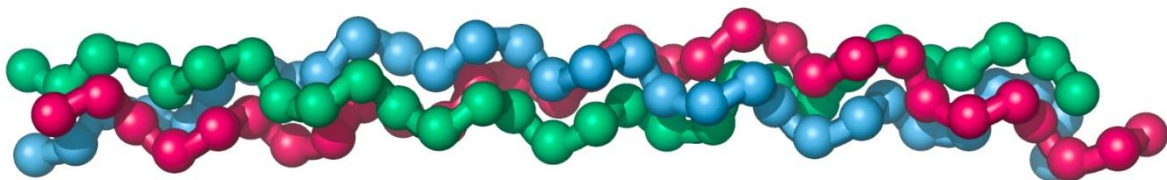


Abbildung 8: Darstellung der Collagen Struktur. Drei  $\alpha$ -Helices (dargestellt in grün, rot und blau) verdrehen sich zu einer Tripelhelix [309].

Der kontrollierte Abbau des EZM Bestandteils ist für das Wachstum, die Invasion und die Metastasierung von bösartigen Tumoren entscheidend. Die Collagenolyse erfolgt hauptsächlich über zinkabhängige Endopeptidasen, den sogenannten Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Collagen I wird vorangehend durch MMP-1, MMP-8, MMP-13 und MMP-14 gespalten. Denaturierte Collagene und Collagen IV - welche einen wichtigen Bestandteil der Basalmembran darstellen – werden durch MMP-2 und MMP-9 zersetzt. Durch ihre Bindung an die nicht-tripel-helikalen Bereiche von Collagen werden sie proteolytisch aktiv [310].

Collagene sind über mehrere Rezeptorfamilien an Zell-Matrix Interaktionen beteiligt [311–313]. Sie sind Liganden von Integrinen, insbesondere binden sie an Integrine der  $\beta 1$  Familie, kombiniert mit einer der vier Untereinheiten, die eine Domäne  $\alpha x$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$  und  $\alpha 11$ ) besitzen. Die Bindung erfolgt über GFOGER- ähnliche Sequenzen, welche als kleinste

gemeinsame Übereinstimmung für die Verknüpfung erforderlich ist [311,314]. Darüber hinaus sind auch weitere Bindungsstellen für Collagen möglich [315]. Die Collagene I-III sind ebenfalls Liganden der *Discoidin Domain*-Rezeptoren (DDR1). Für diese Rezeptoren ist die entscheidende Bindungsstelle in den Collagenen die GVMGFO-Sequenz [312]. Die Aktivierung kann aus der gleichzeitigen Bindung beider DDR-Domänen im Dimer an eine einzige Collagen-Tripelhelix resultieren, oder aber sie binden Collagen unabhängig voneinander [316]. Die lösliche Domäne von DDR reguliert die Collagenablagerung in der EZM, indem sie die Fibrillogenese hemmen [317]. Nach erfolgter Bindung über die eben genannten Zelloberflächenrezeptoren können Collagene über eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege Resistenzen vermitteln. Unter anderem wurde beobachtet, dass Überexpressionen von Collagen in cisplatinresistenten Ovarialkarzinom Zellen CAM-DR induzieren kann [237–239].

## 2.5 Integrine

Integrine sind transmembranäre Proteine, die mit dem Zytoskelett verbunden sind. Somit leiten sie durch ihre Bindungsfunktion Signale zwischen der extrazellulären Umgebung und den intrazellulären Pfaden weiter, diese Kommunikation erfolgt bidirektional [318,319]. Integrine sind heterodimere Rezeptoren, die aus einer  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten aufgebaut sind. Bei Säugetieren verbinden sich 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten in verschiedenen Kombinationen, um 24 Integrine zu bilden, die an verschiedene, wenn auch teilweise überlappende Untereinheiten der EZM-Liganden binden können [318,320].

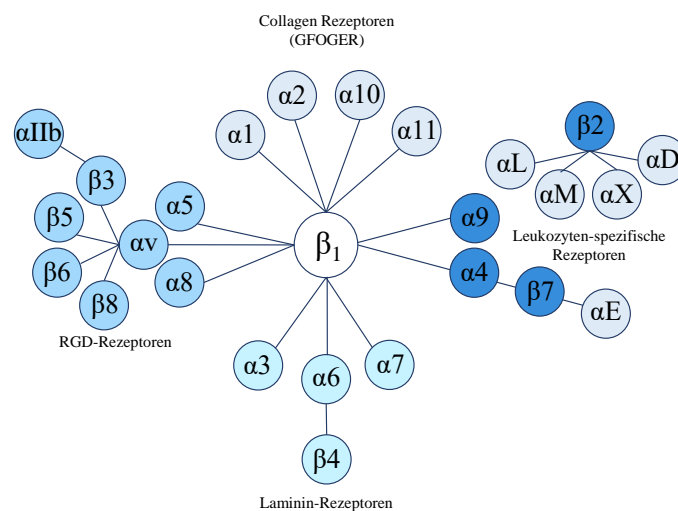


Abbildung 9: Übersicht der Integrin-Familie; modifiziert nach Barczyk et al. [321].

## 2.5.1 Struktur

Beide Untereinheiten eines Integrins bestehen grundsätzlich aus drei Strukturelementen: einer größeren extrazellulären Domäne, einer Transmembran-Domäne und einem kurzen intrazellulären Bereich [322]. Das Bein der  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus einem Oberschenkel (*thigh*), einer kurzen Verbindungssequenz Knie (*knee*) und zwei Wadendomänen (*calf*), welche den Ligandbindungskopf tragen. Dieser Kopf besteht aus einer  $\beta$ -Propellerdomäne mit sieben Blätter-analogen Bereichen (*blades*) (in der Abb. 10 als Zylinder dargestellt). Einige der Propellerblattdomänen enthalten Calcium-bindende EF-Hand-Domänen, diese wirken sich allosterisch auf die Ligandbindung aus [323]. Eine zusätzliche  $\alpha I$  Domäne ist in der Hälfte der  $\alpha$  Ketten zwischen den Propellerwiederholungen 2 und 3 vorhanden [324]. Diese enthalten eine Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS), die für die Ligandbindung essenziell ist.

Die  $\beta$ -Untereinheiten besteht aus vier cysteinreichen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Repeats, einer  $\beta$ -Schwanz-Domäne ( $\beta$ -tail), einer Hybriddomäne (in Sequenzen aufgeteilt), einer I-ähnlichen Domäne ( $\beta I$ ) und einer Plexin-Sempahorin-Integrin (PSI)-Domäne. Ähnlich wie  $\alpha I$  enthält die  $\beta I$  Domäne eine MIDAS-Sequenz für die Ligandenbindung und eine zusätzliche regulatorische Stelle ADMIDAS (*adjacent to MIDAS*), die durch  $Ca^{2+}$  inhibiert und durch  $Mn^{2+}$  für die Ligandbindung aktiviert wird [323]. Wichtig ist, dass die  $\beta I$ -Untereinheiten im Überschuss translatiert wird, im endoplasmatischen Retikulum als unreifer Vorläufer verbleibt, der durch posttranslationale Modifikation, wie z.B. Glykosylierung, reift und erst nach Heterodimerisierung zur Plasmamembran transportiert wird [325–327].

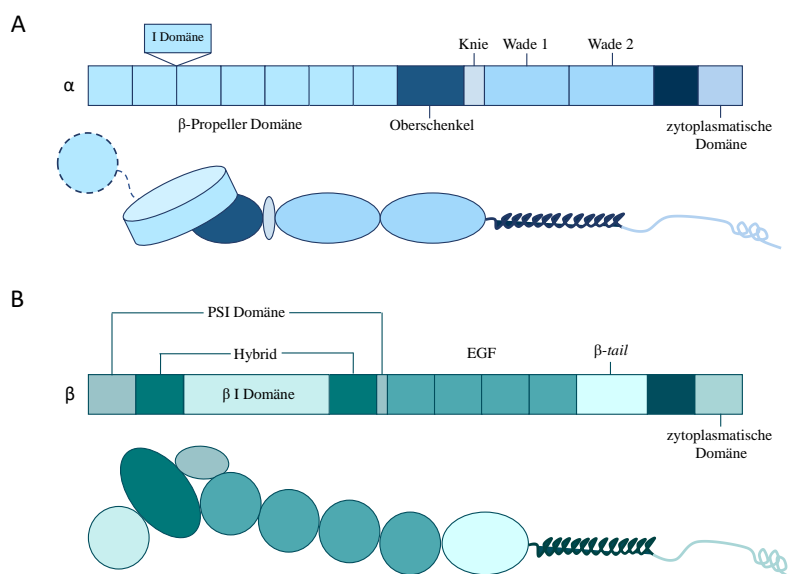


Abbildung 10: Aufbau beider Integrin-Untereinheiten: A. Struktur der  $\alpha$ -Untereinheit B. Struktur der  $\beta$ -Untereinheit; modifiziert nach Springer und Wang [328].

## 2.5.2 Regulierung der Integrin-Aktivierung

Durch diese bidirektionale Verbindung stellen die Integrine räumlich begrenzte Kommunikationswege zwischen der Zelle und ihrer Mikroumgebung her. Integrine benötigen zur Signalübertragung Adapterproteine und Proteinkinasen, da sie selbst keine katalytischen Eigenschaften besitzen. Zusammen mit Wachstumsfaktorrezeptoren bilden sie einen Multiproteinkomplex, der auch als fokaler Adhäsionskomplex bezeichnet wird. In Kontakt mit der  $\beta$ -Integrin-Untereinheit stehen das Aktin-bindende Talin und Filamin, welche wiederum von der p21-aktivierten Kinase (PAK) moduliert werden [329,330]. Die Rekrutierung von Talin, einem Adaptorprotein am Integrin-Schwanz, induziert einen Konformationswechsel in der extrazellulären Domäne. Dies führt zur Aktivierung des Rezeptors und zu einer erhöhten Affinität für EZM-Liganden (*inside-out-signaling*). Bei dieser *Inside-Out*-Signalisierung ist das Integrin in einer gestreckten Konformation aktiv und in einer eingefalteten Konformation inaktiv. Die Beteiligung von Integrin und EZM führt wiederum zur Rekrutierung von Adaptor- und Signalproteinen für die Integrin-Zytoplasma-Domäne (*outside-in signaling*) [331]. Die nachgeschalteten Signalwege regulieren die Aktivierung der FAK-, Src-, AKT-, und ERK-Wege und die Steuerung kleiner GTPasen der RHO-Familie [332]. Die Signalwege sind für viele Integrin-abhängige Prozesse essentiell, wie z.B. die Hemmung der Apoptose. Die Rezeptoren koordinieren die Polymerisation der Aktin-Zytoskelette, um wichtige biologische Funktionen wie Proliferation, Genexpression, Zellüberleben und Zellmotilität zu steuern [333]. Allerdings löst die Inhibierung der FAK- oder Src-Signalgebung keine gravierenden Veränderungen in der Zusammensetzung der Integrinadhäsion aus, was darauf hindeutet, dass die Zusammensetzung der Adhäsion nicht ihre Fähigkeit widerspiegelt, Kinase-abhängige Integrin-Signale nach außen weiterzuleiten [331]. Interessanterweise wurde eine verstärkte Expression von Integrinen in Ovarialkarzinomen mit erhöhtem Tumorwachstum und Metastasierung in Verbindung gebracht [334,335].

## 2.5.3 Signalwege der Integrine

Aufgrund der o.g. funktionellen Involvierung der Integrine in die Malignität der Tumore erscheint eine Inhibition der Integrinfunktion zur Behandlung von Krebs als ein sehr vielversprechender Ansatz. Es wurden mehrere synthetische Peptide und humanisierte Antikörper entwickelt, die in die Integrin-Ligand-Interaktionen hemmend eingreifen können. Ungeachtet der ermutigenden in-vitro- und präklinischen Ergebnisse waren die klinischen Studien der späten Phase allerdings bisher enttäuschend [330]. Die durchgeführte POSEIDON-Studie zeigte keine Verbesserung bei der Behandlung von Patienten mit metastasierendem

Dickdarmkrebs vom K-RAS-Wildtyp mit Abituzumab, einem anti- $\alpha_v$ -Integrin-Antikörper in Kombination mit der Standardbehandlung [336]. Ebenso zeigte eine Phase-3-Studie mit dem Integrin-Antagonisten Cilengitide in Kombination mit einer Strahlentherapie keine Verbesserung der Ergebnisse bei der Behandlung von Glioblastom-Patienten, daher wurde die Weiterentwicklung eingestellt [337]. Angesichts der vielfältigen physiologischen Funktionen der Integrine als Adhäsions- und Signalmoleküle erscheint eine therapeutische Hemmung als onkologische Strategie zu unspezifisch, so dass man eher auf die, den Integrinen nachgeschalteten Signalwege in ihrer onkologischen Überaktivität zielt.

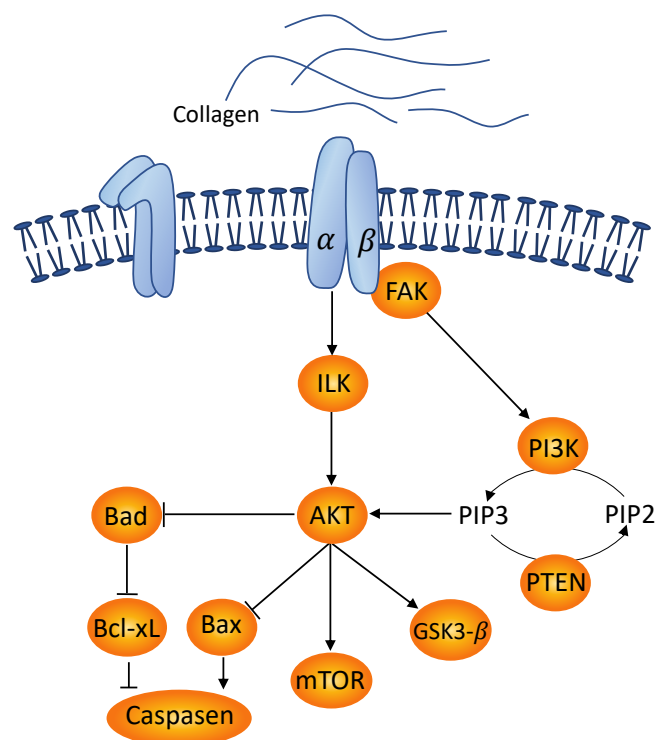


Abbildung 11: Vereinfachte Schematische Darstellung des Integrin Signalweges.

Dazu gehören die fokale Adhäsionskinase (FAK), die Integrin-gekoppelte Kinase (ILK), die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase B (AKT) [318,332], wobei FAK und ILK von besonderer Relevanz sind, da sie eigene Signalkaskaden induzieren können, z.B. auch den PI3K/AKT-Signalweg. Die PI3K ist ein Schlüsselmolekül an der Schnittstelle verschiedener zellulärer Signalwege. Eine Aktivierung von PI3K durch Phosphorylierung führt zur Bildung des Botenmoleküls Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP3). Die Proteinkinase B kann mit ihrer PH-Domäne an PIP3 binden und so an die Zellmembran rekrutiert werden. Dort wird sie von der Phosphoinositid-abhängigen Kinase 1 (PDK1) und einer weiteren Kinase an ihren Aminosäuren Serin (473) und Threonin (308) phosphoryliert und damit aktiviert. Die aktivierte AKT kann dann verschiedene Substrate phosphorylieren und dadurch aktivieren oder inhibieren. Ein Enzym, das diesem Mechanismus entgegenwirkt, ist

die Phosphatase PTEN, die PIP3 inaktiviert, indem sie eine Phosphatgruppe abspaltet. Der Konnex zwischen dem Tumorsuppressor PTEN und Chemoresistenzen wird in Kapitel 2.3.3 näher erläutert. Viele klinische Studien veranschaulichen die Bedeutung dieses Signalweges für die Tumorentstehung und -progression [68,214,330]. Aus diesem Grund hielten wir dies für ein interessantes Ziel zur Untersuchung der CAM-DR.

## **2.6 Discoidin-Domain-Rezeptor, DDR1**

Eine weitere Rezeptorgruppe und Bindepartner des Collagens sind die Discoidin-Domänen-Rezeptoren (DDR), die bereits kurz in Kapitel 2.4.1 erwähnt wurden. DDR gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und besteht aus den zwei Mitgliedern DDR1 und DDR2. Die Expression von DDR1 wird hauptsächlich in Epithelzellen und DDR2 in mesenchymalen Zellen beschrieben [338]. Beide Rezeptoren werden durch native Collagene aktiviert, nicht aber durch hitzedenaturierte Collagene. Ein Unterschied besteht in der Spezifität gegenüber verschiedenen Collagenen. DDR2 bindet bevorzugt an Collagen I, III und X, während DDR1 an I, II, III, IV und mit geringer Affinität an X binden kann [339].

### **2.6.1 Struktur**

Die Unterfamilie von DDR1 besteht aus fünf membranverankerten Isoformen, während DDR2 nur durch ein einziges Protein repräsentiert wird. Die jeweiligen Isoformen wurden durch alternatives Spleißen erzeugt. DDR1a- DDR1c sind funktionelle Rezeptoren in voller Länge, DDR1d und DDR1e sind verkürzt und besitzen entweder eine inaktive oder gar keine Kinase-Domäne [340]. Darüber hinaus wurden zwei weitere sezernierte Spleißvarianten identifiziert. Mit Ausnahme dieser beiden sezernierten DDR1-Isoformen sind alle DDRs Single-Pass-Transmembrannglykoproteine vom Typ I, die sich durch das Vorhandensein von sechs verschiedenen Proteindomänen auszeichnen: eine Discoidin (DS)-Domäne, eine DS-ähnliche Domäne, eine extrazelluläre Juxtamembran (EJXM)-Region, ein Transmembran (TM)-Segment, eine lange IJXM-Region und eine intrazelluläre Kinasen-Domäne (KD), die mit einem kurzen C-Terminus (CT) endet.

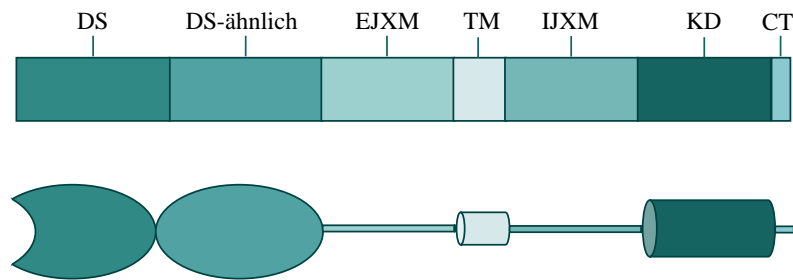


Abbildung 12: Übersicht des Aufbaus von DDR1, modifiziert nach Leitinger [338].

In DDRs enthält die DS-Domäne die collagenbindende Region [341,342]. Alle DS-Domänen enthalten zwei antiparallele Blätter, bestehend aus insgesamt acht  $\beta$ -Strängen in einer Jellyroll-Konfiguration mit sechs Schleifen an der Oberseite, die ein collagenbindendes Motiv bilden. Die Struktur wird durch vier Cysteinreste, die zwei intramolekulare Disulfidbindungen bilden, zusätzlich stabilisiert: Cys-74 (Cys-73 in DDR2) und Cys-177 verbinden die Schleifen 2 und 6, während Cys-31 (Cys-30 in DDR2) und Cys-185 in der Nähe der N- und C-terminalen Regionen liegen. Sequenzunterschiede in diesen Schleifen definieren die Bestimmtheit für jeden Liganden [343].

## 2.6.2 Regulierung der DDR1 Aktivierung

Die DDR Aktivierung verläuft Integrin-unabhängig und bindet bevorzugt an Collagen, dadurch unterscheidet sich der Rezeptor von den anderen RTK, die in der Regel an lösliche Wachstumsfaktoren binden [344]. Nach Bindung von Collagen durchläuft DDR eine Tyrosin-Autophosphorylierung. Ein charakteristisches Merkmal der DDR-Phosphorylierungsdynamik ist die verzögerte und anhaltende Reaktion. Typischerweise durchlaufen klassische RTKs wie der EGF-Rezeptor (EGFR) oder der FGF-Rezeptor innerhalb von Sekunden nach der Ligandenbindung eine Tyrosin-Autophosphorylierung [345]. Im Gegensatz dazu benötigen DDRs je nach Zelltyp einen bemerkenswert langen Zeitraum, um einen ähnlichen aktivierten Zustand zu erreichen (Minuten bis Stunden) [339]. Hinzukommend bleiben im Fall der DDRs die Phosphorylierungswerte tagelang bestehen, ohne dass eine Signalabschwächung erkennbar ist. Studien deuten darauf hin, dass der Bestand von DDR1 auf der Zelloberfläche auch über Ektodomänen-Shedding reguliert werden kann [346,347]. Dies beschreibt einen Prozess, der im Allgemeinen durch die Wirkung von MMPs vermittelt wird und die Freisetzung der extrazellulären Domäne von Membranproteinen mit sich bringt. Es konnte gezeigt werden, dass die EJXM-Region von DDR1 durch membranartigen MMPs (MMP-14, MMP-15 und MMP-16) gespalten wird. Die MMPs können sowohl Basalmembranen, als auch interstitielle Collagene hydrolysieren [348]. Als solche sind sie imstande DDR1 zu regulieren, indem sie die

Integrität der Collagenmatrix verändern und Collagenbindungsstellen freilegen oder abbauen, was sich folglich auf die Rezeptoraktivierung auswirken kann [349].

### **2.6.3 DDR1 Signalweg**

Die Phosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der intrazellulären Domänen aktivierter DDRs erzeugt Andockstellen für Proteinkomplexe [339,350]. Diese wiederum führen zur Aktivierung verschiedener DDR-initiiertes Signalwege, die in Kapitel 2.3.3 näher erläutert wurden. Bisherige Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Stimulation von DDR1 durch Collagen an die Aktivierung der PI3K/AKT- und Ras/ERK MAPK-Kaskaden gekoppelt ist [351,352]. Weitere Ergebnisse zeigen, dass DDR1 transkriptionell durch eine p53- und DDR1-Relais-Feedforward-Schleife reguliert wird. Dadurch werden die Konzentrations-niveaus von p53, sowie einige ihrer Ziel-Gene erhöht. Passend dazu zeigen weitere Daten eine Stress-induzierte Apoptose in Zellen mit fehlender DDR1-Aktivität. Außerdem konnte festgestellt werden, dass DDR1 COX-2 und NF- $\kappa$ B aktiviert und über diese Signalwege Chemoresistenz vermitteln kann [353]. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz von DDR1 für das Zellüberleben [354].

Trotz dieser Ergebnisse lässt das Ausmaß, in dem DDR1 die Migration und Proliferation von Krebszellen fördert, immer noch viele Fragen offen. Dies liegt nicht zuletzt an der Komplexität der Signaltransduktionswege, die an die DDR-Aktivierung gekoppelt sind. Erstens binden DDRs an mehrere Collagentypen und folglich können unterschiedliche Collagene verschiedene Rezeptorreaktionen hervorrufen [354]. Zweitens weisen Collagene mehrere Zell-Interaktionsstellen auf, die weitere Bindungsproteine (z.B. Integrine) ansprechen [312,314]. Drittens ist die DDR-Signalisierung gewebespezifisch [351,352,354]. Viertens können DDRs zusammen mit anderen Signalrezeptoren, einschließlich der Rezeptoren Wnt5a/Frizzled [355] und dem Insulinrezeptor [356], agieren. Zu guter Letzt werden DDR aktivierte Signalwege durch Punktmutationen modifiziert, wie bereits bei mehreren Krebsarten beobachtet werden konnte [357]. Um zu verstehen, ob und wie diese DDR-Veränderungen potenziell zur Krebsentstehung und -progression beitragen können, müssten Signalwege, die spezifisch durch DDRs in Krebszellen aktiviert werden, und ihre funktionellen Konsequenzen identifiziert werden.



## 2.7 mTOR- signaling

Das Protein mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) ist eine Serin/Threonin Kinase und reguliert die Zellproliferation, Autophagie und Apoptose, indem es an mehreren Signalkaskaden der Zelle beteiligt ist. Insbesondere Tumorzellen weisen häufig Anomalien im mTOR-Signalweg auf. Das Protein aktiviert und kontrolliert den Stoffwechsel der Zellen, über Veränderungen in der Aktivität und/oder Expression von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels [358,359]. Daher ist der mTOR-Signalweg ein vielversprechendes Ziel in der Krebstherapie.

### 2.7.1 mTORC1-Struktur

Durch einen Zusammenschluss mit weiteren Proteinen bildet mTOR zwei strukturell und funktionell unterschiedliche Proteinkomplexe, die als mTORC1 und mTORC2 bezeichnet werden. Diese Arbeit beschäftigt sich lediglich mit dem mTORC1 Mechanismus, aufgrund dessen beziehen sich alle weiteren Erläuterungen speziell auf diesen Komplex. Der eben genannte Proteinkomplex besteht aus mehreren Struktureinheiten. Den zentralen Bestandteil bildet die mTOR-Kinase selbst, die als zentrale katalytische Verbindung fungiert. Der N-Terminus enthält Cluster aus Huntingtin, Elongationsfaktor 3, einer Untereinheit der Proteinphosphatase 2A und TOR1 die als HEAT-Repeats zusammengefasst werden. Gefolgt wird dieser Abschnitt von einer FRAP-, ATM- und TRRAP (FAT)-Domäne, der FKBP12-Rapamycin-Bindungsdomäne (FRB) und der C-terminalen FATC-Domäne. Eine weitere Untereinheit bildet der sogenannte RAPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*), welcher als Gerüst für den Zusammenbau des Komplexes und für die Bindung von Substraten und Regulatoren fungiert [360–362]. Einen weiteren Bestandteil stellt das mLST8/GβL (*mammalian LST8/G-protein β-subunit like protein*) dar, welches mit der katalytischen Domäne von mTORC1 assoziieren kann und die Kinasenaktivität stabilisiert [363]. Zusätzlich zu diesen drei Kernkomponenten enthält der Komplex zwei inhibitorische Untereinheiten. Darunter die vierte Komponente, die Regulierungsuntereinheit DEPTOR (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) [364]. Darüber hinaus bildet RAPTOR ein Gerüst für das PRAS40 (*Proline-rich AKT1 substrate 1 40 kDa*; auch als AKT1S1 bekannt), welches ebenfalls als endogener Inhibitor auf die mTORC1-Aktivität wirkt [365].

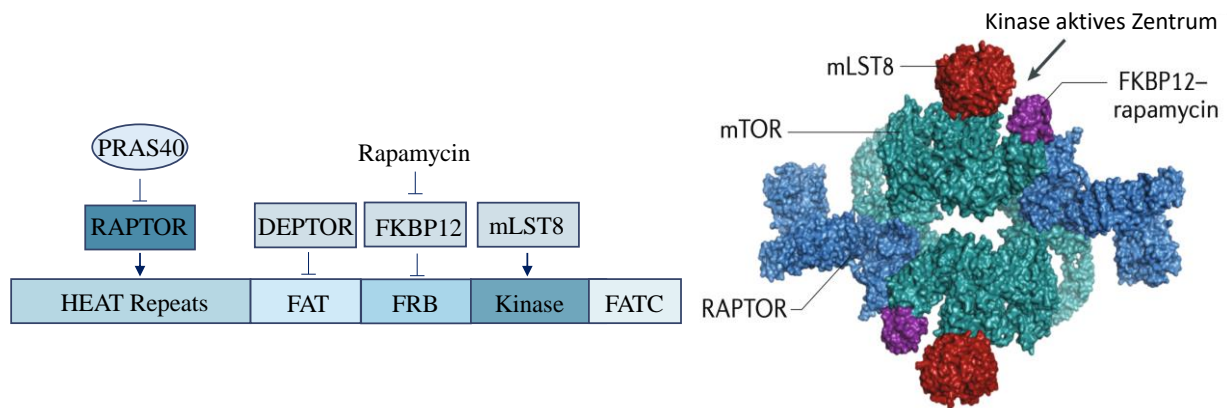


Abbildung 13: Aufbau der mTORC1 (links) schematisch (rechts) im 3D Model; modifiziert nach Grace Y Liu et al. [366].

Der bekannteste und namensgebende Inhibitor von mTOR ist das Rapamycin, welcher auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Ursprünglich fungiert Rapamycin als Immunsuppressivum, dass die Aktivität von T-Zellen hemmt und hauptsächlich nach Nierentransplantationen Verwendung findet. Dabei hemmt Rapamycin nicht direkt die katalytische Kinaseaktivität von mTOR, sondern bindet zusammen mit einem weiteren kleinen Protein, dem Immunophilin FKBP12, spezifisch an mTORC1 (nicht aber an mTORC2). Die gebundene Domäne grenzt an das aktive Zentrum der Kinase und infolgedessen hemmt es nur einige der mTORC1 Funktionen [367,368]. In Kryo-elektromikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Rapamycin-FKBP12 an mTOR den Zugang zum Spalt des aktiven Zentrums auf die Hälfte reduziert, was impliziert, dass diese Bindungsdomäne als *Gatekeeper* der aktiven Substratbindungsstelle fungiert [369].

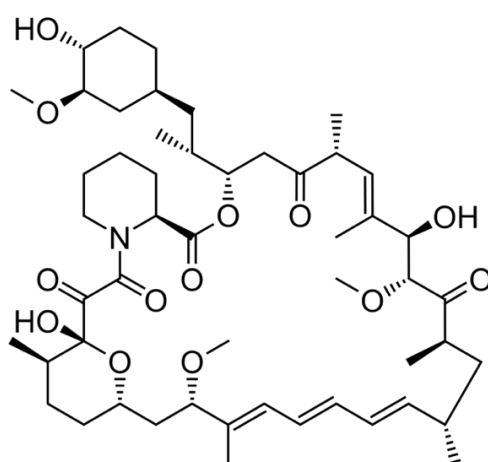


Abbildung 14: Struktur von Rapamycin.

### 2.7.2 mTOR-Signalweg

Wie bereits in Kapitel 2.3.3 erwähnt führen Veränderungen im PI3K/AKT/mTOR Signalweg häufig zu Arzneimittelresistenzen in Tumorzellen. Der mTORC1 Signalweg kann unter anderem über PI3K/AKT in Gang gesetzt werden. Die Aktivierung von PI3K induziert die Umwandlung von PIP2 in PIP3 und die daraus resultierende gesteigerte Expression von AKT.

Phosphoryliertes AKT ist in der Lage, PRAS40 an Thr246 zu phosphorylieren. Obwohl PIP3 direkt mTORC2 rekrutiert, aktiviert das PI3K-Signal auch indirekt mTORC1, vor allem über AKT. Einmal aktiviert, phosphoryliert AKT Tuberin (TSC2; *Tuberous Sclerosis Complex 2*) an Ser939, Ser981 und Thr 1462 [370]. Diese phosphorylierten Stellen rekrutieren das zytosolische Ankerprotein 14-3-3 zu TSC2 und blockieren damit die Fusion des TSC1/TSC2-Dimers [371,372]. Wenn TSC2 nicht mit TSC1 verbunden ist, verliert TSC2 seine GAP (GTPase-aktivierendes Protein) Aktivität und ist nicht mehr in der Lage RHEB-GTP zu hydrolysieren (Abb. 15). Diese Veränderung führt zu einer fortgesetzten Aktivierung von mTORC1 [373]. Darüber hinaus phosphoryliert AKT ebenfalls den mTORC1-Inhibitor PRAS40, wodurch PRAS40 von RAPTOR-Protein auf mTOR dissoziiert und die Aktivierung von mTORC1 ermöglicht wird [365,368]. Da PRAS40 RAPTOR daran hindert, die mTOR Substrate 4E-BP1 und S6K1 zu rekrutieren, besteht durch die Entfernung des RAPTORs die Möglichkeit, beide Substrate über mTOR auf diese Weise zu aktivieren [374]. Zusätzlich zum PI3K-Signalweg kann die Ras-MAPK-Signalkaskade mTORC1 aktivieren (Abb. 15, links). Ähnlich wie bei der AKT-vermittelten Phosphorylierung von TSC2 phosphorylieren ERK und RSK auch TSC2, um den TSC1/2-Komplex zu inhibieren und die RHEB-vermittelte Aktivierung von mTORC1 auszulösen [375]. In ähnlicher Weise kann die RSK auch PRAS40 phosphorylieren, was zur Dissoziation von Raptor führt und die Aktivierung von mTORC1 fördert [376].

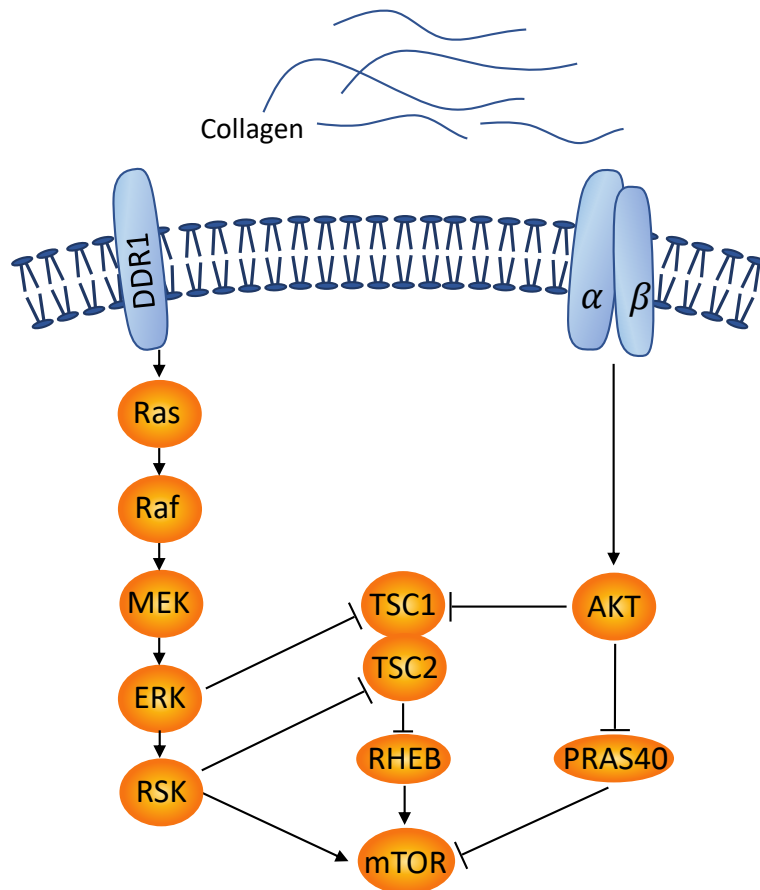


Abbildung 15: Vereinfachte Übersicht des mTOR Signalweges.

## 2.8 HSP27-signaling

Hitzeschockproteine (HSP) sind molekulare Chaperone, die eine wichtige Rolle für das Überleben und die Entwicklung von Zellen spielen. Aufgrund ihrer vielfältigen und funktionellen Differenzierung sind HSPs an der Faltung neu synthetisierter Proteine, der Zusammensetzung von Proteinkomplexen, dem intrazellulären Transport von Proteinen oder der Verhinderung der Denaturierung und/oder unspezifischen Aggregation von falsch gefalteten Proteinen sowohl unter physiologischen als auch unter Stressbedingungen beteiligt. Durch die Involvierung mehrerer Coproteine sind HSPs an der Modulation der Signaltransduktion einschließlich immunologischer Reaktionen und durch Zusammenarbeit mit dem Ubiquitinierungssystem an der Lenkung irreversibel geschädigte Proteine im proteasomalen Abbau beteiligt [377,378].

Auf der Grundlage ihrer vergleichbaren molekularen Masse und der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz werden HSPs in ihre entsprechenden Familien unterteilt, nämlich HSPB (kleine HSP), HSPA (HSP70), DNAJ (HSP40), HSPC (HSP90) und HSPH (HSP110). Der erste Name in der obigen Liste bezieht sich auf das neuartige Nomenklatursystem [379], das

Mehrdeutigkeiten bei der Benennung von HSPs eliminiert und vom *HUGO Gene Nomenclature Committee* (HGNC) akzeptiert wurde. Die Bezeichnung in Klammern entspricht den gebräuchlichen bzw. historischen Namen der großen HSP-Familien [380,381].

HSP27 wird auf dem HSPB1-Gen kodiert und gehört zu einer Familie von ATP-unabhängigen Chaperonen. Der Mechanismus seiner Substrate und die Chaperonfunktion sind im Vergleich zu anderen großen HSPs noch nicht vollständig untersucht worden. HSP27 ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden und spielt eine fundamentale Rolle in der Zellphysiologie bei verschiedenen Krankheitszuständen. Das Chaperon wird systemisch unter basalen Bedingungen exprimiert und durch oxidativen Stress [382], sowie in Krebszellen [383] hochreguliert. Es wird berichtet, dass HSP27 an der Zellresistenz gegen Stressfaktoren und Hitzeschock beteiligt ist, in dem unter anderem die sofortige und vorübergehende Phosphorylierung von HSP27 die Chemoresistenz in Prostata Krebszellen auslöst [384]. Die kleinen HSPs haben in den letzten Jahren zunehmend Aufmerksamkeit erhalten, vor allem aufgrund ihres Potenzials für protektive Ansätze. Aufgrund dessen wurde infolge dieser Arbeit sowohl die Expression von HSP27 als auch dessen Einfluss im Zusammenhang mit Cisplatinresistenzen genauer untersucht.

### 2.8.1 Struktur

Anhand von Röntgenanalysen konnte die kristalline Domäne von HSP27 nur zum Teil aufgeklärt werden, die gesamte Molekülstruktur ist aufgrund der Schwierigkeit, einen stabilen Kristall des oligomeren Proteins von HSP27 zu erhalten bisher noch unbekannt [385]. Das Chaperon besteht aus einem N-Terminus, einer WDPF-Domänenregion, eine  $\alpha$ -Kristallindomänenregion mit  $\beta$ -Blättern, sowie einen flexiblen und variablen C-Terminus. Es ist wahrscheinlich, dass HSP27 seine Struktur in Abhängigkeit je nach Bedingung verändert [386]. Die N-terminale Domäne enthält das WDPF-Motiv, welches für die Oligomerisierung entscheidend ist. Der WDPF-Domänenname wurde von den darin enthaltenen Aminosäureresten abgeleitet, darunter W (Tryptophan), D (Asparaginsäure), P (Prolin) und F (Phenylalanin). Die  $\alpha$ -Kristallinstruktur ist wichtig für die Oligomerisierung und Löslichkeit [387].

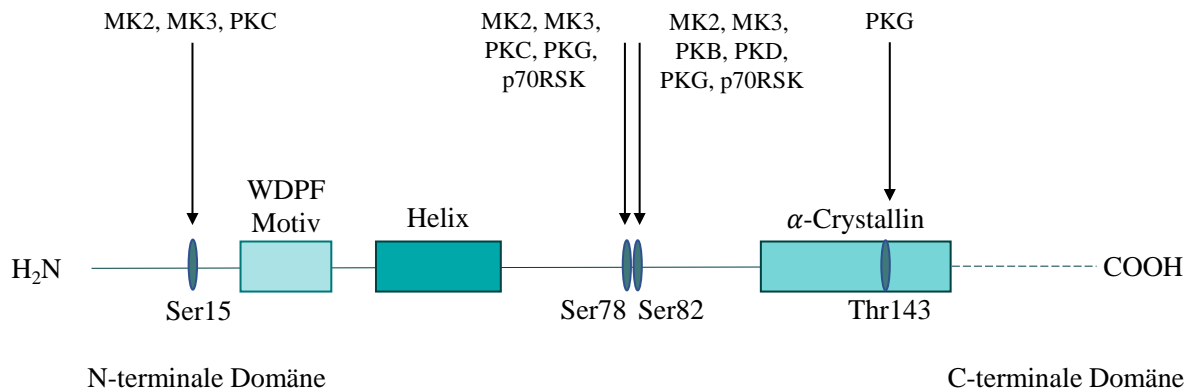


Abbildung 16: Schematischer Aufbau von HSP27; modifiziert nach Katsogiannou et al. [388].

## 2.8.2 Aktivierung von HSP27

Es hat sich gezeigt, dass das Phosphorylierungsgleichgewicht von HSP27 durch Signale reguliert wird, die Proteinkinasen und Phosphatasen aktivieren. HSP27 kann an drei Serinresten (Ser15, Ser78 und Ser82) und einem Threoninrest (Thr143) durch mehrere Kinasen aktiviert werden, darunter die MAPK-aktivierten Proteinkinase-2,-3,-5 (MK2, MK3, MK5), Proteinkinase (PK) B, C, D und G, sowie p38 MAPK und MAPKAP-K1 (ribosomale S6-Kinase; p70RSK) (siehe Abb. 16) [389,390]. Dabei scheint die Wahl der Kinase vom Zelltyp abhängig zu sein, d.h. von der Höhe der Kinase-Expression und dem aktivierten Signalweg. Obwohl zahlreiche Kinasen beschrieben wurden, die direkt oder indirekt mit HSP27 interagieren und/oder phosphorylieren, gibt es Kontroversen zu diesem Thema. Es hat sich gezeigt, dass die Hauptkinasen sehr wahrscheinlich MK2, MK5 und PKD sind [391].

Die Oligomerisierung von HSP27 wird durch Phosphorylierung reguliert. Wenn HSP27 nicht phosphoryliert wird, bildet es ein Oligomer. Die WDPF-Domäne ist für die Ausbildung der Oligomere besonders entscheidend [392], die wiederum aus stabilen Dimeren bestehen, die aus zwei  $\alpha$ -Kristallinen Domänen benachbarter Monomere gebildet werden [393]. Die Dimerisierung erfolgt durch Bildung des länglichen  $\beta$ -Strangs an der Oberfläche der  $\alpha$ -kristallinen Domäne. HSP27 kann Oligomere bis zu 1000 kDa bilden [388].

## 2.8.3 HSP27- Signalweg

Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass die Überexpression und/oder Phosphorylierung von HSP27 den Zellzyklus und damit die Zellproliferation reguliert. Dieser Vorgang scheint allerdings zellspezifisch zu sein. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes HSP27 den MEK/ERK-Signalweg durch einen Mechanismus hemmt, der

sowohl die Abschwächung der c-Raf-Aktivität als auch die Stimulierung der MAPK-Phosphatase-1 (MKP1) durch p38 MAPK einschließt, was zu einer signifikanten Senkung der Cyclin D1-Spiegel und damit zum Zellzyklus-Stillstand führt [394]. HSPs bilden einen wichtigen Regulator für EZM-Remodeling [395,396]. Einige Studien konnten eine Verbindung zwischen erhöhter HSP Expression und MMPs feststellen, sowie eine damit einhergehende verschlechterte Patientenprognose [397,398]. Vor kurzem konnten Rajesh et al. eine gemeinsame Interaktionsstelle von HSP27 sowohl für MMP2 als auch für MMP9 bestätigen [399]. Die zytoprotektiven Eigenschaften von HSP27 ergeben sich unter anderem aus seiner Fähigkeit, den Glutathionspiegel zu erhöhen [400,401]. Darüber hinaus kann HSP27 der Apoptose vorbeugen, indem es Bax inaktiviert [402,403]. Außerdem interagiert HSP27 mit den äußeren mitochondrialen Membranen und stört die Aktivierung des Cytochrom c/Apaf-1/dATP-Komplexes, wodurch die Aktivierung von Procaspase-9 inhibiert wird [400]. Diese Zusammenhänge werden in der späteren Diskussion der Arbeit wieder aufgegriffen.

### **3 Ziele dieser Arbeit**

Die Resistenzbildung von Tumoren gegen antineoplastische Medikamente bildet das Haupthindernis der klinischen Behandlung von Krebserkrankungen und unterstreicht die dringende Notwendigkeit, innovative Therapien zu entwickeln. Damit kommt der Identifizierung und Untersuchung fehlregulierter Signalwege für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte eine große Bedeutung zu. Ein Ziel dieser Promotionsarbeit besteht darin, einen Einblick in die bisher unbekanntenen molekularen Mechanismen der intrinsisch bedingten Cisplatinresistenz von W1CR Zellen zu ermöglichen.

Im Hinblick auf die umweltvermittelte Kommunikation von Krebszellen gilt CAM-DR als wichtiger initialer Mechanismus, um durch eine schnelle, nicht genetisch begünstigte Anpassung, der Apoptose zu entgehen. Die der CAM-DR zugrundeliegenden Mechanismen und die Frage ob und wie dieses Phänomen mit anderen resistenzbildenden Prozessen interferiert, sind bisher unzureichend aufgeklärt. Um die Relevanz und die zugrundeliegenden Vorgänge der CAM-DR in Ovarialkarzinomzellen zu analysieren, untersucht die vorliegende Dissertation die Rolle der Collagenbindung in W1 Ovarialkarzinomzellen im Hinblick auf die Cisplatinresistenz. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin aufzuklären, inwieweit die CAM-DR einen zusätzlichen unabhängigen Prozess oder einen integrierten Teil einer bereits bestehenden Cisplatinresistenz darstellt.

Die Intention dieses Projekts besteht darin, einen Beitrag zur Charakterisierung des Resistenzprofils von Ovarialkarzinomzellen zu leisten, mit dem Zweck neue Angriffspunkte für Sensitivierungsansätze von Krebszellen in einem früheren Stadium der Resistenzbildung zu erschließen.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien und Ausgangsstoffe

##### 4.1.1.1 Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
AlamarBlue™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Argon	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
BacilloI® AF	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Bovines Serum-Albumin, BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CASY®ton	Schärfe Systems GmbH, Reutlingen
Cell Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific inc., Waltham, Massachusetts, USA
CellTiter-Fluor™	Promega GmbH, Mannheim
Cisplatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Clarity™ ECL Western Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Collagen I (Rattenschwanz)	Corning, New York, USA
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid, MTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
DPBS ohne Calcium und Magnesium, steril	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, Schwalbach
Fötales Kälberserum F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutathione Fluorescent Detection Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Helium	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
Isopropanol 100%	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Kohlenstoffdioxid	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
Kupfersulfat-pentahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Laemmli-Probenpuffer, 2× Konzentrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Laemmli-Probenpuffer, 4×Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

---

Mangan(II)chlorid	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Melsept® SF	B. Braun AG, Melsungen
Methanol 99,9%	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcarbonat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Grüssing GmbH, Filsum
Natriumhydroxid	Grüssing GmbH, Filsum
Natronlauge (1M)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific inc., Darmstadt
Polybrene®	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Precision Plus Protein™ Unstained Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array Kit	R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK
Puromycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti®-CELL PBS/EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI-1640® Nährmedium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Salpetersäure 65%	VWR International GmbH, Darmstadt
Salpetersäure 65% Suprapur®	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Salzsäure, (1M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
siRNA Transfection Medium	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
siRNA Transfection Reagent	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
5-Sulfosalicylic acid dihydrate	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
TRIS-Base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung 0,25%	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Tween™ 20	AppliChem GmbH, Darmstadt

---

#### 4.1.1.2 Transfektionssysteme

Transfektionssystem	Hersteller
Integrin $\beta 1$ siRNA (h), shRNA und Lentivirale Partikel Gen Silencer Reagenzien	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Control shRNA Lentiviral Particles-A	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
HSP 27 siRNA (h)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Control siRNA-A	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

#### 4.1.1.3 Inhibitoren

Bezeichnung	Zielstruktur	Hersteller
BEZ235 (Dactolisib)	Dualer PI3K (p110 $\alpha$ , p110 $\gamma$ , p110 $\delta$ , p110 $\beta$ ) und mTOR (mTORC1, mTORC2) Inhibitor.	Selleck Chemicals, München
FAK 14 Inhibitor	Y397 Autophosphorylierungs- Stelle der FAK	Cayman Chemicals, Michigan, USA
ILK-Inhibitor (cdp22)	Inhibierung der ILK vermittelten Phosphorylierung von AKT an Ser473	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
LY294002	Hemmung von PI3K an den Untereinheiten: p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ und p110 $\delta$	Abcam, Cambridge, UK
Rapamycin	Spezifische Inhibierung von mTORC1 durch FKBP12	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
SCH772984	ERK 1/2 Inhibition durch Inhibierung der Phosphorylierung des ERK Substrates p90 ribosomal S6 kinase	Selleck Chemicals, München
U0126	Allosterischer Inhibitor von MEK 1/2	Hycultec GmbH, Beutelsbach
666-15	Inhibiert die Bindung von CREB an das CREB Binde- protein (CBP)	Hycultec GmbH, Beutelsbach

**4.1.1.4 Primäre Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Epitop</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Hersteller</b>
AKT-1 (C-20)	Gesamter C-Terminus von AKT1	Ziege, polyklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
pAKT1 (Thr308)	Thr308 der Phosphorylierungsstelle von AKT1	Kaninchen, polyklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
β-Aktin (C4)	Volle Länge von β-Aktin aus dem Muskelmagen des Vogels (alle Isoformen)	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
mIgGκ BP	Maus-IgGκ Leichtketten	Bindungsprotein, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Caspase-3	Aminosäuren 29-175 des humanen Caspase-3	Maus, monoklonal, IgG <sub>2B</sub>	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Caspase-9	Aminosäuren 1-134 des humanen Caspase-9	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
CREB (D-12)	Aminosäuren 254-327 des humanen CREB	Maus, monoklonal IgG <sub>2a</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
pCREB (10E9)	Ser133 der Phosphorylierungsstelle von CREB	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
CTR1 (FL-190)	Aminosäuren 1-190 des humanen CTR1	Maus, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
DDR1 (D1G6)	Aminosäuren die den Pro600 Terminus der humanen DDR1 umgeben	Kaninchen, monoklonal IgG	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
p-DDR1 (Tyr513)	Tyr513 der Phosphorylierungsstelle von DDR1	Kaninchen, monoklonal IgG	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
ERK-1/2	Gesamter C-Terminus von ERK1 und ERK2	Kaninchen, polyklonal, IgG <sub>1</sub>	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
p-ERK-1/2 (E-4)	Tyr204 der Phosphorylierungsstelle von ERK1/2	Maus, monoklonal IgG <sub>2a</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
FAK (C-20)	Gesamter C-Terminus von FAK	Kaninchen, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

## Material und Methoden

pFAK (2D11)	Tyr397 der Phosphorylierungsstelle von FAK	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
GAPDH (GT239)	Gegen eine zentrale Region des humanen GAPDH	Maus, monoklonal, IgG <sub>2b</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
p-GSK-3 $\beta$ (Ser9)	Ser9 der Phosphorylierungsstelle von GSK-3 $\beta$	Ziege, polyklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
HSP27 (F-4)	Aminosäuren 32-108 der humanen HSP27	Maus, monoklonal, IgG <sub>2a</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
p-HSP27 (B-9)	Ser82 der Phosphorylierungsstelle von HSP27	Maus, monoklonal, IgG <sub>2b</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
ILK (N1C1)	Gegen eine zentrale Region der humanen ILK	Kaninchen, polyklonal, IgG	Gene Tex Inc., Irvine, USA
$\beta$ 1-Integrin (P5D2)	$\beta$ 1 Untereinheit humaner Keratinozyten	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
JNK (D-2)	Aminosäuren 1-424 der humanen JNK	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
p-JNK (29.Thr 183/Tyr 185)	Thr183 und Tyr185 der Phosphorylierungsstellen von JNK	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
p-MAPKAPK-2 (83.Thr 334)	Thr334 der Phosphorylierungsstelle von MAPKAPK-2	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
p-MEK-1/2 (7E10)	Aminosäuren der T-E-Y Sequenz	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
MMP2 (8B4)	Gegen aktiviertes rekombinantes MMP2 humanen Ursprungs	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
MMP9 (2C3)	Aminosäuren 603-614 der humanen MMP9	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
MRP2 (G-1)	Aminosäuren 212-236 der humanen MRP2	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
mTOR (30)	Aminosäuren 185-290 des humanen mTOR	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

p-mTOR (59.Ser 24489)	Ser2448 der Phosphorylierungs- stelle von mTOR	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
p38 $\alpha$ (9F12)	Gegen gesamtes p38 $\alpha$ gerichtet	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
p-p38 (E-1)	Tyr182 der Phosphorylierungs- stelle von p38 $\alpha$	Maus, monoklonal, IgG <sub>2a</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
PI3K p85 $\alpha$ (Z-8)	Aminosäuren 333-430 der humanen PI3K p85 $\alpha$	Kaninchen, polyklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
p-PI3K p85 $\alpha$ (Tyr508)	Tyr-508 der Phosphorylierungs- stelle von PI3K p85 $\alpha$	Ziege, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
PTEN (A2B1)	Aminosäuren 388-400 des humanen PTEN	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
pPTEN (H-3)	Ser380 der Phosphorylierungs- stelle von PTEN	Maus, monoklonal, IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

#### 4.1.1.5 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Epitop	Eigenschaften	Hersteller
Donkey F(ab') <sub>2</sub> Anti Goat IgG	Ziegen-IgG Leichtketten	Esel, polyklonal, F(ab') <sub>2</sub> Fragment, Alexa Fluor488	Abcam plc, Cambridge, UK
Donkey Anti Rabbit IgG	Kaninchen-IgG	Esel, polyklonal, Alexa Fluor405	Abcam plc, Cambridge, UK
Donkey Anti Goat IgG	Ziegen-IgG	Esel, polyklonal, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Goat Anti Rabbit IgG	Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
mIgG $\kappa$ BP	Maus-IgG $\kappa$ Leichtketten	Bindungsprotein, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

## 4.1.2 Hergestellte Reagenzien

### 4.1.2.1 Antikörperverdünnungen Western Blot

Antikörperverdünnung/-stammlösung	Zusammensetzung	
AKT-1 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	AKT (C-20)	50 µL
	TBS-T	10 mL
pAKT1 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	pAKT1 (Thr308)	50 µL
	TBS-T	10 mL
β-Aktin (1:200-1000)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	β-Aktin (C4)	10-50 µL
	TBS-T	10 mL
Caspase-3 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	Caspase-3	50 µL
	TBS-T	10 mL
Caspase-9 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	Caspase-3	50 µL
	TBS-T	10 mL
CREB (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	CREB (D-12)	50 µL
	TBS-T	10 mL
p-CREB (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	pCREB (10E9)	50 µL
	TBS-T	10 mL
CTR1 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	CTR1 (FL-190)	50 µL
	TBS-T	10 mL
DDR1	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	DDR1 (D1G6)	50 µL
	TBS-T	10 mL
p-DDR1	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-DDR1 (Tyr513)	50 µL
	TBS-T	10 mL
ERK-1/2 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	ERK-1/2	20 µL
	TBS-T	10 mL

p-ERK-1/2 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-ERK-1/2 (E-4)	20 µL
	TBS-T	10 mL
FAK	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	FAK (C-20)	50 µL
	TBS-T	10 mL
p-FAK	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-FAK (2D11)	50 µL
	TBS-T	10 mL
GAPDH (1:20000)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	GAPDH (GT239)	0,5 µL
	TBS-T	10 mL
pGSK-3β (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	pGSK3-β (Ser9)	50 µL
	TBS-T	10 mL
HSP27 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	HSP27 (F-4)	20 µL
	TBS-T	10 mL
p-HSP27 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-HSP27 (B-9)	20 µL
	TBS-T	10 mL
ILK (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	ILK (N1C1)	50 µL
	TBS-T	10 mL
β1-Integrin (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	β1-Integrin (P5D2)	50 µL
	TBS-T	10 mL
JNK (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	JNK (D-2)	20 µL
	TBS-T	10 mL
p-JNK (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-JNK (29.Thr 183/Tyr 185)	20 µL
	TBS-T	10 mL
p-MAPKAPK-2 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-MAPKAPK-2 (83.Thr334)	50 µL
	TBS-T	10 mL



## Material und Methoden

p-MEK-1/2 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-MEK-1/2 (7E10)	50 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL
MMP2 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	MMP2 (8B4)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL
MMP9 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	MMP9 (2C3)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL
MRP2	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	MRP2 (G-1)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL
mTOR (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	mTOR (30)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL
p-mTOR (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-mTOR (59.Ser 24489)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL
p38 $\alpha$ (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p38 $\alpha$ (9F12)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL
p- p38 $\alpha$ (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-p38 $\alpha$ (E-1)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL
PI3K (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	PI3K p85 $\alpha$ (Z-8)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL
p-PI3K (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-PI3K p85 $\alpha$ (Tyr508)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL
PTEN (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	PTEN (A2B1)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL
p-PTEN (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-PTEN (H-3)	20 $\mu$ L
	TBS-T	10 mL

mIgGκ BP (1:10000)	Magermilchpulver	1 g
	Anti-mouse Antikörper	1 µL
	Streptactin aus Precision Plus Protein™ WesternC™ Pack	0,5 µL
	TBS-T	20 mL
Sekundärer anti-goat Antikörper (1:10000)	Magermilchpulver	1 g
	Anti-goat Antikörper	1 µL
	Streptactin aus Precision Plus Protein™ WesternC™ Pack	0,5 µL
	TBS-T	20 mL
Sekundärer anti-rabbit Antikörper (1:10000)	Magermilchpulver	1 g
	Anti-rabbit Antikörper	1 µL
	Streptactin aus Precision Plus Protein™ WesternC™ Pack	0,5 µL
	TBS-T	20 mL

#### 4.1.2.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Agarose-Lösung 1,5 %	Agarose	0,40 g
	W1-Vollmedium	26,67 mL
BEZ235 (Dactolisib) Arbeitslösung (1 mM)	BEZ235	1 mg
	DPBS	ad 2,13 mL
BEZ235 (Dactolisib) Stammlösung (100 nM)	BEZ Stammlösung (1 mM)	0,42 µL
	DPBS	ad 4,20 mL
Blocking-Lösung	Magermilchpulver	5,0 g
	TBS-T	ad 100 mL
BSA-Lösung 0,5 %	BSA	0,25 g
	Natriumazid	0,05 g
	PBS-Puffer	50 mL
BSA-Lösung 1 %	BSA	0,50 g
	Natriumazid	0,05 g
	PBS-Puffer	50 mL
BSA-Lösung 3 %	BSA	1,50 g
	Natriumazid	0,05 g
	PBS-Puffer	50 mL
Cisplatin-Arbeitslösung AAS (10 µg/mL)	Cisplatin-Stammlösung (1mg/mL)	100 µL
	Purelab® Plus-Wasser	ad 10 mL
Cisplatin-Arbeitslösung MTT (1 mM)	Cisplatin-Stammlösung (5 mM)	0,20 mL
	DPBS	0,80 mL
Cisplatin-Stammlösung AAS (1 mg/mL)	Cisplatin	15,4 mg
	Purelab® Plus-Wasser	ad 10 mL

## Material und Methoden

Cisplatin-Stammlösung MTT (5 mM)	Cisplatin DPBS	15 mg ad 10 mL
Cisplatin-Standard AAS (50 ng/mL)	Cisplatin-Arbeitslösung AAS (10 µg/mL) Purelab® Plus-Wasser	250 µL ad 50 mL
Cisplatin Quailitätskontrolle AAS (10 ng/mL)	Cisplatin-Arbeitslösung AAS (10 µg/mL) Purelab® Plus-Wasser	50 µL ad 50 mL
Cisplatin Quailitätskontrolle AAS (20 ng/mL)	Cisplatin-Arbeitslösung AAS (10 µg/mL) Purelab® Plus-Wasser	100 µL ad 50 mL
Cisplatin Quailitätskontrolle AAS (40 ng/mL)	Cisplatin-Arbeitslösung AAS (10 µg/mL) Purelab® Plus-Wasser	200 µL ad 50 mL
Elektrodenpuffer	Elektrodenpuffer 10x Aqua millipore	100 mL ad 1000 mL
Elektrodenpuffer 10x	Glycin TRIS-Base SDS Aqua millipore	72 g 15 g 5 g ad 500 mL
FAK14 Inhibitor- Stammlösung (1 mM)	FAK 14 Inhibitor Purelab Plus®-Wasser	2,84 mg ad 10 mL
FAK14 Inhibitor- Arbeitslösung (10 µM)	FAK 14 Inhibitor- Stammlösung Purelab Plus®-Wasser	100 µL ad 10 mL
Glycin-Lösung (0,1 M)	Glycin PBS-Puffer	0,375 g 50 mL
ILK Inhibitor Stammlösung (1 mM)	ILK-Inhibitor DMSO	2,5 mg ad 4,515 mL
ILK Inhibitor Arbeitslösung (1 µM)	ILK-Stammlösung (1 mM) DPBS	10 µL ad 0,1 mL
Kryo-Medium	FKS DMSO	45 mL 5 mL
Luminol-Peroxidlösung	Clarity Western Peroxid- Reagenz Clarity Western Luminol- Reagenz	4 mL 4 mL
LY294002- Stammlösung (25 mM)	LY294002 DMSO	25 mg 3,254 mL
LY294002-Arbeitslösung (1,0 µM)	LY294002 Stammlösung (25 mM) DBPS	0,2 µL ad 5 mL
Lysepuffer	PMSF-Stammlösung (0,3 mol/L) Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X) Cell Extraction Buffer	34 µL 500 µL 10 mL

Mangan(II)chlorid-Stammlösung (100 $\mu$ M)	Mangan(II)chlorid Purelab Plus®-Wasser	0,629 mg ad 50 mL
Mangan(II)chlorid-Arbeitslösung (10 $\mu$ M)	Mangan(II)chlorid- Stammlösung (100 $\mu$ M) Purelab Plus®-Wasser	5 mL ad 50 mL
MTT-Reagenz (5 mg/mL)	MTT PBS-Puffer	50 mg ad 10 mL
Proteinstandard-Lösung (0,2 mg/mL)	BSA Aqua millipore	2 mg ad 10 mL
Puromycin 5 mg/mL	Puromycin DPBS	50 mg 10 mL
Salpetersäure (6,5 %)	Salpetersäure 65 % Purelab Plus®-Wasser	100 mL ad 1000 mL
SCH772984-Arbeitslösung (0,1 $\mu$ M)	SCH772984-Stammlösung DPBS	0,05 $\mu$ L ad 5 mL
SCH772984-Stammlösung (10 mM)	SCH772984 DMSO	5 mg 851 $\mu$ L
Selektionsmedium (Integrin $\beta$ 1 <i>knock down</i> )	Fötale Kälberserum F7524 Puromycin (2,75 $\mu$ g/mL) Penicillin/Streptomycin- Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL) RPMI Nährmedium	50 mL 152,6 $\mu$ L 5 mL 500 mL
5-Sulfosalicylic acid dihydrat (5 %)	5-Sulfosalicylic acid dihydrat Aqua Millipore	1 g ad 20 mL
TBS	TBS 10x Aqua Millipore	100 mL ad 1000 mL
TBS 10 $\times$	Natriumchlorid TRIS-Base Aqua Millipore pH-Einstellung mit 1 M Salzsäure auf 7,3	40 g 6,060 g ad 500 mL
TBS-T	TBS 10 $\times$ Tween™ 20 Aqua millipore	100 mL 2 mL ad 1000 mL
Transferpuffer	Transferpuffer 10 $\times$ Aqua millipore	100 mL ad 1000 mL
Transferpuffer 10x	Glycin TRIS-Base Aqua millipore	72g 15 g ad 500 mL
UO126-Arbeitslösung (5 $\mu$ M)	UO126-Stammlösung DPBS	0,42 $\mu$ L ad 5 mL
UO126-Stammlösung (58,6 mM)	UO126 DMSO	5,8 mg 1000 $\mu$ L

Vollmedium W1 und W1CR	Fötale Kälberserum F7524 Penicillin/Streptomycin- Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL) RPMI-1640® Nährmedium	50 mL 5 mL 500 mL
666-15-Arbeitslösung (1 µM)	666-15 DPBS	1 µL ad 10 mL
666-15-Stammlösung (10 mM)	666-15 DMSO	5 mg 806 µL

### 4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
CASY® cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CELLSTAR® 96 Well Platte, TC-behandelt, schwarz, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CytoOne® 96-Well-Platte, TC-behandelt	Starlab GmbH, Ahrensburg
CytoOne® 24-Well-Platte, TC-behandelt	Starlab GmbH, Ahrensburg
Deckgläser Stärke No. 1, eckig	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Einmalspritzen Injekt® Solo (10 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen Injekt® Solo (20 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Filterpapier 50/PKG, Mini T/B	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-PROTEAN® TGX™ stainfree	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gel-Pipettenspitzen MultiFlex Round	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
Graphitröhrchen, Omega platform tubes	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Kryoröhrchen PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroplatte, 96-Well, PS, V-Boden, klar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte, schwarz	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte, weiß	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Objektträger Stärke ca. 1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen (1-10 µL), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (1-200 µL), gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (101-1000 µL), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (5 mL) Plastibrand®, natur	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettier Reservoirs	Argos Technologies, Inc., Illinois, USA

Platinhohlkathodenlampe, UltraAA Lampe	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
Probenflaschen (2 mL), konisch	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
Reagiergefäße (0,6 mL)	Corning B.V.Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Reagiergefäße (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (2,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhrchen, 15 mL, PP, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, 50 mL, PP, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Roti <sup>®</sup> -PVD, 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturflaschen, 50 mL, 25 cm <sup>2</sup> , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 250 mL, 75 cm <sup>2</sup> , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 550 mL, 175 cm <sup>2</sup> , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 650 mL, 175 cm <sup>2</sup> , CELLCOAT Collagen Type I	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

#### 4.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Accu-Jet <sup>®</sup>	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Accu-Jet <sup>®</sup> 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
Analysenwaage Sartorius R160P	Sartorius AG, Göttingen
Autoclav Systec V-95	Systec, GmbH; Linden
Autosampler PSD 100	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
ChemiDoc <sup>™</sup> XRS+ System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CO <sub>2</sub> -Inkubator MCO-170 AIC (UV)	Panasonic Healthcare Co., Kadoma, Japan
Folienschweißgerät Sealboy 236	Audion Electro Verpackungsmaschine GmbH; Kleve
Graphitrohratomisator GTA 100	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Heizplatte ARE Heating magnetic stirrer	VELP scientifica; Usmate Belate, Italien
Inkubationshaube TH 15	Edmund Brühler GmbH, Hechingen
Laborschüttler KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen

---

Laminar-Air-Flow-Werkbank Heraeus Herasafe HSP 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Laminar-Air-Flow-Werkbank Holten safe 2010	Heto-Holton A/S, Allerød, DK
Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Lichtmikroskop Wilovert 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Lichtmikroskop Wilovert Standard HF/K	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer RCT basics	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Mehrfachdispenser HandyStep® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Mehrfachdispenser HandyStep® electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (10 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (50 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (100 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (250 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (500 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Blotting Module mit PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg
Multiskan® EX	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold
Multiwellreader FLUOstar™ OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Offenburg
PARAFILM® M	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
pH-Meter S20 SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Pinzetten, diverse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipette (1-5 mL) Finnpipette®	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Pipette (10 µL) Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (100 µL) Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (1000 µL) Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (10 µL) Ranin	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (100 µL) Transferpette® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (200 µL) Transferpette® S-12	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (200 µL) Transferpette®-12 electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Purelab® Plus Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle
Purelab® Flex Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle
Schüttelinkubator Unimax® 1010	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Spatel, diverse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Spektrometer SpectrAA® Zeeman 220	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt

---

---

Steri-Cycle® CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Thermomixer comfort (IsoTherm 1,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank 60°C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Ultraschallbad Sonorex® Super RK 103 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vortex-Genie 2	Scientific industries, New York, USA
Zellzähler CASY® 1 Model TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge Micro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

---

### 4.1.5 Software

---

Bezeichnung/Version	Urheber
2010 Microsoft:	© Microsoft Corporation 2010
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microsoft Office Excel v14.0.7190.5000</li> <li>• Microsoft Office Word v14.0.7190.5000</li> <li>• Microsoft Visio v14.0.7188.5002</li> </ul>	
Ascent Software™ v2.6	© Thermo LabSystems Oy 1996-2002
Image Lab v6.0	© Bio-Rad Laboratories 2010
Optima v.2.20R2	© BMG Laptech
Prism 5 for Windows v5.00	© GraphPad Software Inc. 1992-2007
Prism 5 for Mac v5.00	© GraphPad Software Inc. 1992-2007
SpectrAA 220Z, AA 240Z v5.1 PRO	©Varian Australia 1997-2006
ZEN 2012 v.1.1.2.0	© Carl Zeiss
Zotero 5.0.85	© Roy Rosenzweig Center for History and New Media

---



## 4.2 Zellkultur

Alle lebenden Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen *Laminar-Air-Flow* Werkbank durchgeführt. Um potentielle Kontaminationen zu vermeiden, wurde strikt auf sauberes und aseptisches Arbeiten geachtet. Alle verwendeten Materialien wurden hierfür vor jeder Verwendung für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden regelmäßig mit 70 % (V/V) Isopropanol gereinigt.

### 4.2.1 Zelllinien

Als Testsystem wurden für diese Dissertation die beiden humanen Ovarialkarzinomzellen W1 und die gegen Cisplatin resistente Zelllinie W1CR verwendet. Diese wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Januchowski vom Institut für Medical Science der Universität Posen zur Verfügung gestellt. Diese Tumorzelllinien wurden aus einem ovarialen Adenokarzinom einer unbehandelten Patientin etabliert. Die cisplatinresistente Zelllinie W1CR wurde durch wiederholte Exposition der W1-Zellen mit inkremental steigenden Cisplatinkonzentrationen generiert. Beide Zelllinien wachsen als *monolayer* adhärent in Zellkultur [404]. Des Weiteren wurden genetisch modifizierte Klone dieser beiden Zelllinien für diese Dissertation verwendet, nähere Informationen dazu sind in Kapitel 4.3 und 4.4 zu finden.

### 4.2.2 Inkulturnahme

Zur längeren Lagerung wurden *Back-ups* in einem Hochleistungsgefrierschrank aufbewahrt. Die entsprechenden Zelllinien wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und schnellstmöglich in 1 mL Zellkulturmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend in eine Zellkulturflasche (25 cm<sup>3</sup>) überführt, in der bereits 4 mL Medium vorgelegt waren. Um eine optimale Nährstoffversorgung zu gewährleisten, wurden die Zellen bei starker Konfluenz (ca. 80-90 %) in die nächstgrößere Zellkulturflaschen (75 cm<sup>3</sup>) überführt. Wenn der Zellrasen dicht genug war, kamen die Zellen in eine 175 cm<sup>3</sup> Zellkulturflasche, in der die entsprechende Weiterkultivierung stattfand.

### 4.2.3 Kultivierung

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen im Inkubator unter Standardbedingungen (37 °C, 80 – 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt). Als Nährmedium diente RPMI1640-Medium, dem 10 % FKS und 5 % Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt wurde. Alle drei Tage wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und durch neues Zellkulturmedium ersetzt. Zusätzlich wurde den W1CR Zellen 100 ng/mL Cisplatinlösung nach dem Splitten zum Zellmedium zugesetzt, damit die Zellen ihre Resistenz gegenüber Cisplatin beibehielten [404].

Durch lichtmikroskopische Kontrolle wurde das Wachstum, die Morphologie und die Vitalität überwacht. Außerdem enthielt das Medium Phenolrot als Indikator, der ebenfalls zur visuellen Kontrolle des Zellwachstums diente. War der Zellmonolayer zu mehr als 80 % belegt, so wurden die adhärenen Zellen abgelöst und nach Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche ausgesät, um so optimale Wachstumsbedingungen zu garantieren. Zunächst wurde das alte Medium entfernt und die Zellen daraufhin mit PBS-Puffer gewaschen. So konnten tote Zellen und trypsininhibierende Substanzen, wie beispielsweise Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen entfernt werden. Um die Zellen enzymatisch abzulösen, erfolgte eine kurze Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank (bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) für ca. 2 Minuten. Dabei wurde versucht eine längere Einwirkzeit der Trypsin-EDTA-Lösung möglichst zu vermeiden. Durch Klopfen der Zellkulturflasche erfolgte eine weitere Ablösung sowie eine Prüfung, inwieweit alle Zellen vollständig vom Flaschenboden gelöst wurden. Die Enzymreaktion wurde durch Medium Zugabe gestoppt, ebenso diente dieses Medium zum Spülen der Zellen vom Kulturflaschenboden. Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und zentrifugiert (bei 1640 rpm für 4 min und 4 °C). Anschließend konnte der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet in frischem Nährmedium resuspendiert werden. Diese Zellsuspension wurde entweder verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche überführt oder für weitere Versuche verwendet. Die Anzahl der jeweiligen Subkultivierungen der einzelnen Zelllinien wurde jeweils als Passage auf die neue Zellkulturflasche notiert. Alle Zellen wurden spätestens nach Passage 20 verworfen, damit sich die Zellen genetisch nicht zu weit vom Masterstock entfernten. Zusätzlich wurden alle Zellen in regelmäßigen Zeitabständen auf Mykoplasmen untersucht.

#### 4.2.4 Lagerung

Zur längeren Lagerung wurden sogenannte *Backup*'s aus Zellpellets mit möglichst niedriger Passagenzahl, die bei der Weiterkultivierung erhalten wurden, erstellt. Dafür wurden die Zellen wie unter Kapitel 4.2.3 beschrieben abgelöst und in Kryomedium, bestehend aus 90 % FKS und 10 % DMSO als Kryoprotektor resuspendiert und jeweils 1 Mio. Zellen/mL aliquotiert. Die Aliquots wurden in einem Hochleistungsgefrierschrank aufbewahrt. Durch schnelles Einfrieren bei -80 °C werden alle zellulären Prozesse gestoppt, es kommt durch das DMSO nur zur Ausbildung sehr kleiner Eiskristalle, die aufgrund der Größe nicht die Membran und Organellen zerstören. Eine endgültige Lagerung in der Gasphase eines Stickstofftanks wurde bei den W1 Zelllinien nicht vorgenommen, da sich dies negativ auf die Vitalität der Zellen ausgewirkt hätte.

#### 4.2.5 Zellzahlbestimmung

Für einige Experimente war eine bestimmte Zellzahl erforderlich, um reproduzierbare Bedingungen gewährleisten zu können. Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde das CASY<sup>®</sup>1-Zellzählgerät Model TT Cell Counter verwendet, welches auf dem Prinzip der Widerstandsmesstechnik basiert [405]. Innerhalb einer Messung wird über die Kapillare ein Spannungsfeld angelegt, in der die mit Elektrolyten gefüllte Kapillare einen definierten elektrischen Widerstand darstellt. Nach dem die Zellen aus der Probelösung in die Messkapillare aufgenommen werden, verdrängen diese, ihrem Volumen entsprechend, eine konkurrierende Menge an Elektrolyten. Das hat eine Widerstandsänderung innerhalb der Kapillare zur Folge, die sich proportional zum Volumen der Zellen verhält. Neben der absoluten Zellzahl kann das CASY<sup>®</sup> auch Angaben zur Größenverteilung der Zellpopulation darstellen. Tote Zellen werden vom Gerät erkannt und direkt separiert, da diese keine intakte Zellmembran besitzen und ihr Volumen dem eines Zellkerns entspricht. Mithilfe der definierten vitalen Zellzahl konnte das benötigte Volumen an Zellsuspension für die entsprechenden Versuche berechnet werden. Für die Zellzahlbestimmung wurden 20 µL Zellsuspension in 10 mL sterilfiltrierter Casy<sup>®</sup>ton-Lösung versetzt (Verdünnung 1:500) und vermessen.

### 4.3 Lentivirale Transduktion

Als stabile Transduktion wird eine Methode der Molekularbiologie bezeichnet, mit Hilfe derer es möglich ist ein Fremd-Gen stabil in das Genom einer Wirtszelle einzuführen. Bei diesem Vorgang wird die fremde DNA über einen viralen Vektor in eine Säugetierzelle eingebaut

[406]. In der vorliegenden Dissertation wurde diese Methode genutzt um das  $\beta$ 1-Integrin-Gen und die damit verbundene Proteinexpression zum Erliegen zu bringen. Hierfür wurden modifizierte Lentiviren eingesetzt, die aus Sicherheitsgründen nicht in der Lage sind sich zu replizieren. Damit ein Lentivirus das zu untersuchende Fremd-Gen in eine Zelllinie transportieren kann, muss dieses Gen zunächst in einen viralen Vektor eingebaut werden. Diese Vektoren besitzen noch alle erforderlichen Genelemente, um in der Wirtszelle Kopien des viralen Genoms herzustellen und den Einbau in das Zellgenom zu gewährleisten. In der Regel enthält die eingebaute Gensequenz zahlreiche Kopien des gewünschten DNA-Abschnitts, um ein verhältnismäßig hohes Niveau der Ziel-RNA zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit eine *small hairpin* RNA (shRNA) verwendet, die gegen die  $\beta$ 1-Integrin Gensequenz gerichtet ist. Die shRNA ist ein künstliches doppelsträngiges RNA-Molekül, welches im Wirtsgenom angekommen je nach Promotor, durch Polymerase II oder Polymerase III im Zellkern transkribiert wird. Das Produkt ahmt pri-micro-RNA (pri-miRNA) nach und wird von Drosha (eine Ribonuklease Enzym) weiterverarbeitet. Die resultierende Pre-shRNA wird von Exportin 5 aus dem Kern transportiert. Im Zytoplasma schneidet anschließend Dicer (eine Helikase mit RNase-Motiv) aus der Pre-shRNA kleine, doppelsträngige RNA-Stücke heraus, die typischerweise am 5'-Ende eine Phosphatgruppe tragen und am 3'-Ende um zwei Basen überstehen. Die kurzen RNA-Fragmente werden siRNAs genannt. Die siRNAs werden dann von einem weiteren Enzymkomplex *RNA-induced silencing complex* (RISC) gebunden. Der RISC entwindet den siRNA-Doppelstrang in zwei einzelsträngige RNAs. Der *sense*- (Passagier)-Strang wird abgebaut, während RISC mit dem *antisense*- (Leit)-Strang nach komplementären mRNA-Sequenzen in der Zelle sucht. Im Fall einer perfekten Komplementierung spaltet RISC die mRNA. Im Fall einer unvollkommenen Komplementierung unterdrückt RISC die Translation der mRNA. Beides führt zu einer unterdrückten Proteinexpression des Zielproteins.

In dieser Arbeit ist die produzierte Leit-siRNA komplementär zu der mRNA, die das  $\beta$ 1-Integrin Protein kodiert, und hemmt somit dessen Translation. Dieser Vorgang wird auch „*Silencing-Effekt*“ bezeichnet, weil es die Proteinmenge an  $\beta$ 1-Integrinen senkt. Die Zellen weisen anschließend ein Phänotyp auf, der einem *knock-out* ähnelt. Da mit dieser Technologie oft nur eine partielle Unterdrückung eines Gens erreicht wird, hat sich in Anlehnung an den Begriff *knock-out* der Begriff *knock-down* für die shRNA abhängige Genunterdrückung etabliert.

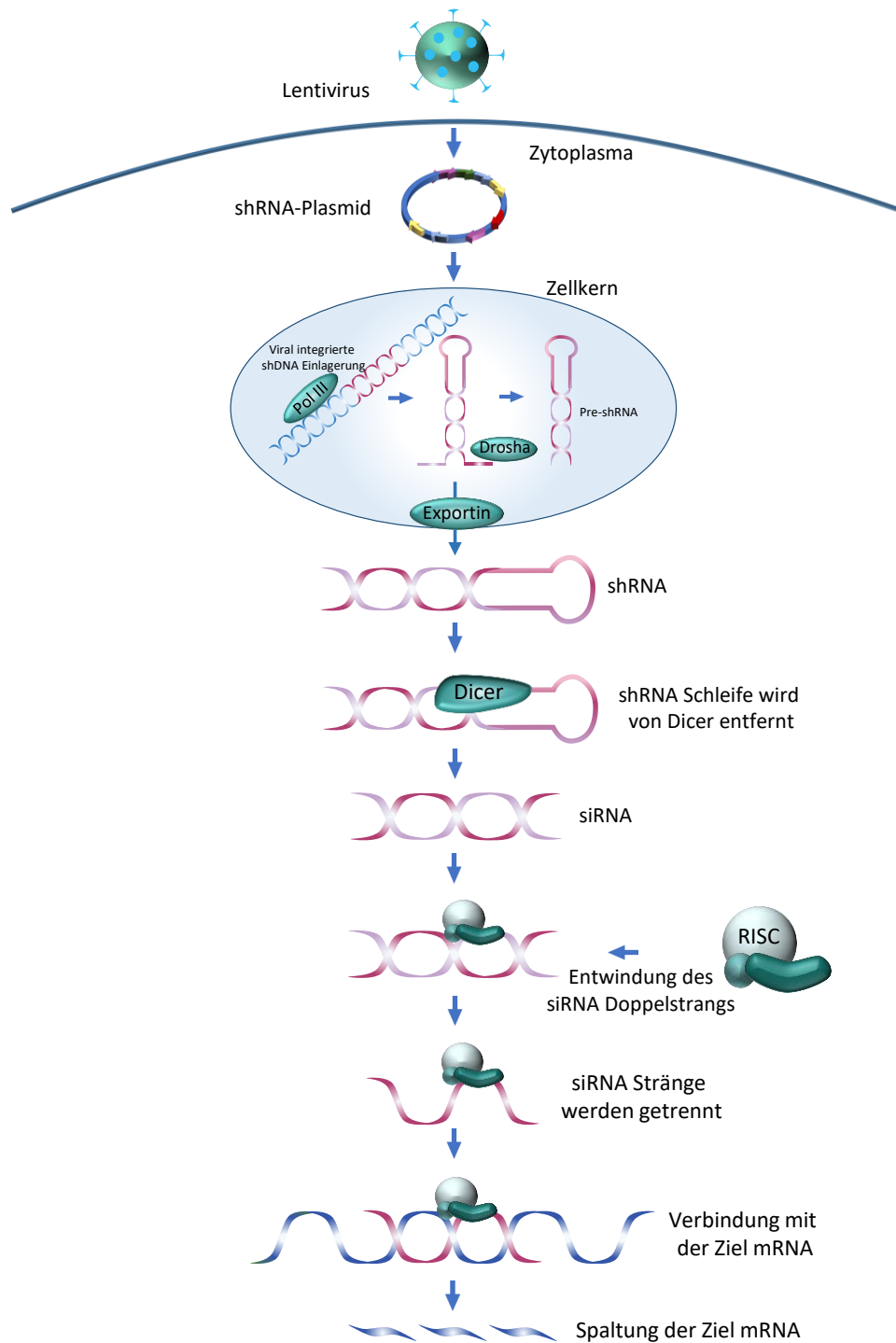


Abbildung 17: Prinzip der lentiviral-vermittelten shRNA Zelltransduktion.

Zur Selektion stabil transduzierter Zellen muss der eingesetzte virale Vektor einen Resistenzgenmarker besitzen, der in der erfolgreich transduzierten Zelle exprimiert wird. Bei Verwendung eines spezifischen Selektionsmediums über mehrere Zellteilungszyklen hinweg können nur Zellen überleben, die das Resistenzgenprodukt permanent exprimieren, während Zellen ohne Resistenzgenprodukt abgetötet werden. Der hier verwendete Vektor enthält bspw. codierende Abschnitte für eine Puromycinresistenz. Puromycin ist ein Nucleosid-Antibiotikum und hemmt die Translation, indem es eine verfrühte Termination einleitet. Die transduzierten

Zellen können ein zusätzliches Enzym – die Puromycin-N-Acetyltransferase (PAC) – produzieren, wodurch es diesen Zellen möglich ist Puromycin abzubauen. Deshalb kann über ein puromycinhaltiges Medium (Selektionsmedium) gewährleistet werden, dass die Zellen ihre transduzierten Eigenschaften nicht verlieren. Der Selektionsdruck zwingt die Zellen die eingeschleuste DNA zu bewahren, obwohl der Aufenthalt von Fremd-DNA für die Zellen eine Stresssituation darstellt.

Darüber hinaus wurden beide Zelllinien mit viralen Partikeln transduziert, die identisch zu den *knock-down* Vektoren sind, mit dem Unterschied, dass diese eine *scramble*-Sequenz kodieren. Die *scramble*-Sequenz führt zu einer siRNA ohne Funktion. Diese zusätzliche Transduktion ist wichtig, da bei einer stabilen Transduktion die eingeschleuste DNA in das Genom der Zelllinie integriert wird und normalerweise nur wenig Einflussmöglichkeiten bestehen, wo genau die fremde genetische Information im Genom tatsächlich eingesetzt wird, da dies ein zufälliger Prozess ist. So besteht auch immer die Gefahr, dass durch die Integration der gewünschten DNA ein chromosomales Gen getroffen und damit inaktiviert wird. Somit wird die Wahrscheinlichkeit für Insertionsmutagenesen erhöht. Die *scramble* siRNA schließt potenziell irreführende Effekte aus, die durch die Transduktion selbst und nicht durch den  $\beta$ 1-Integrinen *knock-down* entstehen.

### **4.3.1 Ermittlung der Puromycin Konzentration**

Es ist wichtig, dass vor Beginn der Transduktion die Puromycin Toxizität für die jeweilige Zelllinie bestimmt wird. Zu diesem Zweck wurde eine *Killcurve* erstellt. Die Zellen wurden dafür zunächst in einer 24-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von Puromycin in aufsteigenden Konzentrationen (0,25 - 10  $\mu\text{g/mL}$ ). Das Wachstum der Zellen wurde in den nächsten 7 Tagen mikroskopisch beobachtet, um auf diese Weise eine optimale Antibiotika Konzentration zu ermitteln. Darunter wird die niedrigste Puromycin Konzentration verstanden, die in der Lage ist, alle Zellen abzutöten. Darüber hinaus ist es möglich, zwei weitere Punkte zu bestimmen. Zum einen die minimale Dosis, damit ist eine Konzentration gemeint, die so gut wie keinen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Zum anderen die maximale Dosis, die bereits innerhalb der ersten 3 Tage alle Zellen abtötet. Die optimale Dosierung betrug sowohl für die W1 als auch für die W1CR Zellen 2,75  $\mu\text{g/mL}$  Puromycin. Alle transduzierten Zellen wurden dementsprechend in Selektionsmedium kultiviert (W1/W1CR Vollmedium mit Puromycin 2,75  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 4.3.2 $\beta$ 1-Integrin-Transduktion der W1 und W1CR Zellen

Zu Beginn der Transduktion wurden W1 und W1CR Zellen (mit niedriger Passagenzahl) in einer Dichte von  $1 \times 10^3$  Zellen/Well in einer 96-Well Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde zunächst das komplette Zellmedium abgesaugt und danach durch 100  $\mu$ L frisches Medium zuzüglich 4  $\mu$ g/mL Polybrene<sup>®</sup> ersetzt. Polybrene<sup>®</sup> ist der kommerzielle Handelsname für Hexadimethrinbromid, welches dazu verwendet wird, um die Effizienz der Transduktion zu erhöhen [407]. Bei der Substanz handelt es sich um ein kationisches Polymer, das die Ladungsabstoßung zwischen Virionen und Sialinsäure auf der Zelloberfläche neutralisiert [408].

Die erste Reihe der Wells jeder Probe diente zur späteren Kontrolle der Puromycin Selektivität. Hier wurde zunächst normales Vollmedium ohne weitere Zusätze verwendet. In der zweiten Wellreihe folgte eine Zugabe des eben genannte Polybrene<sup>®</sup> haltigen Mediums, damit ein toxischer Einfluss der Substanz ausgeschlossen werden konnte. Die Dritte Wellreihe wurde ebenfalls mit Polybrene<sup>®</sup> haltigem Medium versorgt. Im Anschluss wurden die Viruspartikel aufgetaut, resuspendiert und 4  $\mu$ L des Integrin  $\beta$ 1 shRNA (h) lentiviralen Partikels wurde den entsprechenden Wells der dritten Reihe hinzugefügt. In zwei weiteren Wells für W1 und W1CR Zellen wurden ebenfalls 4  $\mu$ L der Kontroll shRNA lentiviralen Partikels-A zu den Zellen pipettiert (siehe Abb. 18). Da die Lentiviren nicht mehr replikationsfähig sind, ist es notwendig, die Zellen mit einem Überschuss an Viruspartikeln zu inkubieren, um auf diese Weise eine ausreichende Integration der Gensequenz in die Ovarialkarzinomzellen zu gewährleisten [406]. Nach 24 h Inkubationszeit wurde das Medium mit den überschüssigen infektiösen Viren vorsichtig abpipettiert und erneut für einen weiteren gleichen Transduktionsansatz verwendet (Wellbezeichnung: Tag 2). Alle weiteren Wells wurden abgesaugt und auf Selektionsmedium umgestellt. Die Zugabe von Puromycin führte zur Selektion stabiler Klone.

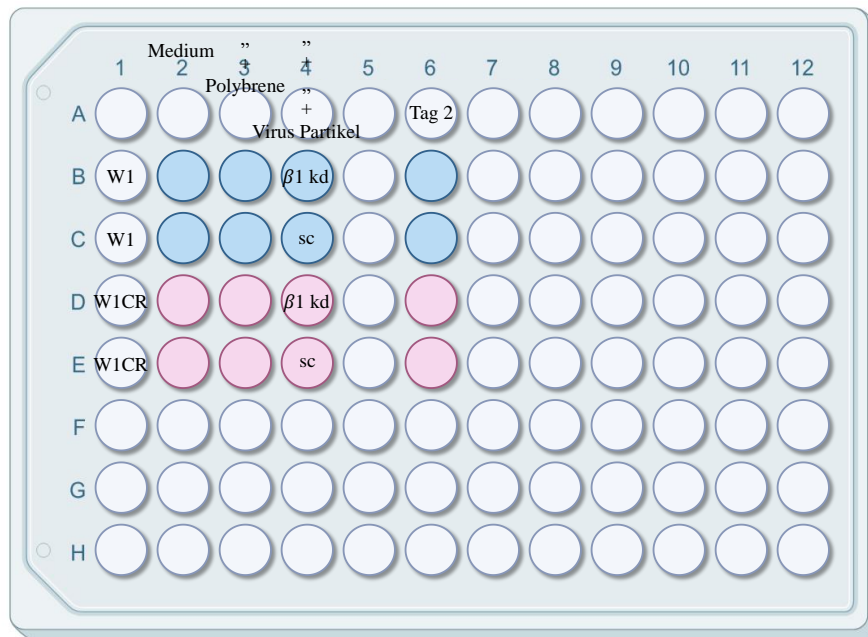


Abbildung 18: Pipettierschema einer 96-Well-Platte für die Transduktion von W1 und W1CR Zellen.

Über einen Zeitraum von einem Monat wurden die Zellen weiter kultiviert und bei ausreichender Konfluenz in größere Wachstumsplatten bis hin zu den üblichen Zellkulturflaschen überführt. Sobald eine Probe die Zellzahl von ca.  $10^6$  erreicht hatte, wurden schnellstmöglich *Back up*'s für eine langfristige Lagerung erstellt. Außerdem wurden die Zellen nie länger als bis zur Passage 15 kultiviert und verwendet. Die Polybren<sup>®</sup> Kontrollen (2. Reihe) wuchsen im Vollmedium analog zu normalen Zellen. Wie erwartet starben die Puromycin Kontrollen (1. Reihe) noch innerhalb der ersten Woche. Mit den nach Transduktion erhaltenen W1  $\beta$ 1 kd, W1 scramble, W1CR  $\beta$ 1 kd und W1CR scramble wurden einem erneuten Versuch die Puromycin *Killcurves* bestimmt, wobei die optimalen sowie maximalen Dosierungen unverändert blieben.

#### 4.4 *Small-interfering* RNA Transfektion

Eine Fremd-RNA lässt sich auf unterschiedlichen Wegen in Zellen einbringen. Bei Transfektionstechniken wird die RNA direkt von Säugerzellen aufgenommen [406]. Bei der transienten Transfektion wird die eingeschleuste Fremd-RNA in der Zelle weder als Plasmid repliziert, noch wird sie stabil ins Genom integriert. Vielmehr liegt sie über einen begrenzten Zeitraum als Fremd-RNA in der Zelle vor. Deshalb ist der „*Silencing*-Effekt“ nur für einen kurzen Zeitraum stabil. Danach kehrt die Zelle zum Wildtyp-Phänotyp zurück, weil die siRNA mit der Zeit abgebaut wird. Aufgrund dessen mussten die Zellen zwei Tage nach erfolgter Transfektion für die jeweiligen Versuchsdurchführungen geerntet und analysiert werden.



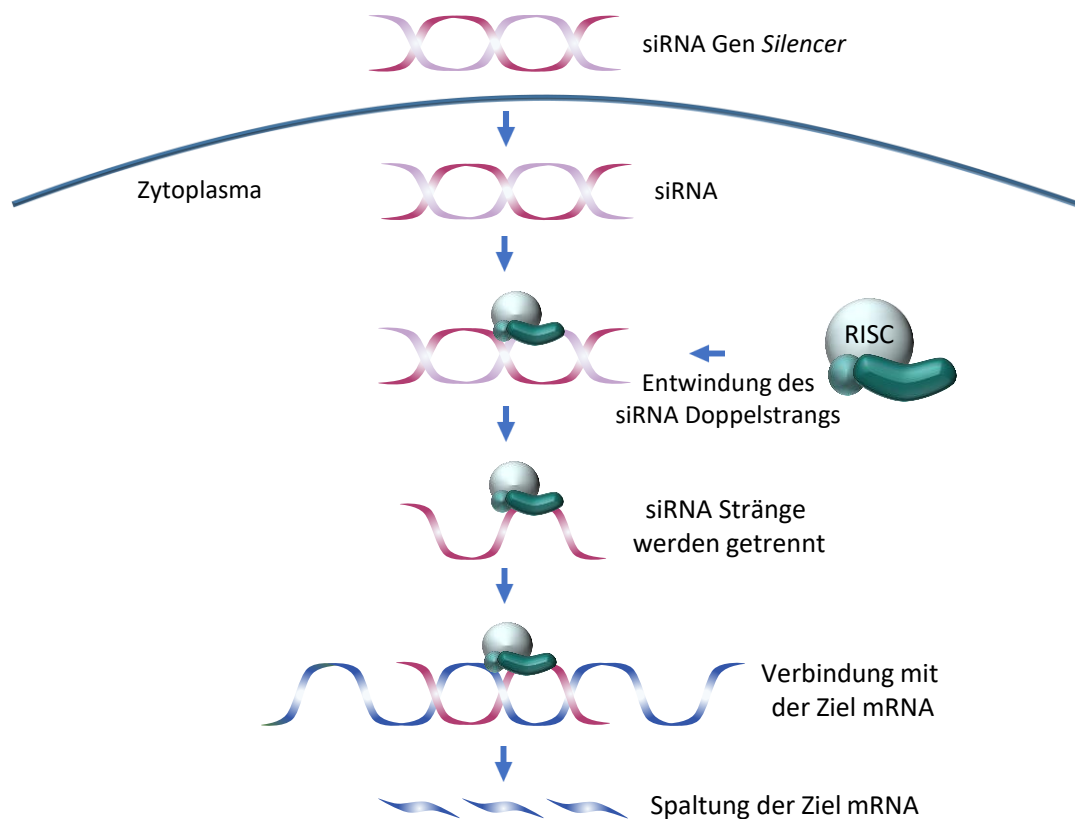


Abbildung 19: Prinzip der siRNA vermittelten Zelltransfektion.

In unserem Fall wurde die Expression von HSP27 unterdrückt, indem eine HSP27-siRNA mit den genspezifischen Sequenzen über eine liposomenvermittelte Transfektion in die Zelle transportiert wurde. Diese Methode beruht darauf, dass nach Mischung von siRNA und Liposomen (die kationische und neutrale Lipide enthalten) die negativ geladenen Phosphatgruppen der siRNA-Moleküle mit der positiv geladenen Oberfläche der Liposomen interagieren. Wahrscheinlich interagieren die restlichen, freien positiven Ladungen auf den Lipiden mit Sialinsäureresten der Zelloberflächen und bringen so die siRNA an die Zielzelle heran. Die Aufnahme der Zellen erfolgt daraufhin durch Endozytose oder durch das Verschmelzen der Liposomen mit der Zellmembran. Analog zu dem in Kapitel 4.3 beschriebenen Vorgang wird die siRNA von RISC gebunden. Der RISC entwindet den siRNA-Doppelstrang und sucht dann mit jeweils einem der beiden RNA-Einzelstränge nach komplementären mRNA-Sequenzen in der Zelle. Werden solche komplementären mRNA-Sequenzen identifiziert, wird diese mRNA durch RISC abgebaut. Somit steht die mRNA nicht mehr für die Proteintranslation zur Verfügung, d.h. die Menge des von der mRNA codierten Proteins in der Zelle nimmt ab. Es handelt sich bei dieser siRNA somit um eine posttranslationale *down*-Regulation der Proteinexpression.

#### 4.4.1 HSP27 Transfektion von W1 und W1CR Zellen

Für die Transfektion wurden beide Zelllinien (mit niedriger Passagenzahl) in einer 6-Well Platte in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesät. Nach einer Inkubation über Nacht bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  hatte der Zellrasen eine Konfluenz von ca. 60-80 % erreicht. Alle verwendeten Lösungen wurden gemäß dem *siRNA Transfection Protocol* von Santa Cruz Biotechnology hergestellt. Für jeden Transfektionsansatz wurden  $6\text{ }\mu\text{L}$  HSP27-siRNA oder unkonjugierte Kontroll-siRNA-A in  $100\text{ }\mu\text{L}$  Transfektionsmedium mit  $6\text{ }\mu\text{L}$  Transfektionsreagenz in weiteren  $100\text{ }\mu\text{L}$  Transfektionsmedium gemischt. Diese Mischung wurde  $30\text{ min.}$  bei RT inkubiert. Anschließend wurde dieses siRNA-Transfektionsreagenzgemisch für jeden Ansatz nochmals mit  $0,8\text{ mL}$  Transfektionsmedium versetzt. Nach vorsichtigem Vortexen wurde die fertige Mischung auf die zuvor mit  $2\text{ mL}$  siRNA-Transfektionsmedium gewaschenen Zellen gegeben. Nach erneuter Inkubation über Nacht wurde  $1\text{ mL}$  Medium mit  $20\%$  FKS und  $2\%$  Antibiotikaanteil ergänzend für weitere  $24\text{ h}$  zu den Zellen gegeben, ohne dabei das Transfektionsgemisch zu entfernen. Am darauffolgenden Tag wurde schließlich die Transfektionsmischung abgesaugt und durch normales Wachstumsmedium ersetzt. Alle experimentellen Messungen erfolgten  $24\text{ h}$  nach Austausch des Mediums.

#### 4.5 Collagen-Beschichtung

Die Komplexität des Zellkulturmodells in Bezug auf eine Adhäsionsoberfläche kann durch Beschichtung mit EZM Molekülen um einen wichtigen Einflussfaktor erweitert werden. Wie bereits in Kapitel 2.3.4.1 erwähnt, können Moleküle der EZM zur CAM-DR beitragen. Da Integrine einen wichtigen Teil dieser Arbeit darstellen, lag es nah für bestimmte Versuchsdurchführungen Collagenbeschichtungen zu nutzen, um auf diesem Weg die Integrin-Aktivierung zu stimulieren. Dafür verwendeten wir einerseits kommerziell vorbeschichtete Collagen I Zellkulturflaschen und stellten andererseits manuell eigene Collagen I beschichtete 96-Well Platten unter sterilen Bedingungen her.

Die Eigenbeschichtung von 96-Well Platten (Oberfläche:  $0,143\text{ cm}^2$ ) erfolgte durch die Zugabe von  $10\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Collagen. Das erforderliche Collagenvolumen beträgt  $0,03\text{ ml/Well}$ . Die benötigte Collagenkonzentration für die Arbeitslösung (AL) wurde mittels Formel 1 bestimmt.

$$\frac{0,143\text{ cm}^2 \times 10\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2}}{30\text{ }\mu\text{L}} = 0,0477\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$$

*Formel 1: Berechnung der gewünschten Collagenkonzentration (AL).*

Basierend auf der Anzahl der zu beschichtenden Wells und dem benötigten Volumen pro Well konnte das Gesamtvolumen der AL ermittelt werden. Für eine 96-Well Platte werden 1,8 mL AL benötigt. Um Pippettierfehler auszugleichen wurde ein Überschuss mit einberechnet und das Gesamtvolumen auf 2 mL AL aufgerundet. Mithilfe dieser Werte konnte als nächstes die Menge an Collagen berechnet werden, die für das erforderliche Volumen an AL benötigt wurde.

$$2 \text{ mL} \times 0,0477 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} = 0,095 \text{ mg Collagen}$$

*Formel 2: Berechnung der erforderlichen Masse von Collagen (AL) für eine Platte.*

Im nächsten Schritt wurde mittels der erhaltenen Masse das benötigte Volumen der Collagenstammlösung (SL) berechnet. Für eine exemplarische Rechnung wird hier eine Collagen-SL mit 2 mg/mL verwendet.

$$\frac{0,095 \text{ mg}}{2 \text{ mg/mL}} = 0,048 \text{ ml Collagen}$$

*Formel 3: Berechnung des benötigten Volumens der Collagen (SL).*

Für die Herstellung der Collagen AL wird das berechnete Volumen der Collagen-SL in 1,952 mL DPBS aufgenommen. Nach Herstellung der AL wurden die Wells mit jeweils 0,03 mL dieser Lösung beschichtet und für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit einer Pasteurpipette abgesaugt und mit sterilem PBS gespült. Zum Abschluss wurden die Platten für 1 h im Inkubator (bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) getrocknet. Die Platten konnten durch eine luftdichte Verpackung und einer Lagerung bei 4 °C für einen Zeitraum von 4 Wochen verwendet werden.

## 4.6 3D Model

Die Kultivierung von Zellen auf flachen Kunststoffoberflächen bildet einen künstlichen, zweidimensionalen Zellrasen. Unter natürlichen Umständen wachsen Zellen dreidimensional umgeben von anderen Zellen, Membranen, Fasern und Adhäsionsproteinen. Mithilfe dieses 3D Models soll eine in-vivo-artige Umgebung simuliert werden, die für bessere interzelluläre Interaktionen sorgt. Zu diesem Zweck wurde für die vorliegende Arbeit eine Sphäroid-Technik etabliert. Die Modifizierung von Zellkulturoberflächen durch die Verwendung von Agarose beschichteten Platten fördert die Bildung von Sphäroidkulturen, indem sie das Anheften von Zellen an ihrer Oberfläche verhindern [409]. Unter diesen Bedingungen kann die Mehrzahl der Tumorzellen wachsen und zu einer Kugel aggregieren.

Zur Herstellung eines 3D Modells in 96-Well Platten wurde als erstes Agarose in Vollmedium gelöst, sodass eine Agarosekonzentration von 1,5 % entstand. Diese Suspension wurde für 20 min bei 120 °C und 2 bar autoklaviert und anschließend schnellstmöglich unter eine sterile Werkbank gestellt. Da die Agarose unter keinen Umständen abkühlen durfte, wurde das Gefäß in ein vorgewärmtes Wasserbad auf eine Heizplatte bei ca. 60 °C gestellt. Anschließend wurden 50 mL/Well der flüssigen Agarose unter sterilen Bedingungen mit einem Multistepper in eine 96-Well Platte mit flachem Boden gegeben. Je nach Versuch wurden durchsichtige Platten für mikroskopische Analysen verwendet oder schwarze Platten für *Zytotoxizitäts-assays* mittels Alamar Blue™ (siehe Kapitel 4.7.2). Die Agarose erstarrt innerhalb nur weniger Sekunden. Ein Volumen von 50 mL bildet eine geeignete konkave Oberfläche. Nach Abkühlung der Platten wurden diese steril eingeschweißt und konnten für bis zu 10 Tage lichtgeschützt gelagert werden [410].

## **4.7 Zytotoxizitäts-assays**

### **4.7.1 MTT-assay**

Für Untersuchungen der Zellviabilität wurden in dieser Arbeit in erster Linie *MTT-assays* verwendet. Bei diesem kolorimetrischen Verfahren wird das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen unter NADH-Verbrauch zu violetter Formazan reduziert (Abb. 20) [411]. Das Formazan Produkt reichert sich als unlösliches Präzipitat im Inneren der Zelle an und lagert sich in der Nähe der Zelloberfläche ab. Dessen Farbintensität kann nach Lösung in DMSO photometrisch bestimmt werden [412]. Die Enzyme sind nur in lebensfähigen Zellen mit intaktem Metabolismus aktiv, somit ist die Menge des gebildeten Farbstoffs proportional zur Zellvitalität. Steigt demnach die Konzentration einer toxischen Substanz an, nimmt die Anzahl der vitalen Zellen ab und so auch die Farbintensität. Damit ermöglicht der *MTT-assay* eine Aussage über die  $EC_{50}$  toxischer Substanzen. Bei der  $EC_{50}$  handelt es sich um die Konzentration, bei der die Hälfte aller Zellen stirbt [413].

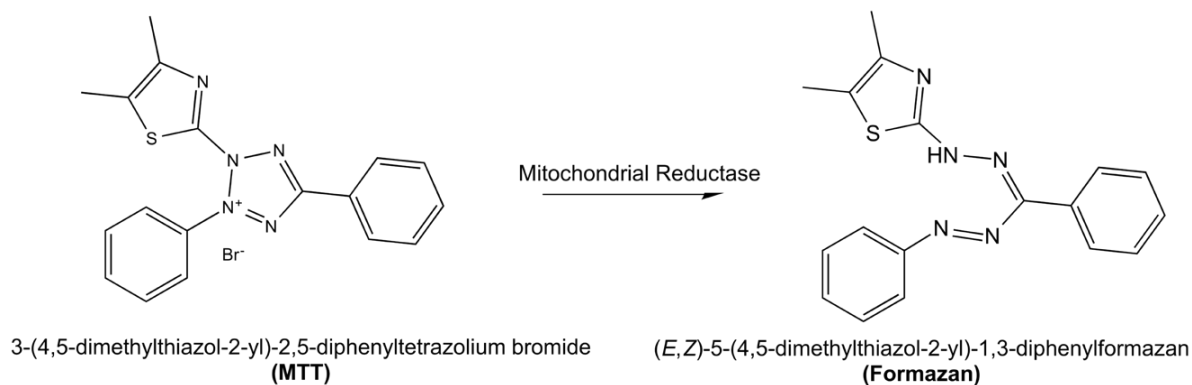


Abbildung 20: Reduktive Spaltung des gelben Farbstoffes MTT in violettes Formazan.

Nach der Zellzahlbestimmung (Kapitel 4.2.5) wurden jeweils 5.000 und 10.000 W1 und W1CR Zellen pro Well in sterile 96-Well-Platten ausgesät (Abb. 21). Jede Platte wurde horizontal mit drei Replikaten der W1, sowie der W1CR Zelllinie beimpft. Das Volumen der Zellsuspension betrug dabei, wenn eine Vorinkubation in Form von Inhibitoren erfolgte, 80  $\mu\text{L}$ . Wurden die Zellen nur mit einer Verdünnungsreihe behandelt, lag das Volumen bei 90  $\mu\text{L}$ . Aus Schutz vor Verdunstung wurden die äußeren Wells mit 90  $\mu\text{L}$  DPBS befüllt. Am darauffolgenden Tag wurden die adhären Zellen entweder nur mit einer Verdünnungsreihe beimpft, oder es wurde für die Toxizitätsbestimmung eine Vorinkubation mit den jeweiligen aufgeführten Inhibitoren durchgeführt, um den Einfluss von bestimmten Molekülen auf die Zytotoxizität von Cisplatin näher zu untersuchen. Nach der erforderlichen Inkubationszeit wurde innerhalb der Platte jede Reihe von links nach rechts in aufsteigender logarithmischen Cisplatinkonzentration ( $10^{-7,5}$  –  $10^{-3,5}$  mol/L) mit 10  $\mu\text{L}$  beimpft, wobei die erste Reihe von links die Wachstumskontrolle darstellte und lediglich 10  $\mu\text{L}$  DPBS enthielt. Das Gesamtvolumen pro Well betrug somit 100  $\mu\text{L}$ . Platten ohne Wirkstoffzusatz dienten zur Kontrolle. Die Platten wurden anschließend für 72 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert [414].

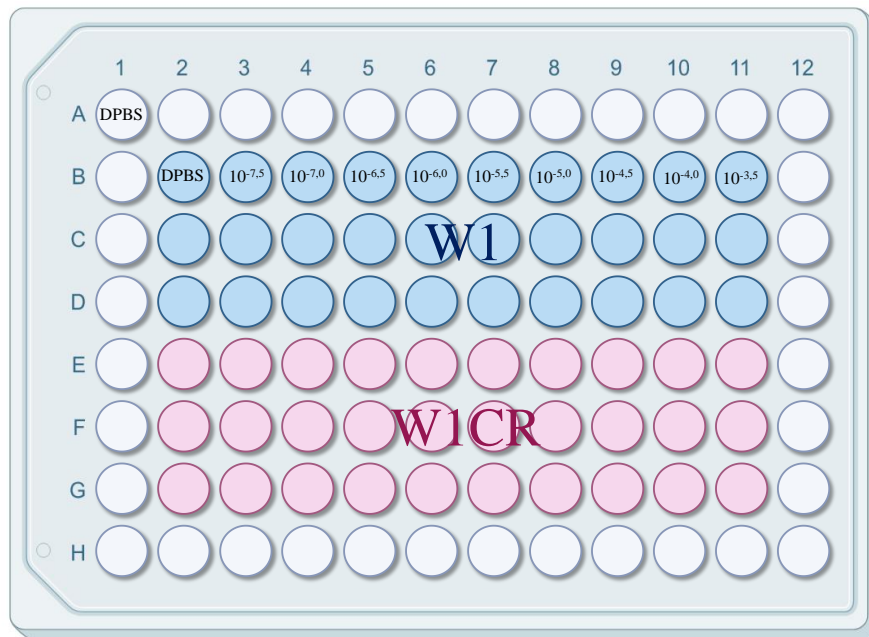


Abbildung 21: Pipettierschema einer 96-Well-Platte für den MTT-assay.

Im nächsten Schritt erfolgte 72 h nach Cisplatininkubation die Zugabe einer frisch hergestellten MTT-Lösung von jeweils 20  $\mu\text{L}$  pro Well und die Inkubation wurde für eine weitere Stunde fortgesetzt. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium durch vorsichtiges Ausschlagen der 96-Well Platte auf Zellstoff entfernt. Durch Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  DMSO pro Well wurden die violetten Formazankristalle gelöst. Aufgrund der Farbintensität kann die darauffolgende Messung der Absorption mit Hilfe des Multiwell-Readers Multiskan EX<sup>®</sup>, bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 570 \text{ nm}$  durchgeführt werden. Um die Hintergrundabsorption durch Medium- und Serumrückstände zu berücksichtigen, wurden die Platten zusätzlich bei 690 nm vermessen. Die ermittelten Absorptionswerte bei 690 nm wurden von denen bei 570 nm subtrahiert. Diese Ergebnisse wurden ausgewertet, indem sie gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Substanzkonzentration aufgetragen wurden. Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism wurde eine Konzentrations-Effekt-Kurve über eine nicht lineare Regression erstellt.

#### 4.7.2 AlamarBlue<sup>™</sup>-assay

AlamarBlue<sup>™</sup> ist ein Synonym für den Farbstoff Resazurin, der ebenfalls für Zellviabilitäts-assay geeignet ist. Dem MTT-assay sehr ähnlich wird Resazurin durch aerobe Prozesse metabolisch aktiver Zellen zu Resorufin reduziert, welches rosa fluoresziert. Diese irreversible Reaktion ist somit proportional zur Anzahl der lebensfähigen Zellen. Die Fluoreszenzintensität kann bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm detektiert werden.

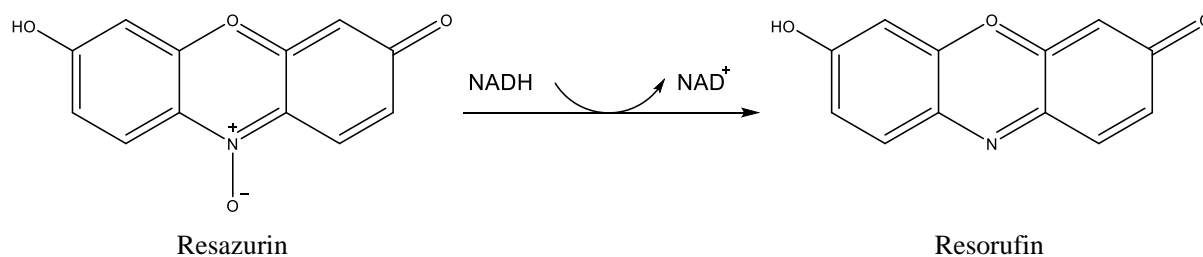


Abbildung 22: Struktur von Resazurin und dem rosa fluoreszierenden Resorufin, das aus der Reduktion lebensfähiger Zellen resultiert.

Um die Zellviabilität im 3D Model messen zu können mussten wir für diese Versuche auf den AlamarBlue™-assay zurückgreifen. Der entscheidende Grund hierfür waren die Sphäroide, die auf einer Agarose-beschichteten Oberfläche gewachsen sind. In MTT-assays müssen die Platten auf Zellstoff ausgeklopft werden, was dazu führen würde, dass die Agarose mitsamt Sphäroid aus dem Well fällt und eine Viabilitätsmessung somit nicht möglich macht. In sterilen opaken, mit Agarose beschichteten 96-Well Platten (Kapitel 4.6) wurden Zellen analog zu MTT-assay ausgesät (Kapitel 4.7.1). Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{L}$  einer aufsteigender logarithmischen Cisplatinkonzentration ( $10^{-7,5} - 10^{-3,5}$  mol/L) beimpft und für 72 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug, die Agarose ausgenommen, hier ebenfalls 100  $\mu\text{L}$ / Well. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Zellen mit 0,15 mg/mL Resazurin detektiert. Hierfür wurden 20  $\mu\text{L}$  der Lösung in alle Wells pipettiert und für weiter 3 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Zum Schluss erfolgt die Vermessung der Fluoreszenzintensität am FLUOstar™OPTIMA.

### 4.7.3 Auswertung und Statistik

Alle Zytotoxizitätsversuche wurden mind.  $n = 3$  in Triplikaten durchgeführt. Ziel dieser Versuche war die Bestimmung der  $\text{EC}_{50}$ -Werte von Cisplatin unter Präinkubation verschiedener Inhibitoren. Zur graphischen Auswertung wurde die Absorption gegen den dekadischen Logarithmus der getesteten molaren Substanzkonzentrationen aufgetragen. Für die folgende Normalisierung wurde der höchste Absorptionswert als 100 % festgesetzt. Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism wurde eine Konzentrations-Effekt-Kurve über eine nicht lineare Regression erstellt. Bei S-förmigen Kurven gibt es genau einen X-Wert, bei dem das mittlere Niveau zwischen *Bottom* und *Top* erreicht wird. Dieser Punkt wird  $\text{EC}_{50}$  *effective concentration 50 %* bezeichnet. Anhand der ermittelten Regression wurden die  $\text{EC}_{50}$  Werte der behandelten Zellen aus den erhaltenen sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Kurven bestimmt. Das Ergebnis stellt an diesem Punkt 50 % der toten Zellen dar, bei deren Konzentration die Halbmaximalwirkung vorliegt. Aus dem Quotienten dieser  $\text{EC}_{50}$ -Werte von cisplatinresistenten

W1CR und den ursprünglichen W1 Zellen lässt sich der Resistenzfaktor berechnen. Da die logarithmierten  $EC_{50}$ -Werte als normalverteilt angesehen werden konnten, werden für spätere statistische Auswertungen mittels One-Way-ANOVA die  $pEC_{50}$ -Werte herangezogen [415]. Das Signifikanzniveau wird mittels Asteriskus dargestellt wie folgt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Der  $pEC_{50}$ -Wert ist der negativ dekadische Logarithmus der  $EC_{50}$ , mit dessen Hilfe der Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet wurde. Anschließend erfolgte eine Rückrechnung der  $EC_{50}$ -Werte durch Entlogarithmieren zur Darstellung einer Übersicht.

$$pEC50 = -\log(EC50)$$

*Formel 4: Berechnung des  $pEC_{50}$ -Wertes.*

## 4.8 Proteinanalytik

### 4.8.1 Lysatgewinnung

Zur Analyse der Genexpression auf Proteinebene wird die Bestimmung des Proteingehalts vorausgesetzt, da Proteine zur finalen Signalübertragung der genetischen Kodierung dienen. Um alle zellulären Bestandteile der Untersuchung zugänglich zu machen, ist es erforderlich die Zellen zu lysieren. Zur Gewinnung von Lysaten wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % in einer Zellkulturflasche kultiviert (bei 37 °C, 5 %  $CO_2$ ). Wenn eine Vorinkubation mit Collagen, Cisplatin oder eine Kombination beider Substanzen vorhergesehen war, erfolgte nach dem Anwachsen der Zellen die Zugabe von Cisplatin in einer Konzentration von 1  $\mu M$ , was der subtoxischen Konzentration für W1 und W1CR entspricht. Nach einer Inkubation von 72 h wurden die Zellen mit EDTA-Lösung 0,02 % von der Flaschenwand abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde in kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurden alle Pufferrückstände entfernt und der gleiche Waschschrift ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in Lysepuffer aufgenommen und jeweils in ein Eppendorf Gefäß überführt. Die Menge des Lysepuffers richtet sich nach der Größe des Pellets. Als nächstes wurden die Zellen im Thermomixer bei 4 °C und 800 U/min 30 Minuten lang lysiert. Die Bestandteile der Membran wurden anschließend durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C abgetrennt. Der klare Überstand wurde dekantiert und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

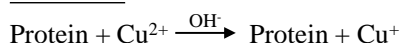
#### 4.8.1.1 BCA-assay

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge der Lysate wurde ein *BCA-assay* (Bicinchoninsäure) angewendet. Dieser *assay* ist der Biuret-Reaktion ähnlich, welcher als



Grundlage die Reaktion von freien Aminogruppen in Proteinen unter Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  in alkalischer Lösung beinhaltet. Das Salz der Bicinchoninsäure bildet in alkalischem Medium einen 2:1 Chelatkomplex mit  $\text{Cu}^+$ -Ionen unter Bildung eines stabilen violetten Chromophors, dessen Farbintensität photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden kann. Dabei ist die Intensität des gebildeten Farbstoffes proportional zum Proteingehalt. Durch eine Kalibrierung mittels eines Standards kann die Proteinkonzentration einer Probe quantifiziert werden [416].

Schritt 1:



Schritt 2:

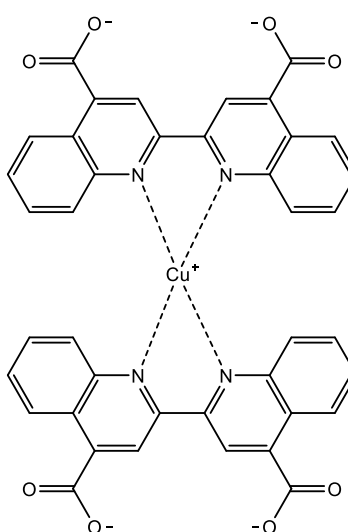


Abbildung 23: BCA-assay Reaktion mit Struktur des gefärbten BCA-Komplexes.

Für die quantitative Bestimmung der Proteine wurden aus den Lysat-Stammlösungen jeweils eine 1:10, eine 1:50 und eine 1:100 Verdünnung erstellt, um Messwerte im linearen Kalibrierbereich zu erhalten. Des Weiteren musste eine Standardverdünnungsreihe (S1-S6) angelegt werden, auf welche die Untersuchungsergebnisse in vergleichbarer und standardisierter Art und Weise bezogen werden konnten. Als Standard wurde eine BSA-Konzentrationsreihe verwendet. Zur Qualitätssicherung stehen außerdem Qualitätskontrollproben (QC) in drei Konzentrationen zur Verfügung, die den Kalibrierbereich abdecken. Die aufbereiteten Proben, Qualitätskontrollen und Kalibrierungskonzentrationen wurden in Form von Duplikaten in eine 96-Multiwell-Platte je 20  $\mu\text{L}$  pipettiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  der BCA-Lösung pro Well wurden die Platten für eine Inkubationszeit von 60 Minuten bei 60 °C im Trockenschrank inkubiert. Das in der BCA-Lösung enthaltene  $\text{Cu}^{2+}$  wird proportional zur anwesenden Proteinmenge zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, welches wiederum mit zwei Molekülen BCA einen farbigen Chelatkomplex bildet. Schließlich kann nach dem Abkühlen

die Messung im Kalibrierungsbereich bei 570 nm im Multiwell-Readers Multiskan EX® erfolgen [417].



Abbildung 24: Übersicht des Pipettierschemas einer 96-Well-Platte für den BCA-assay.

## 4.8.2 SDS-Gelelektrophorese

Die Quantifizierung der zu untersuchenden Proteine nach der Größe erfolgt durch *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Zur Auftrennung werden Gele bestehend aus Polyacrylamid und einem anionischen Tensid, SDS verwendet. Das Trennprinzip der SDS-PAGE basiert darauf, dass die Proteine eine konstante Menge SDS binden (1,4 g SDS/g Protein) und damit negativ geladene Protein-SDS-Komplexe von gleichem Ladungs- und Größenverhältnis entstehen, die wiederum im elektrischen Feld abhängig von ihrer Molekülgröße zur Anode (Plus-Pol) wandern. Die Auswahl der Gelkonzentration richtet sich nach dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine. Je kleiner das Molekulargewicht der Proteine, desto höher konzentriert sollte das verwendete Fertiggel sein. Ein Gel besteht aus zwei Bestandteilen, einem Sammelgel (oben) und dem Trenngel (unten), die sich im Hinblick auf den pH-Wert, die Ionenstärke und die Porengröße unterscheiden. Das Sammelgel enthält die Probenfächer, diese haben die Aufgabe die aufgetragenen Proben in schmale Banden zu konzentrieren die nebeneinander wandern können, ohne sich gegenseitig zu beeinträchtigen. Wichtig ist außerdem, dass die einzelnen Proben auf gleicher Höhe gemeinsam starten, sodass im anschließenden Trenngel die Auftrennung nach Molekulargewicht erfolgen kann [418]. Als Elektrolyt wird ein Tris-Glycin-Chlorid

Puffersystem eingesetzt. Das Glycin liegt im neutralem pH des Sammelgels überwiegend als Zwitterion vor und ist im basischen pH-Wert des Trenngels anschließend negativ geladen. Während die Chloridionen im Sammelgel vor den Proteinen wandern und auf Grund dessen auch als *leading ions* bezeichnet werden, folgt das Glycin den Proteinen und wird deswegen auch *trailing ion* genannt. Im basischen Trenngel wandern beide Moleküle vor den Proteinen her. An der Grenzphase zwischen Sammel- und Trenngel kommt es zu einem Stapelungseffekt, da durch den pH-Gradienten das Glycin die Proteine überholen kann und die Lauffront optisch sowohl schmaler als auch schärfer wird. Die am häufigsten verwendete Elektrophorese-methode ist das SDS-PAGE Verfahren nach Laemmli. Hierfür wird ein Tris-Glycin-Puffer verwendet, der auch als Laemmli-Puffer bekannt ist. Dieser Puffer enthält reduzierende Thiole wie das  $\beta$ -Mercaptoethanol, welche die Disulfidbrücken spalten. Die am schnellsten wandernden Proteine bilden mit den ebenfalls durch das Gel laufenden anionischen Bestandteilen des Laemmli Puffers die Laufmittelfront. Durch den enthaltenen kleinen, anionischen Farbstoff Bromphenolblau im Laemmli Puffer wird diese Laufmittelfront sichtbar gemacht. Die kleine molekulare Größe führt dazu, dass der Farbstoff schneller als die Proteine durch das Gel laufen kann. Mithilfe dieser farbigen Lauffront kann eine optimale Elektrophorese Laufzeit bestimmt werden.

Die Proteinlysate, die einer Gesamtproteinmenge von 20  $\mu$ g entsprachen, wurden zunächst mit dem gleichen Volumenanteil an Laemmli-Probenpuffer 2 $\times$  Konzentrat versetzt und gevortext. Anschließend wurden die Gele in Vertikalkammern eingespannt und die einzelnen Sammelgeltaschen mit den Lysaten beschickt. Auf jedem Gel wurde zusätzlich zur Größenbestimmung der Banden ein standardisierter Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Dieser Proteinstandard wurde in zwei Geltaschen mit einem Volumen von 1,5  $\mu$ L pro Tasche gefüllt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in Elektrophoresepuffer nach Anlegen einer konstanten elektrischen Spannung von 200 V für einen Zeitraum von 40-60 Minuten je nach Polymerisationsgrad des Gels. Im Anschluss erfolgte eine *stainfree* Detektion. Hierfür wurde das Gel in Transferpuffer überführt (Einstellung: *Good sensitivity* 2,5 min) und am ChemiDoc™ XRS+ System für 2,5 min vermessen. Die durch die UV-Strahlung vermittelte Verbindung von Trihalo-Komponenten und den Thiolgruppen der Proteine kann eine Fluoreszenzintensität aufgenommen werden. Diese Intensität spiegelt die Gesamtaufnahme aller Proteine wider, die zur Normalisierung der Probe diente. Das Trenngel wurde anschließend für den Western-Blot verwendet.

### 4.8.3 Western Blot

Western Blot ist eine Analysetechnik zum Nachweis spezifischer Proteine. Für die vollständige Übertragung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine synthetische Membran wurde das Tank-Blot-Verfahren angewendet. Hierbei werden die Proteine in einer mit Puffer gefüllten Western-Blot-Kammer durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf die Oberfläche einer Membran transferiert und dort immobilisiert [418]. Bei diesem Versuch wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran verwendet, die zunächst für 20 s in Methanol äquilibriert werden musste, um die Hydrophobie der Membran herabzusetzen. Anschließend wurde die Membran bis zur weiteren Verwendung in Transferpuffer aufbewahrt. Das aus der SDS-PAGE erhaltene Trenngel wurde zusammen mit der PVDF-Membran luftblasenfrei in die mit Transferpuffer gefüllte Blotting-Apparatur mit einem Gefrier-Akku eingesetzt. Hierfür wurden in eine Sandwich-Vorrichtung zwei Fiberglasmatten gelegt und zunächst die Luft aus den Poren der Fiberglasstruktur herausgedrückt. Zusätzlich wurde beidseitig jeweils ein Blottingpapier unter das Gel und über die Membran gesetzt. Das Gel wurde nun in der Sandwich-Vorrichtung in die Western-Blot-Kammer eingebaut. Dabei erfolgt der Einbau unter ständiger, luftblasenfreier Bedeckung der Bestandteile mit Transferpuffer. Die Halterung wurde in die Blotting-Kammer eingesetzt und über einem Magnetrührer platziert. Nach Anlegen einer konstanten Spannung von 100 V wurde der elektrophoretische Transfer über einen Zeitraum von einer Stunde durchgeführt. Während dieser Zeit wurden die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen. Dabei wandern die SDS beladenen, negativ geladenen Proteine wieder in Richtung Plus-Pol. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten, und die Proteine sind anschließend für weitere Detektionsmethoden zugänglich. Nach Ablauf der Transferzeit wurde die Membran entnommen und bis zum spezifischen Proteinnachweis durch Chemolumineszenz in Tris-gepufferter Salzlösung geschüttelt. Nach Ablauf der Transferzeit wurde die Membran entnommen und bis zum spezifischen Proteinnachweis durch Chemolumineszenz in Tris-gepufferter Salzlösung geschüttelt.

#### 4.8.3.1 Proteindetektion

Zur Quantifizierung der Proteinexpression auf der PVDF-Membran wurden Antigen-Antikörper-Reaktionen durchgeführt. Dafür bindet zunächst ein spezifischer Antikörper an die Epitope im gesuchten Protein. Dieser direkt am Protein haftende Antikörper wird als Primärantikörper bezeichnet. Die Detektion erfolgt über eine Immunkonjugation. Dabei bindet ein sekundär gekoppelter Antikörper, der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist, spezifisch an den ersten Antikörper. Der Sekundärantikörper ist mit dem lichtempfindlichen

Enzym der Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Dieses Enzym bewirkt durch Zugabe von Luminol eine Umwandlung zum Phthalat, in dem sich der Sauerstoff in einen angeregten Triplettzustand befindet und strahlungslos in einen angeregten Singulettzustand wechselt, um am Ende durch Freisetzung von Licht (428 nm) wieder zurück in den Singulett Grundzustand zu kehren. Die Chemilumineszenzreaktion wird im ChemiDoc™ XRS+ System visualisiert [418].

Dafür wurde nach dem erfolgreichen Proteintransfer die Membran zunächst für 1 h bei RT in 50 mL Blocking-Lösung (5 %) gelegt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Oberfläche abzusättigen, wobei ein direktes Beträufeln der Membran vermieden wurde. Anschließend folgten drei Waschvorgänge mit 10 mL TBS-T Lösung für je 10 Minuten auf dem Schüttelinkubator. Danach erfolgte eine Zugabe der primären Antikörper-Lösungen von 10 mL 1 h bei RT auf dem Schüttelinkubator. Als housekeeping Protein wurden  $\beta$ -Actin oder GADPH gewählt. Durch den Marker konnte gewährleistet werden, dass die Proteinkonzentration in allen Geltaschen gleich eingebracht wurde. Die Inkubation wurde über Nacht im Kühlschrank fortgesetzt. Am darauffolgenden Tag wurden unspezifisch gebundene Antikörper mithilfe von drei Waschstritten á 10 Minuten mit TBS-T Puffer, die Detergentien enthalten, entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (10 mL) für 1,5 h bei RT. Vor der Detektion wurden alle Membranen wiederholt zweimal mit TBS-T für 10 min gespült.

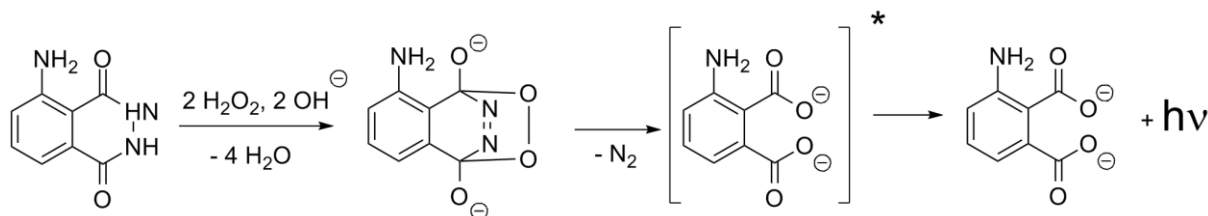


Abbildung 25: Reaktion der Meerrettichperoxidase katalysierten Luminolreaktion.

Die optische Detektion der Proteine erfolgte durch Zugabe von 4 mL einer Luminol-Peroxidlösung und bedeckte stets die gesamte Oberfläche der Membran. Dieses Reagenz wurde aus 3 mL Luminol-Lösung und 2 mL Wasserstoffperoxid-Lösung zusammengesetzt. HRP am sekundären Antikörper katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, dessen Chemilumineszenz mithilfe des ChemiDoc™ XRS+ System detektiert werden kann.

#### 4.8.4 Auswertung und Statistik

Für alle Western Blots wurden mind. drei Messungen durchgeführt. Jede Proteinanalyse enthielt dabei eines der genannten *housekeeping* Proteine, die exemplarisch mit dem zugehörigem Blot in dieser Arbeit gezeigt werden. Außerdem wurde von allen erhaltenen Western Blots die Pixeldichten bestimmt, welche mittels *stainfree* Detektion auf die zugehörige Gesamtproteinmenge normalisiert wurden. Anschließend wurde die relative Pixeldichte ermittelt, indem die Ergebnisse auf die unbehandelten W1 Zellen bezogen wurden. Dieses Verhältnis konnte graphisch mit entsprechender Standardabweichung festgehalten werden. Zusätzlich wurde eine Statistik mittels One Way ANOVA mit anschließendem Tukey Post-hoc Test erhoben. Das Signifikanzniveau wird mittels Asteriskus dargestellt wie folgt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.8.5 Proteome Profiler Array

Der *Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array Kit* ermöglicht ein umfangreiches Screening der Zellen, in dem simultan 43 unterschiedliche Phosphorylierungsprofile von Kinasen analysiert werden. Das Prinzip des Arrays beruht auf einer *Dot-Blot* Verfahrenstechnik. Diese ist der Western Blot Methode sehr ähnlich, mit der Ausnahme, dass ohne eine vorangegangene Gelelektrophorese die Proteinlysate direkt auf die Membran aufgetragen werden. Für den *Dot-Blot* wird eine Nitrozellulosemembran verwendet, auf der die Primäantikörper bereits vorfixiert sind. Jeder Antikörper liegt als Duplikat vor, außerdem befinden sich neben den Positiv- auch Negativkontrollen auf der Membran. Die Membranen werden mit dem gewünschten Lysaten inkubiert. Alle nicht bindenden Proteine werden abgewaschen. Nach Zugabe des Detektionsantikörpers und Streptavidin-HRP konnte die Membran nach Zugabe einer ECL-Lösung am ChemiDoc™ XRS+ System detektiert werden.

Mit einem *Human Phospho-Kinase Array Kit* konnten vier unterschiedliche Zelllysate gleichzeitig vermessen werden. Deshalb wurden zunächst Zellen unter den gewünschten Bedingungen inkubiert (Tab. 1). Die Intensität der einzelnen Signale ist proportional zur Menge an gebundenem Protein.

Zellen	Behandlung
W1	Cisplatin
W1	Collagen + Cisplatin
W1CR	Cisplatin
W1CR	Collagen + Cisplatin

Tabelle 1: Inkubationsansätze der Lysate für den Proteome Profiler.

Der *Proteome Profiler Array* wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die geernteten Lysate wurden mit Hilfe eines BCA-assays (Kapitel 4.8.1.1) quantifiziert. Von jedem einzelnen *Dot* wurde die Pixeldichte bestimmt. Als Negativkontrolle dienten zwei PBS-Dots auf der Membran, deren Pixeldichte das Hintergrundrauschen widerspiegelte. Alle Messwerte wurden von dem jeweiligen Mittelwert des Hintergrundrauschens subtrahiert. Die Positivkontrollen dienten einerseits zur Überprüfung der Array Funktionalität und andererseits zur Normalisierung. Der Mittelwert der Positivkontrolle einer willkürlichen Membran wurde als 100 % Wert festgelegt, anschließend wurden die Positivkontrollen aller anderen Membranen auf diesen Wert bezogen. Der resultierende Faktor war Membran-spezifisch und wurde mit allen *Dots* auf dieser Membran multipliziert. Zum Schluss wurde der Mittelwert der Duplikate bestimmt und dieser mitsamt Standardabweichung graphisch aufgetragen. Für den *Proteome Profiler* konnte keine statistische Auswertung erhoben werden, da es sich um eine Einzelmessung handelt.

## 4.9 Quantitative Platinbestimmung

### 4.9.1 Grundlagen der AAS

Zur Quantifizierung des Cisplatingehaltes der Zellen wurde der korrelierende Platingehalt der Probe mittels einer flammenlosen Atomabsorptionsspektrometrie mit Graphitrohrtechnik (GF-ASS) bestimmt. Die AAS basiert auf einem spektralanalytischen Verfahren, mit dem sowohl der qualitative Nachweis als auch die quantitative Bestimmung von Metallatomen durchgeführt werden kann. Vorausgesetzt wird, dass die Metallatome in den gasförmigen Zustand überführt werden können, um einen bestimmten Energiebetrag in Form von Licht der entsprechenden Wellenlänge aufzunehmen und nach der Anregungszeit wieder zu emittieren. Der Zusammenhang zwischen der Absorption des Lichts durch Platinatome der Probe in deren Konzentration wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben, wonach die Abnahme der Lichtintensität durch Absorption der Konzentration der zu bestimmenden Probe proportional ist [419].

## 4.9.2 Aufbau der AAS

Die AAS besteht im Wesentlichen aus vier Bauteilen: der Lichtquelle, in diesem Fall eine Platin-Hohlkathodenlampe, einem Graphitrohrfurn, der die Atomisierungseinheit bildet, einem Monochromator (265,9 nm entsprechen der Platin Absorptionslinie) und einer Detektionseinheit. Ein schematischer Aufbau des Atomabsorptionsspektrometers ist in Abb. 26 dargestellt.

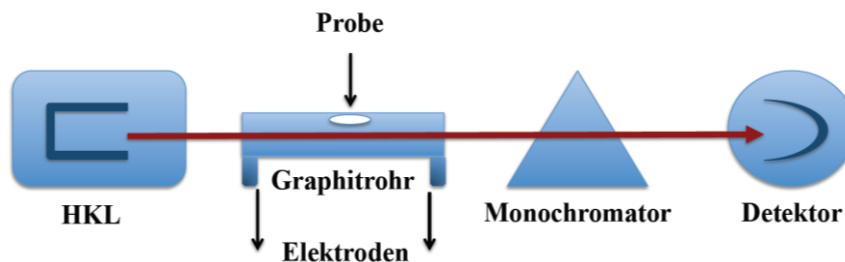


Abbildung 26: Schematischer Aufbau der AAS.

Als Lichtquelle wurde eine UltrAA<sup>®</sup>-Lampe verwendet, welche sich durch ein zweites Elektrodenpaar auszeichnet. Die Kathode wird von einem offenen Zylinder aus dem betreffenden Element, in unserem Fall Platin, gebildet. Die Anode besteht in der Regel aus Wolfram. Durch diese zusätzliche Elektrode wird ein sogenannter Booster-Effekt erzeugt, der die Eigenabsorption, der in der Hohlkathode entstehenden Platin-Atome vermindert. Das führt letztendlich zu einer erhöhten Intensität des emittierten Lichts und einem verminderten Grundrauschen. Diese Eigenschaft ermöglicht eine Quantifizierung von Analyten im unteren Konzentrationsbereich. Damit die Platinatome in den energetischen Grundzustand gelangen können, wird die Probe in ein elektrisch beheizbares Graphitrohr injiziert, welches sich nach Anlegen eines elektrischen Stroms von einigen Hundert Ampere aufheizt und die Probe atomisiert. Graphit kann Strom leiten und sich beim Anlegen einer elektrischen Spannung durch seinen elektrischen Widerstand erhitzen. Damit das Graphitrohr nicht verbrennt, findet das Aufheizen in einer Argon-Schutzatmosphäre statt. Der Messlichtstrahlengang ist in der Mittelachse des Graphitrohres justiert.



Beim Durchgang einer Messung wird folgendes Temperaturprogramm durchlaufen:

Schritt	Phase	Temperatur [°C]	Vorgang
1	Trocknung	95-120	Lösungsmittel wird entfernt
2	Trocknung	400	Vollständige Trocknung der Probe
3	Pyrolyse	650 -1300	Entfernung von organischem Material
4	Atomisierung	2700	Probe wird atomisiert
5	Ausheizen	2700	Vollständige Entfernung der Probereste im Graphitrohr

*Tabelle 2: Temperaturprogramm der RF-AAS während einer Messung.*

Jeder Schritt besteht aus einer Anstiegszeit, die als Rampe bezeichnet wird. Innerhalb dieser Zeit wird auf die erforderliche Temperatur erhitzt. Dabei gilt, je langsamer die Aufheizrate gewählt wird, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit eines Verspritzens der Probe und desto besser wird die Präzision bei vermehrten Wiederholungsmessungen. Für eine schonendere Trocknung kann Schritt eins noch einmal in zwei Trocknungsschritten unterteilt werden. Trocknung 2 wird hauptsächlich für Proben mit komplexerer Matrix benötigt und kann bei einfachen Proben entfallen. Wichtig ist insbesondere die Rampen Einstellung während der Atomisierung, hier werden üblicherweise 0 Sekunden ausgewählt. Dadurch wird die max. Leistung der Spannungsversorgung auf das Graphitrohr gebracht und damit einhergehend eine max. Aufheizrate erreicht. Für eine darauffolgende Abkühlung vor der nächsten Messung ist eine Wasserkühlung in der Graphithalterung integriert [420].

Zur Unterdrückung des Hintergrundrauschens wird eine Untergrundkorrektur vorgenommen. Emissionslinien von Atomen können durch ein Magnetfeld aufgespalten werden, während der Untergrund keine Aufspaltung aufweist. Der sogenannte Zeeman-Effekt kann zur Korrektur der Untergrundabsorption genutzt werden, welche durch Streuung und Absorption von organischen Molekülen herbeigeführt wird (DS277). Aufgrund dessen werden sämtliche Messungen unter einem abgeschalteten Magnetfeld und einem eingeschalteten Magnetfeld (0,8 Tesla) durchgeführt. Beide Messungen erfolgen direkt hintereinander mit einem Abstand von nur wenigen Millisekunden. Während das Magnetfeld nicht aktiv ist, werden die Absorptionen des Platins und die des Hintergrundes vermessen. Wird das Magnetfeld anschließend eingeschaltet, erfolgt nur die Absorptionsmessung des Hintergrundes, weil die Elementlinie durch das Magnetfeld verschoben wird. Dieser Effekt ermöglicht durch Subtraktion der beiden Messungen eine Ermittlung der Intensität des Platinsignals (MA 149).

Ein Vorteil der GF-AAS gegenüber der Flammentechnik (F-AAS) besteht darin, dass die Probe quantitativ in den Strahlengang gebracht werden kann und dort länger verweilt (bis zu 7 Sek.). Außerdem können störende Matrixbestandteile gut abgetrennt werden. Die Nachweisgrenze der GF-AAS Technik ist um bis zu 3 Dezimalstellen genauer als bei der F-AAS.

### 4.9.3 Versuchsbedingungen zur Platinbestimmung

#### 4.9.3.1 Kalibrierung

Um eine quantitative Bestimmung der Platinkonzentration ermitteln zu können, wurde zunächst eine Kalibrierung durchgeführt. Der verwendete Kalibrierbereich für eine Einfachinjektion betrug 5 – 50 ng/mL. Dafür wurde vor jeder neuen Messung ein Standard 50 (50 ng Platin/mL) aus einer 5 mmol/L Cisplatin-Stammlösung frisch hergestellt. Die übrigen Standards aus der Kalibrierung wurden durch Verdünnung des Standards 50 mit Suprapur® 6,5 % durch den Autosampler des Geräts erzeugt (siehe Tab. 3). Die Salpetersäure diente als Blindwert und das Injektionsvolumen betrug stets 20 µL.

Kalibratoren	Platin [ng/mL]	Standard [µL]	Suprapur® 6,5 % [µL]
1	5	2	18
2	10	4	16
3	20	8	12
4	30	12	8
5	40	16	4
6	50	20	0

Tabelle 3: Herstellung der Kalibriergerade durch den Autosampler für einen Kalibrierbereich von 5,0 – 50,0 ng/mL.

Die Kalibrierung galt als erfolgreich abgeschlossen, wenn die Abweichung der Standards unter 15 % lag und am LLOQ (*Lower Limit of Quantification*) unterhalb 20 % vom nominalen Wert lag. Mindestens vier von sechs Standards müssen diese Kriterien erfüllen (66,7 %), wobei die LLOQ- und ULOQ-Standards (*Upper Limit of Quantification*) diese Kriterien immer erfüllen sollten. Außerdem sollte der Korrelationskoeffizient  $r \geq 0,99$  (lineare Regression) entsprechen [420].

#### 4.9.3.2 Qualitätssicherung während der Messung

Nach der Erstellung einer Kalibriergeraden, sowie am Ende eines Messdurchlaufes wurden jeweils drei Qualitätskontrollen vermessen. Außerdem wurde nach jeder neuen Messreihe eine Qualitätssicherung durchgeführt, um während der Messung die Präzision und Richtigkeit der

Probenmessung zu sichern. Dafür wurden drei Qualitätskontrollproben (QC), die den gesamten Arbeitsbereich abdecken, erstellt (10, 20 und 40 ng Platin/mL). Insgesamt sollten 10 % aller Proben und mind. sechs Proben QCs sein. Die QC wurden ebenfalls aus der 5 mmol/L Cisplatin-Stammlösung hergestellt. Die Proben wurden als Triplikate vermessen. Die Gesamtmessung galt als erfolgreich, wenn die Abweichung von mindestens drei Viertel der Qualitätskontrollen nicht mehr als  $\pm 15$  % betrug. Alle Messungen erfolgten im sogenannten PROMT (*Precision optimized measurement time*) Modus. Hierbei wurden min. zwei Injektionen durchgeführt. Wichen die Messsignale um mehr als 5 % ab, erfolgte eine dritte Messung und gegebenenfalls eine vierte Bestimmung. Lag die Standardabweichung über 15 %, wurde diese Probe im weiteren Messverlauf erneut analysiert.

#### 4.9.4 Intrazelluläre Platin Konzentration

Um den aufgenommenen Cisplatingehalt von W1 und W1CR Zellen genau zu bestimmen wurden zunächst in Zellkulturflaschen mit oder ohne Collagen ausgesät. Sobald die Zellen adhärent waren, wurden sie noch am selben Tag mit 1  $\mu$ M Cisplatin beimpft und für 72 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit kaltem DPBS-Puffer gewaschen und mit 2 mL Trypsin/EDTA für 2 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> abgelöst. Anschließend wurde die Trypsinierung mit 8 mL Medium abgestoppt und die Zellen von der Zellflasche gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reagiergefäß überführt und zentrifugiert (bei 1640 rpm für 4 min und 4 °C). Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet noch einmal in 1 mL DPBS aufgenommen und resuspendiert. Hier wurden 20  $\mu$ L der Proteinprobe für einen BCA-*assay* entnommen. Die restliche Suspension wurde ein weiteres Mal zentrifugiert und der Überstand wiederholt abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde insgesamt zweimal durchgeführt und zum Schluss konnte das entstandene Zellpellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert werden. Für die weitere quantitative Platinbestimmung wurde jedes Zellpellet mit 50  $\mu$ L Salpetersäure Suprapur<sup>®</sup> 65 % versetzt und bei 60 °C im Wasserbad für min. 1 h lysiert. Zum Schluss wurden die Proben 1:25 verdünnt und anschließend mittels GF-AAS vermessen.

#### 4.10 Glutathion-*assay*

Zur quantitativen Messung von freiem Glutathion (GSH) in W1- und W1CR-Zellen wurde ein *glutathione fluorescent detection kit* benutzt. Hierfür wird ein proprietäres, nicht fluoreszierendes Nachweisreagenz verwendet, das kovalent an die freie Thiolgruppe von GSH

bindet und damit ein fluoreszierendes Produkt bildet. Dazu wurden zunächst Zellen mit der gewünschten Behandlungen 72 h inkubiert (Tab. 4).

Zellen	Behandlung
W1	unbehandelt
W1	Cisplatin
W1	Collagen
W1	Collagen + Cisplatin
W1CR	unbehandelt
W1CR	Cisplatin
W1CR	Collagen
W1CR	Collagen + Cisplatin

Tabelle 4: Inkubationsansätze der Lysate für den Glutathion-assay.

Die Zellpellets wurden nach den Angaben des Herstellers zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in kalter 5 % 5-Sulfosalicylsäure-dihydrat Lösung resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen wie in Kapitel 4.8.1 beschrieben lysiert und zur Quantifizierung des Gesamtproteins ein BCA-assay durchgeführt (Kapitel 4.8.1.1). Der assay wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde die 96-Well-Platte mittels Detektion der Fluoreszenzemission im FLUOstar™ OPTIMA bei 510 nm mit einer Anregung von 390 nm gemessen.

#### 4.11 Gen-array

Alle Gen-array Analysen wurden freundlicherweise von unserem Kooperationspartner im Institut für Medical Science der Universität in Posen angefertigt. Die dortige Analyse der Gendaten erfolgte unter Leitung von Dr. Radek Januchowski und Dr. Piotr Zawierucha. Für den Gen-array wurden die Proben auf einem Affymetrix GeneChip U219-Mikroarrays zusammen mit Kontroll-cRNA und Oligo B2 hybridisiert. Die Hybridisierung wurde bei 45 °C für 16 h durchgeführt, wobei ein AccuBlock™ digitaler Trockenbad-Hybridisierungssofen verwendet wurde. Des Weiteren wurden die Microarrays gemäß dem Herstellerprotokoll mit einer Affymetrix GeneAtlas™ Fluidics Station gewaschen und gefärbt. Im letzten Schritt wurden alle Microarrays in einer Affymetrix GeneAtlas™ Imaging Station gescannt. Diese Scans der Microarrays wurden als \*.CEL-Dateien lokal gespeichert. Die weitere Bearbeitung dieser Rohdaten ist in Wantoch et al. beschrieben [240].

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Arbeit besprochen und im Zusammenhang mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten gebracht. Studien zu Resistenzentwicklungen werden in den meisten Fällen an Paaren von arzneimittelsensitiven und -resistenten Zelllinien durchgeführt. Deshalb befasst sich diese Dissertation mit den neu etablierten Ovarialkarzinomzellen W1 und deren cisplatinresistenten Zell-Subtyp W1CR.

### 5.1 Charakterisierung der Cisplatinresistenz

Aufgrund der unbekanntenen resistenzgebenden Eigenschaften der neuen Zelllinie W1CR wurden die Ovarialkarzinome zu Beginn dieser Arbeit im Hinblick auf ihre Resistenz näher untersucht. Dies soll einen ersten Einblick in das verwendete Modellsystem geben.

#### 5.1.1 Cisplatintoxizität in W1 und resistenten W1CR Zellen

Um die genauen Resistenzwerte der jeweiligen Zelllinien zu ermitteln, wurden hierfür Toxizitätskurven mittels MTT-assay erstellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf 96-Well Platten, welche anschließend für 72 h mit Cisplatin inkubiert wurden.

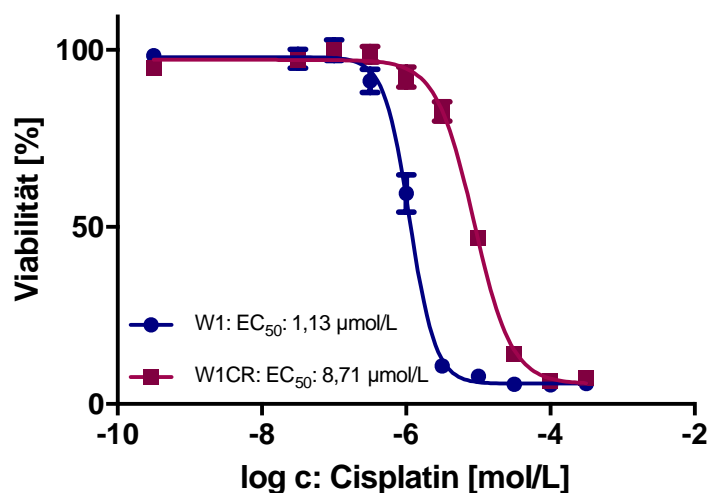


Abbildung 27: Dargestellt ist die Viabilität nach 72 h mittels MTT-assays von W1- und W1CR Zellen, zur Ermittlung der EC<sub>50</sub> von Cisplatin. Der Graph repräsentiert jeweils einen Versuch in Triplikaten.

Die cisplatinresistente Sublinie W1CR zeigt eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber dem Zytostatikum auf, was durch einen ca. achtfach höheren EC<sub>50</sub>-Wert im Vergleich zu W1-Zellen im MTT-assay dargestellt ist (Abb. 27). Daraus resultierend ergibt sich ein hoher Resistenzfaktor für das Ovarialkarzinompärchen ( $R_f = 7,71$ ). Diese Werte bestätigen, dass das

verwendete Zellsystem zur Charakterisierung einer Chemoresistenz geeignet ist. In allen nachfolgenden Toxizitätsversuchen dient eine alleinige Zugabe von Cisplatin als Referenz für Untersuchungen unter Coinkubation, um auf diese Weise den Einfluss der verschiedenen Substanzen auf die Vitalität der Tumorzellen beurteilen zu können.

### 5.1.2 Morphologie der W1 und resistenten W1CR Zellen

Zur grundlegenden Charakterisierung der zellulären Unterschiede beider Zellen wurden diese anfangs mikroskopisch analysiert. Hierfür wurden die cisplatin sensitiven W1 gegen die cisplatinresistenten W1CR Zellen sowohl im normalen Vollmedium als auch unter Cisplatinbehandlung beobachtet. Im Zuge dessen konnten somit auch die stressbedingten strukturellen Veränderungen innerhalb einer Zelle festgehalten werden.

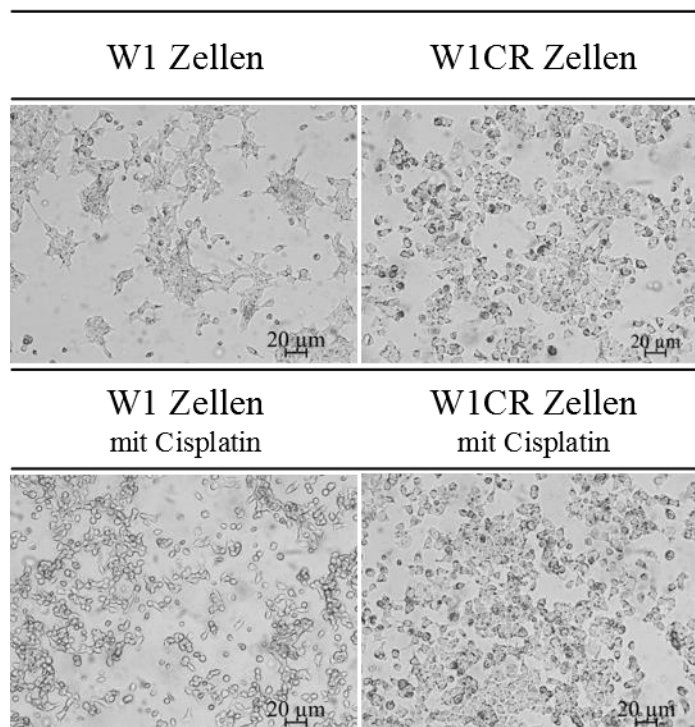


Abbildung 28: Lichtmikroskopische Betrachtung der W1 (links) und W1CR Zellen (rechts) ohne Cisplatin (oben) und unter 72 h Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) Einfluss (unten).

Bei Betrachtung der Aufnahmen ist deutlich zu erkennen, dass die W1 Zellen einen gestreckteren Phänotypen aufweisen und dazu neigen in größeren Zellclustern zu wachsen. Durch ihre Ausspreizung sind die W1 Zellen stärker miteinander vernetzt. Im Gegensatz dazu weisen die resistenten W1CR Zellen morphologische Veränderungen auf. Ihr Phänotyp erscheint eckiger und zeigt kaum eine Affinität zur Ausspreizung. 72 h nach Zytostatikazugabe ändert sich die Erscheinungsform der W1 Zellen. Das Bild lässt eindeutig erkennen, dass die

W1 Zellen ihre Neigung zur Ausspreitung verlieren. Demgegenüber bleibt die W1CR Zelle nach Cisplatininkubation morphologisch unverändert.

Diese Aufnahmen weisen auf eine cisplatinbedingte Stresssituation zur Morphologieänderung der W1 Ovarialkarzinomzellen hin. Es scheint so als ob die W1 Zellen nach Cisplatinkontakt ihre Zell-Zell-Kontakte nicht mehr im selben Ausmaß ausbauen können, wie zuvor. Im Gegensatz dazu wird deutlich, dass sich die cisplatinresistente W1CR Zelle an die Bedingungen angepasst hat und deshalb keine morphologischen Veränderungen aufweist.

### 5.1.3 mRNA Level der W1CR Zellen im Vergleich zu W1 Zellen

Für eine umfangreiche Analyse der Unterschiede zwischen dem Ovarialkarzinom Zellpärchen ist ein Blick auf die Gen-Ebene besonders interessant. Hierfür wurde die W1 Zelllinie samt Subtyp einem genetischen Screening unterzogen.

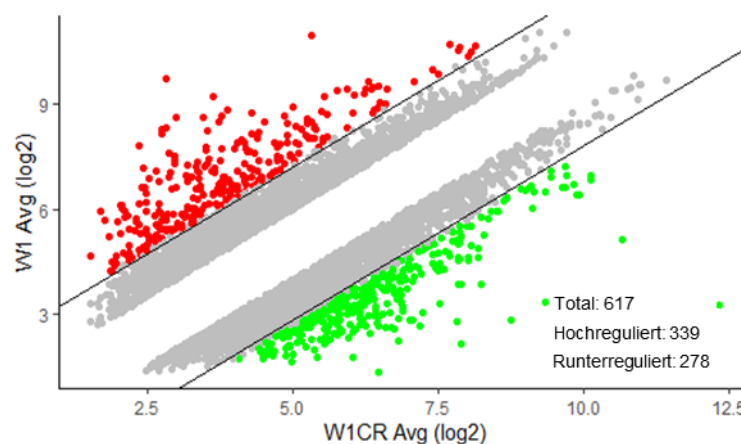


Abbildung 29: Streudiagramm der hoch- und runterregulierten Gene (Vervielfachung  $>5$  /  $<-5$ ) in den resistenten W1CR Zellen im Vergleich zu W1 Zellen, beide Zelllinien jeweils in einem unbehandelten Zustand.

Die Gegenüberstellung von W1 und W1CR Zellen im unbehandelten Zustand auf mRNA-Ebene durch eine Mikroarray-Analyse des gesamten Transkriptoms zeigt eine erhöhte Expression von 339 Genen und eine verminderte Expression von 278 Genen in W1CR Ovarialkarzinomen im direkten Vergleich zur Ursprungszelle.

Für einen funktionellen Einblick in die mit der Resistenz verbundene genetische Regulation, wurde eine DAVID-Analyse durchgeführt, um statistisch signifikante GO-Terme im W1CR/W1 Zelllinienvergleich zu erfassen.



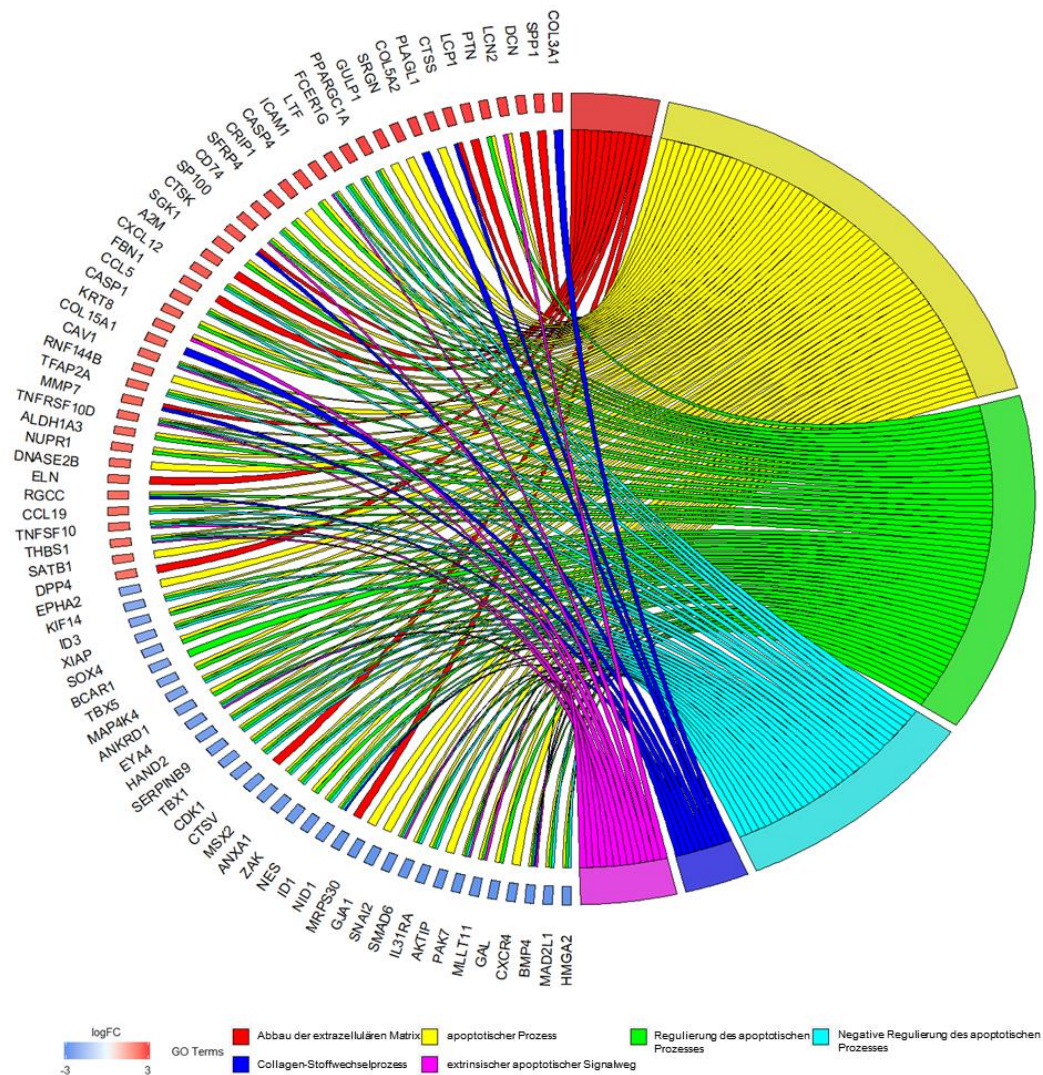


Abbildung 30: Sehnendiagramm, welches eine Zuordnung zwischen deregulierten Genen von W1CR Zellen und beeinflussten GO-Termen darstellt.

Das Sehnendiagramm zeigt angereicherte GO-Terme in der Gruppe der biologischen Prozesse in Bereichen, die mit Apoptose und EZM, sowie Collagen assoziiert sind. Auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass die Expressionsniveaus, welche die GO-Gruppen zur Apoptose enthalten, zwischen W1 und W1CR Zellen mehr oder weniger ausgeglichen vorliegen, während die Familie der EZM- und Collagen-verwandten GO-Terme in den resistenten Zellen hochreguliert sind, mit Ausnahme von NID1 und CTSV. Das NID1 kodierte Nidogen-2 verbindet in erster Linie Collagen und Laminin miteinander [421]. Darüber hinaus sind Zellinteraktionen mit der EZM bekannt, die allerdings für die W1CR Resistenz nicht relevant zu sein scheinen [422]. Das CTSV wird insbesondere in Brust- und Kolorektalkarzinomen exprimiert und scheint im Falle dieser Eierstockkrebsart keine Auswirkung zu zeigen.

Auffallend ist bei der genauen Betrachtung der zehn am stärksten überexprimierten Gene, dass die Hälfte einen Bezug zur EZM Struktur der Zelle aufweist. Collagen-Typ-III, Alpha-1



(COL3A1) ist ein Hauptbestandteil der EZM, welches vermehrt zusammen mit Collagen-Typ-I im Gewebe vorkommt. In Hohlorganen, wie beispielsweise der Gebärmutter, ist es besonders oft vertreten. Auch Collagen-Typ-V Alpha-2 (COL5A2) kommt in Gewebe vor, welches Typ-I-Collagene enthält und den Abbau von heterotyper Fasern reguliert, die sowohl aus Typ-I- als auch aus Typ-V-Collagen bestehen. Die zweithöchste Expression weist auf Osteopontin (SPP1) hin, ebenfalls ein extrazelluläres Strukturprotein, welches die Fähigkeit besitzt an Integrine zu binden [423]. Osteopontin wird in einer Vielzahl von Krebszellen, einschließlich Eierstockkrebs überexprimiert [424]. Decorin (DCN) ist ein kleines zelluläres Proteoglycan und ebenfalls Bestandteil des Bindegewebes. Es bindet an Collagen-Typ-I Fibrillen und ist mitverantwortlich für die Matrixanordnung [425]. Im Gegensatz dazu spaltet Cathepsin S (CTSS), als hoch effiziente Elastase, einige Proteine der EZM, unter anderem auch Collagene. Die Expression kann ferner durch proinflammatorische Faktoren ausgelöst werden und trägt nachweislich zur Tumorentstehung bei [426]. Ähnlich dazu katabolisiert das Cathepsin K (CTSK) Collagene und wird insbesondere in signifikanten Mengen in Brustkrebszellen vorgefunden [427]. Ebenfalls interessant ist die Überexpression des CAV1-Gens, welches das Gerüstprotein Caveolin-1 kodiert. In der Plasmamembran lokalisiert, verbindet dieses Protein Integrin-Untereinheiten mit der Tyrosinkinase FYN. Dieser Schritt ermöglicht eine Kopplung von Integrinen an den Ras-ERK-Signalwegs [428]. Unter den herunterregulierten Genen ist das ZAK zu finden. Dieses Gen gehört zu den Signaltransduktionsmoleküle der MAPK-Familie. Das entsprechende Protein hat eine proapoptotische Wirkung, die in den W1CR Zellen allerdings vermindert aktiv zu sein scheint [429].

Die Daten veranschaulichen eine deutliche Tendenz zur EZM bezogenen Resistenz der W1CR Zellen. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass insbesondere der Eierstockkrebs reichlich von Matrixgewebe umgeben ist. So könnte die Einbettung in eine schützende Mikroumgebung zu mutierten Signalwegen und einer Inhibierung der Apoptose führen. Wie bereits in Kapitel 2.3.4.1 erwähnt wird dieses Phänomen als CAM-DR, eine zelladhäsionsvermittelte Arzneimittelresistenz bezeichnet. Die molekularen Mechanismen der CAM-DR und der zugrundeliegende Signalweg sind derzeit noch nicht vollständig nachvollziehbar. In Anbetracht der Schlüsselrolle für die Resistenzbildung, könnte ein Einblick in die molekularen Grundlagen der CAM-DR ein attraktiver neuer Angriffspunkt für eine frühzeitige Beeinflussung der Resistenzbildung durch pharmakologische Sensibilisierungsstrategien bieten und wird deshalb nachfolgend genauer untersucht.

## 5.2 Charakterisierung der CAM-DR

In vielen vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass CAM-DR ein häufiger Auslöser für die Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika sein kann [281]. Wie in Kapitel 2.4.1 erörtert, stellen Collagene eine wichtige Komponente der EZM dar. Um den potenziellen Einfluss einer CAM-DR vermittelten Resistenz in unseren Zellen zu untersuchen, beschäftigen sich weitere Versuche dieser Arbeit mit der Fragestellung, inwieweit ein CAM-DR Effekt auf die Ovarialkarzinomzellen W1 und W1CR grundsätzlich übertragbar ist. Daher wurden beide Zelllinien zunächst, wie in Kapitel 4.5 beschrieben auf collagenbeschichteten Oberflächen kultiviert und anschließend für Viabilitätsstudien, sowohl mit als auch ohne Cisplatin, für 72 h inkubiert.

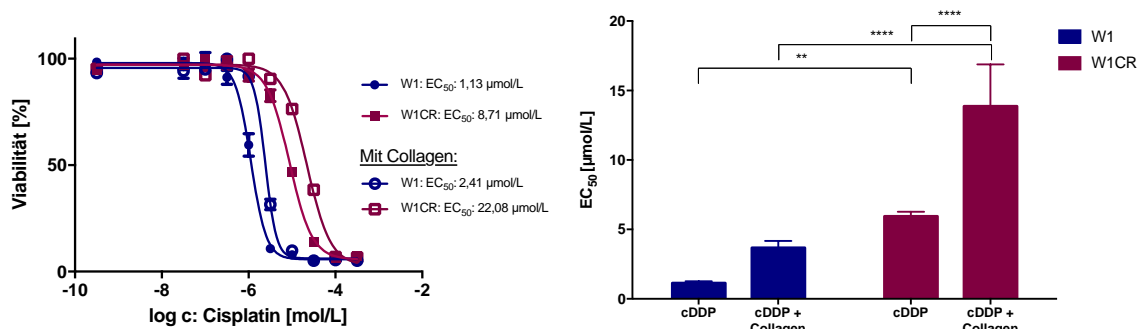


Abbildung 31: Durch Zelladhäsion vermittelte Cisplatinresistenz (CAM-DR) in W1 und W1CR Zellen, induziert durch Collagen Bindungen. Eine exemplarische Viabilitätskurve (links) und ein Balkendiagramm (rechts), welches die Mittelwerte eines n=3 Datensatzes widerspiegelt.

Die Kultivierung auf collagenbeschichteten Oberflächen zeigt eindeutig einen massiven Verlust der Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin. Die abnehmende Empfindlichkeit ist durch eine allgemeine Rechtsverschiebung zu höheren EC<sub>50</sub> Werten der collagenbehandelten Zellen in der Viabilitätskurve gekennzeichnet. Im Fall der collagenbehandelten Zellen sind die EC<sub>50</sub> Werte im Vergleich zu ihren Kontrollen doppelt bis dreifach erhöht. So führt sowohl die Beschichtung in den cisplatinempfindlichen W1 Zellen (unbehandelt EC<sub>50</sub> W1: 1,13 µmol/L vs. behandelt: 2,41 µmol/L), als auch in den cisplatinresistenten Zellvertretern (unbehandelt EC<sub>50</sub> W1CR: 8,71 µmol/L vs. behandelt: 22,08 µmol/L) zu einem EC<sub>50</sub> Anstieg. Es wird deutlich, dass beide Zelllinien, die auf EZM beschichteten Platten einer Cisplatinbehandlung ausgesetzt waren, mit einer signifikanten Resistenzentwicklung reagieren. Bemerkenswert ist dabei die besonders stark ausgeprägte Steigerung der EC<sub>50</sub> von Cisplatin in den bereits resistenten W1CR Zellen. Dieser durch Collagen induzierte erhebliche Anstieg der Resistenz deutet darauf hin, dass CAM-DR offensichtlich ein unabhängiger Prozess ist, der zu bereits bestehenden

Cisplatinresistenz von W1CR Zellen beiträgt, aber nicht zwangsläufig die Grundlage der intrinsisch bedingten Resistenz darstellt.

Die Ergebnisse bestätigen in diesem Zusammenhang die Relevanz von EZM Substraten für eine CAM-DR Bildung. Des Weiteren stimmt diese Beobachtung mit den verminderten intrazellulären Platinkonzentrationen in den Zellen nach der Collagenbehandlung überein (Abb. 36). Vermutlich können Krebszellen an Collagene binden und ihre Mikroumgebung derart verändern, dass die Zellen über eine nachgeschaltete Kaskade Proteine aktivieren, die zu einer verminderten Apoptose führen könnte. Die Aktivierung der erhöhten Chemoresistenz durch EZM Moleküle wird unter anderem den Integrinen zugeschrieben, auf die im späteren Verlauf dieser Dissertation detaillierter eingegangen wird (Kapitel 5.5). Um Indizien von potenziell involvierten Signalwegen und Mechanismen zu sammeln, wurden in dieser Arbeit nachfolgend weitere Untersuchungen unternommen.

### **5.2.1 Morphologie collagenkultivierter W1 und W1CR Zellen**

Im Anschluss wurde untersucht, inwieweit die CAM-DR bedingte Veränderung der Cisplatintoxizität mit morphologischen Unterschieden einhergeht. Dafür wurden lichtmikroskopische Aufnahmen beider Zelllinien erstellt. Die Ovarialkarzinome wurden zu diesem Zweck auf collagenbeschichteten Oberflächen kultiviert und nach 72 h Inkubationszeit abgelichtet. Gleichzeitig wurden weitere Zellen, die ebenfalls mit Collagen behandelt wurden, zusätzlich mit 1  $\mu$ M Cisplatin für 72 h inkubiert. Anschließend erfolgten auch hier Aufnahmen des morphologischen Zellzustandes, um eine mögliche stressbedingte Veränderung zu erfassen.

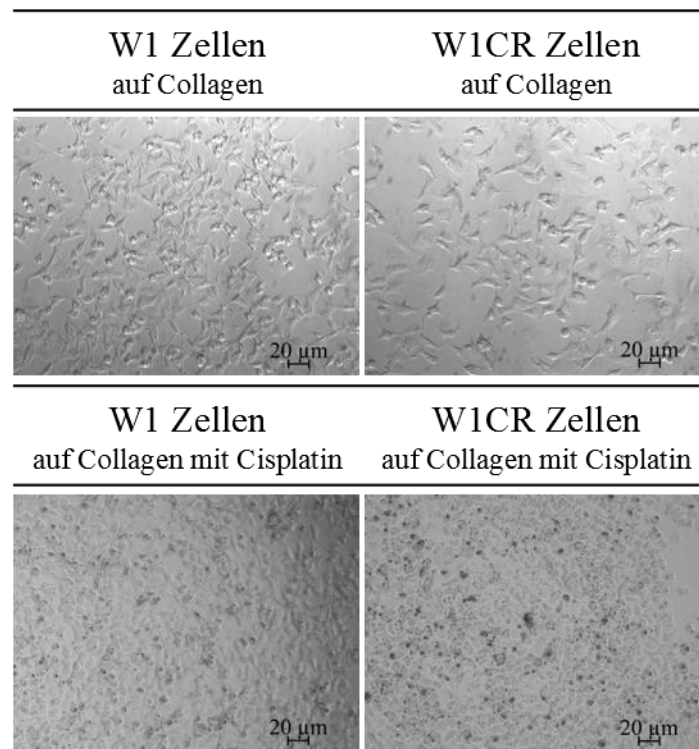


Abbildung 32: Lichtmikroskopische Betrachtung der W1 (links) und W1CR Zellen (rechts) mit Collagen (oben) und mit Collagen unter 72 h Cisplatin (1 µM) Einfluss (unten).

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen ermöglichen einen Einblick in die Einbettung der Eierstockkrebszellen auf einer collagenbeschichteten Oberfläche. Anhand der Bilder ist gut zu erkennen, dass sich beide Zelllinien durch die Collagenmatrix verstärkt ausspreizen. Diese morphologische Anpassung ist insbesondere für die W1CR Zellen neu, die ohne Collagen eine deutlich weniger gestreckte Form annehmen (Abb. 28). Nach zusätzlicher Beimpfung der auf collagengewachsenen Zellen mit Cisplatin ist zu beobachten, dass die Zellen weiterhin in starken Zellverbänden wachsen. Optisch wird auf diese Weise ersichtlich, dass die Ovarialkarzinomzellen durch gleichzeitige Behandlung mit EZM Bestandteilen besser mit cisplatinbedingtem Stress umgehen können. Insbesondere die Toleranz der W1 Zellen nach Cisplatinzugabe scheint sich durch die anwesende Collagenmatrix im Vergleich ohne EZM Molekül (Abb. 28) deutlich zu verbessern. Eine mögliche Ursache für dieses Verhalten könnte auf eine strukturell bedingte Abschottung gegen chemotherapeutischen Stress durch den erhöhten Anteil an Collagenmatrix zurückzuführen sein. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Zellen im Stande sind über Collagene Adhäsionsrezeptoren zu binden, welche wiederum durch eine nachgeschaltete Signalkaskade zu einer verstärkten Chemoresistenz führen könnten.

## 5.2.2 mRNA Level der collagenbehandelten Zellen

Um die Beeinflussung der zellulären Reaktion auf Collagen und die bestehende Cisplatinresistenz in den W1CR Zellen weiter zu analysieren, wurde im nächsten Schritt die mRNA Deregulierung auf genetischer Ebene überprüft. Der erste Vergleich der Genexpression erfolgte hierbei zwischen W1 Zellen, welche mit und ohne Collagen kultiviert wurden. Der zweite Vergleich stellt dasselbe Szenario für die resistenten W1CR Zellen dar.

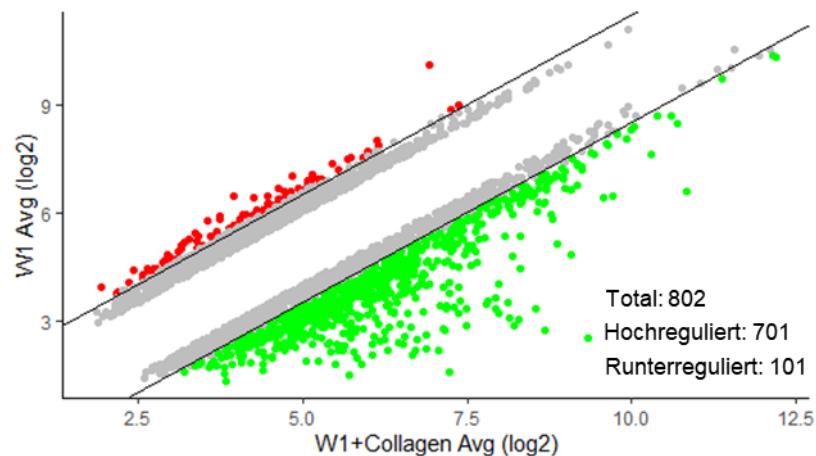


Abbildung 33: Streudiagramm der hoch- und runterregulierten Gene (Vervielfachung  $>3$  /  $<-3$ ) in den cisplatinempfindlichen W1 Zellen im Vergleich zu W1 Zellen, die auf Collagen kultiviert wurden.

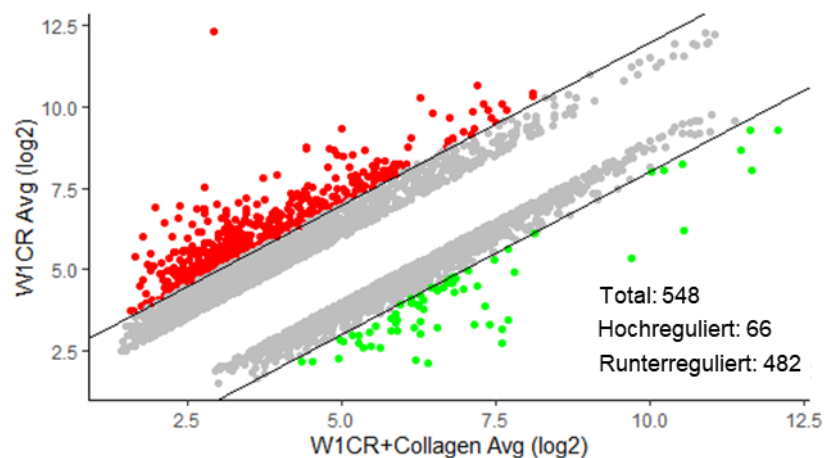


Abbildung 34: Streudiagramm der hoch- und runterregulierten Gene (Vervielfachung  $>3$  /  $<-3$ ) in den resistenten WCR1 Zellen im Vergleich zu WCR1 Zellen, die auf Collagen kultiviert wurden.

Das erste Streudiagramm veranschaulicht die Genexpression von W1 Zellen im Vergleich zu collagenbeschichteten W1 Zellen. Zu beobachten ist, dass nach Collageninkubation 701 Gene hochreguliert wurden und lediglich 101 Gene eine Downregulation aufweisen (Abb. 33). Auffallend ist, dass die Anzahl der hochregulierten Gene der resistenten Zelllinie nach Collagenbehandlung erheblich geringer ausfällt. Hier weisen nur 66 Gene eine verstärkte Aktivierung auf. Dementsprechend fällt die Zahl der *down*-regulierten Gene der resistenten

Zelllinie deutlich höher aus. Insgesamt 482 Gene weisen nach Collagenkultivierung eine Herabregulierung ihrer Expression auf (Abb. 34). Hierbei sei erwähnt, dass 136 Gene der 482 herunterregulierten Gene zu den verstärkt exprimierten Genabschnitten der Resistenzkennung von W1CR vs. W1 gehören, was in Abb. 29 dargestellt ist.

Dieser mRNA Datensatz führt zu der Annahme, dass die sensitiven W1 Zellen mithilfe von Collagen dazu in der Lage sind, entsprechende Signalwege und damit verbundenen Gene verstärkt zu aktivieren. Dadurch könnten Mechanismen in Gang gesetzt werden, die zu einer erhöhten Cisplatinresistenz mittels Collagen führen. Dies passt zu den Beobachtungen aus Abb. 31. Die bereits resistenten W1CR Ovarialkarzinome fahren mit Hilfe der Collagenbindungen ihre Genexpression herunter. Zunächst scheint dieses Ergebnis überraschend zu sein, doch legt diese Analyse die Vermutung nahe, dass die ohnehin schon resistente Zelllinie nicht auf eine verstärkte Aktivierung auf mRNA Ebene angewiesen ist und dementsprechend über eine Umstrukturierung der Signalkaskade eine *down* Regulierung der Genexpression initiieren könnte. Eindeutig geht jedoch daraus hervor, dass die CAM-DR bedingte Resistenz in W1 und W1CR Zellen einen grundsätzlich unterschiedlichen Weg einschlägt und somit vermutlich nicht über die gleiche Signaltransduktion höheren Cisplatinkonzentrationen widerstehen.

Zur fortführenden Interpretation der *gene array* Daten aus Abb. 34 wurde als nächstes eine DAVID-Analyse durchgeführt. Diese Methode dient dazu die statistisch signifikanten GO-Terme in einem Vergleich zwischen W1CR Zellen mit Collagen vs. W1CR Zellen zu ermitteln.

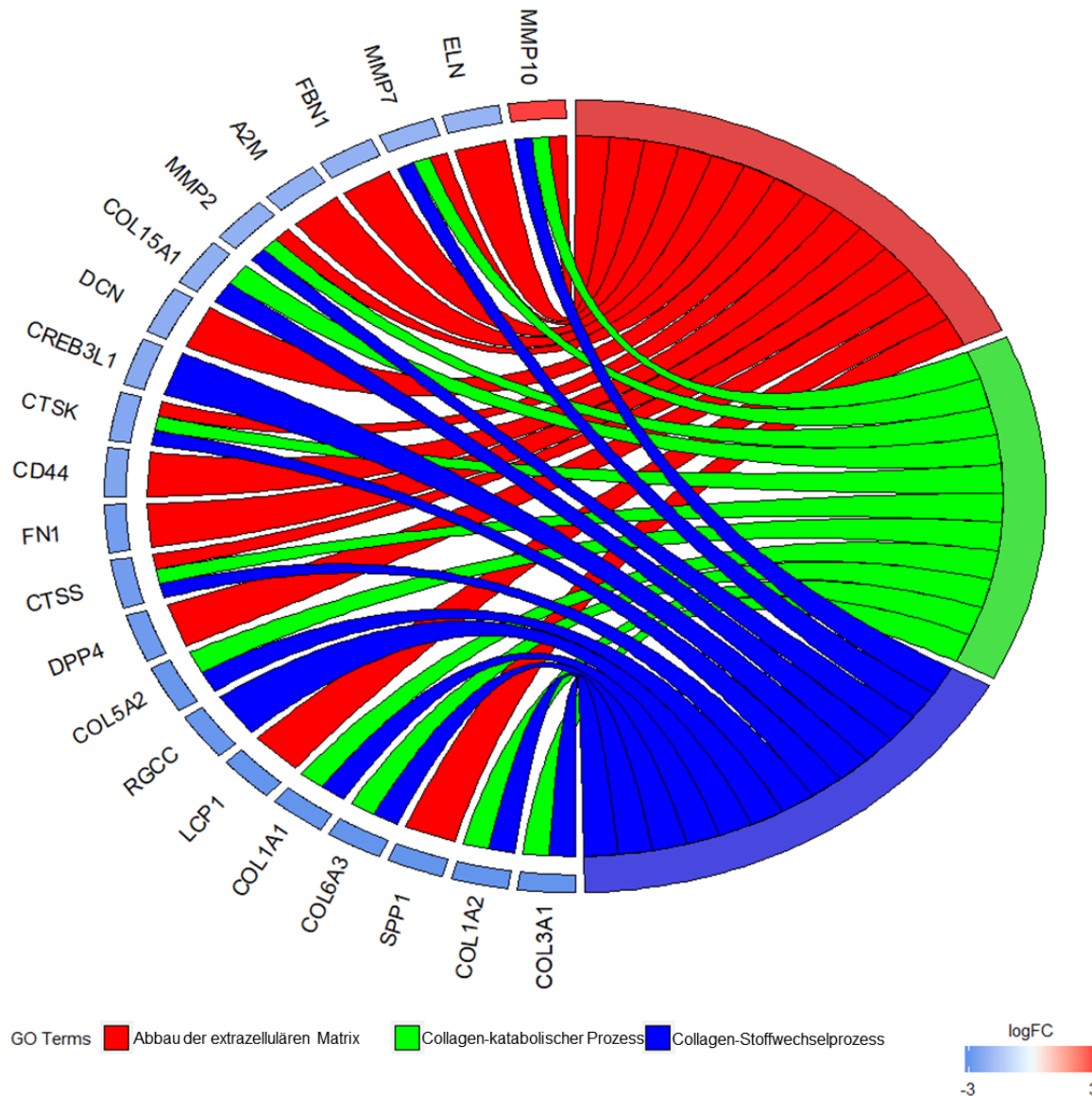


Abbildung 35: Sehnendiagramm, welches eine Zuordnung zwischen deregulierten Genen von W1CR Zellen unter Einfluss von Collagen und der beeinflussten Go-Termen darstellt.

Auch hier bestätigt sich das Bild, dass offenbar alle Gene der EZM- und Collagen-GO Anreicherungsdaten, mit der Ausnahme von MMP10, eine verminderte Genexpression aufweisen. Bei dem stark hochregulierten MMP10 handelt es sich um eine Stromelysin, die an der Aktivierung von pro-MMPs beteiligt ist und eine Collagenase ähnliche Domäne besitzt. Allerdings spaltet MMP10 kein fibrilläres Collagen vom Typ I [430]. Bei näherer Betrachtung der Gene fällt direkt auf, dass sechs Collagen-Typen darunter: COL3A1, COL1A2, COL6A1, COL5A2 und COL15A1 zum Teil besonders stark herunterreguliert werden. Sowohl COL3A1 als auch COL5A2 waren dabei im direkten Vergleich zwischen W1CR und W1 Zellen besonders stark in den resistenten W1CR Zellen hochreguliert (Abb. 30). Dieses Phänomen ist nicht nur für diese beiden Collagengene zu beobachten, sondern insbesondere auch für die

zuvor verstärkt exprimierten EZM induzierten Gene, wie z.B. SSP1, DCN, CTSS und CTSK (Abb. 30). Die Genexpression dieser Gene fährt nach Kultivierung der W1CR Zellen auf Collagen stark herunter. Diese genetische Gegenregulation deutet letztendlich darauf hin, dass durch die künstlich zugefügte Collagen I-Menge kein Bedarf an einer verstärkten Matrix assoziierten Genexpression mehr besteht. Insbesondere die eindeutige und hohe Anzahl an Genen mit Collagenbezug unterstützt diese Vermutung. Dies bestätigt die bereits postulierte Theorie, dass die W1CR Zellen durch die Collagenbeschichtung eine Umstrukturierung der Signalwege induzieren und damit andere Kaskaden mobilisieren können. Aufgrund des Überschusses an Collagen I scheint eine Expression von Collagengen nicht mehr benötigt und dementsprechend eingespart zu werden. Im Allgemeinen ist die Resistenz multifraktionell, da mehrere Mechanismen gleichzeitig in derselben Tumorzelle zur Verfügung stehen. Resistente Zellen sind dafür bekannt, ihre Toleranz über eine Vielzahl unterschiedlicher Signalwege zu regulieren. Je nach Lebensbedingung stehen diese Mechanismen bereit und werden möglichst effizient eingesetzt [68].

All diese Anzeichen deuten darauf hin, dass die CAM-DR, getrennt von der eigentlichen intrinsischen Resistenz abläuft und sich über einen anderen Mechanismus äußert. In diesem CAM-DR Signalweg könnte die resistente Zelle die Vorteile ihrer neuen Umgebung (Collagen I-Überfluss) somit möglichst energieeffizient ausnutzen, um bestmöglich gegen die Cisplatinbedingungen zu bestehen.

### **5.3 Zelluläre Aufnahme von Cisplatin**

Um zu überprüfen, ob die Resistenz von W1CR Zellen durch eine verminderte zelluläre Akkumulation des Zytostatikums induziert wird, beschäftigen sich die nächsten Versuche dieser Arbeit mit fAAS Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Platinkonzentrationen innerhalb der Ovarialkarzinomzellen. Hierfür wurden die Zellen wie in Kapitel 4.9.4 beschrieben vorbereitet und anschließend spektroskopisch vermessen.



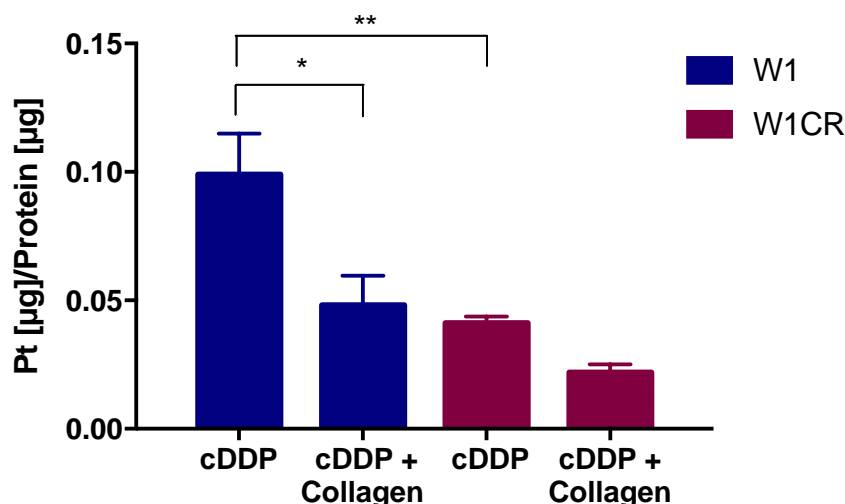


Abbildung 36: Analyse der intrazellulären Platinkonzentration mittels fAAS in W1 und W1CR Zellen mit und ohne Collagen Behandlung, nach einer Inkubationszeit von 72 h mit 1 µM Cisplatin (n=3).

Diese Daten zeigen, dass der Platingehalt in den resistenten Zellen im Vergleich zu den identisch behandelten W1 Zellen um etwa die Hälfte geringer ausfällt. Außerdem wird deutlich, dass eine Behandlung mit Collagen in beiden Zellen mit einer verminderten Cisplatinaufnahme einhergeht. Dieser Effekt ist in den Wildtyp Zellen allerdings stärker ausgeprägt als in den W1CR Zellen. Die niedrigen Platinspiegel in W1CR Zellen im Vergleich zu den cisplatinempfindlichen W1 Zellen stellen einen ersichtlichen Grund für eine geringere Zytotoxizität dar, die durch Collagen weiter abgeschwächt wird. Eine naheliegende Erklärung für diese Ergebnisse könnte auf die Aktivität zellulärer Transporter zurückzuführen sein. Aufgrund dessen wurden nachfolgend Efflux- und Influxtransporter, die speziell für Cisplatin bekannt sind genauer untersucht.

### 5.3.1 Proteinexpression des Effluxtransporters MRP2

Die vorangegangenen Ergebnisse zur intrazellulären Cisplatinkonzentration gaben Anlass, das Expressionsniveau des im Zusammenhang mit Cisplatinresistenzen am besten beschriebenen Effluxtransporters, MRP2 zu analysieren. Sich hierbei ergebende Veränderungen können zu einer verminderten oder erhöhten Akkumulation von Cisplatin innerhalb der Zelle führen und damit potenziell zur Resistenz der Zelle beitragen.

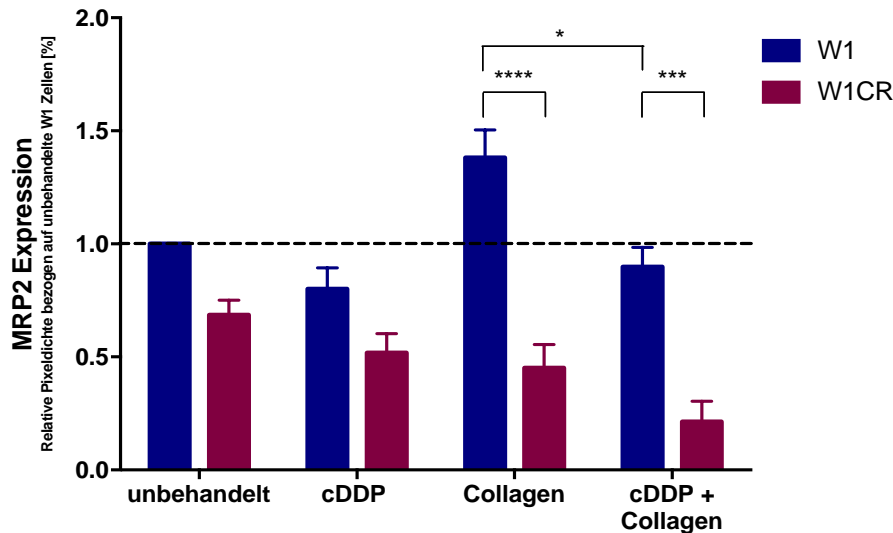


Abbildung 37: Analyse der Proteinexpression von MRP2 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten W1 Zellen als 100 % festgelegt (n=4).

Die Untersuchungen des Proteinspiegels von MRP2 lassen erkennen, dass der Effluxtransporter nicht entscheidend dereguliert wird. Allerdings wird deutlich, dass MRP2 auf einem niedrigeren Niveau in den W1CR Zellen exprimiert wird als in den W1 Zellen. Überraschend ist außerdem der verminderte Proteingehalt nach erfolgter Cisplatinbehandlung. Somit ist eine vermittelte Resistenz über eine erhöhte Expression des Effluxtransporters MRP2 auszuschließen. Dieser Transporter ist insbesondere dafür bekannt, sehr spezifisch das GSH gebundenes Cisplatin aus der Zelle zu schleusen. Deshalb erfolgte im nächsten Versuch eine genauere Betrachtung des GSH Status innerhalb der Zelle.

### 5.3.1.1 Untersuchungen der GSH Konzentration

Als einer der wichtigsten Entgiftungsmechanismen ist GSH in der Lage Cisplatin abzufangen und mithilfe von MRP2 aus der Zelle zu transportieren. Aus diesem Grund wurde eine GSH-Bestimmung in beiden Zellarten unter den o.g. Behandlungen durchgeführt. Die Versuchsvorbereitung und Durchführung wurde, wie in Kapitel 4.10 beschrieben vorgenommen und anschließend vermessen.

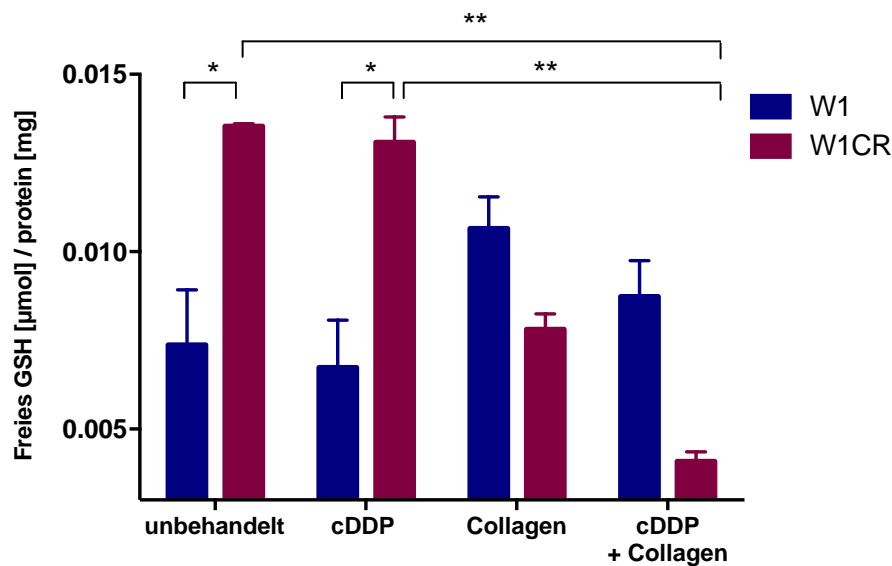


Abbildung 38: Quantifizierung des freien Glutathions in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h ( $n=3$ ).

Bemerkenswerterweise zeigen die Daten, dass die unbehandelten und mit Zytostatikum beimpften resistenten Zellen den höchsten Gehalt an freiem GSH enthalten. Darüber hinaus weisen die W1CR Zellen eine doppelt so hohe Konzentration an GSH auf wie ihre Wildtyp Vertreter. Diese Beobachtung ist allerdings nicht auf die collagenbehandelten W1CR Zellen übertragbar. Die cisplatinempfindlichen W1 Zellen deuten ebenfalls auf keinen signifikant erhöhten GSH Wert nach Cisplatinbehandlung hin.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass trotz geringem MRP2 Expressionsniveaus in den W1CR Zellen eine verstärkte GSH vermittelte Entgiftung der Zelle stattfindet, was die niedrigen intrazellulären Cisplatinkonzentrationen erklären könnte (Abb. 36). Die GSH vermittelte Entgiftung stellt somit eine potenzielle Ursache für den intrinsischen Resistenzmechanismus in W1CR Zellen dar. Dadurch stellt sich die Frage, über welche Signalwege die GSH Produktion stimuliert wird. Für diese Antwort sind ergänzende Versuchsreihen erforderlich. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte ein mögliches Szenario ausfindig gemacht werden (Kapitel 5.9).

### 5.3.2 Proteinexpression des Influxtransporters CTR1

Darüber hinaus kann die intrazelluläre Cisplatinkonzentration auch durch einen verminderten Influx reduziert werden. Dies könnte somit ebenfalls ein Grund für die in Abb. 36 beobachtete geringere Platinkonzentration der W1CR Zellen darstellen. Der bekannteste Cisplatininfluxtransporter CTR1 wurde deshalb nachfolgen auf Proteinebene genauer betrachtet.

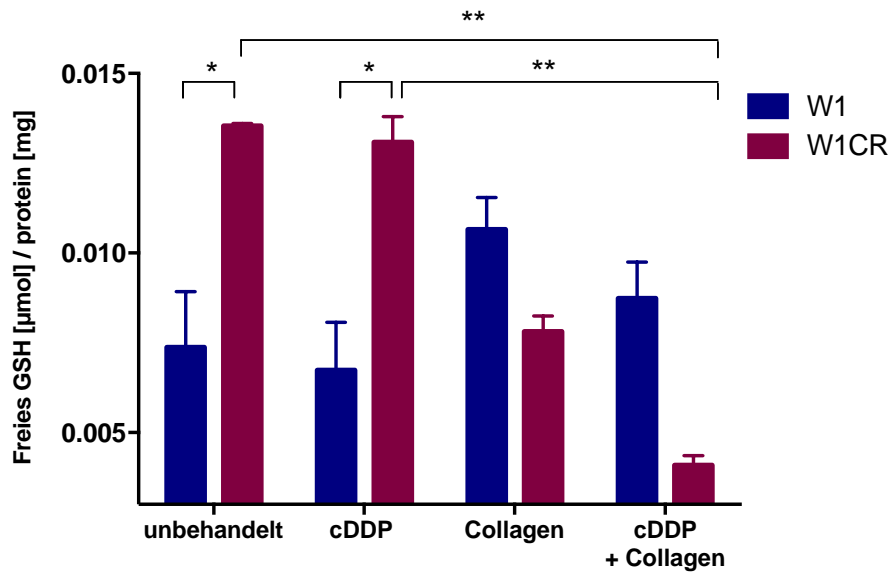


Abbildung 39: Analyse der Proteinexpression von CTR1 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten W1 Zellen als 100 % festgelegt ( $n=3$ ).

Die Grundexpression des CTR1 Influxtransporters liegt bei allen Behandlungsschemata unter dem Proteinlevel der unbehandelten W1 Zellen. Darüber hinaus stimmt das Expressionsprofil des Cisplatintransportes mit dem Resistenzverhalten der Zellen überein. CTR1 wird in W1CR Zellen deutlich weniger exprimiert als in W1 Zellen. Weiterhin ist die Proteinexpression der cisplatinbehandelten W1CR Zellen nach Collagenzugabe ebenfalls herunterreguliert.

Beide Beobachtungen passen zu den oben angegebenen intrazellulären Platindaten (Abb. 36). Durch die Behandlung mit Cisplatin werden die CTR1 Level in beiden Zellen als eine Gegenregulation weiter herunterreguliert. Selbiges gilt für die kombinierte Behandlung der Zellen mit Collagen, wobei hier das Ausmaß der Downregulation von CTR1 in den W1CR Zellen das der Cisplatinbehandlung nochmals übertrifft. Damit verbunden ist eine geringere Cisplatinintensität innerhalb der Zelle, somit erreicht das Zytostatikum sein angestrebtes *target* nicht, was einen klaren Einblick in die Mechanismen der in W1CR Zellen existierenden Resistenz ergibt. Zu berücksichtigen ist an dieser Stelle, dass der CTR1 Transporter nur an der Zellmembran einen aktiven Influx von Cisplatin beeinflussen kann. Die Proteinlysate spiegeln den gesamten Anteil des Kupfertransporters und somit auch den internalisierten CTR1 Anteil wider.

## 5.4 Etablierung eines 3D Models

Zweidimensionalen (2D) Gewebekulturmodellen mangelt es an realistischer Komplexität, da die richtige Gewebearchitektur und die Zell-Zell-Kontakte verloren gehen. Um den Einfluss der Mikroumgebung besser untersuchen zu können wurde ein 3D Model für die W1 und W1CR Zellen etabliert. Durch dieses neue System können in vivo Situationen besser nachgestellt werden.

### 5.4.1 Morphologie agarosekultivierter W1 und resistenten W1CR Zellen

Beide Zelllinien wurden zunächst, wie in Kapitel 4.6 ausführlich erklärt, auf Agarosebeschichteten Platten ausgesät. Bereits nach 24 h ist eine Ausbildung von Sphäroiden zu erkennen. Als Erstes erfolgte eine lichtmikroskopische Beobachtung der in Agarose eingebetteten Zellen.

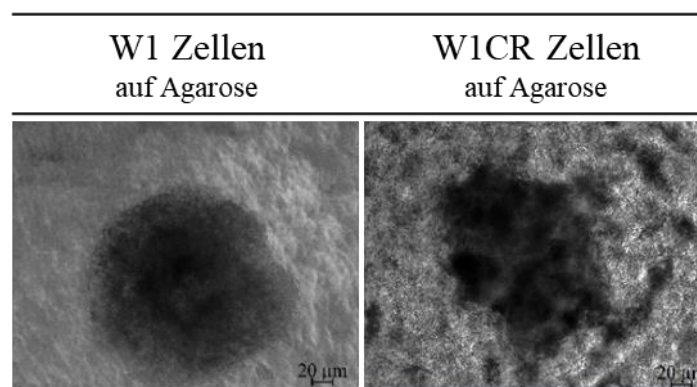


Abbildung 40: Lichtmikroskopische Aufnahmen von W1 Zellen (links) und W1CR Zellen (rechts) Sphäroiden.

Die lichtmikroskopischen Bilder der aus W1 Zellen gebildeten Sphäroide zeigen einen klar umrissenen Verbund, der außerdem geometrisch betrachtet einem Kreis sehr nahekommt (Abb. 40 links). An den dunkleren Stellen im Zentrum ist die Ansammlung an Zellen besonders kompakt, wohingegen für die W1CR Zellen keine Sphäroidbildung erkennbar ist. Die resistenten Zellen bilden sehr lockere, vereinzelt Zellansammlungen, die nicht wie die Sphäroide der W1 Zellen in einem erkennbaren Konstrukt zusammenhängen (Abb. 40 rechts). Darüber hinaus variiert die geometrische Formgebung der losen Zellgruppierung stark. Die resistenten Zellen scheinen möglichst viel Fläche zur Ausbreitung einzelner Kolonien auszunutzen. Generell ist zu beobachten, dass die W1CR Zellen eher weniger dazu neigen, in mehreren Zellschichten übereinander zu wachsen.

Auch wenn die mangelnde Fähigkeit der W1CR Zellen Sphäroide auszubilden zunächst überrascht, so war bereits in Abb. 32 zu beobachten, dass die W1 Zellen eher zu einer stärkeren

Vernetzung neigen als ihr resistenter Subtyp. Die morphologischen Aufnahmen des 3D Modells bestätigen somit die erhöhte Neigung zu Zell-Zell-Kontakten in den Wildtyp Zellen.

#### 5.4.2 Viabilitäts-Messung des 3D Modells via AlamarBlue-assay™

Im nächsten Schritt wurde die Zytotoxizität von Cisplatin im 3D Kulturmodell für beide Zelltypen analysiert. Da für die Messung der Sphäroide der AlamarBlue-assay™ verwendet wurde, mussten für die Kontrolle ebenfalls 2D Messungen mit demselben assay Verfahren durchgeführt werden.

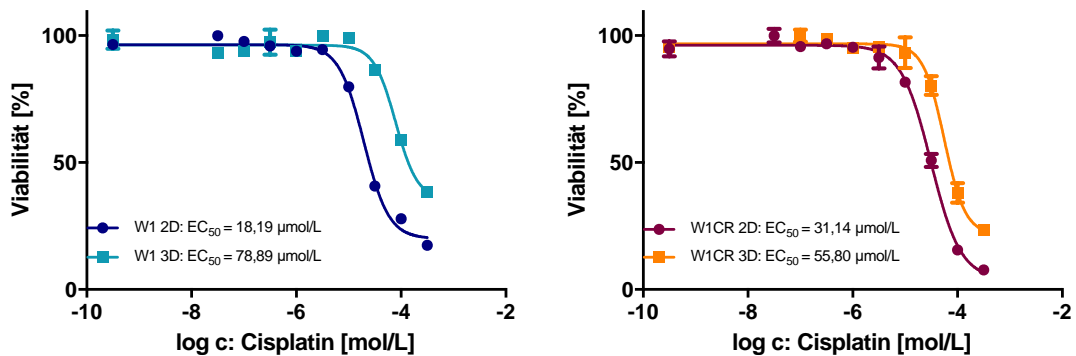


Abbildung 41: Zytotoxizität von Cisplatin nach 72 h Inkubationszeit im 2D und 3D Modell in W1 Zellen (links) und W1CR Zellen (rechts). Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten.

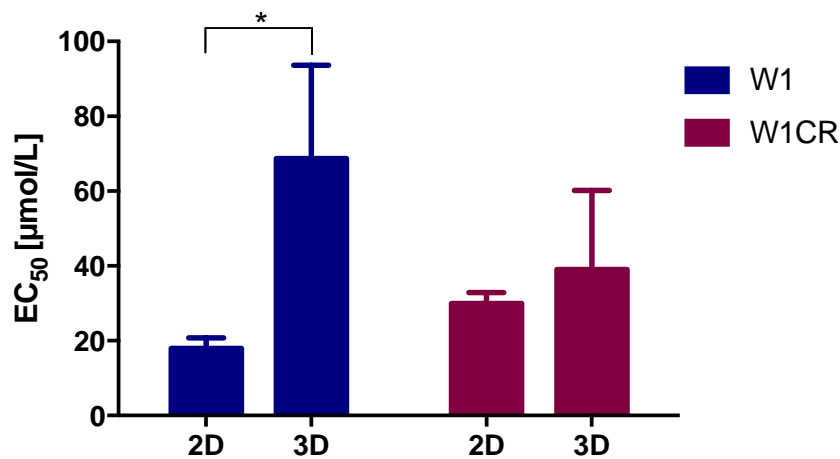


Abbildung 42: Zytotoxizität von Cisplatin nach 72 h im 2D und 3D Modell in W1 Zellen und W1CR Zellen. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte aller Daten dar ( $n=3$ ).

Im direkten Vergleich der  $EC_{50}$  Werte der zweidimensional gewachsenen W1 und W1CR Zellen in Abb. 41 ist erkennbar, dass die W1CR Zellen auch in diesem Toxizitäts-assay eine höhere Resistenz gegenüber Cisplatin aufweisen als ihre empfindlichen Wildtypzellen. Die Kurven in Abb. 41 lassen erkennen, dass die  $EC_{50}$  Werte im 3D Modell deutlich höher sind als in den unbeschichteten Platten des 2D Modells. Diese Erkenntnis ist auf die Ausbildung der Sphäroide und das damit verbundenen Zellwachstum auf mehreren Ebenen zurückzuführen, da

dadurch wesentlich mehr Zellen pro Well wachsen können. In Abb. 42 wird die signifikant erhöhte Resistenz in den W1 Zellen durch die Einbettung in eine 3D Matrix deutlich sichtbar, während die resistenten Zellen im 3D Model keine besonders nennenswerte Steigerung der Cisplatinresistenz aufweisen. Diese Beobachtung ist auf die mangelnde Fähigkeit der Sphäroidbildung zurückzuführen, die in Abb. 40 gut zu erkennen war. Durch die flächendeckende Ausbreitung der W1CR Zellen auf der Agarose-bedeckten Oberfläche kann mehr Cisplatin an die einzelnen Zellen gelangen. Wohingegen die W1 Zellen durch ihre Sphäroid-Formung wahrscheinlich dazu in der Lage sind, ihre inneren Zellen von Cisplatin abzuschirmen, was wiederum mit einem massiven Verlust der Empfindlichkeit gegenüber dem Chemotherapeutikum einhergeht.

Aus den erhobenen Daten geht somit hervor, dass die Ausbildung von Zell-Zell Kontakt für die W1 Zellen einen höheren Stellenwert besitzt. Sehr wahrscheinlich können die Wildtyp Zellen EZM Moleküle nicht nur durch Abschirmung von Zytostatika nutzen, sondern auch über die Kontakte Signalmechanismen in Gang setzen. Zumindest deuten darauf die Collagendaten aus Abb. 31 hin, die eine CAM-DR vermittelte Resistenz nahelegen sowie die in Abb. 33 vergleichbar hohe Zahl an überexprimierten Genen nach Collagenbehandlung. Im Gegensatz dazu spielen Zell-Zell-Kontakte für die bereits resistenten W1CR Zellen eine eher untergeordnete Rolle, da sie weder dazu neigen, in Agglomeraten auf 2D Oberflächen (Abb. 32) zu wachsen, noch in einem 3D Model bestrebt sind, Sphäroide auszubilden. Somit bestärkt dies die Vermutung, dass die W1CR Zellen zwar EZM Moleküle, wie beispielsweise Collagen, zur Resistenzsteigerung nutzen, dass dies jedoch auf einen völlig anderen Signalweg geschieht als in den W1 Zellen. Um diesem unbekanntem potenziellen Mechanismus auf den Grund zu gehen, soll nachfolgend der Fokus auf collageninduzierte Signalwege gerichtet werden.

## 5.5 Einfluss des $\beta 1$ -Integrins auf CAM-DR der W1 Zelllinien

Die weitere Entwicklung dieser Arbeit führte zu einer genaueren Betrachtung der Wechselwirkungen zwischen Oberflächenrezeptoren und der EZM Komponente Collagen. Integrine scheinen die wahrscheinlichsten Kandidaten für die Vermittlung der Collagenbindung zu sein, von der bekannt ist, dass sie EZM bindende Ereignisse in intrazelluläre *outside-in-signaling* umwandeln, welche die Zellproliferation und das Überleben der Zelle begünstigen.

### 5.5.1 Auswirkung des $\beta 1$ -Integrin *knock-downs* in W1 Zellen

Die voran gegangenen Daten deuten auf eine Beteiligung von  $\beta 1$ -Integrin hin, da alle Collagen Typ I bindenden Integrine eine  $\beta 1$ -Untereinheit aufweisen. Somit bestand der nächste naheliegende Schritt in einem *knock-down* des  $\beta 1$ -Integrins in beiden Zellarten. Dies wurde, wie im Abschnitt Material und Methoden Kapitel 4.3 beschrieben, in einem lentiviralen Ansatz durchgeführt. Um die Effizienz der Transduktion zu bestätigen, wurden sowohl die neu erzeugten *knock-down* Zellen ( $\beta 1$ -kd) als auch die entsprechenden *scramble* Kontrollzelllinien (sc) im Western Blot analysiert, um die Proteinmenge an  $\beta 1$ -Integrin in den neu gewonnenen Zellen im Verhältnis zu den Wildtypzellen (wt) zu messen.

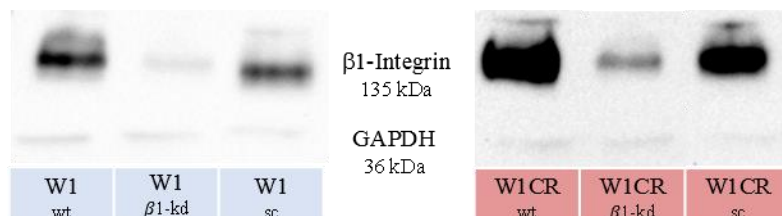


Abbildung 43: Exemplarische Detektion der  $\beta 1$ -Integrin und GAPDH Proteinbanden von W1 und W1CR Zellysaten, sowie die jeweiligen  $\beta 1$ -Integrin *knock-down* Lysate und entsprechende *scramble* Kontrollzellysate ( $n=3$ ).

Anhand dieser Proteinexpressionen wird deutlich, dass beide  $\beta 1$ -kd Ansätze in W1 und W1CR Zellen eine überzeugende *Down*-Regulierung des  $\beta 1$ -Integrins aufweisen, wobei in den resistenten W1CR  $\beta 1$ -kd Zellen noch eine kleine Restmenge an  $\beta 1$ -Integrin vorgefunden werden kann. Die Kontroll *scramble* Zellen beider Ovarialkarzinomzellen zeigen wie gewünscht eine dem wt ähnlichen Proteingehalt auf. Außerdem offenbart die Proteinquantifizierung einen beträchtlichen Unterschied in der Expression des  $\beta 1$ -Integrin in W1CR Zellen, welche deutlich mehr Protein aufweisen im Vergleich zu ihren cisplatinempfindlichen W1 wt Zellen.



### 5.5.1.1 Morphologie des $\beta 1$ -Integrin *knock-downs* in W1 Zellen

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde nach erfolgreicher Transduktion ebenfalls die Zellmorphologie der Ovarialkarzinome beurteilt. Veränderungen in den Phänotypen können dabei erste Aufschlüsse über das Zellverhalten geben.

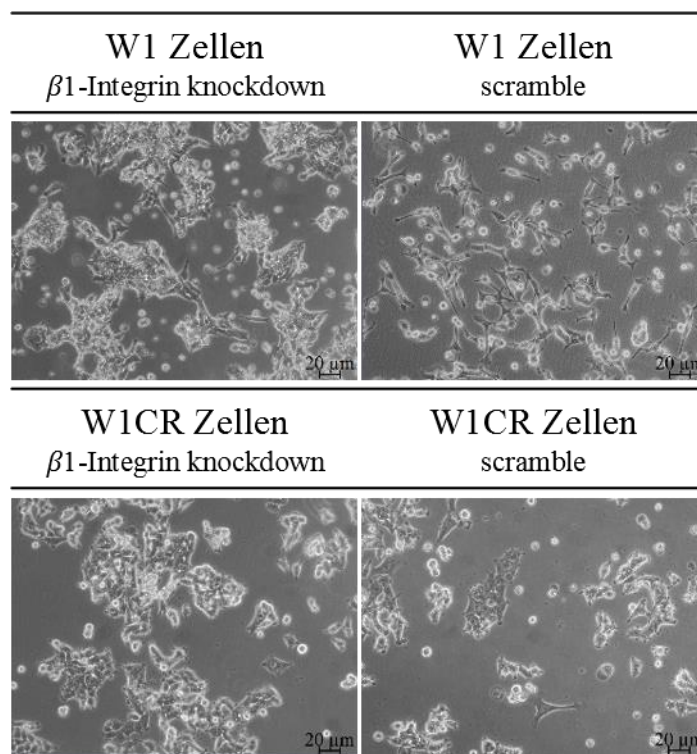


Abbildung 44: Lichtmikroskopische Betrachtung der W1 (oben) und W1CR Zellen (unten) als  $\beta 1$ -Integrin knock-down (links) und als scramble Variante (rechts).

Das Fehlen des  $\beta 1$ -Integrins beeinflusst die Adhäsionsfähigkeit der Zellen mit der Kultivierungsoberfläche. Deutlich wird, dass kd-Zellen dazu neigen, enge Zellagglomerate zu bilden und sich weniger auf der Oberfläche ausbreiten. In diesem Zusammenhang fiel schon während der Zellkultur auf, dass die  $\beta 1$ -kd W1 und W1CR Zellen bereits durch Abklopfen der Kulturflasche ihre Haftung verloren haben und im Clusterverbund im Medium schwammen, wenn sie nicht vorsichtig behandelt wurden. Erstaunlich war außerdem, dass die  $\beta 1$ -kd Zellen bei hoher Konfluenz dazu neigten, vermehrt übereinander zu wachsen. Insbesondere die W1CR  $\beta 1$ -kd Zellen zeigen eine auffällige morphologische Veränderung im Vergleich zu ihren nicht lentiviral behandelten W1CR wt Zellen (Abb. 32) auf. Nach der Transduktion weisen die Zellen eine wesentlich höhere Affinität zur Clusterbildung auf als zuvor.

Diese Erscheinungsänderung lässt sich damit erklären, dass die Zellen durch den Mangel an  $\beta 1$ -Integrin keine ausreichende Stabilität über die Adhäsion am Kulturflaschenuntergrund finden und sich deshalb verstärkt über Zell-Zell-Kontakte gegenseitig Halt geben.

### 5.5.1.2 Effekt des *knock-downs* auf die Integrin-vermittelte Resistenzbildung

Um aufzuklären, ob der Verlust des  $\beta 1$ -Integrins die Resistenzbildung durch Collagen beeinflussen kann, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit sowohl die  $\beta 1$ -kd als auch die sc Zellen beider Zelllinien auf ihre Cisplatintoxizität in Ab- und Anwesenheit von Collagen untersucht.

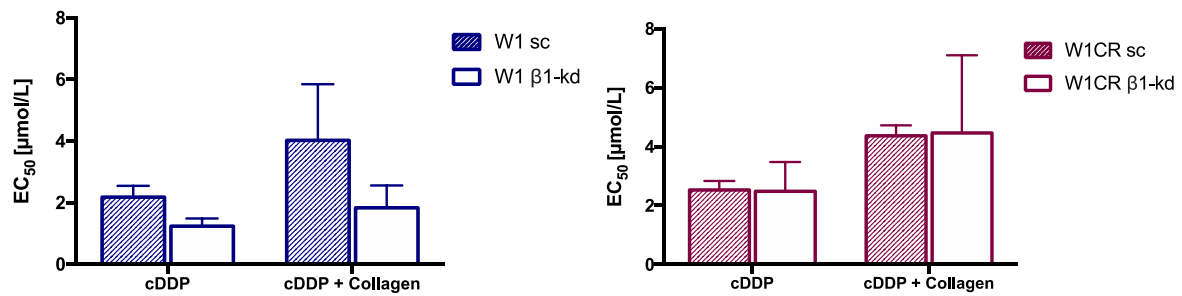


Abbildung 45: Durch Zelladhäsion vermittelte Cisplatinresistenz in W1 (links) und W1CR (rechts)  $\beta 1$ -Integrin *knock-down* und scramble Zellen, induziert durch Collagenbindungen (n=3).

Bemerkenswert ist, dass der Einfluss des  $\beta 1$ -Integrin *knock-downs* auf die Cisplatinempfindlichkeit für beide Zelltypen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die W1  $\beta 1$ -kd Zellen werden im Vergleich zu den sc Kontrollzellen empfindlicher gegenüber Cisplatin (Abb. 45 links). Verstärkt wird dieses Phänomen durch die Kultivierung dieser Zellen auf Collagen. Diese Beobachtung passt zu der Annahme, dass durch den Verlust des  $\beta 1$ -Integrins die Bindungsstellen für Collagen verloren gehen und dies ein wichtiger Aspekt für die Cisplatinempfindlichkeit darstellt. Darüber hinaus ergänzen diese Daten die zuvor beobachtete Affinität zu Zell-Zell-Kontakten (Kapitel 5.4.2), um die Notwendigkeit der Zelladhäsion. Im Zusammenhang mit Collagen scheinen demnach auch Zell-Matrix-Kontakte für die W1 Krebszellen bedeutsam zu sein.

Im direkten Gegensatz dazu beeinflusst der  $\beta 1$ -Integrin *knock-down* die Cisplatinempfindlichkeit der W1CR Zelllinie nicht und das sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Collagen. Dabei muss allerdings auch berücksichtigt werden, dass die W1CR sc Kontrolle offensichtlich nicht resistenter ist als die W1 sc Kontrolle. Ein möglicher Grund für die ähnlichen EC<sub>50</sub> Werte beider sc Zelllinien könnte auf die Transduktion zurückzuführen sein und den dadurch provozierten Zellstress. Des Weiteren könnte es sich in diesem Fall auch um eine Punktmutation handeln, da das Transduktionssystem den Nachteil einer zufälligen Integration in das Genom der Zelle mit sich bringt. So kodieren die *scramble* Partikel eine nicht zielgerichtete Sequenz und sollen als Negativkontrolle für einen zielgerichteten lentiviralen *knock-down* dienen, welches zwar dasselbe Konstrukt an sich besitzt, aber auch mehrere verschiedene *knock-down* Zielstrukturen.

Aufgrund dessen ist es möglich, dass sich die *scramble* Sequenz an einer anderen Stelle des Zellgenoms als dem angestrebten *knock-down* eingefügt hat. Je nach Integrationsbereich kann dieses Phänomen zu unerwünschten Effekten wie Insertionsmutagenese oder unterschiedliche Expressionsniveaus der shRNA führen [431]. Aufgrund dessen wurde die *scramble* Kontrolle in den nachfolgenden Versuchen zum Teil durch eine Wildtyp Kontrolle ersetzt.

Die Daten deuten darauf hin, dass die  $\beta$ 1-Integrin gesteuerte CAM-DR ein eindeutiger Faktor für die Cisplatinresistenz von W1 Zellen darstellt, wenn diese mit Collagen in Kontakt treten. Interessanterweise reagieren die resistenten W1CR Zellen zwar zusätzlich zu ihrer bereits bestehenden intrinsischen Cisplatinresistenz auf Collagen in Form einer CAM-DR, allerdings scheinen die Signalwege teilweise anders und unabhängig von  $\beta$ 1-Integrin zu verlaufen als für die W1 Zellen. Aus diesem Grund wurde klar, dass weitere Untersuchungen erforderlich sind, um die molekularen Mechanismen der Cisplatinresistenz aufzuklären. Um die Integrin induzierte Signalkaskade weiter zu erforschen, wurden deshalb in den nächsten Versuchen die nachgehaltenen Schlüsselproteine untersucht.

## **5.5.2 Untersuchungen der Integrin-vermittelten Signalwege**

### **5.5.2.1 Auswirkung der ILK in W1 und W1CR Zellen auf die Cisplatinsensitivität**

Um zu untersuchen, ob sich die unterschiedliche Abhängigkeit der CAM-DR in W1 und W1CR Zellen von  $\beta$ 1-Integrin in einem intrazellulären Integrin-Signalweg manifestiert, konzentrieren sich die nächsten Versuche auf die Integrin-gekoppelte-Kinase (ILK). Aktivierte Integrine führen über eine Signalkaskade zur Hochregulierung der ILK, welche im Anschluss wiederum AKT durch Phosphorylierung aktivieren kann.

Zur Überprüfung der Relevanz dieser Kaskade in beiden Zelllinien wurden zunächst Zytotoxizitätsstudien mit einem ILK-Inhibitor durchgeführt, um zu untersuchen ob eine funktionelle Hemmung der ILK die Zellsensitivität beeinflusst. Dieser Ansatz ermöglicht eine tiefergehende Charakterisierung des jeweiligen Resistenzverhaltens. Zu diesem Zweck wurde die Pyrazolverbindung cdp22 verwendet. Durch Vorversuche wurde eine subtoxische Inhibitorkonzentration von 1,0  $\mu$ M für beide Zelllinien ermittelt. Die Präinkubation des Inhibitors erfolgte 1 ½ h vor Cisplatinzugabe.

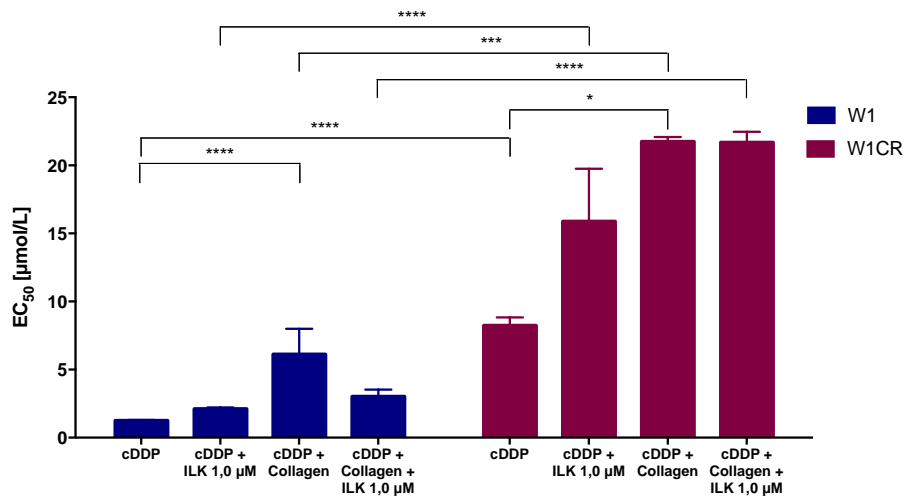


Abbildung 46: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer ILK-Inhibitor Präinkubation (n=3).

Während die Hemmung der ILK für die cisplatinempfindlichen Zellen ohne Collagen keine Auswirkung auf die Viabilität der Zellen zeigt, konnte interessanterweise der hohe EC<sub>50</sub>-Wert, der auf collagenkultivierten Zellen mithilfe des ILK-Inhibitors deutlich herunterreguliert werden. Diese Daten bestätigen dadurch die Integrin Abhängigkeit der collagenvermittelten Cisplatinresistenz in den W1 Zellen.

Im Gegensatz dazu reagieren W1CR Zellen nicht auf eine ILK-Hemmung. Stattdessen erhöht der Inhibitor sogar den EC<sub>50</sub>-Wert von Cisplatin, was auf die Annahme zurückzuführen ist, dass die resistenten Zellen über ausweichende Signalwege antiapoptotische Proteine verstärkt aktivieren. Bemerkenswerter ist jedoch die Tatsache, dass der Inhibitor keine Interferenz mit der collageninduzierten Resistenzbildung zeigt. Diese Daten bestätigen somit eindeutig, dass die CAM-DR in den bereits resistenten W1CR Zellen einen anderen Weg verfolgt als den für die W1 Zellen relevanten  $\beta$ 1-Integrin Signalweg.

An dieser Stelle gilt es abzuklären, ob die dargestellte reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin durch eine integrinaktivierte Signalkaskade erfolgt. Dafür wurde derselbe Viabilitätsassay mit den jeweiligen  $\beta$ 1-kd und sc Zellen beider Ovarialkarzinome angesetzt.

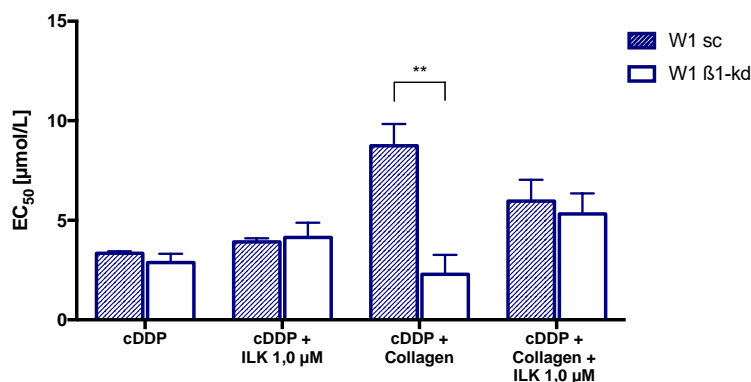


Abbildung 47: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 sc und W1 β1-kd Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer ILK-Inhibitor Präinkubation (n=2).

Während sich die W1 sc Zellen proportional ähnlich zur ursprünglichen Wildtypzelle aus Abb. 46 verhält, weisen die β1-kd Zellen eine veränderte Signaltransduktion auf. Durch den Verlust des β1-Integrins in den kd Zellen fehlt dem Collagen ein entscheidender Bindungspartner, weshalb die kd-Zelle keine CAM-DR aufweist. Im nächsten Schritt führt der Mangel an Integrin zu einer verminderten Aktivierung von ILK, aufgrund dessen verursacht die Hemmung der ILK keine erkennbaren Sensitivierung der W1 β1-kd Zelle (Abb. 47). Diese Versuchsreihe bestätigt damit eindeutig den β1-Integrin Signalweg der Collagenresistenz für die W1 Zellen.

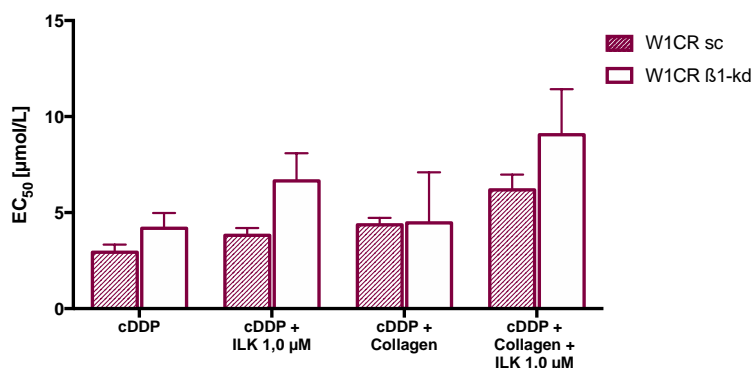


Abbildung 48: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1CR sc und W1CR β1-kd Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer ILK-Inhibitor Präinkubation (n=2).

Ähnlich der Wildtypzelle ist eine tendenzielle Steigerung der EC<sub>50</sub>-Werte der sc W1CR Zellen in den Behandlungen zu beobachten, wenn auch nicht ganz so stark ausgeprägt. Hinzukommend zeigen die β1-kd Zellen keinen sensitivierenden Einfluss durch ILK-Blockierung. Allerdings zeigte bereits der Wildtyp keine ILK inhibitorische Beeinträchtigung, so dass hier weiterhin für die W1CR Zellen keine Integrin-vermittelte Resistenz oder Signaltransduktion erkennbar wird.

Als nächstes wurden Western Blots durchgeführt, um die ILK-Expression in beiden Ovarialkarzinomen unter Einfluss von Cisplatin und Collagen zu analysieren.

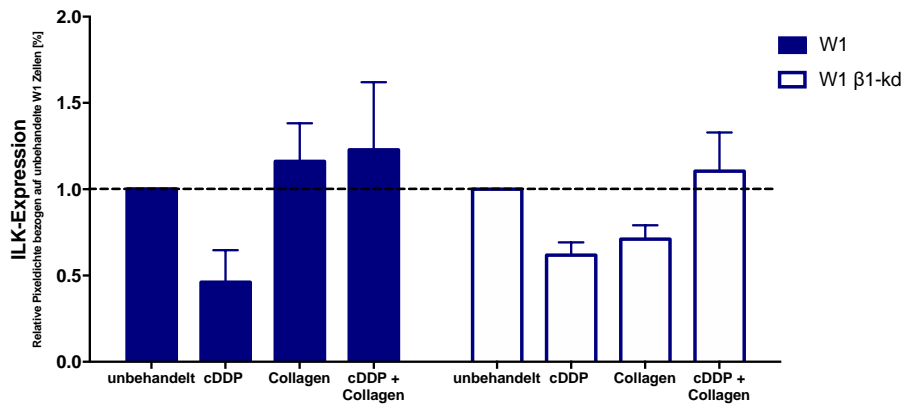


Abbildung 49: Analyse der Proteinexpression von ILK in unbehandelten W1 und W1  $\beta$ 1-kd Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100% festgelegt (n=3).

Während die Cisplatinbehandlung von W1 Zellen die Proteinexpression durch apoptotischen Stress reduziert, induziert Collagen wiederum eine Hochregulierung der ILK, die auch bei einer kombinierten Behandlung aus Collagen und Cisplatin beständig bleibt (Abb. 49). Dies weist ebenfalls darauf hin, dass die  $\beta$ 1-Integrin Collagenabhängigkeit den CAM-DR-Prozess auslöst (Abb. 46).

Der ILK-Gehalt in W1  $\beta$ 1-kd Zellen äußert sich durch ein ähnliches Verhalten, mit Ausnahme, dass diese Zellen nicht durch eine ILK-Hochregulierung nach Collagenbehandlung reagieren. Diese Beobachtung fügt sich in das Bild, dass die Bedeutung der  $\beta$ 1-Integrin-aktivierten Signalkaskade bei Vorhandensein von Collagen unterstreicht. Die ILK-Expression in den W1  $\beta$ 1-kd Zellen, die auf Collagen kultiviert und zusätzlich mit Cisplatin behandelt wurden, fällt allerdings trotz Integrinverlust nicht kleiner aus. Ein Grund hierfür könnte sein, dass der hervorgerufene Cisplatinstress auch über andere Signalwege ILK z.B. durch PI3K aktivieren kann.

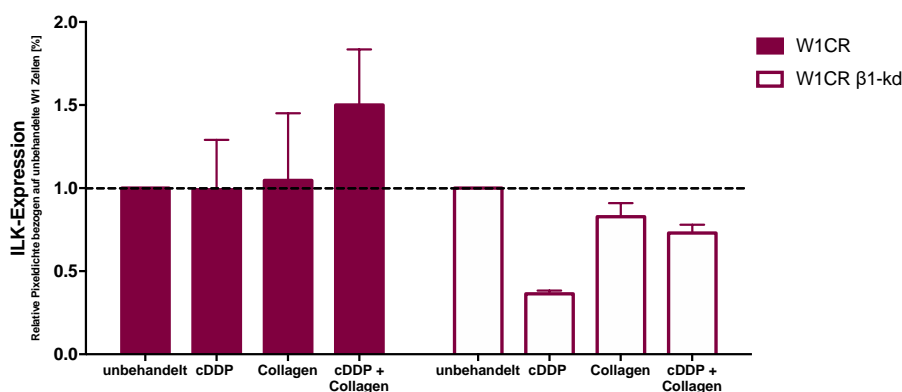


Abbildung 50: Analyse der Proteinexpression von ILK in unbehandelten W1CR und W1CR  $\beta$ 1-kd Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

Im Gegensatz zu den in Abb. 49 gezeigten Daten reduzieren die W1CR Zellen ihre ILK-Expression bei Cisplatinbehandlung nicht (Abb. 50). Auch collageninduziert keinen höheren Proteingehalt und bleibt auf einem ähnlichen Niveau, wie die unbehandelte und mit Zytostatikum gestresste Zelle. Erst die Kombination des EZM Moleküls und Cisplatin führt zu einer deutlichen Steigerung des ILK Levels. Vermutlich sind die resistenten Zellen in der Lage ihre Umgebung in Stresssituationen auszunutzen und ILK hochzuregulieren, um das Überleben der Zellen damit zu sichern. Dies scheint allerdings nur eine Gelegenheitssituation zu sein, da in Abb. 46 zu erkennen war, dass eine Inhibierung der ILK die W1CR Zellen mit gleichem Behandlungsschemata in ihrer Viabilität nicht eingeschränkt hat.

Mithilfe der W1CR  $\beta$ 1-kd Zellen wird deutlich, dass die Bereitschaft ILK zu exprimieren mit dem Verlust des  $\beta$ 1-Integrins abnimmt. Diese Beobachtung unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass hinsichtlich der Chemoresistenz gegenüber Cisplatin eine Umstrukturierung der Signalkaskaden in W1CR Zellen stattfinden könnte, um ihre Resistenz über andere Proteine aufrecht zu erhalten. Durch den Integrinmangel scheint eine Expression der ILK nicht mehr nützlich zu sein.

#### **5.5.2.2 Auswirkung der FAK in W1 und W1CR Zellen auf die Cisplatinresistenz**

In Anbetracht der bisherigen Daten wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit Proteine untersucht, die ebenfalls dem Integrin nachgeschaltet sind. Die Änderung der Integrin-Konformation und die damit einhergehende Aktivierung führt zur Autophosphorylierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) an Tyr 397 [432]. So wurde in den nächsten Versuchen das Protein FAK im Zusammenhang mit Cisplatinresistenzen analysiert. Dafür wurden die Zellen in den nächsten Experimenten vor der Cisplatinbehandlung mit dem FAK-Inhibitor (FAK 14), welcher über die Tyr 397-Bindungsstelle die Hemmung initiiert, 4 h vorinkubiert [433]. Bei der verwendeten Konzentration von 1,0  $\mu$ M besitzt der Inhibitor keine intrinsischen Effekte auf das Überleben der W1 Zellen.

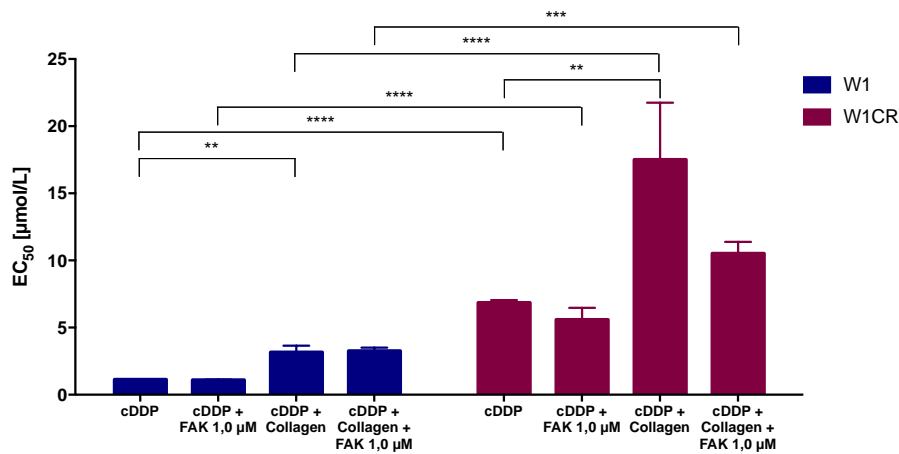


Abbildung 51: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer FAK-Inhibitor Präinkubation (n=3).

Im Vergleich zur allgemeinen Behandlung mit Cisplatin wirkt sich eine Vorinkubation mittels FAK-Inhibitors nicht sichtbar auf die Toxizität des Zytostatikums in W1 Zellen aus. Besonders interessant ist die Tatsache, dass die Hemmung der FAK keinerlei Wirkung auf die Umkehrung der collageninduzierten Cisplatinresistenz in W1 Zellen aufweist. Im Gegensatz dazu reagieren die W1CR Zellen empfindlicher auf die Inhibierung der FAK. Während nur eine minimale Sensibilisierung in den W1CR Zellen zu beobachten ist, die mit Cisplatin und FAK-Inhibitor behandelt wurden, zeigt sich eine wesentlich deutlichere Sensitivierungstendenz in W1CR Zellen die zusätzlich auf Collagen kultiviert wurden.

Dieses Verhalten der W1CR Zellen passt zum Sachverhalt, da sie Integrine erst nach Ausformung von Kontakten zur EZM die Dimerisierung der FAK mit anschließender Autophosphorylierung begünstigen [434]. Insofern ist eine Inhibierung der FAK unter Collageneinfluss am vielversprechendsten. Die Ergebnisse zeigen eine FAK-Abhängigkeit der W1CR Zellen, insbesondere in der CAM-DR vermittelten Resistenz. Allerdings ist der FAK-Inhibitor nicht in der Lage die collageninduzierte Resistenz komplett aufzuheben, womit die FAK nicht als alleiniger Auslöser für die CAM-DR der W1CR Zellen verantwortlich sein kann. Im Gegensatz dazu scheint der FAK Signalweg für die cisplatinempfindlichen W1 Zellen nicht essenziell zu sein.

Im Anschluss wurden auch die  $\beta$ 1-kd und sc Zellen mit dem gleichen Versuchsansatz untersucht. Dadurch ist es möglich eine Integrinabhängigkeit für FAK genauer zu charakterisieren.



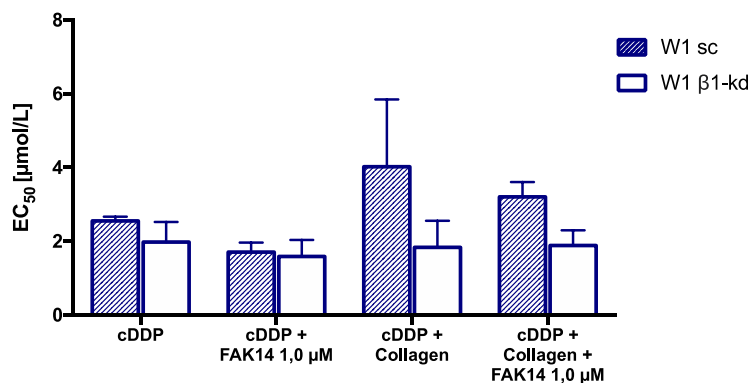


Abbildung 52: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 sc und W1 β1-kd Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer FAK-Inhibitor Präinkubation (n=3).

Die transduzierten W1 Zellen zeigen wie ihre Wildtypvariante keine Änderungen nach FAK-Blockierung. Die W1 sc Zellen zeigen dabei ein ähnliches Verhalten wie die Wildtyp Zellen. Schön zu erkennen ist, dass der Inhibitor keinen Einfluss auf die EC<sub>50</sub>-Werte der collagenkultivierten Zellen zeigt. Somit kann FAK als potenzieller CAM-DR Vermittler für die W1 Zellen eindeutig ausgeschlossen werden.

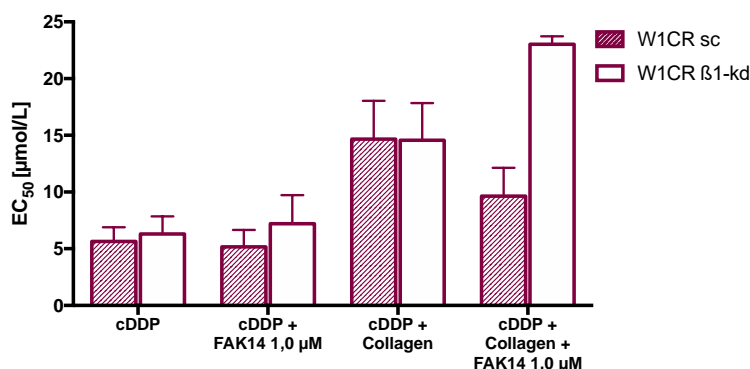


Abbildung 53: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1CR sc und W1CR β1-kd Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer FAK-Inhibitor Präinkubation (n=2).

Interessanter hingegen ist die Betrachtung der W1CR β1-kd und sc Zellen. Auch hier stellen die sc Zellen eine dem Wildtyp sehr ähnliche Kontrollzelllinie dar. In Abb. 53 wird deutlich, dass die β1-kd Zellen keine Minderung der EC<sub>50</sub>-Werte und damit keine Sensitivierung mittels FAK-Inhibitor aufweisen. Dies passt zu den Wildtyp-Ergebnissen aus Abb. 51, welche primär eine FAK vermittelte Sensibilisierung unter gleichzeitiger EZM Behandlung entfalten. Durch das fehlende Integrin der β1-kd Zellen, kann keine Integrin vermittelte Signalkaskade über FAK erfolgen. Schlussendlich kommt es dadurch nicht zu einer Hochregulierung von FAK, womit der Inhibitor keine Wirkung auf das Überleben der Zelle besitzt. Erstaunlicherweise zeigen die β1-kd Zellen nach Blockierung der FAK sogar eine Resistenzsteigerung auf. Eine Ursache hierfür könnte darin begründet sein, dass durch die Blockierung der FAK die Zelle ihre

Signalwege neu organisiert, sodass die Resistenz über eine andere Kaskade verstärkt ablaufen könnte. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die W1CR Zellen in der Lage sind, nicht nur über Integrine Collagene zu binden, sondern auch über andere Rezeptoren eine Resistenz ausbauen, denen wiederum eine andere Signalkaskade nachgeschaltet ist (Kapitel 2.6). Zur Aufklärung dieser Hypothese werden im späteren Verlauf dieser Arbeit Nachforschungen erfolgen (Kapitel 5.8.1).

Neben den eben besprochenen Viabilitäts-*assays* wurden außerdem Western Blots zur Quantifizierung des Proteingehalts von FAK und der aktivierten, phosphorylierten Variante p-FAK für beide Wildtypzellen angefertigt.

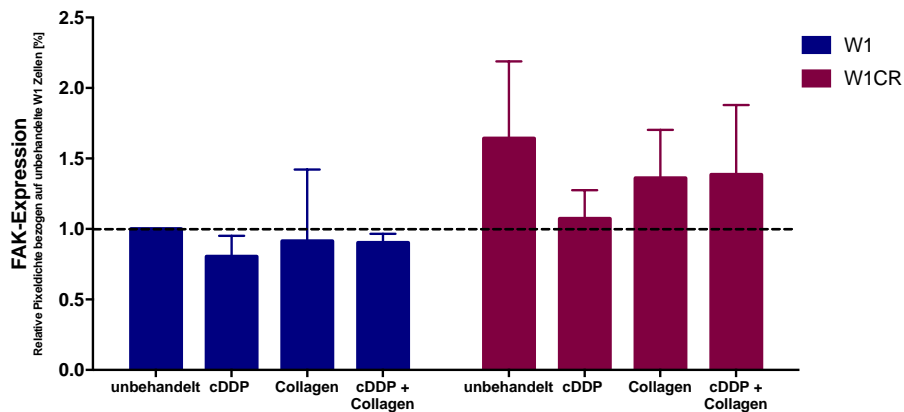


Abbildung 54: Analyse der Proteinexpression von FAK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt ( $n=3$ ).

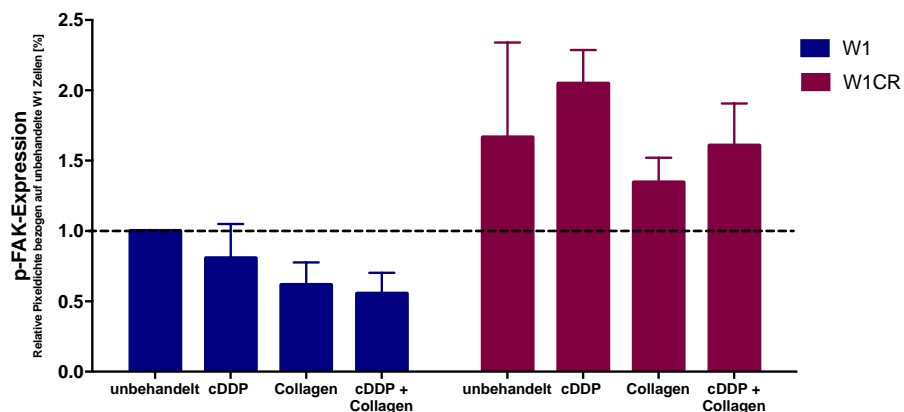


Abbildung 55: Analyse der Proteinexpression von p-FAK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt ( $n=2$ ).

In dieser Versuchsreihe sind die Unterschiede zwischen beiden Zelllinien hinsichtlich ihrer FAK-Expression deutlich zu erkennen. Die W1 Zellen verfügen über weniger FAK, und der Gehalt an aktiviertem p-FAK nimmt für alle Behandlungen ab. Im Gegensatz dazu weisen die W1CR Zellen einen quantitativ höheren Anteil an FAK auf. Hinzukommend steigt die

Proteinmenge der aktivierte p-FAK Form für alle Behandlungsvarianten nochmals an, sodass die W1CR Zellen deutlich mehr p-FAK exprimieren als ihre Wildtyp Vertreter. Besonders deutlich wird p-FAK-Aktivierung für die W1CR Zellen unter alleiniger Cisplatinbehandlung.

Diese Proteinexpressionen offenbaren keine FAK-Relevanz gegenüber den W1 Zellen. Die collagenvermittelte CAM-DR dieser Zellen verläuft eindeutig nicht über FAK. Die Western Blot Daten der W1 Zellen stimmen somit mit den FAK-Inhibitor MTT-*assay* Ergebnissen überein. Für die resistenten W1CR Zellen zeichnet sich hingegen ein etwas anderes Bild ab. Während im Viabilitäts-*assay* der FAK-Inhibitor unter Collageneinfluss den stärksten Effekt verzeichnet, wird im Western Blot zusätzlich deutlich, dass bereits unter alleinigem Cisplatinstress die aktivierte p-FAK Expression zunimmt. Letzten Endes kristallisiert sich dadurch ein möglicher FAK abhängiger Resistenzmechanismus für die W1CR Zellen heraus. Dieser wird anschließend in den *downstream* folgenden Proteinen weiterhin analysiert.

## **5.6 Der PI3K/AKT-Signalweg**

### **5.6.1 Einfluss der PI3K auf die Cisplatinempfindlichkeit beider W1 Zellen**

Im Hinblick auf die effektive Inhibierung der ILK für die W1 Zellen und der FAK für die W1CR Zellen, sowie den Erkenntnissen einer damit verbundenen Cisplatinempfindlichkeit, zielten die weiteren Experimente auf die nachgeschaltete PI3K ab. Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei PI3K um ein Schlüsselprotein in der Schnittstelle multipler Signalkaskaden, die an der Zellproliferation beteiligt sind (Kapitel 2.3.3).

Zu diesem Zweck wurde der duale Inhibitor LY294002 verwendet, welcher die PI3K als auch BET kompetitiv hemmen kann. Die Inhibierung von PI3K erfolgt dabei über eine ATP-Bindungsstelle der p85 $\alpha$  Untereinheit [435]. Über Vorversuche konnte eine subtoxische Inhibitorkonzentration von 0,1  $\mu$ M für beide Zelllinien ermittelt werden. Die Präinkubation des Inhibitors erfolgte 6 h vor Cisplatinzugabe.

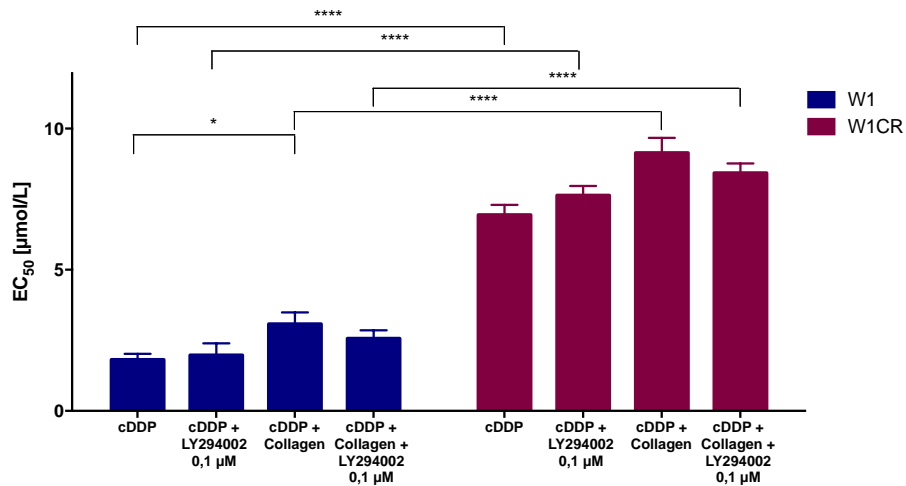


Abbildung 56: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer PI3K-Inhibitor Präinkubation (n=3).

Eine Inkubation der W1 und W1CR Zellen mit LY29002 geht mit einer unauffälligen zytotoxischen Wirkung des Cisplatins einher. Während in beiden Zelltypen ohne Kultivierung auf Collagen gar kein inhibitorischer Effekt zu verzeichnen ist, kann eine leichte Sensibilisierung durch LY294002 in collagenbehandelten Zellen beobachtet werden, die sich über erniedrigte EC<sub>50</sub>-Werte ausdrückt. Für die W1CR Zellen könnte diese Erkenntnis auf eine FAK induzierte Phosphorylierung der PI3K zurück zu führen sein und damit eine Weiterleitung der integrinvermittelten CAM-DR Signalkaskade der W1CR Zellen darstellen. Allerdings ist auch hier wie bereits beim FAK-Inhibitor (Kapitel 5.5.2.2) der PI3K-Inhibitor nicht im Stande die collagenvermittelte Resistenz umzukehren. Zudem scheinen auch die auf collagenkultivierten W1 Zellen im geringen Ausmaß den PI3K-Weg zu nutzen, um die toxische Wirkung des Zytostatikums entgegenzuwirken.

Um mehr über die PI3K-Relevanz und ihre resistenzgebenden Eigenschaften zu erfahren, wurde im nächsten Schritt die Proteinmenge für PI3K sowie dessen phosphorylierte Variante p-PI3K mittels Western Blot für beide Ziellinien quantifiziert.

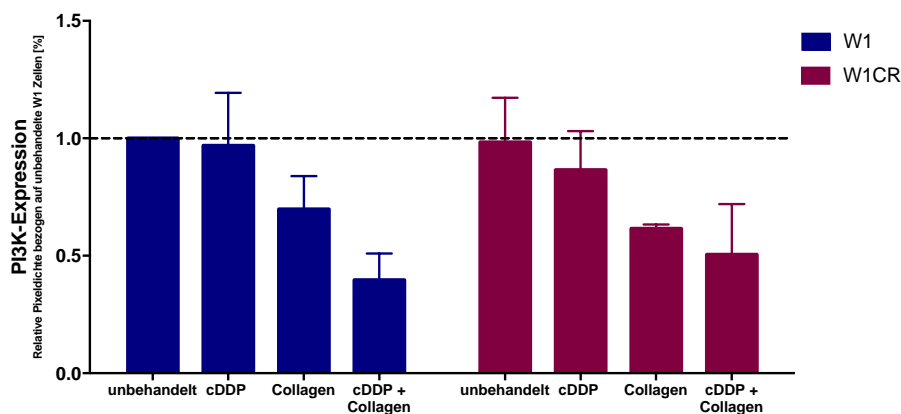


Abbildung 57: Analyse der Proteinexpression von PI3K in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

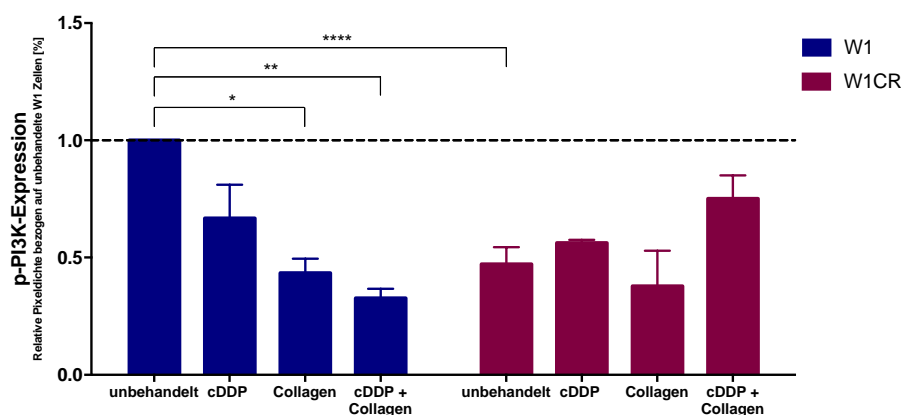


Abbildung 58: Analyse der Proteinexpression von p-PI3K in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

Die Erkenntnisse, die aus den Blot Versuchen gezogen werden können, fügen sich in das bisherige Bild der beiden Zelllinien gut ein. So exprimieren beide Zellen vergleichbare Proteinmengen von PI3K. Sowohl der Gehalt von PI3K als auch p-PI3K wird durch die verwendeten Behandlungen nicht hochreguliert. Die W1 Zellen tendieren innerhalb der jeweiligen Behandlungsschemata zu einer Herunterregulierung der PI3K Aktivität. Speziell die Collagenbindung senkt den p-PI3K Spiegel in W1 Zellen deutlicher als in W1CRZellen.

Dieser Einblick bestätigt die Vermutung, dass PI3K in W1 Zellen eine eher geringfügige Bedeutung einnimmt. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die W1CR Zellen, in denen ebenfalls die Expression von PI3K sowie p-PI3K tendenziell *down*-reguliert werden. Eine Ausnahme bildet W1CR Zellen unter Collagen- und Cisplatinbehandlung. Diese Zellen deuten auf eine Aktivierung, bzw. eine Steigerung des Expressionsniveaus zwischen PI3K und p-PI3K hin. Diese Feststellung fügt sich gut in das bisherige Bild der Zelllinie und zu den inhibitorischen LY294002 Daten (Abb. 56) ein. An dieser Stelle sollte jedoch erwähnt werden, dass die

beobachten Veränderungen keine eindeutigen Signifikanzen aufzeigen und dieser Signalmechanismus demnach wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle in der CAM-DR der W1CR Zellen spielt.

### 5.6.2 Einfluss der PTEN auf die Cisplatin sensitivität beider W1 Zellen

Antagonistisch zu PI3K wirkt PTEN, indem es PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert. Aufgrund dessen sind PTEN Untersuchungen im Kontext des PI3K/AKT-Signalweg unerlässlich, sodass die nachfolgenden Versuche sich mit der Proteinexpression von PTEN und p-PTEN befassen.

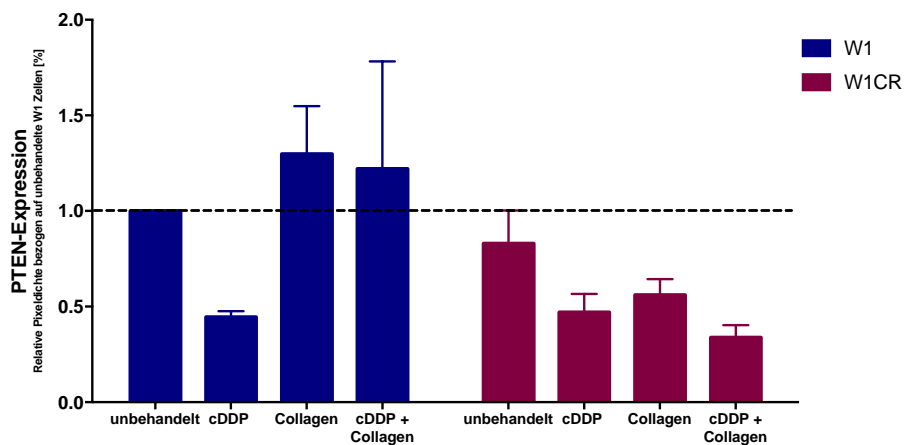


Abbildung 59: Analyse der Proteinexpression von PTEN in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt ( $n=4$ ).

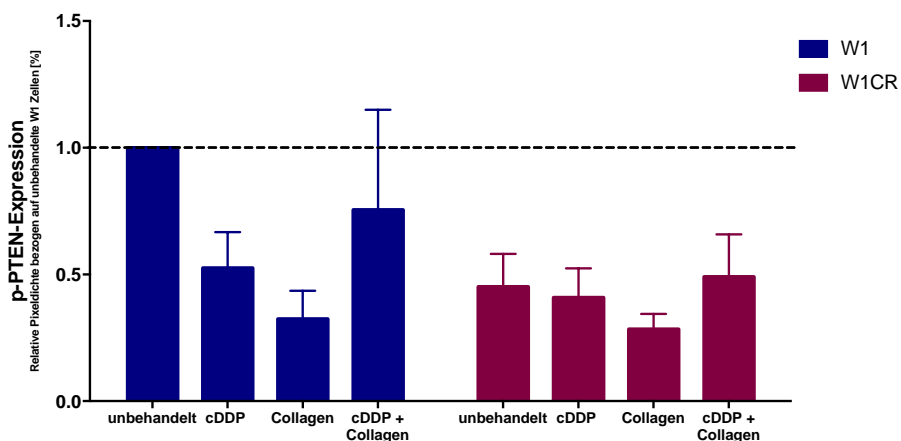


Abbildung 60: Analyse der Proteinexpression von p-PTEN in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt ( $n=4$ ).

Die Befunde legen nahe, dass der PI3K Gegenspieler PTEN in beiden Ovarialkarzinomzellen generell eine marginale Expression aufweist. Auch wenn die W1 Zellen unter Einfluss von Collagen recht viel PTEN im Grundzustand besitzen, so findet jedoch keine Phosphorylierung und damit keine einhergehende Aktivierung des Proteins statt. Diese Ergebnisse passen

dahingehend, dass PTEN als Tumorsuppressor agiert, welcher in hohen Konzentrationen (p-PTEN) die Apoptose der Zellen aktivieren kann [223,224]. In dieses Bild fügen sich beispielsweise die unbehandelten W1CR Zellen ein, die im Vergleich zu W1 Zellen wesentlich weniger p-PTEN exprimieren. Außerdem zeigen die unter Collagenbehandlung resistenter werdenden Zellen ebenfalls ein vergleichsweise geringes Expressionsniveau. Interessanterweise erhöht sich der p-PTEN Spiegel nach zusätzlicher Cisplatinbehandlung, was die Zellen dazu veranlassen könnte in die Apoptose zu gehen. Dieser Effekt spiegelt sich wiederum deutlich stärker in den W1 Zellen wider. Im Vergleich dazu fällt die Hochregulierung von p-PTEN in den W1CR Zellen mit Collagen und Cisplatin geringer aus, was ebenfalls dazu passt, da die W1CR Zellen deutlich resistenter sind als ihre Wildtyp Zellen. Der Negativregulator des PI3K/AKT-Signalweges PTEN könnte auf diese Weise im geringen Ausmaß an der Cisplatinempfindlichkeit der W1 Zellen beteiligt sein.

### 5.6.3 Einfluss der AKT auf die Cisplatinempfindlichkeit beider W1 Zellen

Um zu untersuchen, ob der PI3K/AKT-Signalweg Einfluss auf die Cisplatinresistenz hat wurden im weiteren Verlauf die der PI3K nachgeschalteten Komponenten AKT und pAKT anhand ihrer Expressionslevel mittels Western Blot untersucht.

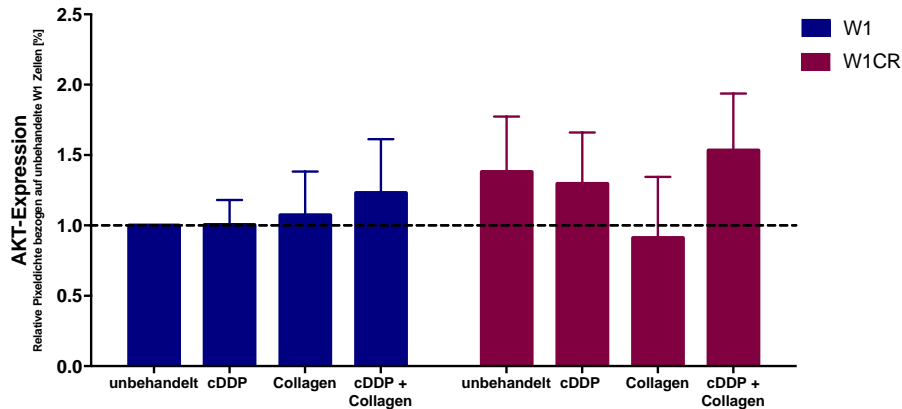


Abbildung 61: Analyse der Proteinexpression von AKT in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

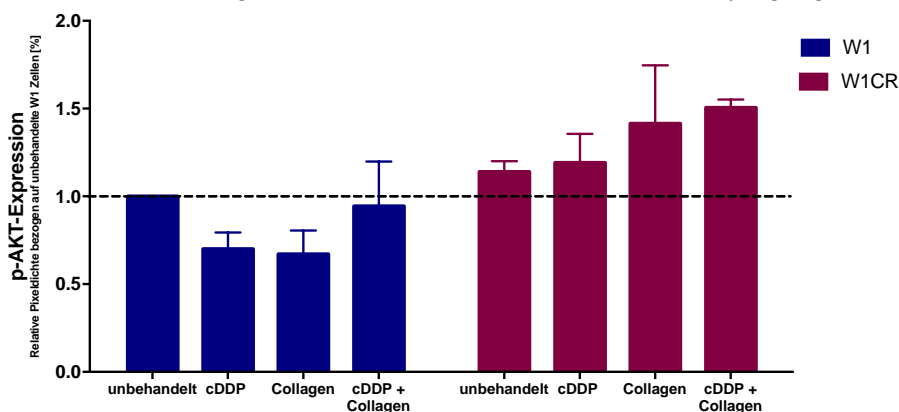


Abbildung 62: Analyse der Proteinexpression von p-AKT in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=4).

Bei Betrachtung der erhobenen Daten fällt die vergleichsweise niedrige AKT und p-AKT Expression der W1 Zellen im Vergleich zu den resistenten W1CR Zellen auf. Dies passt zu den vorangegangenen Daten, in denen die W1 Zellen ebenfalls in den vorgeschalteten Proteinen wie FAK und PI3K nur geringfügige Expressionsniveaus aufweisen konnten (Kapitel 5.5.2.2 und 5.6.1). Wahrscheinlich wird die PI3K/AKT-Achse in W1 Zellen durch eine etwas höhere Expression der Phosphatase PTEN antagonisiert (Abb. 60), die bei der PI3K vermittelten PIP3 Bildung entgegenwirkt und somit die AKT- Aktivierung funktionell antagonisiert. Der erhöhte Einfluss auf die Resistenzsignalisierung in W1CR Zellen spiegelt sich auch in höheren Proteingehalten von AKT und p-AKT als *downstream* Komponente wider. Allerdings nimmt das Level an aktiviertem p-AKT auch in den W1CR tendenziell ab, mit Ausnahme der



collagenbehandelten Zellen. Dabei weisen die W1CR Zellen mit alleiniger Collagenbehandlung eine verstärkte Aktivierung durch das pAKT/AKT Verhältnis auf, während die collagenbehandelten W1CR Zellen unter Cisplatin einfluss ihr Expressionsniveau von unaktivierten und aktiviertem AKT konstant halten. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um potentiell beteiligte CAM-DR Mechanismen oder alternative Collagensensoren neben  $\beta$ 1-Integrinen in W1CR Zelle aufzudecken.

### 5.6.3.1 Auswirkung auf den Wnt-Signalweg mittels GSK3 $\beta$

Die AKT steuert eine Vielzahl weiterer Effektorproteine, unter anderem ist die GSK3 $\beta$  der AKT nachgeschaltet. GSK3 $\beta$  kann über AKT phosphoryliert und damit deaktiviert werden. Dadurch ist die AKT ein Aktivator für Signalwege, die normalerweise durch GSK3 $\beta$  gehemmt werden. Die p-GSK3 $\beta$  stellt ein Schlüsselmolekül des Wnt-Signalwegs dar. Dieser Signalweg wird mit einer erhöhten Malignität und Resistenzbildung in Krebszellen assoziiert [436]. Der Gehalt an p-GSK3 $\beta$  wurde nachfolgend quantifiziert, um mögliche Auswirkungen der jeweiligen Behandlungsmethoden auf die Expression zu identifizieren.

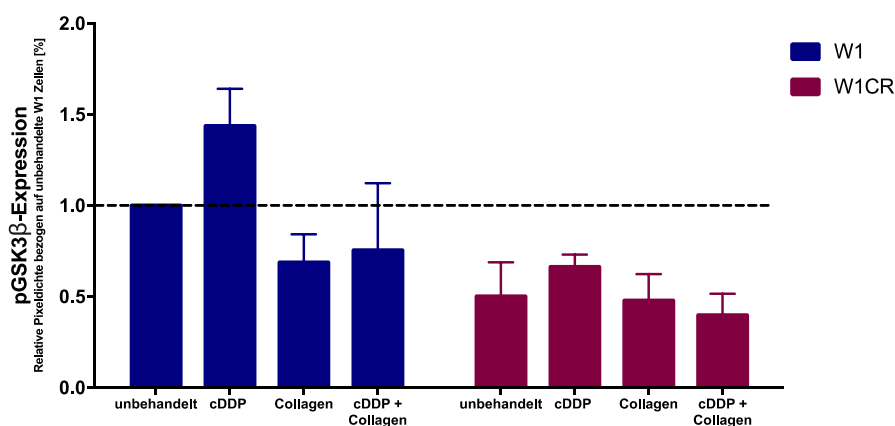


Abbildung 63: Analyse der Proteinexpression von p-GSK3 $\beta$  in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=2).

Anhand der Daten wird ersichtlich, dass die p-GSK3 $\beta$  aufgrund der niedrigen Expressionsniveaus in beiden Zelllinien und damit einhergehend der Wnt-Signalweg für die W1 Zellen nicht relevant erscheint. Im Falle einer Wnt Aktivierung liegt GSK3 $\beta$  deaktiviert vor, indem es durch AKT phosphoryliert wird.

Dieser postulierte fehlende Einfluss des Wnt-Signalwege auf die Cisplatinresistenz des W1 Zellen stimmt mit früheren Erkenntnissen über die Unwirksamkeit des Wnt-Inhibitors FH535 überein, der in W1CR Zellen keine Sensitivierung induzierte [437]. Somit wird der Wnt-

Signalweg als potenzieller Schlüsselfaktor für die collagenvermittelte Resistenzbildung dieser Zellen ausgeschlossen.

#### 5.6.4 Einfluss von mTOR auf die Cisplatin sensitivität beider W1 Zellen

Mit der Fokussierung auf mTOR wurde ein weiteres *downstream target* von AKT in die Untersuchungen einbezogen. Wie in Kapitel 2.7 beschrieben handelt es sich bei mTOR um ein bekanntes Schlüsselprotein für Zellwachstum und -proliferation. Für Untersuchungen der funktionellen Rolle von mTOR im Zusammenhang mit Cisplatinresistenzen wurde Rapamycin als mTORC1-Inhibitor in einer nicht toxischen Konzentration von 10 und 100 nM eingesetzt.

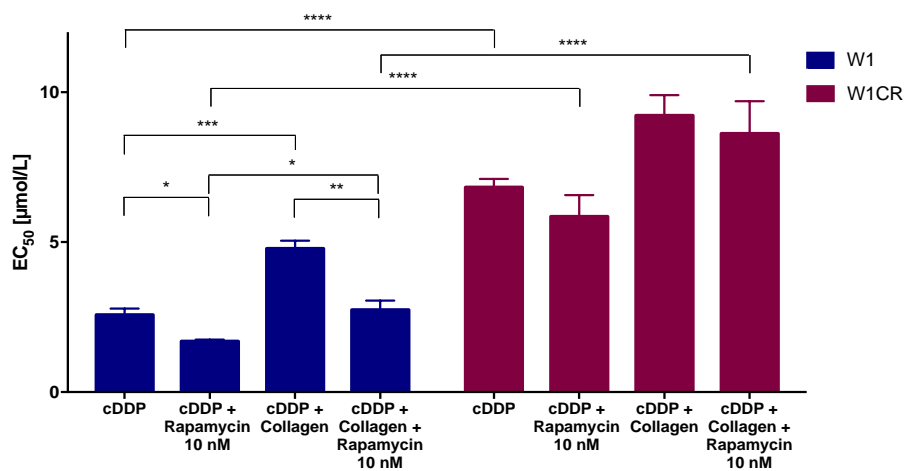


Abbildung 64: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer 10 nM mTOR-Inhibitor Präinkubation (n=3).

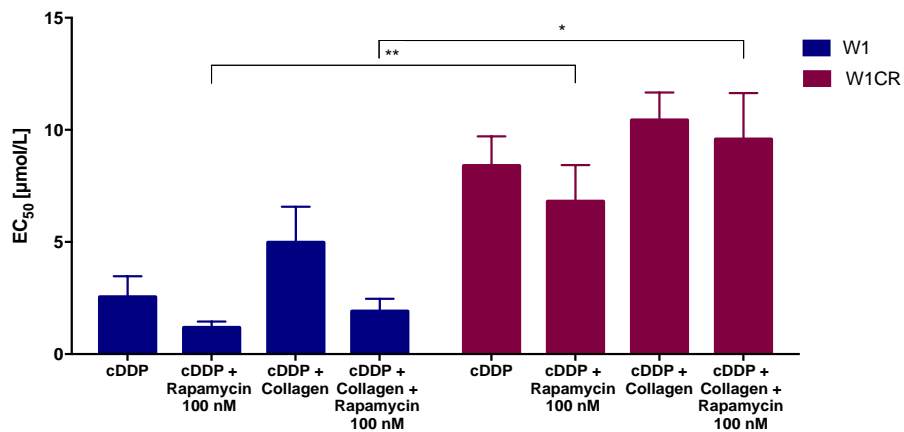


Abbildung 65: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer 100 nM mTOR-Inhibitor Präinkubation (n=3).

Interessanterweise ist Rapamycin sowohl in einer hohen Konzentration (100 nM), als auch in einer niedrigeren Konzentration (10 nM) in der Lage die Cisplatinresistenz beider Ovarialkarzinome zu beeinflussen. Besonders hervorzuheben ist dabei die vollständige Umkehrung der collagenvermittelten Resistenz für die W1 Zellen. Allgemein ist darüber hinaus

festzustellen, dass Rapamycin einen größeren inhibitorischen Effekt auf die cisplatinempfindlichen W1 Zellen ausübt, als auf W1CR Zellen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Proteinexpressionen von mTOR und p-mTOR in W1 und W1CR Zellen untersucht, um weitere Einblicke in die Proteinaktivität zu erhalten.

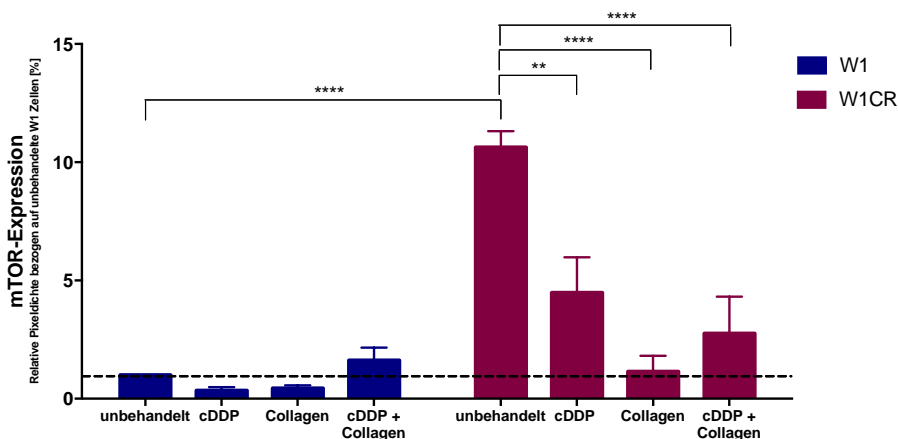


Abbildung 66: Analyse der Proteinexpression von mTOR in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

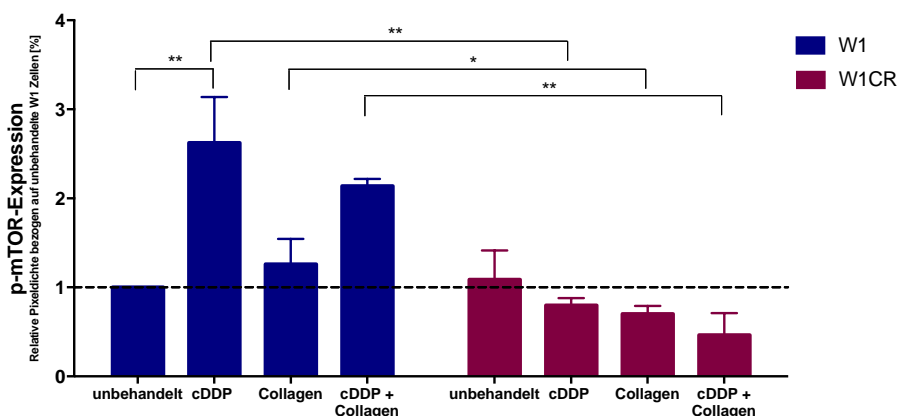


Abbildung 67: Analyse der Proteinexpression von p-mTOR in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

Die Analyse von mTOR und p-mTOR ergab eine signifikante Erhöhung des inaktivierten mTORs der W1CR Zellen, insbesondere die unbehandelten Variante zeichnet sich durch eine enorme Pixeldichtensteigerung aus. Obwohl die grundlegende mTOR Konzentration in W1CR Ovarialzellen viel stärker ausgeprägt ist, so ist die Aktivierung von mTOR über Phosphorylierung für die cisplatinempfindlichen W1 Zellen wesentlich höher. Auffallend ist in diesem Zusammenhang, dass die Behandlung mit Zytostatika den p-mTOR Gehalt der Wildtypzelle weiter erhöht. Im Gegensatz dazu führt die gleichzeitige Behandlung von Cisplatin und Collagen zu einer Senkung des p-mTOR Spiegels der W1CR Zellen.

Zusammengefasst heben die Viabilitäts- und Western Blot Ergebnisse mTOR als ein maßgebliches Ziel für die Sensibilisierung durch collageninduzierte CAM-DR in W1 Zellen hervor. Während der Collageneffekt in W1CR Zellen allem Anschein nach einem anderen Resistenzpfad und nur partiell dem Integrin-vermittelten Weg über FAK, PI3K, AKT und mTOR folgt. Somit muss die CAM-DR der resistenten Zellen über eine weitere Hauptsignalkaskade erfolgen. Im weiteren Verlauf sollen deshalb neue potenzielle Signalwege ermittelt und analysiert werden.

## 5.7 Screening der Kinaseaktivitäten in W1 und W1CR Zellen

Die bisher diskutierten Ergebnisse geben zusammengefasst fundierte Hinweise auf die Involvierung eines integrinvermittelten Signalweges in die zugrundeliegenden Mechanismen der Collagenresistenz in W1 Ovarialkarzinomzellen. Allerdings ist zu vermuten, dass die CAM-DR der W1CR Zellen über einen anderen Signalweg stärker reguliert wird. Zudem ergaben die bisher untersuchten Proteine keine Hinweise zur intrinsischen Cisplatinresistenz der W1CR Zellen. Um einen Überblick in die Signalwege zu erhalten, die mit Resistenzen auf Proteinebene assoziiert werden, wird im nächsten Versuch ein *Proteome Profiler*<sup>TM</sup> Array mit dem Schwerpunkt auf humane Phosphokinasen in cisplatinbehandelten W1 und W1CR Zellen in An- und Abwesenheit von Collagen durchgeführt. Der Array umfasst insgesamt 45 Phosphorylierungsstellen unterschiedlicher Kinasen. Nachfolgend werden die interessantesten 28 Expressionsprofile graphisch dargestellt, darunter Proteine aus den bereits untersuchten Signalwegen, sowie eine neue potenzielle Signalkaskade. An dieser Stelle soll außerdem erwähnt werden, dass lediglich die Banden innerhalb derselben Kinase miteinander verglichen und ins Verhältnis gesetzt werden können, da die Antikörper aufgrund ihrer unterschiedlichen Selektivität nicht proportional zueinander sind. Demzufolge ist ein Vergleich der Behandlungsarten im Hinblick auf unterschiedliche Proteine nicht möglich. Zudem ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei dem *Proteome Profiler*<sup>TM</sup> Array um eine einzelne Durchführung handelt, sodass auffällige potenzielle Kinasekandidaten durch weitere Versuche spezifischer analysiert werden müssen.

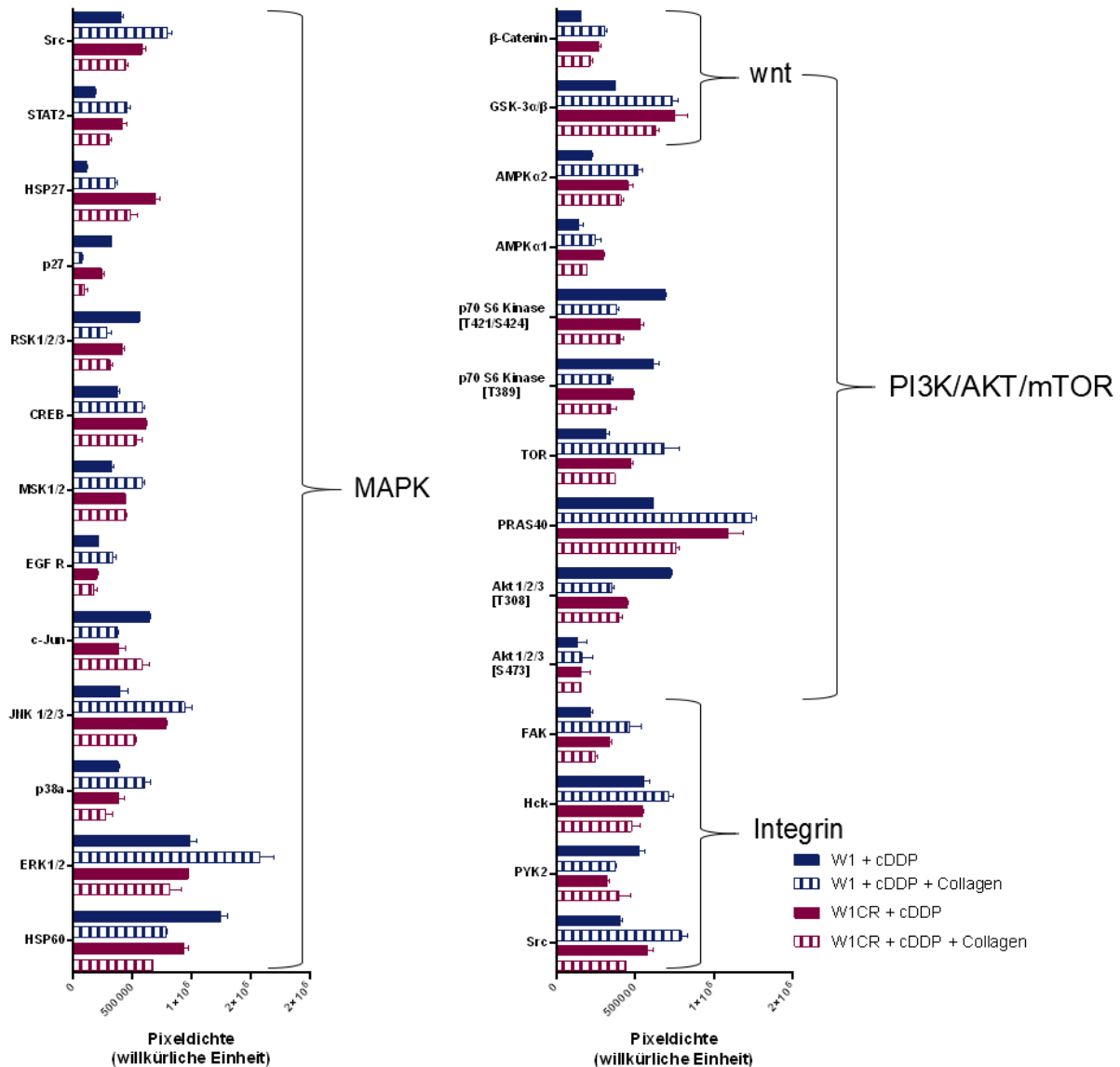


Abbildung 68: Datensatz des humanen Proteom Profiler Kinase Aktivitätsarrays von W1 und W1CR Zellen nach Cisplatinzugabe (1 µM) mit oder ohne zusätzlicher Collagenbehandlung.

Aus der Datenanalyse geht eindeutig hervor, dass die Collagenbindung eine Vielzahl der Signalkomponenten in W1 Zellen hochreguliert. Im Unterschied dazu fällt in den meisten Proteinen die intrinsische Resistenz der W1CR Zellen unter Cisplatinbehandlung intensiver aus als unter gleichzeitige Collagenbehandlung. Die ausgewählten Proteine können grob in vier Kategorien unterteilt werden: - zum einen die Integrin-gebundene Signalkinasen, welche zweitens zum Teil *downstream* an den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg anschließen, drittens den Wnt-Signalweg und zuletzt der MAPK-Signalweg. In die letztgenannte Signalkaskade reihen sich die meisten Proteine des *Proteome Profiler*<sup>TM</sup> Arrays ein. Nachdem in dieser Arbeit bereits intensiver auf den integrinvermittelten Signalweg und die ablaufende *downstream* Kaskade eingegangen wurde, soll nun der Fokus auf neue potenzielle Signalmechanismen gelegt werden, die an der Chemoresistenz beteiligt sein könnten. Aufgrund dessen werden nachfolgend die

Kinasen des MAPK-Signalweg als Ursache für potenzielle Resistenzmechanismen genauer betrachtet.

Bei der Interpretation der Daten sticht insbesondere die zentrale Kinase ERK hervor, da es von den dargestellten Proteinen die höchste Signalintensität aufweist. Beide Zelllinien zeigen bei alleiniger Cisplatinbehandlung eine starke Phosphorylierung, welche sich allerdings nicht in der Intensität zwischen den W1 und W1CR Zellen unterscheidet. Auffallend ist die in den collagenbehandelten W1 Zellen höhere Proteinexpression im Vergleich zu W1CR Zellen mit gleicher Behandlung. Dem Protein ERK nachgeschaltet ist RSK, welche nachfolgend CREB aktiviert [438]. Beide Proteine zeigen jedoch keine besonderen Auffälligkeiten in ihrem Expressionsverhalten. Ebenso stellt STAT3 eine *downstream* Komponente von ERK dar. In diesem Fall weisen die W1 Zellen mit alleiniger Cisplatinbehandlung die stärkste Hochregulierung auf, während alle anderen Behandlungen nur marginale unterschiede Profile zeigen.

Da der MAPK Signalweg, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben in drei Kaskaden eingeteilt werden kann, ist ein Blick auf die Aktivierung der nächstwichtigen Kinase JNK besonders interessant. Auch hier weisen die collagenbehandelten W1 Zellen wieder die stärkste Upregulierung auf. Im Verhältnis dazu ist die Proteinmenge bei alleiniger Cisplatingabe durch das niedrigste JNK Niveau gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu verhalten sich die W1CR Zellen genau spiegelverkehrt, der Gehalt an JNK scheint ohne Collagen höher zu sein als bei vorhandener Collagenbindung. Der JNK Kaskade folgend reiht sich zunächst c-Jun und im Anschluss p53 an. Erstaunlich ist, dass die Regulierung der nachgeschalteten c-Jun nicht proportional zu JNK verläuft. Anders als für JNK deuten die höchsten Proteinlevel in den nachgeschalteten Proteinen auf die cisplatininkubierte W1Zellen.

Der dritte Pfad des MAPK Signalwegs wird durch die Schlüsselkomponente p38 initiiert. Die Änderungen der Phosphorylierung sind vergleichsweise gering. Am stärksten exprimieren auch hier wieder die collagenkultivierten W1 Zellen das Protein. Die *downstream* Kinase MSK, welche wie RSK ebenfalls CREB aktivieren kann, weist eine ähnliches Phosphorylierungsmuster wie p38 auf. Daneben stellt HSP27 ein weiteres Substrat von p38 dar. Dieses *Heat shock protein* weist die bemerkenswertesten Expressionswerte auf, wobei die resistenten W1CR Zellen das höchste Level an HSP27 aufweisen. Kein anderes Protein des *Proteome Profiler™ Arrays* zeigt eine derartige Differenz zwischen W1 und W1CR Zellen bei alleiniger Cisplatinbehandlung. Die Expressionswerte sind um den Faktor 6,22 für die resistente

Zelllinie erhöht. Jedoch scheint dieses eindrucksvolle Gefälle der Signale nicht nach zusätzlicher Collageninkubation aufzutreten. Diese Indizien weisen auf eine entscheidende Rolle des HSP27 in der intrinsischen Cisplatinresistenz der W1CR Zellen hin.

Die ermittelten Daten des *Zell screenings* deuten auf einige interessante Kinaseregulierungen in dem bisher für die W1 und W1CR Zellen noch nicht untersuchten MAPK Signalwegs. Infolgedessen wurden Schlüsselkomponenten der MAPK Kaskade im Hinblick auf ihre Beteiligung an der Resistenzbildung und ihren Wert als Ziel für Sensibilisierungsstrategien eingehend analysiert.

## 5.8 Der MAPK-Signalweg

Der MAPK *pathway* gilt wie in Kapitel 2.3.3 genauer beschrieben allgemein als ein Schlüsselregulator des Zellwachstums und der Zellproliferation, der unter anderem durch Wachstumsfaktorrezeptoren sowie Zelladhäsion stimuliert werden kann [439]. Um zu ermitteln, ob der MAPK Signalweg auch im Hinblick auf die collageninduzierte Resistenz von W1CR Zellen oder unabhängig vom Matrixeffekt ausschlaggebend für die intrinsische Cisplatinresistenz hochreguliert wird, werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit Schlüsselkomponenten des MAPK Signalwegs auf unterschiedlichen Ebenen analysiert.

### 5.8.1 Auswirkung des DDR1-Rezeptors auf die Cisplatinresistenz

Die erhobenen Daten weisen bisher darauf hin, dass die resistenten W1CR Zellen ihre collageninduzierte Cisplatinresistenz auch nach einem  $\beta$ 1-Integrin *knock-down* beibehalten, was wiederum auf die Aktivität anderer Collagenrezeptoren schließen lässt. Abgesehen vom  $\beta$ 1-Integrin werden in der wissenschaftlichen Literatur nur einige wenige Collagenrezeptoren beschrieben. Unter ihnen scheint DDR1 der wahrscheinlichste Kandidat zu sein, da die fehlgeleitete Expression des Rezeptors mit einer erhöhten Tumorentstehung bei einigen Krebsentitäten assoziiert wird [353]. Dazu passend handelt es sich bei DDR1 um einen Rezeptor, der mit dem MAPK Signalweg in Verbindung gebracht wird. Um aufzuklären, ob DDR1 ein relevanter Rezeptor der W1CR Zellen ist, werden nachfolgend die Expressionsniveaus von DDR1 und p-DDR1 mittels Western Blot analysiert und mit den cisplatinempfindlichen W1 Zellen verglichen. In diesem Fall ist graphisch der Quotient aus phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem DDR1 graphisch dargestellt, um die Proteinaktivierung deutlicher darzustellen.

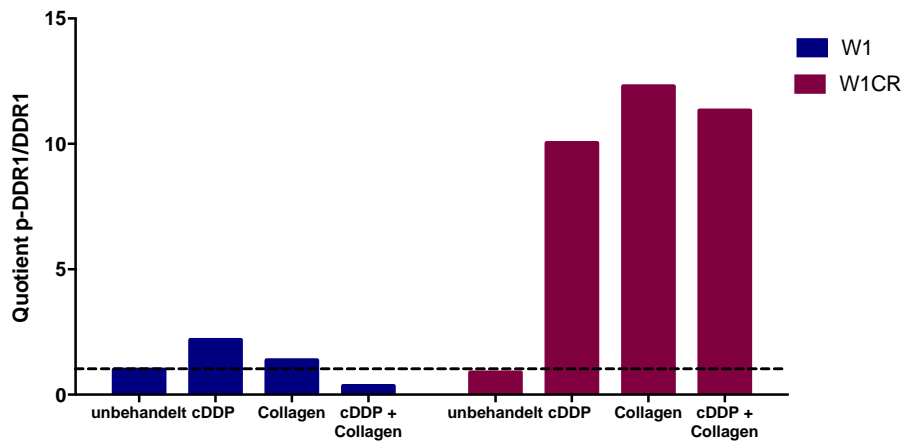


Abbildung 69: Analyse der Proteinexpression von p-DDR/DDR in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

Eindrucksvoll zu erkennen ist, dass der aktivierte DDR1-Gehalt in W1CR Zellen im Vergleich zur sensitiven Zelle um ein Vielfaches höher ausfällt. Bei näherer Betrachtung der Daten wird besonders die collagenbedingte DDR1-Aktivierung deutlich. Während bei reiner Cisplatinbehandlung ohne zusätzliche Matrix der Rezeptor um den Faktor 5 in W1CR Zellen stärker aktiviert wird, erhöht sich das Aktivierungspotenzial bei alleiniger Collagenbehandlung nochmals (Faktor 9). Am bemerkenswertesten ist jedoch der Vergleich der W1CR und W1 Zellen nach simultaner Collagen- und Cisplatininkubation, in diesem Fall aktivieren die resistenten Zellen DDR1 um den Faktor 32 stärker als ihr cisplatinempfindlicher Subtyp.

Offensichtlich nutzen die resistenten Krebszellen DDR1 als einen alternativen Collagensensor zur Vermittlung der matrixinduzierten Resistenz, was damit auch die Unabhängigkeit dieser Zellen von  $\beta$ 1-Integrin erklärt. So könnte auch DDR1 für die erhöhte p-AKT Expression (Abb. 62) der W1CR Zellen verantwortlich sein, da DDR1 ebenfalls in den PI3K/AKT Signalweg eingreifen kann.



## 5.8.2 Aktivität des ERK Signalwegs in W1 Zellen

Zur fortführenden Interpretation der *Proteome Profiler*<sup>TM</sup> Daten sind weitere Untersuchungen der diskutierten Proteine notwendig. Bei Betrachtung der deregulierten Kinasen des MAPK *pathways* tritt insbesondere ERK hervor. Infolgedessen wird diese, dem DDR1 nachgeschaltete Signalkaskade (MEK, ERK, CREB), als nächstes eingehender analysiert. Hierfür wurde die entsprechenden Kinasen der Krebszellen sowohl auf mRNA- und Proteinexpressionsebene als auch mithilfe inhibierender Ansätze untersucht.

### 5.8.2.1 Auswirkung von MEK auf die Chemoresistenz

An dieser Stelle gilt es abzuklären, ob die Resistenzen gegenüber Cisplatin durch einen ERK vermittelten Signalweg erfolgen. Aktivierte DDR1 Rezeptoren führen über eine Signaltransduktion zur Hochregulierung von MEK, welche wiederum als vorgeschaltete Kinase die ERK phosphorylieren kann. Somit trägt das Verständnis der zellinternen MEK-Regulierung innerhalb verschiedener Behandlungsansätze, sowie zwischen beiden Zelllinien zur Aufklärung der ablaufenden Mechanismen bei.

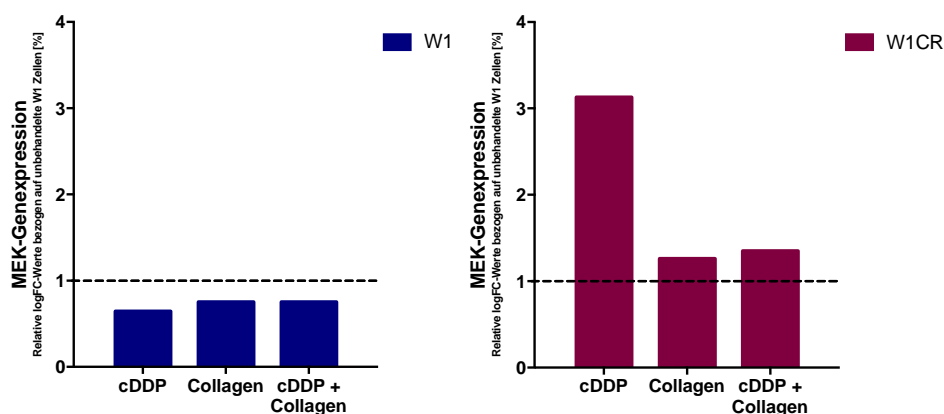


Abbildung 70: Analyse der mRNA Expression von MEK in W1 (links) und W1CR Zellen (rechts), dargestellt als faktorielle Deregulierung gegenüber den unbehandelten W1 Zellen (=1) unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h.

Die Befunde legen nahe, dass der mRNA Spiegel von MEK in cisplatinbehandelten W1CR Zellen im Vergleich zur ursprünglichen Zelllinie mehr als dreimal so stark ausgeprägt ist. Im Vergleich dazu, scheint eine Inkubation der W1CR Zellen mit Collagen nur wenig Einfluss auf die m-RNA Expression von MEK zu haben.

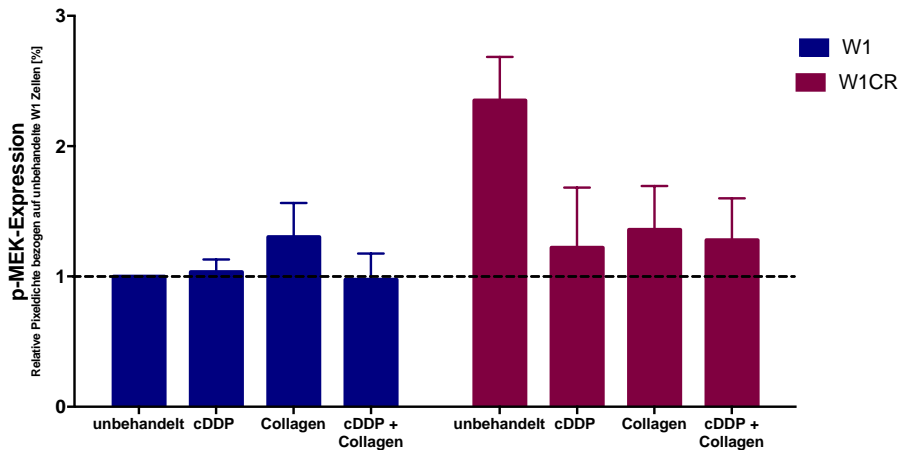


Abbildung 71: Analyse der Proteinexpression von p-MEK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt ( $n=3$ ).

Die Tendenzen der m-RNA Ergebnisse finden sich in der Proteinquantifizierung von p-MEK wieder. Auch hier zeigt das Expressionslevel der unbehandelten resistenten Zelle das höchste Ausmaß. Im Vergleich zur unbehandelten sensitiven Subtypzelle steigt der Proteingehalt um mehr als das Doppelte in W1CR Zellen an. Auffallend ist, dass weder eine Collageninkubation noch eine kombinierte Behandlung mit Cisplatin den p-MEK Gehalt erhöht. Der Proteinlevel der pMEK weist innerhalb der W1 Zellen auf einen leichten Anstieg mittels Collagenbehandlung auf. Allerdings wird dieser Effekt nicht durch eine zusätzliche Cisplatingabe verstärkt.

Da die Signaltransduktion von MEK wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben mit der Förderung einer Cisplatinresistenz in Verbindung gebracht werden kann, was wiederum mit einer geringeren Toxizität des antineoplastischen Medikaments verknüpft ist, erfolgen im nächsten Schritt Toxizitätsversuche mittels MTT-*assay* für eine funktionelle Überprüfung der Beteiligung einer MEK Signalkaskade im Kontext einer verminderten Cisplatintoxizität. In dieser Versuchsreihe erhielten beide Zelllinien 4 h vor Cisplatinzugabe eine subtoxische Konzentration des MEK1/2-Inhibitors U0126. Mithilfe der Hemmung soll die Phosphorylierungskaskade der *downstream* Komponente ERK und damit der weitere Signalweg unterbrochen werden.

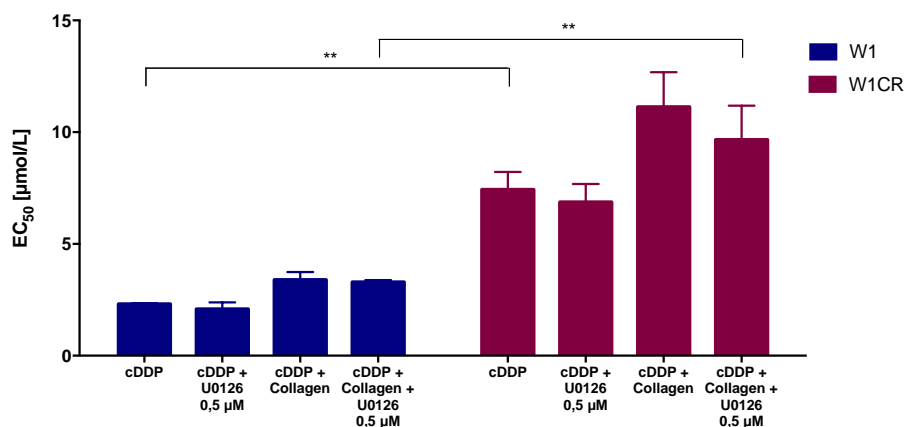


Abbildung 72: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer 0,5 µM MEK-Inhibitor Präinkubation (n=3).

Anhand der ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte beider Zelllinien wird schnell deutlich, dass der MEK Inhibitor keinen Einfluss auf die W1 Zellen entfaltet. Allerdings ist die Beeinträchtigung der Cisplatintoxizität der W1CR Zellen nach erfolgter Inhibitorzugabe auch an dieser Stelle nur marginal.

Zusammengenommen weisen die MEK-Daten auf eine intrinsisch höhere Aktivität in W1CR Zellen, welche unabhängig vom Collageneffekt erfolgt. Allerdings kann diese Aktivität nicht über eine Inhibierung von MEK beeinflusst und bestätigt werden. Das lässt vermuten, dass MEK als alleiniges Protein nicht für die W1CR Resistenz ausschlaggebend ist. Für die W1 Zellen ist mithilfe der erhobenen Daten MEK als collagenvermittelter Resistenzfaktor auszuschließen.

### 5.8.2.2 Auswirkung von ERK auf die Chemoresistenz

Der MEK direkt nachgeschaltet ist die zentrale Kinase ERK, welche als Hauptkomponente und Namensgeber dieser MAPK Signalkette fungiert. In vielen Tumorentitäten ist dieses Protein ein zentraler Bestandteil von Resistenzmanifestierungen und zeigte bereits im *Proteome Profiler*<sup>TM</sup> eine auffällige Hochregulierung innerhalb der collagenkultivierten W1 Zellen. Durch unterstützende Western Blot Daten sollen die genauen Expressionsniveaus der aktivierten und inaktivierten ERK Form erfasst werden.

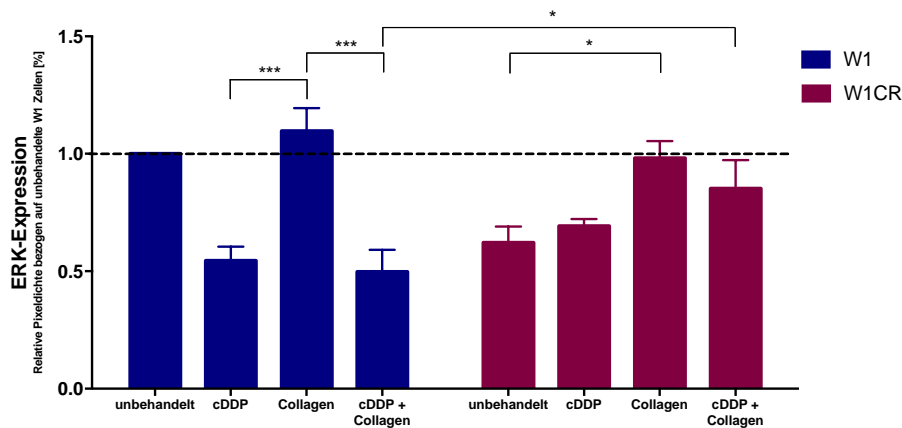


Abbildung 73: Analyse der Proteinexpression von ERK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

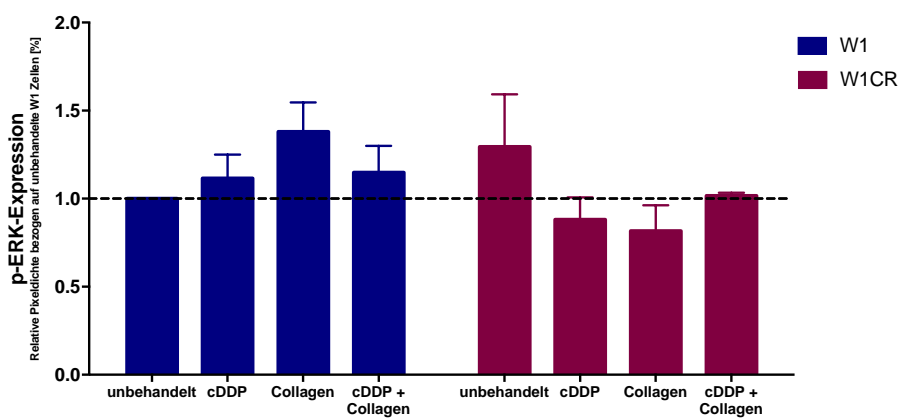


Abbildung 74: Analyse der Proteinexpression von p-ERK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

Die Erkenntnis, die aus diesen Versuchen gezogen werden können, fügt sich in das bisherige Bild beider Zelllinien gut ein. So entwickeln auch hier die unbehandelten W1CR Zellen die deutlichste ERK-Aktivierung. Das Verhältnis der nicht phosphorylierten Form zur aktivierten p-ERK Form ist für diese Zelllinie ohne Behandlung am stärksten ausgeprägt. Der Einfluss von Collagen in W1CR Zellen bewirkt hingegen eine Senkung des p-ERK Spiegel. Beide cisplatinhaltigen Ansätze der W1CR Zellen deuten lediglich auf eine geringe ERK Aktivierung hin. Mit Blick auf die W1 Zellen wird schnell deutlich, dass über die induzierte Stresssituation der Cisplatinbeimpfung die p-ERK Expression im Vergleich zur inaktivierten ERK Form deutlich ansteigt.

Basierend auf diesen erhobenen Daten erfolgt im Anschluss eine Inkubation beider Ovarialkarzinome mit SCH772984, einem ERK -Inhibitor, um weiteren Aufschluss über eine strukturell bedingte Abhängigkeit der Chemoresistenz zum ERK Signalweg zu erhalten. Für

die Viabilitäts-assays wurden die Krebszellen in einen Zeitraum von 4 h vor Cisplatinzugabe mit SCH772984 präinkubiert.

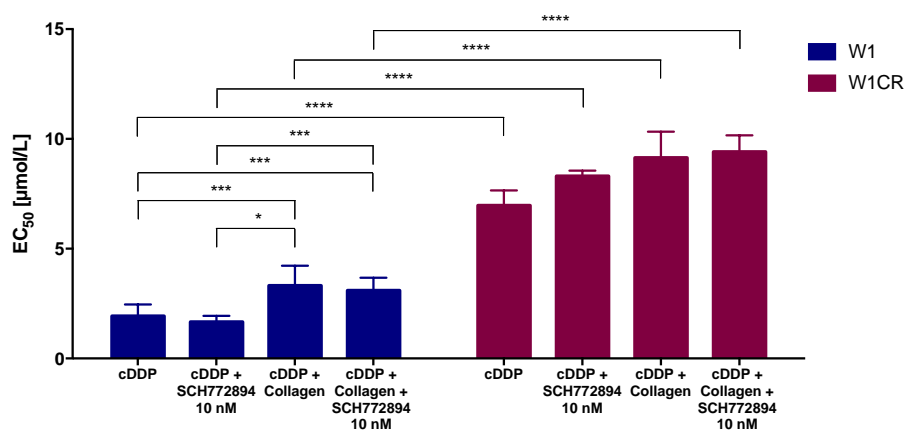


Abbildung 75: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer 10 nM ERK-Inhibitor Präinkubation (n=3).

Eine Vorinkubation der W1 Zelllinie mit dem ERK-Inhibitor resultiert sowohl in An- als auch Abwesenheit von Collagen in einer leichten Senkung der EC<sub>50</sub>-Werte und einer damit einhergehenden Steigerung der Cisplatintoxizität. Die Blockierung von ERK mittels SCH772984 führt jedoch bei den W1CR Zellen nicht zu einer Sensibilisierung gegenüber Cisplatin, was sich in den nahezu identischen und zum Teil sogar leicht erhöhten EC<sub>50</sub>-Werten der jeweiligen Behandlungsmethoden widerspiegelt. Eine mögliche Erklärung dieser gesteigerten Resistenz könnte darin bestehen, dass die Zellen versuchen den Verlust von ERK über andere antiapoptotische molekulare Mechanismen zu kompensieren.

Als abschließendes Resümee zur Hauptkinase des MAPK Signalwegs kann eine mögliche CAM-DR Involvierung der ERK für die W1 Wildtypzellen in Betracht gezogen werden. Nach erfolgter Cisplatinbehandlung ist ein p-ERK Anstieg und damit eine potenzielle Aktivierung der Signalkaskade wahrscheinlich, die wiederum mit Hilfe der ERK-Inhibierung mit einer leichten Cisplatinsensitivierung der Zelllinie einhergeht. Zwar wurde für die resistenten W1CR Zellen ebenfalls eine erhöhte ERK-Aktivierung durch Proteinquantifizierung gemessen, allerdings macht die Tatsache, dass die resistenten Krebszellen durch eine Vorbehandlung mittels ERK-Inhibitor unbeeinflusst in ihrer Toxizität gegenüber Cisplatin bleiben, einen Beitrag der ERK zur Cisplatinresistenz für diese Zellen unwahrscheinlich.

### 5.8.2.3 Auswirkung von CREB auf die Chemoresistenz

Um die Signaltransduktion innerhalb des MAPK-Signalwegs weiter zu verfolgen, konzentrieren sich die nächsten Versuche auf CREB als finale Zielstruktur dieses *pathways*. Die Phosphorylierung von CREB innerhalb der MAPK-Signalkaskade erfolgt dabei durch RSK2, die wiederum eine nachgeschaltete Komponente von ERK darstellt. Das Protein beeinflusst die Zelltranskription und dadurch auch die Proliferation von Krebszellen [438].

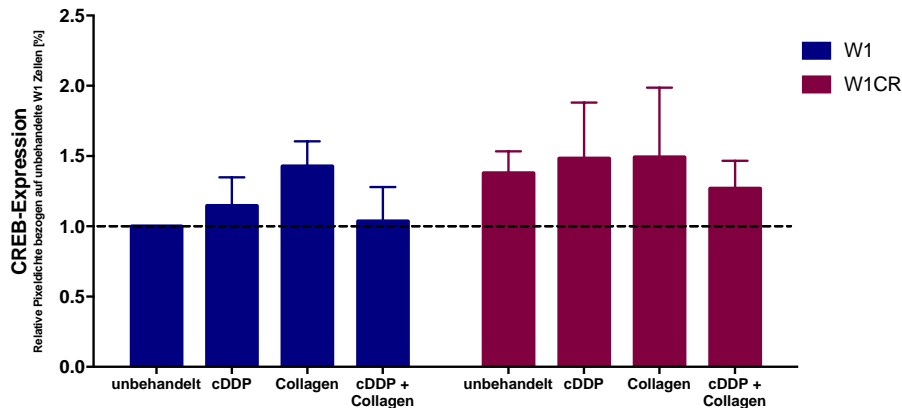


Abbildung 76: Analyse der Proteinexpression von CREB in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100% festgelegt (n=3).

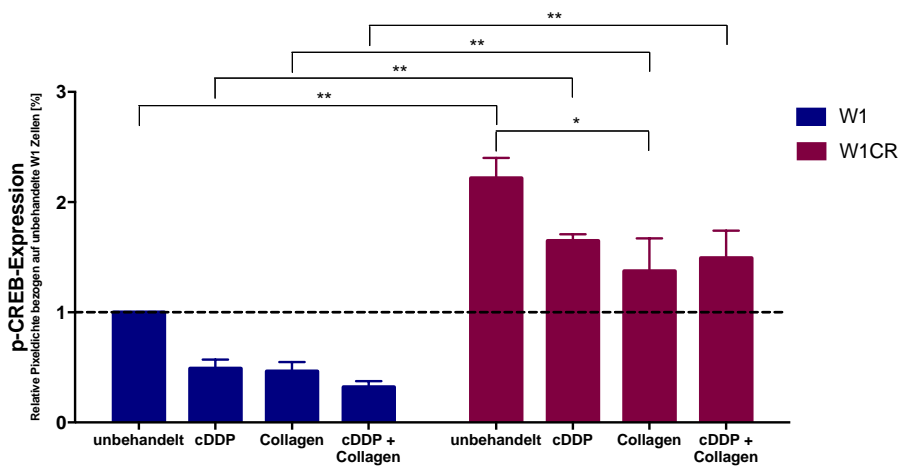


Abbildung 77: Analyse der Proteinexpression von p-CREB in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

Obwohl W1 als auch W1CR Zellen vergleichbare Proteinkonzentrationen an CREB exprimieren, übertreffen die W1CR Zellen ihren Wildtypen bei der CREB-Aktivierung deutlich, während die Expression von p-CREB für W1 Zellen in allen Behandlungsansätzen abnimmt. Interessant ist auch, dass wie bereits in den MEK- und ERK-Daten beobachtet, der p-CREB Gehalt nicht weiter durch Collagen hochreguliert wird, was die Unabhängigkeit dieses Signalweges von der Matrixbindung unterstreicht.

Im Anschluss an die Proteinquantifizierung stand eine zusätzliche funktionelle Überprüfung der CREB involvierten Signalweiterleitung im Kontext einer reduzierten Cisplatintoxizität der W1 Zellen im Fokus. Zu diesem Zweck wurde der CREB- Inhibitor 666-15 in subtoxischen Konzentrationen eingesetzt. Dafür wurden die Zellen für einen Zeitraum von 4 h vor Cisplatinzugabe mit dem Inhibitor versetzt.

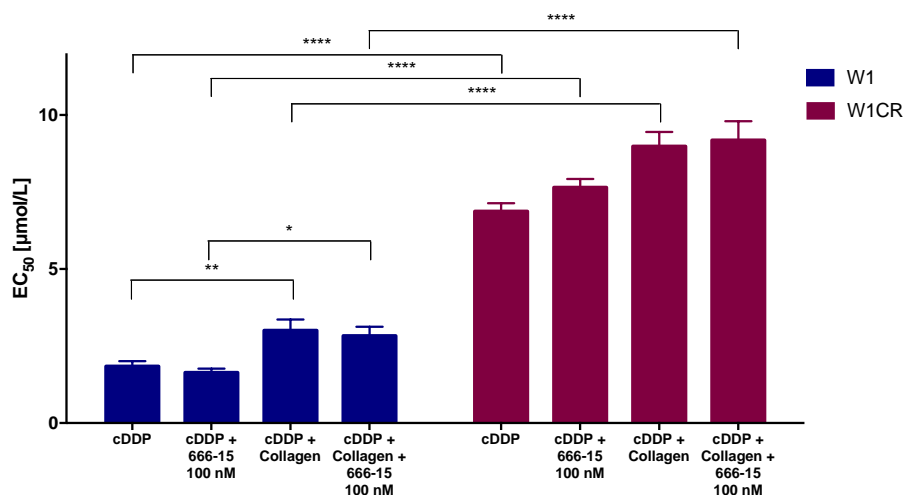


Abbildung 78: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer 100 nM CREB-Inhibitor Präinkubation (n=3).

Im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Cisplatin bewirkt eine zusätzliche Vorinkubation mit 666-15 eine geringfügige Änderung der zytotoxischen Wirksamkeit. Diese Daten passen zu dem vorangegangenen Expressionsmuster der Zelllinie, da die W1 Zellen nur wenig p-CREB als aktive Form exprimieren (Abb. 77), dessen Signalweiterleitung gehemmt werden kann. Die collageninduzierte Resistenz bleibt trotz CREB Hemmung bestehen. Eine Präinkubation der W1CR Krebszellen mit dem niedermolekularen CREB-Inhibitor hatte hingegen keinen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von Cisplatin, was sich in den tendenziell leicht hochregulierten EC<sub>50</sub>-Werten widerspiegelt.

Die Schlussfolgerung der erhobenen CREB Daten zeigt, dass für die W1 Zellen trotz gering ausfallender CREB Expression die Cisplatintoxizität mithilfe eines CREB-Inhibitors beeinflusst werden kann, wenn auch nur in geringem Ausmaß. Diese Beobachtungen könnten, wie zuvor schon für ERK postuliert, ebenfalls einen Beitrag zur CAM-DR repräsentieren. Den Ergebnissen zufolge kann eine Beteiligung der CREB im Kontext der Chemoresistenz bei W1CR Zellen als unwahrscheinlich eingestuft werden. Denn obwohl die Zellen wesentlich mehr CREB aktivieren als die Wildtypzelllinie, verursacht eine Hemmung desselben Proteins keine Cisplatinresensibilisierung. Demnach bedienen sich diese Zellen anderer molekularer Signalmechanismen, um der toxischen Wirkung des Zytostatikums zu entgehen.

### 5.8.3 Aktivität des JNK Signalwegs in W1 Zellen

Im Hinblick auf den geringen Einfluss des MEK/ERK/CREB-Signalwegs, wurde die Signalübertragung über JNK, aufgrund ihrer Beteiligung an matrixbezogenen Signalkaskaden, in Betracht gezogen [440]. Da der JNK *pathway* sowohl von  $\beta$ 1-Integrin, als auch über DDR1 in Gang gesetzt werden kann, stellt das Protein eine besonders interessante Zielstruktur für diese Arbeit dar. Die phosphorylierte JNK interagiert mit weiteren Kinasen, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, die anschließend die Zellproliferation regulieren können. Vor diesem Hintergrund wurden als nächstes die mRNA Expression der JNK in W1 und W1CR Zellen untersucht.

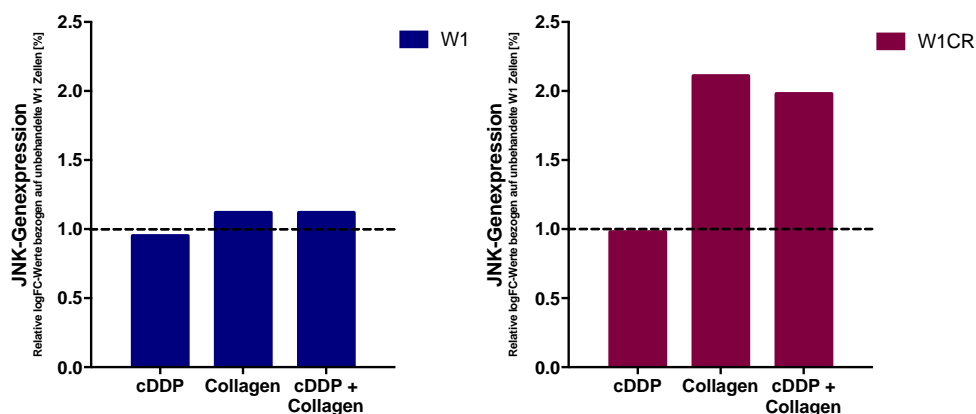


Abbildung 79: Analyse der mRNA Expression von JNK in W1 (links) und W1CR Zellen (rechts) im Bezug auf unbehandelte W1 Zellen (=1) unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h.

Den erhaltenen Ergebnissen zufolge sind nur geringfügige Unterschiede der JNK mRNA-Spiegel innerhalb der cisplatinsensitiven W1 Zellen in allen Behandlungsschemata zu erkennen, während eine Kultivierung der W1CR Zellen auf Collagen mit einer eindrucksvollen Steigerung der mRNA-Expression einhergeht.

Zur Überprüfung der Relevanz dieser Kaskade in beiden Zelllinien wurde im weiteren Verlauf der Proteingehalt der inaktivierten und aktivierten JNK Form in W1 und W1CR Zellen untersucht.



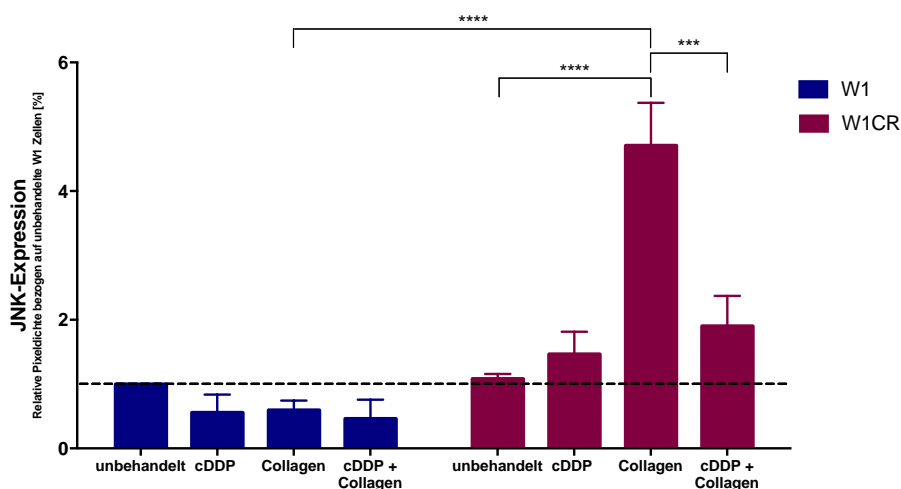


Abbildung 80: Analyse der Proteinexpression von JNK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

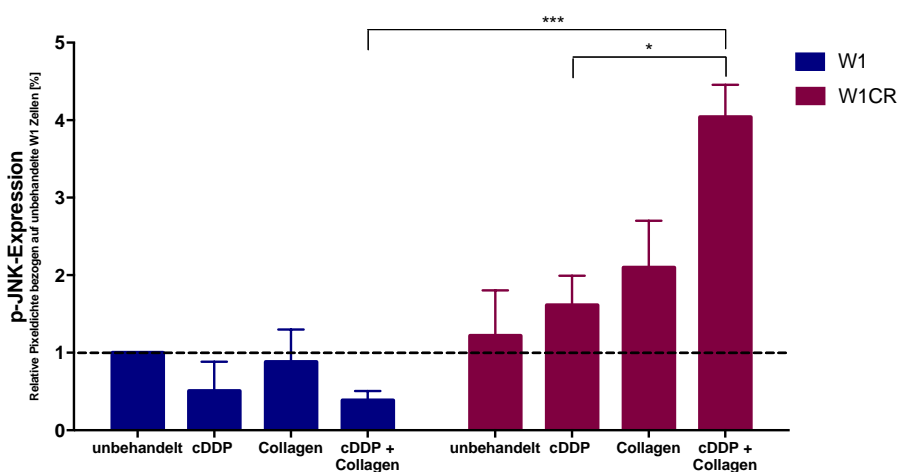


Abbildung 81: Analyse der Proteinexpression von p-JNK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

Anhand der beiden Befunden wird ersichtlich, dass sich zwar die Grundniveaus der Proteinexpression von JNK in beiden unbehandelten Zelllinien nicht unterscheiden, allerdings eine Collagenkultivierung innerhalb der resistenten W1CR Zellen eine massive Hochregulierung von JNK hervorruft. Dieses Phänomen konnte bereits auf mRNA-Ebene für diese Zellen verzeichnet werden (Abb. 79). Besonders interessant sind die Daten im Hinblick auf die p-JNK-Form. So fällt auf, dass durch eine kombinierte Behandlung von Collagen und Cisplatin die Kinase signifikant hochreguliert wird. Demzufolge ist denkbar, dass die W1CR Zellen mithilfe der Collagenbindung einen höheren Basisgehalt an JNK exprimieren. Dieser steht unter Stressbedingungen als Schutzmaßnahme zur Phosphorylierung und zur damit verbundenen Aktivierung der Signalkaskade zur Verfügung. Im Gegenteil dazu wird die p-JNK Proteinmenge in Wildtyp Zellen unter demselben Behandlungsansatz stark reduziert.

Zusammengenommen weisen diese Daten auf eine entscheidende Schlüsselrolle der JNK in der Vermittlung der collageninduzierten Resistenz von W1CR Zellen hin und stellen damit ein potenzielles Ziel für die Sensibilisierung und Überwindung der CAM-DR in diesen Zellen dar. Ungeachtet dessen hatte die Beeinträchtigung der JNK Aktivität im Vergleich zu W1 Zellen keinen Einfluss auf die intrinsische Resistenz von W1CR Zellen.

## 5.9 HSP27 Signalweg

Den erhobenen Daten zufolge scheinen andere Mechanismen für die intrinsische Cisplatinresistenz relevant zu sein. In den am stärksten deregulierten Kinasen des *Proteome Profiler™ Arrays* sticht insbesondere HSP27 hervor. Hier ergab sich die größte Diskrepanz zwischen der Expression von W1 und W1CR Zellen. Das Hitzeschockprotein ist ein wichtiger *downstream*-Effektor der p38 Signalkaskade und somit auch ein weiterer Bestandteil des MAPK Signalnetzwerks. Da die dazugehörige Signaltransduktion in der Literatur bereits mit dem Auftreten von antiapoptotischen Verhalten in Verbindung gebracht werden konnte (Kapitel 2.8), war die Untersuchung des Chaperons im Zusammenhang mit der vorherrschenden intrinsischen Cisplatinresistenz Bestandteil der nachfolgenden Experimente. Zur Überprüfung der Relevanz dieser Signalvermittlung in beiden Zelllinien wurden zunächst Proteinexpressionen der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Form von HSP27 durchgeführt.

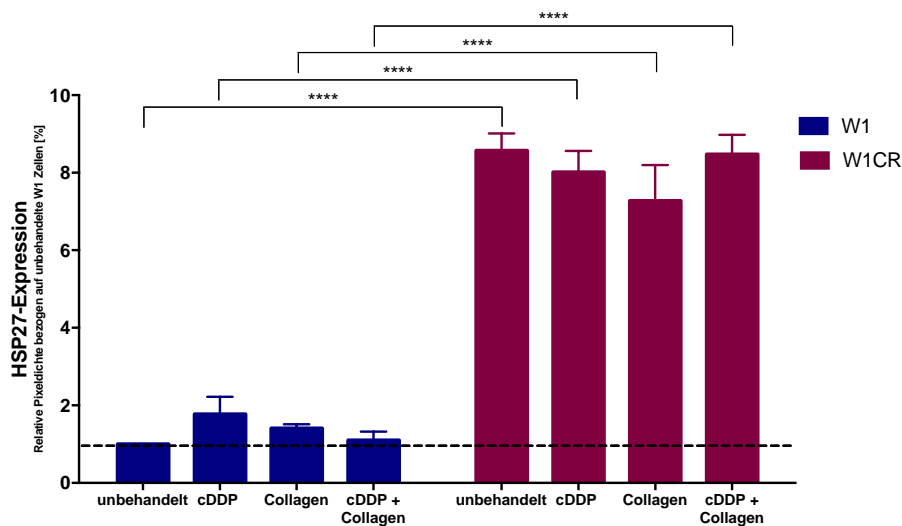


Abbildung 82: Analyse der Proteinexpression von HSP27 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

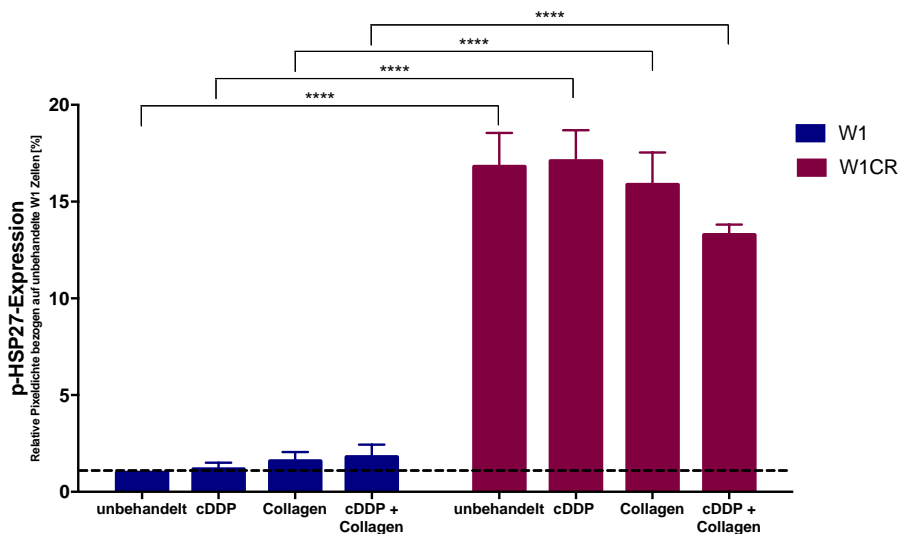


Abbildung 83: Analyse der Proteinexpression von p-HSP27 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt ( $n=3$ ).

Bei Betrachtung der ausgewerteten Daten tritt die im Vergleich zum W1 Zellsystem eine enorme Differenz der Proteinexpressionswerte zwischen W1 und der cisplatinresistenten W1CR Zelllinie in den Vordergrund, welche sich in signifikant größeren Expressionsniveaus widerspiegelt. Das Behandlungsschema scheint dabei von untergeordneter Relevanz zu sein. Erstaunlicherweise steht der resistente Subtyp Zelle im Vergleich zur W1 Zelle bereits eine achtfach höhere Proteinkonzentration in der inaktiven Protein Form zur Verfügung. Diese Diskrepanz dehnt sich darüber hinaus durch die Phosphorylierung des Chaperons noch weiter aus. Die Expressionswerte sind für die resistenten Karzinome um mehr als das fünfzehnfache erhöht. Diese eindrucksvollen Unterschiede weisen auf eine Aktivität des p38-Signalwegs in W1CR Ovarialkarzinomen hin, der offensichtlich unabhängig von der Collagenbindung verläuft, aber zu einer intrinsisch höheren Cisplatinresistenz beitragen könnte. Aus diesem Grund wurden nachfolgend die im p38 Signalweg vorgeschalteten Kinasen ebenfalls in Bezug auf ihre Proteinmenge quantifiziert. Diese Daten tragen allerdings nicht zum Verständnis der HSP27 Regulierung bei und werden deshalb in dieser Arbeit nicht gezeigt. Demnach scheint der p38 *pathway* nicht für die gesteigerte Hochregulierung von HSP27 verantwortlich zu sein, sondern wird vermutlich durch anderweitige, noch nicht aufgeklärte molekulare Mechanismen reguliert.

Um Aussagen über eine potenzielle Beteiligung der HSP27 vermittelten Signale in dem Phänomen der Cisplatinresistenz von W1CR Zellen treffen zu können, wurden nachfolgend resistente W1CR Zellen auf funktioneller Ebene untersucht. Zu diesem Zweck wurden mittels siRNA HSP27 *knock-down* Zellen etabliert.

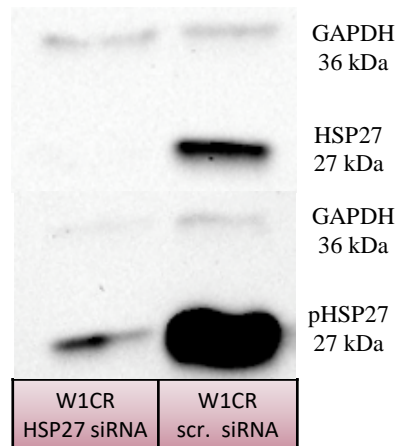


Abbildung 84: Exemplarische Detektion der HSP27 und GAPDH Proteinbanden der W1CR transfizierten Zelllysate ( $n=3$ ).

Zu erkennen ist die Pixeldichte von HSP27 72 h nach erfolgter Transfektion. Während die Kontrollzelle W1CR scramble siRNA enthält und eine extrem ausgeprägte Expression des Chaperons aufweist, so wird die Pixeldichte durch den *knock-down* stark dezimiert. Es sind lediglich leichte Rückstände des Proteins detektierbar. Das schwache HSP27 Signal innerhalb der *knock-down* Zellen kann darauf zurück zu führen sein, dass die Zellen mittels siRNA nur transient transfiziert werden konnten. Aufgrund dessen mussten alle Experimente spätestens 72 h nach erfolgreicher Transfektion durchgeführt werden. Somit haben die Zellen ihre maximale Verwendbarkeit vor der Lysatherstellung erreicht. Eventuell waren vereinzelte Zellen wieder in der Lage HSP27 zu exprimieren. Natürlich könnte ein weiterer Grund darin bestehen, dass der *knock-down* nicht zu 100 % erfolgreich war und ein kleiner Teil der Zellen nicht transfiziert wurde. Diese Möglichkeit muss immer in Betracht gezogen werden, wenn kein *Zell-sorting* vorgenommen werden kann.

Im Hinblick auf die effektive Hemmung von HSP27 zielten weitere Untersuchungen auf Erkenntnisse einer damit verbundenen Cisplatinempfindlichkeit ab. So wurde die Wirkung der HSP27 *knock-down* Zellen analysiert, indem die Cisplatinzytotoxizität mithilfe von MTT-*assays* gemessen wurde.

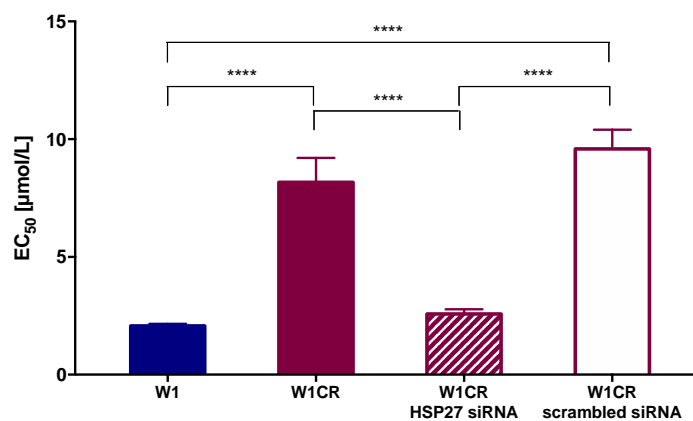


Abbildung 85: Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, sowie W1CR HSP27 siRNA und W1CR scramble siRNA transfizierten Zellen (n=3).

Besonders hervorzuheben ist in diesem Datensatz der totale Resistenzverlust der W1CR HSP27 siRNA Zellen. Während die scramble Kontrollzellen im Vergleich zu den W1CR Wildtyp Zellen nahezu identische EC<sub>50</sub>-Werte aufweisen, verhalten sich die W1CR HSP27 siRNA Zellen in Bezug auf die Cisplatintoxizität annähernd wie die cisplatinempfindlichen W1 Zellen. Diese cisplatin-sensibilisierende Wirkung durch HSP27 Elimination hebt den Unterschied zwischen W1 und W1CR Zellen auf funktioneller Ebene deutlich hervor und untermauert damit die Schlüsselrolle des kleinen Chaperons innerhalb der intrinsischen W1CR Chemoresistenz.

Zusammengenommen weist die Datenlage damit eindeutig auf die zentrale Bedeutung von HSP27 bei der intrinsischen Cisplatinresistenz von W1CR Zellen als unabhängigen Weg hin, welcher zusätzlich zum CAM-DR Phänomen wirkt. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend fügen sich die vorangegangenen Ergebnisse aus Kapitel 5.3.1 bezüglich der Glutathion Konzentration hervorragend mit ins Bild mit ein. Der Anstieg der Glutathion Expression ist ein *downstream* Effekt, welcher aus der Aktivierung von HSP27 resultiert [401]. Somit könnte der glutathionbedingte Entgiftungsmechanismus (Abb. 38) eine potenzielle Grundlage für die Sensibilisierung der transfizierten *knock-down* Zellen darstellen. Um zu überprüfen welche weiteren Mechanismen von HSP27 *downstream* stimuliert werden und zur intrinsischen Resistenz beitragen, werden nachfolgend Zielstrukturen von HSP27 experimentell untersucht.

### 5.9.1 Effekt auf die intrinsischen Caspasenkaskade

In Anbetracht der effektiven Hemmung von HSP27 und den Erkenntnissen einer damit verbundenen intrinsischen Cisplatinresistenz wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit Proteine untersucht, die dem Signalweg des Chaperons nachgeschaltet sind. Das kleine Hitzeschockprotein interagiert mit den äußeren Mitochondrienmembranen und stört dabei die Bildung des Apoptosom, wodurch die Aktivierung von Caspase 9 und der nachfolgenden

Caspase 3 gehemmt wird [441]. Die Enzymkaskade der Caspasen bildet einen essenziellen Bestandteil des programmierten Zelltodes (Kapitel 2.3.3). Aufgrund dessen werden beide Cysteinproteasen mittels Western Blot Methode im Hinblick auf den Proteingehalt von W1 und W1CR Krebszellen analysiert.

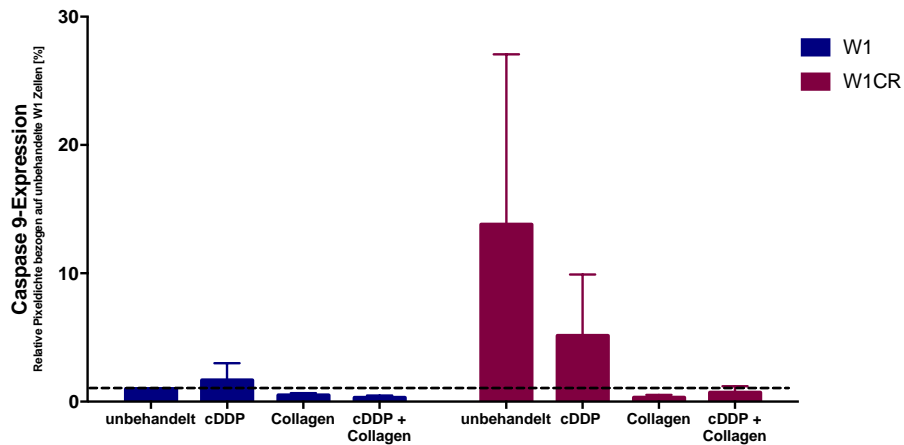


Abbildung 86: Analyse der Proteinexpression von Caspase 9 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt ( $n=3$ ).

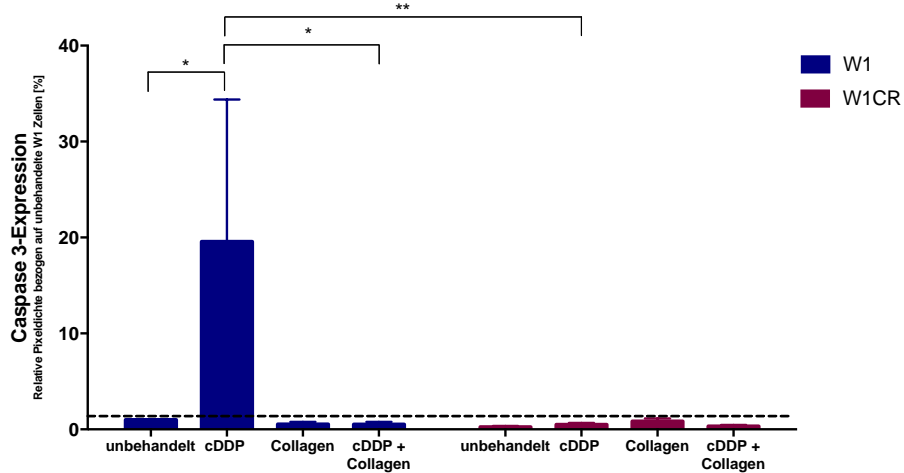


Abbildung 87: Analyse der Proteinexpression von Caspase 3 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt ( $n=3$ ).

Mithilfe der Proteinquantifizierung der beiden Caspasen kann beobachtet werden, dass die Caspase 9 Expressionsdaten (Abb. 86) besonders innerhalb der unbehandelten, sowie mit alleinigen Zytostatika inkubierten W1CR Zellen stark ausgeprägt sind. Die aktivierte Form von Caspase 9 (Apoptosom) stimuliert wiederum Caspase 3. Allerdings ist trotz erhöhter Caspase 9 Konzentration der resistenten Zelllinie keine gleichbleibende Tendenz in den Expressionswerten der Effektor-Caspase 3 festzustellen. Dies bestätigt die Annahme, dass HSP27 in der Lage ist die Bildung des Apoptosoms und damit der Möglichkeit einer

Signalweiterleitung über Caspase 3 zu verhindern. Somit ist die Zelle nicht im Stande, über die Effektor-Caspase die Apoptose einzuleiten, was mit einer Resistenz besagter Zelllinie einhergehen könnte. Für die Wildtyp W1 Zellen zeichnet sich hingegen ein anderes Bild ab. Während die cisplatin sensitiven Ovarialkarzinome erstaunlich wenig Caspase 9 Protein aufweisen, so steigt der Proteingehalt nach Cisplatinbehandlung dieser Zellen von Caspase 3 trotzdem stark an. Dieses Phänomen könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Apoptose auch durch extrazelluläre Signale z.B. über Caspase 8 aktiviert werden kann.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Einfluss einer erhöhten Aktivität von HSP27 auf die abgeschwächte Aktivierung der Caspasenkaskade eine endgültige Antwort für das gesteigerte Überleben der resistenten W1CR Zellen unter cisplatininduziertem Stress zu sein scheint.

### 5.9.2 Analyse der Matrix-Metalloproteasen 2 und 9

Zusammengenommen geben die bisher diskutierten Ergebnisse fundierte Hinweise auf eine HSP27 Involvierung in die zugrundeliegenden Mechanismen der intrinsischen Chemoresistenz der W1CR Ovarialzellen. Neben der gesteigerten Glutathion Konzentration und Unterbrechung der Caspasen Aktivierungskette können weitere HSP27 *targets* wie MMP das Tumorwachstum beeinflussen. In neueren Studien konnte nachgewiesen werden, dass HSP27, insbesondere über MMP2 und MMP9, die Zelladhäsion verstärken und die Zellmigration und -invasion modulieren kann [399].

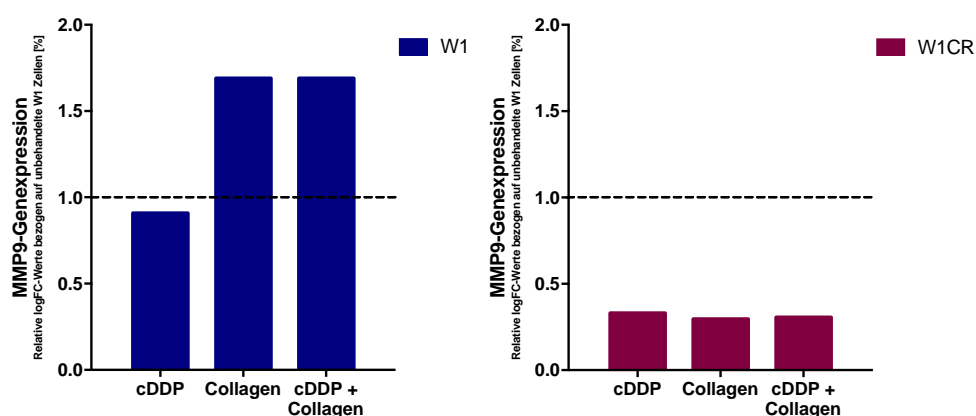


Abbildung 88: Analyse der mRNA Expression von MMP-9 in W1 (links) und W1CR Zellen (rechts) dargestellt als faktorielle Änderung gegenüber unbehandelten W1 Zellen sowie unter Einfluss von Cisplatin ( $1 \mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h.

Anhand der mRNA Daten kann gezeigt werden, dass die MMP9 Genexpression innerhalb der Wildtypzelle stärker stimuliert wird, als in den resistenten Subtypzellen. Eine Collagenbehandlung der W1 Zellen verstärkt die Expressionslevel von MMP9 besonders stark,

während die resistenten W1CR Zellen im Kontrast zu ihren Wildtyp Zellen die MMP9 mRNA Aktivitäten herunterregulieren. Innerhalb der Behandlungsansätze sind für die resistenten Zellen keine Unterschiede zu beobachten.

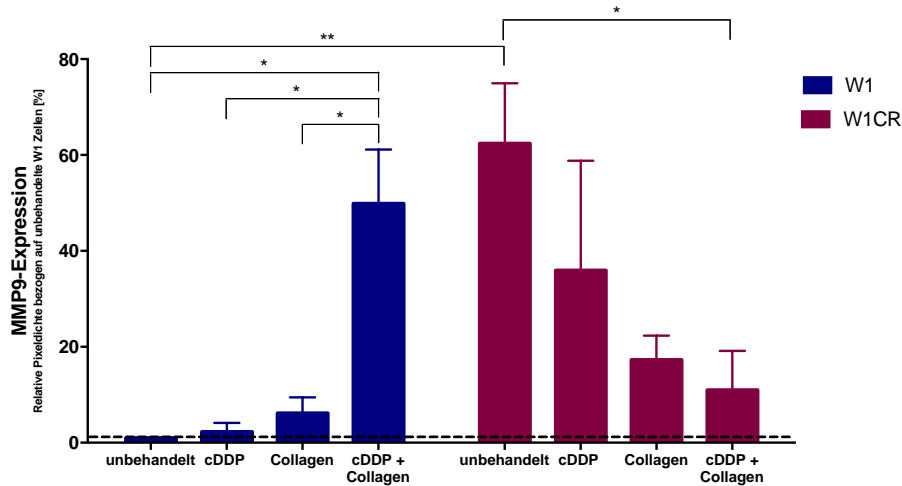


Abbildung 89: Analyse der Proteinexpression von MMP9 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

Interessanterweise verändert sich dieses Bild bei der Betrachtung der Expressionsdaten auf Proteinebene. Während W1 Zellen durch die kombinierte Behandlung von Collagen und Cisplatin, passend zu den vorangegangenen mRNA Daten einen besonders hohen MMP9 Spiegel aufweisen, vermindert die gleiche Behandlung die Expression in W1CR Zellen. Außerdem zeigen die resistenten unbehandelten Zellen eine vergleichsweise gleichstarke Hochregulierung. Ebenfalls relativ gut ausgeprägt sind die W1CR Werte der Zellen, die nur mit Cisplatin inkubiert wurden. Die Ergebnisse der resistenten Zellen stimmen mit den HSP27 Daten überein und bestätigen die Vermutung einer weitergeleiteten Signalkaskade und einer damit verbundenen MMP9 Aktivierung. Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass ERK ebenfalls in der Lage ist, MMP9 auszulösen. Da die ERK Daten für die gleichen Behandlungsansätze die höchste Aktivierung aufwiesen (Abb. 73 und 74), ist diese Signalweiterleitung als additives Element nicht auszuschließen. Allerdings kommt nur eine zusätzliche und keine alleinige Involvierung infrage, da die Proteinniveaus extrem hohe Werte aufweisen, die über eine alleinige ERK Signaltransduktion nicht möglich wären. Eine weitere Möglichkeit für die Aktivierung von MMP9 besteht in einer Signalübermittlung ausgehend von mTOR. Dieser Weg wäre vor allem für die W1 Karzinome, welche mit Cisplatin und Collagen behandelt wurden, denkbar.



Nachfolgend wurde MMP2 ebenfalls auf mRNA und Protein Ebene untersucht.

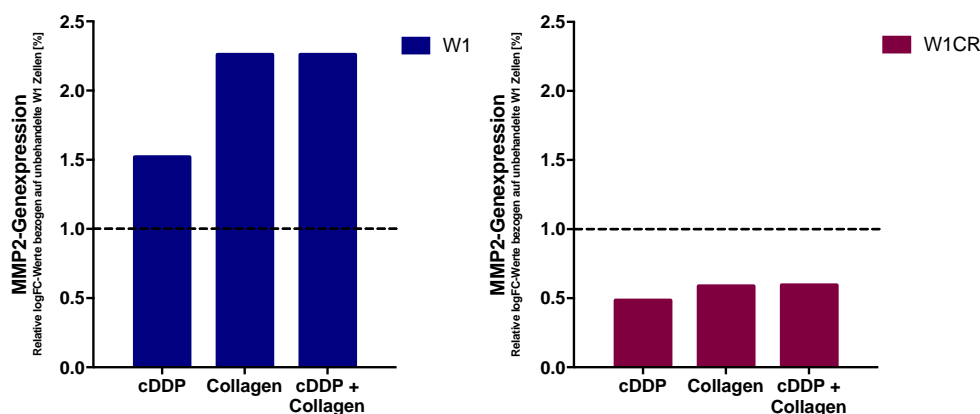


Abbildung 90: Analyse der mRNA Expression von MMP2 in W1 (links) und W1CR Zellen (rechts) in Relation zu unbehandelten W1 Zellen sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h.

Die MMP2 mRNA Level weisen eine große Ähnlichkeit zu den MMP9 Expressionsdaten auf. Für W1 Zellen ist ein Anstieg der MMP2 mRNA Level zu beobachten. Insbesondere die Kultivierung der Zellen auf Collagen scheint den mRNA-Gehalt verstärkt zu stimulieren. Im direkten Vergleich dazu fallen die W1CR Genexpressionsdaten um ein Drittel kleiner aus und unterscheiden sich innerhalb der Behandlungsart nicht signifikant voneinander.

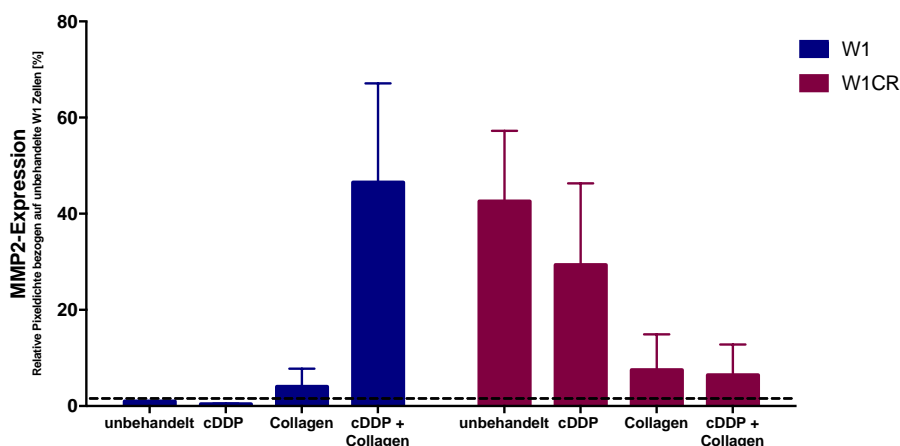


Abbildung 91: Analyse der Proteinexpression von MMP2 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

Für die Proteinebene zeigt sich ebenfalls ein dem MMP9 ähnliches Bild. Bei den W1 Zellen ist ein starker Anstieg der MMP2-Spiegel unter Collagen- und Cisplatininkubation zu beobachten. Alle anderen Behandlungsschemata derselben Zelllinie weisen keine nennenswerten Deregulierungen der Proteinexpression auf. Auch in diesem Datensatz exprimieren die resistenten Zellen ohne jegliche Behandlung und nach alleiniger Cisplatinzugabe den größten MMP2 Anteil. Die MMP2 Ergebnisse der W1CR Zellen passen zu den HSP27 Werten und

bestärken damit die Hinweise auf eine intrinsisch vermittelte HSP27 Resistenz. Für die W1 Zellen hingegen war keine HSP27 vermittelte Aktivierung zu verzeichnen, sodass die Regulierung der MMP2 über andere Signalwege verursacht werden muss. Auch MMP2 kann wie MMP9 über den mTOR Signalweg aktiviert werden, diese Möglichkeit würde in dem Fall mithilfe der vorangegangenen Daten aus Kapitel 5.6.4 eine plausible Erklärung darstellen.

Als Fazit aus den MMP Experimenten kann eine HSP27 bedingte Beeinflussung der resistenten W1CR Karzinome gezogen werden. Darüber hinaus bestätigt die Herunterregulierung von MMP2 und MMP9 nach Collagenbehandlung derselben Zelllinie eine separierte Regulation der CAM-DR und intrinsischen Resistenzwege. Die MMP Daten weisen außerdem auf eine mTOR/MMP Achse der cisplatinempfindlichen Wildtyp Zelle, welche die erhöhte Aktivierung des mTOR Signalwegs in diesen Zellen widerspiegelt.

Um die Relevanz einer mTOR bedingten MMP2 Achse für W1 Zellen zu validieren, wurden im nächsten Ansatz die MMP2 Expression nach mTOR-Inhibitor analysiert. Als Inhibitor wurde auch hier Rapamycin für die Beimpfung der Zelllysate verwendet.

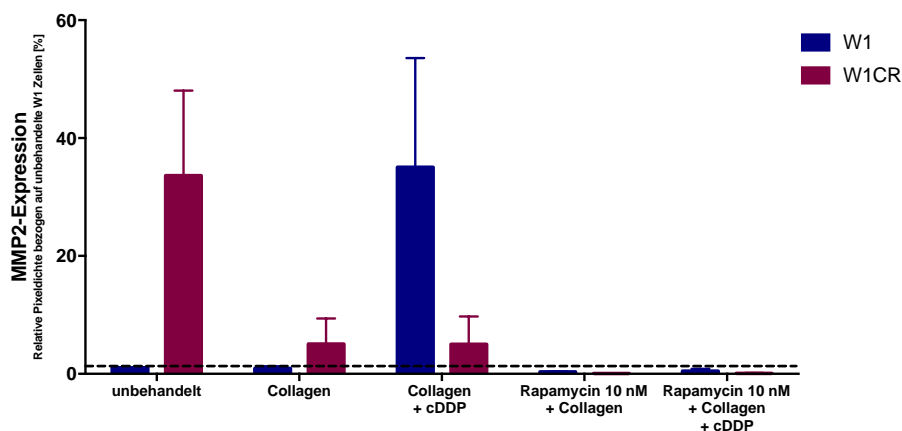


Abbildung 92: Analyse der Proteinexpression von MMP2 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen, sowie Rapamycin (10 nM) nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3).

Wie in Abb. 92 dargestellt, dämpft die mTOR Hemmung die MMP2 Proteinexpression der cisplatinempfindlichen W1 Zellen und bestätigt damit die Rolle von mTOR als Resistenz-initiiierender Faktor der CAM-DR. Im Gegensatz dazu hatte Rapamycin auf W1CR Zellen unter Collagenbindung einen wesentlich geringeren Einfluss auf den MMP2 Spiegel, da MMP2 in dieser Zelllinie vor allem in unbehandelten Zellen verstärkt exprimiert wird. Dies weist auf eine andere Regulierung von MMP2 innerhalb der resistenten Krebszelllinie hin. Die bisher erhobenen Daten lassen vermuten, dass der Signalweg über HSP27 führt.



Für die W1 Zellen zeichnet sich eine klare Achse ab, welche die Collagenbindung über  $\beta$ 1-Integrin abdeckt, wodurch ein intrazelluläres Integrin-Signal induziert wird, was mithilfe eines  $\beta$ 1-Integrin *knock-down* Ansatzes eindeutig bestätigt wird. Die W1  $\beta$ 1-kd Zellen reagieren empfindlicher auf Cisplatin und weisen keine Resistenzbildung nach Collagenbeschichtung auf. Den funktionellen CAM-DR Hintergrund betreffend folgen die W1 Zellen einem mTOR abhängigen Signalweg. So bestätigt die vorliegende Arbeit, dass Rapamycin als mTOR Inhibitor die CAM-DR Aktivität in W1 Zellen vollständig umkehrt. Somit könnte der Einsatz von mTOR-Inhibitoren ein interessantes *target* zur Umgehung von matrixbedingter Chemoresistenzen darstellen.

Im Gegensatz dazu weisen W1CR Zellen in ihrer collagenvermittelten Resistenz keine nennenswerte  $\beta$ 1-Integrin Abhängigkeit auf. Da die W1CR Zellen in der Lage waren, einen  $\beta$ 1-Integrin *knock-down* zu kompensieren und die CAM-DR aufrechtzuerhalten, führten weitere Experimente zu einer starken Hochregulierung von DDR1. Die starke Aktivierung des Rezeptors nach Collagenbindung deutet auf eine Ausweichstrategie der W1CR Ovarialkarzinome. Dabei induziert DDR1 seine zellulären Effekte über eine Vielzahl von nachgeschalteten Proteinen, darunter Mitglieder des PI3K/AKT und des MAPK Signalwegs. Dies könnte den Einfluss der W1CR Zellen auf AKT begründen.

Die Daten der ERK Signalkaskade weisen auf eine höhere Aktivität des MEK/ERK/CREB-Signalwegs in W1CR Ovarialkarzinomen hin, der offensichtlich unabhängig von der Collagenbindung verläuft, aber zu der intrinsisch höheren Cisplatinresistenz beitragen könnte. Die untersuchten Signalkomponenten scheinen jedoch für eine Sensibilisierung irrelevant zu sein.

Nach der DDR1 induzierten MAPK Signalkette wurde die *downstream* Komponente JNK als kritisches Schlüssel-molekül in collagenkultivierten W1CR Zellen identifiziert. Sie stellen damit ein potenzielles Ziel für die Sensibilisierung und Überwindung der CAM-DR in benannten Zellen dar.

Im Zuge dieser Promotionsarbeit wurde HSP27 als Hauptkomponente für die intrinsische Cisplatinresistenz der W1CR Zellen identifiziert. Diese Beobachtung konnte mithilfe eines siRNA vermittelten *knock-downs* bestätigt werden. So konnte das Sensitivitätsniveau der resistenten Zellen durch den Verlust von HSP27 auf das gleiche Level wie das der cisplatinempfindlichen W1 Zellen gebracht werden. Das kleine Hitzeschockprotein reguliert

dabei unter anderem den Anstieg des Glutathionspiegels, welcher für die Entgiftung von Cisplatin von entscheidender Bedeutung ist. Der niedrigere Platinspiegel von W1CR Zellen im Vergleich zu W1 Zellen ist eine offensichtliche Ursache für die geringere Sensibilisierung der resistenten Zellen auf das Zytotoxin. Die signifikant höheren Glutathion Konzentrationen in W1CR Zellen bieten zweifellos eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen, da Glutathion als Cofaktor von MRP2 den Cisplatinexport erleichtert.

Darüber hinaus interagiert HSP27 mit Caspase 9, wodurch die Bildung des Apoptosoms und die Aktivierung von Caspase 3 verhindert wird. Die durch das kleine Chaperon induzierte Hemmung der Caspasenkaskade und die damit einhergehende antiapoptotische Wirkung bildet den eindeutigen Beweis einer HSP27 vermittelten Chemoresistenz innerhalb der W1CR Zellen. Ein weiteres HSP27 *target* stellen MMP2 und MMP9 dar. Beide liegen jeweils für W1CR Zellen ohne Collageneinfluss besonders stark ausgeprägt vor. Dies bestätigt unter anderem eine separate Regulierung der CAM-DR und der intrinsischen Resistenz. Die MMP Daten weisen außerdem auf eine mTOR/MMP Signalvermittlung der W1 Zellen hin und konnten mithilfe einer Rapamycin induzierten mTOR Inhibierung bestätigt werden.

Den erhobenen Daten nach bietet das kleine Hitzeschockprotein interessante neue Angriffspunkte für klinische Sensibilisierungsstrategien in der Behandlung von Krebspatienten. Ebenso können die diskutierten Signalmechanismen einen neuen Blickwinkel auf die ablaufenden molekularen Prozesse innerhalb von Krebszellen geben und veranschaulichen die komplexen Zusammenhänge der internen Signaltransduktion. Auf dieser Basis können potenziell innovative und neue molekular gesteuerte Therapieansätze entwickelt werden. So könnten beispielsweise moderne Inhibitor-Kombinationen innerhalb der stratifizierten Medizin Anwendung finden.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* 2011;117:1097–102. <https://doi.org/10.1002/cncr.25553>.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018;68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [3] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie. 10. Auflage 2012. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart; 2012.
- [4] Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2018;15:81–94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>.
- [5] Melo FDSE, Vermeulen L, Fessler E, Medema JP. Cancer heterogeneity—a multifaceted view. *EMBO Rep* 2013;14:686–95. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.92>.
- [6] Lupia M, Cavallaro U. Ovarian cancer stem cells: still an elusive entity? *Molecular Cancer* 2017;16:64. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0638-3>.
- [7] Foley OW, Rauh-Hain JA, del Carmen MG. Recurrent epithelial ovarian cancer: an update on treatment. *Oncology (Williston Park, NY)* 2013;27:288–94, 298.
- [8] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012;31:1869–83. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>.
- [9] Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biology & Medicine* 2017;14:9–32.
- [10] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- [11] Yoneda A, Lendorf ME, Couchman JR, Mulhaupt HAB. Breast and ovarian cancers: a survey and possible roles for the cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Histochem Cytochem* 2012;60:9–21. <https://doi.org/10.1369/0022155411428469>.
- [12] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69–90. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>.
- [13] Krebs - Startseite Zentrum für Krebsregisterdaten - Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom) n.d.<https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Eierstockkrebs/eierstockkrebs.html> (accessed April 16, 2020).
- [14] Cancer today n.d. <http://gco.iarc.fr/today/home> (accessed June 10, 2020).

- [15] Kurman RJ, Shih I-M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol* 2011;42:918–31. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.03.003>.
- [16] Kujawa KA, Lisowska KM. [Ovarian cancer--from biology to clinic]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2015;69:1275–90. <https://doi.org/10.5604/17322693.1184451>.
- [17] Bignotti E, Tassi RA, Calza S, Ravaggi A, Bandiera E, Rossi E, et al. Gene expression profile of ovarian serous papillary carcinomas: identification of metastasis-associated genes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2007;196:245.e1-245.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.10.874>.
- [18] Lisowska KM, Olbryt M, Student S, Kujawa KA, Cortez AJ, Simek K, et al. Unsupervised analysis reveals two molecular subgroups of serous ovarian cancer with distinct gene expression profiles and survival. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016;142:1239–52. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2147-y>.
- [19] Cho KR, Shih I-M. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:287–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246>.
- [20] Prat J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2014;124:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2013.10.001>.
- [21] du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009;115:1234–44. <https://doi.org/10.1002/cncr.24149>.
- [22] Empfehlungen von der European Society for Medical Oncology (ESMO) und der European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) bei fortgeschrittenem Ovarialkrebs. Empfehlungen von Der European Society for Medical Oncology (ESMO) Und Der European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) Bei Fortgeschrittenem Ovarialkrebs | Univadis n.d. <https://www.univadis.de/viewarticle/empfehlungen-von-der-european-society-for-medical-oncology-esmo-und-der-european-society-of-gynaecological-oncology-esgo-bei-fortgeschrittenem-ovarialkrebs-684528> (accessed April 19, 2020).
- [23] Advanced-stage-III-IV-ovarian-cancer-surgery-Quality-indicators-Complete-report.pdf n.d.
- [24] Wagner U, Reuß A. S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren“: Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF: Langversion 3.0, 2019, AWMF-Registernummer: 032/035OL. *Forum* 2019;34:413–5. <https://doi.org/10.1007/s12312-019-00671-4>.
- [25] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>.

- [26] Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie. 11., völlig neu bearbeitete Aufl. 2020. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart; 2019.
- [27] Ho GY, Woodward N, Coward JIG. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2016;102:37–46. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.03.014>.
- [28] Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 2014;740:364–78. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- [29] Motzer RJ. Optimal treatment for advanced seminoma? *Cancer* 1993;72:3–4. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930701\)72:1<3::aid-cnrcr2820720103>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930701)72:1<3::aid-cnrcr2820720103>3.0.co;2-6).
- [30] Tsimberidou A-M, Braithe F, Stewart DJ, Kurzrock R. Ultimate fate of oncology drugs approved by the us food and drug administration without a randomized Trial. *J Clin Oncol* 2009;27:6243–50. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.6018>.
- [31] Dhar S, Kolishetti N, Lippard SJ, Farokhzad OC. Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy in vivo. *PNAS* 2011;108:1850–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011379108>.
- [32] Drugs of choice for cancer. *Treat Guidel Med Lett* 2003;1:41–52.
- [33] WHO | WHO Model Lists of Essential Medicines. WHO n.d. <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/> (accessed April 23, 2020).
- [34] Persaud N, Jiang M, Shaikh R, Bali A, Oronsaye E, Woods H, et al. Comparison of essential medicines lists in 137 countries. *Bull World Health Organ* 2019;97:394-404C. <https://doi.org/10.2471/BLT.18.222448>.
- [35] WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf n.d.
- [36] Peyrone M. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie* 1844;51:1–29. <https://doi.org/10.1002/jlac.18440510102>.
- [37] Barry NPE, Sadler PJ. 100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs. *Pure and Applied Chemistry* 2014;86:1897–910. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-0504>.
- [38] Rosenberg B, Camp LV, Krigas T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 1965;205:698–9. <https://doi.org/10.1038/205698a0>.
- [39] Rosenberg B, Vancamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* 1969;222:385–6. <https://doi.org/10.1038/222385a0>.



- [40] Prestayko AW, editor. Cisplatin, current status and new developments. illustrated edition. New York: Academic Press; 1980.
- [41] Chemical & Engineering News: Top Pharmaceuticals: Cisplatin n.d. <http://pubsapp.acs.org/cen/coverstory/83/8325/8325cisplatin.html>? (accessed April 24, 2020).
- [42] Carpenter D. Reputation and Power: Organizational Image and Pharmaceutical Regulation at the FDA. 1st ed. Princeton University Press; 2014.
- [43] Product Label 2008. <https://web.archive.org/web/20080208232952/http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/onctools/summary.cfm?ID=73> (accessed April 24, 2020).
- [44] Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014;740:364–78. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- [45] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7:573–84. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>.
- [46] Canetta R, Rozenzweig M, Carter SK. Carboplatin: the clinical spectrum to date. *Cancer Treat Rev* 1985;12 Suppl A:125–36. [https://doi.org/10.1016/0305-7372\(85\)90027-1](https://doi.org/10.1016/0305-7372(85)90027-1).
- [47] 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* 2017;142:8–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.007>.
- [48] Steinhilber D, Schubert-Zsilavec M, Roth H. *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe*. 2. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2010.
- [49] Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol* 1999;17:409–22. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.1.409>.
- [50] Alderden RA, Hall MD, Hambley TW. The Discovery and Development of Cisplatin. *J Chem Educ* 2006;83:728. <https://doi.org/10.1021/ed083p728>.
- [51] Petrović M, Todorović D. BIOCHEMICAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF CISPLATIN IN CANCER CELLS. *Facta Universitatis, Series: Medicine and Biology* 2016;0:12–8.
- [52] Ivanov AI, Christodoulou J, Parkinson JA, Barnham KJ, Tucker A, Woodrow J, et al. Cisplatin binding sites on human albumin. *J Biol Chem* 1998;273:14721–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14721>.
- [53] Urien S, Lokiec F. Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients. *Br J Clin Pharmacol* 2004;57:756–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02082.x>.
- [54] Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a

- review. *Br J Cancer* 1993;67:1171–6.
- [55] 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 USA* 2002;99:14298–302. <https://doi.org/10.1073/pnas.162491399>.
- [56] Davies MS, Berners-Price SJ, Hambley TW. Slowing of cisplatin aquation in the presence of DNA but not in the presence of phosphate: improved understanding of sequence selectivity and the roles of monoaquated and diaquated species in the binding of cisplatin to DNA. *Inorg Chem* 2000;39:5603–13. <https://doi.org/10.1021/ic000847w>.
- [57] Timerbaev AR, Hartinger CG, Aleksenko SS, Keppler BK. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem Rev* 2006;106:2224–48. <https://doi.org/10.1021/cr040704h>.
- [58] 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* 2002;246:95–104.
- [59] Esteban-Fernández D, Moreno-Gordaliza E, Cañas B, Palacios MA, Gómez-Gómez MM. Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs. *Metallomics* 2010;2:19–38. <https://doi.org/10.1039/B911438F>.
- [60] Baik M-H, Friesner RA, Lippard SJ. Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine? *J Am Chem Soc* 2003;125:14082–92. <https://doi.org/10.1021/ja036960d>.
- [61] Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 1985;24:707–13. <https://doi.org/10.1021/bi00324a025>.
- [62] Ramachandran S, Temple BR, Chaney SG, Dokholyan NV. Structural basis for the sequence-dependent effects of platinum–DNA adducts. *Nucleic Acids Res* 2009;37:2434–48. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp029>.
- [63] Pullman A, Pullman B. Molecular electrostatic potential of the nucleic acids. *Q Rev Biophys* 1981;14:289–380.
- [64] Rabik CA, Dolan ME. Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33:9–23. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.09.006>.
- [65] Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* 2003;103:645–62. <https://doi.org/10.1021/cr020010d>.
- [66] Malinge JM, Giraud-Panis MJ, Leng M. Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA. *J Inorg Biochem* 1999;77:23–9. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(99\)00148-8](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(99)00148-8).

- [67] Woźniak K, Błasiak J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochim Pol* 2002;49:583–96. <https://doi.org/024903583>.
- [68] Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265–79. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>.
- [69] Zamble DB, Mikata Y, Eng CH, Sandman KE, Lippard SJ. Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. *J Inorg Biochem* 2002;91:451–62. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(02\)00472-5](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(02)00472-5).
- [70] Imamura T, Izumi H, Nagatani G, Ise T, Nomoto M, Iwamoto Y, et al. Interaction with p53 Enhances Binding of Cisplatin-modified DNA by High Mobility Group 1 Protein. *J Biol Chem* 2001;276:7534–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008143200>.
- [71] Moggs JG, Szymkowski DE, Yamada M, Karran P, Wood RD. Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. *Nucleic Acids Res* 1997;25:480–91.
- [72] Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A. Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res* 1999;59:3968–71.
- [73] Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, et al. The Role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 Defects in Cisplatin and Oxaliplatin Resistance: Correlation with Replicative Bypass of Platinum-DNA Adducts. *Cancer Res* 1998;58:3579–85.
- [74] Wagner JM, Karnitz LM. Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival. *Mol Pharmacol* 2009;76:208–14. <https://doi.org/10.1124/mol.109.055178>.
- [75] Pabla N, Huang S, Mi Q-S, Daniel R, Dong Z. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2008;283:6572–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707568200>.
- [76] Two 4N cell-cycle arrests contribute to cisplatin-resistance. - PubMed - NCBI n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23560058> (accessed May 6, 2020).
- [77] Lovejoy CA, Cortez D. Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair (Amst)* 2009;8:1004–8. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.006>.
- [78] Lempiäinen H, Halazonetis TD. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J* 2009;28:3067–73. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.281>.
- [79] Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2012;12:801–17. <https://doi.org/10.1038/nrc3399>.
- [80] Damia G, Filiberti L, Vikhanskaya F, Carrassa L, Taya Y, Dincalci M, et al. Cisplatin and Taxol Induce Different Patterns of p53 Phosphorylation. *Neoplasia* 2001;3:10–6. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900122>.

- [81] Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 2001;268:2764–72. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02225.x>.
- [82] Basu A, Krishnamurthy S. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. *J Nucleic Acids* 2010;2010. <https://doi.org/10.4061/2010/201367>.
- [83] Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, et al. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 2003;4:321–8. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00244-7).
- [84] Lin Y, Ma W, Benchimol S. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet* 2000;26:122–7. <https://doi.org/10.1038/79102>.
- [85] Makin GWJ, Corfe BM, Griffiths GJ, Thistlethwaite A, Hickman JA, Dive C. Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *EMBO J* 2001;20:6306–15. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.22.6306>.
- [86] Brozovic A, Ambriović-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol* 2010;40:347–59. <https://doi.org/10.3109/10408441003601836>.
- [87] Dijt FJ, Fichtinger-Schepman AM, Berends F, Reedijk J. Formation and repair of cisplatin-induced adducts to DNA in cultured normal and repair-deficient human fibroblasts. *Cancer Res* 1988;48:6058–62.
- [88] Sawant A, Kothandapani A, Zhitkovich A, Sobol RW, Patrick SM. Role of mismatch repair proteins in the processing of cisplatin interstrand cross-links. *DNA Repair (Amst)* 2015;35:126–36. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.10.003>.
- [89] Ryan CJ, Bajrami I, Lord CJ. Synthetic Lethality and Cancer - Penetrance as the Major Barrier. *Trends Cancer* 2018;4:671–83. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.08.003>.
- [90] Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol* 2002;62:1154–9. <https://doi.org/10.1124/mol.62.5.1154>.
- [91] Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001;59:657–63. <https://doi.org/10.1124/mol.59.4.657>.
- [92] Joybari AY, Sarbaz S, Azadeh P, Mirafsharieh SA, Rahbari A, Farasatinasab M, et al. Oxaliplatin-induced renal tubular vacuolization. *Ann Pharmacother* 2014;48:796–800. <https://doi.org/10.1177/1060028014526160>.
- [93] Aggarwal SK. A histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1053–73. <https://doi.org/10.1177/41.7.8515048>.

- [94] Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;42:317–25. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(01\)00219-0](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(01)00219-0).
- [95] Aggarwal SK. Calcium modulation of toxicities due to Cisplatin. *Met Based Drugs* 1998;5:77–81. <https://doi.org/10.1155/MBD.1998.77>.
- [96] Russo Krauss I, Ferraro G, Merlino A. Cisplatin-Protein Interactions: Unexpected Drug Binding to N-Terminal Amine and Lysine Side Chains. *Inorg Chem* 2016;55:7814–6. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01234>.
- [97] Melnikov SV, Söll D, Steitz TA, Polikanov YS. Insights into RNA binding by the anticancer drug cisplatin from the crystal structure of cisplatin-modified ribosome. *Nucleic Acids Res* 2016;44:4978–87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw246>.
- [98] Gatti L, Cassinelli G, Zaffaroni N, Lanzi C, Perego P. New mechanisms for old drugs: Insights into DNA-unrelated effects of platinum compounds and drug resistance determinants. *Drug Resist Updat* 2015;20:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.04.001>.
- [99] Hellberg V, Wallin I, Eriksson S, Hernlund E, Jerremalm E, Berndtsson M, et al. Cisplatin and oxaliplatin toxicity: importance of cochlear kinetics as a determinant for ototoxicity. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:37–47. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn418>.
- [100] Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S, Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B, Peng Q, et al. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *Int J Nanomedicine* 2018;13:2107–28. <https://doi.org/10.2147/IJN.S157541>.
- [101] Serinan E, Altun Z, Aktaş S, Çeçen E, Olgun N. Comparison of Cisplatin with Lipoplatin in Terms of Ototoxicity. *J Int Adv Otol* 2018;14:211–5. <https://doi.org/10.5152/iao.2018.4097>.
- [102] Sersa G, Cemazar M, Miklavcic D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res* 1995;55:3450–5.
- [103] Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis* 2014;5:e1257. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.428>.
- [104] Thakur B, Ray P. Cisplatin triggers cancer stem cell enrichment in platinum-resistant cells through NF- $\kappa$ B-TNF $\alpha$ -PIK3CA loop. *J Exp Clin Cancer Res* 2017;36:164. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0636-8>.
- [105] Shen D-W, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev* 2012;64:706–21. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005637>.
- [106] Avan A, Postma TJ, Ceresa C, Avan A, Cavaletti G, Giovannetti E, et al. Platinum-induced neurotoxicity and preventive strategies: past, present, and future. *Oncologist* 2015;20:411–32. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0044>.

- [107] Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O, et al. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2004;50:287–90. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.03.003>.
- [108] Yilmaz HR, Sogut S, Ozyurt B, Ozugurlu F, Sahin S, Isik B, et al. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health* 2005;21:67–73. <https://doi.org/10.1191/0748233705th216oa>.
- [109] Caro AA, Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:27–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121704>.
- [110] Cavaletti G, Zanna C. Current status and future prospects for the treatment of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. *Eur J Cancer* 2002;38:1832–7. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(02\)00229-0](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(02)00229-0).
- [111] Milosavljevic N, Durantou C, Djerbi N, Puech PH, Gounon P, Lagadic-Gossmann D, et al. Nongenomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling. *Cancer Res* 2010;70:7514–22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1253>.
- [112] Milosavljevic N, Durantou C, Djerbi N, Puech PH, Gounon P, Lagadic-Gossmann D, et al. Nongenomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling. *Cancer Res* 2010;70:7514–22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1253>.
- [113] Florea A-M, Büsselberg D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers (Basel)* 2011;3:1351–71. <https://doi.org/10.3390/cancers3011351>.
- [114] Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 2006;70:1390–4. <https://doi.org/10.1124/mol.106.022624>.
- [115] Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol* 2010;77:887–94. <https://doi.org/10.1124/mol.109.063172>.
- [116] Holzer AK, Howell SB. The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Res* 2006;66:10944–52. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1710>.
- [117] Ishida S, McCormick F, Smith-McCune K, Hanahan D. Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. *Cancer Cell* 2010;17:574–83. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.011>.
- [118] Al-Eisawi Z, Beale P, Chan C, Yu JQ, Huq F. Carboplatin and oxaliplatin in sequenced combination with bortezomib in ovarian tumour models. *J Ovarian Res* 2013;6:78.

- <https://doi.org/10.1186/1757-2215-6-78>.
- [119] Li X, Lin Z, Zhang B, Guo L, Liu S, Li H, et al.  $\beta$ -elemene sensitizes hepatocellular carcinoma cells to oxaliplatin by preventing oxaliplatin-induced degradation of copper transporter 1. *Sci Rep* 2016;6:21010. <https://doi.org/10.1038/srep21010>.
- [120] Bompiani KM, Tsai C-Y, Achatz FP, Liebig JK, Howell SB. Copper transporters and chaperones CTR1, CTR2, ATOX1, and CCS as determinants of cisplatin sensitivity. *Metallomics* 2016;8:951–62. <https://doi.org/10.1039/c6mt00076b>.
- [121] Gupta A, Lutsenko S. Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Med Chem* 2009;1:1125–42. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.84>.
- [122] van den Berghe PVE, Folmer DE, Malingré HEM, van Beurden E, Klomp AEM, van de Sluis B, et al. Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. *Biochem J* 2007;407:49–59. <https://doi.org/10.1042/BJ20070705>.
- [123] Blair BG, Larson CA, Safaei R, Howell SB. Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. *Clin Cancer Res* 2009;15:4312–21. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0311>.
- [124] Blair BG, Larson CA, Adams PL, Abada PB, Pesce CE, Safaei R, et al. Copper transporter 2 regulates endocytosis and controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in vivo. *Mol Pharmacol* 2011;79:157–66. <https://doi.org/10.1124/mol.110.068411>.
- [125] Huang CP, Fofana M, Chan J, Chang CJ, Howell SB. Copper transporter 2 regulates intracellular copper and sensitivity to cisplatin. *Metallomics* 2014;6:654–61. <https://doi.org/10.1039/c3mt00331k>.
- [126] Öhrvik H, Logeman B, Turk B, Reinheckel T, Thiele DJ. Cathepsin Protease Controls Copper and Cisplatin Accumulation via Cleavage of the Ctr1 Metal-binding Ectodomain. *J Biol Chem* 2016;291:13905–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.731281>.
- [127] Gupta A, Lutsenko S. Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Med Chem* 2009;1:1125–42. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.84>.
- [128] Safaei R, Adams PL, Maktabi MH, Mathews RA, Howell SB. The CXXC motifs in the metal binding domains are required for ATP7B to mediate resistance to cisplatin. *J Inorg Biochem* 2012;110:8–17. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.02.016>.
- [129] Boal AK, Rosenzweig AC. Crystal structures of cisplatin bound to a human copper chaperone. *J Am Chem Soc* 2009;131:14196–7. <https://doi.org/10.1021/ja906363t>.
- [130] Hall MD, Okabe M, Shen D-W, Liang X-J, Gottesman MM. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:495–535. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.080907.180426>.

- [131] Kalayda GV, Wagner CH, Buss I, Reedijk J, Jaehde U. Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer* 2008;8:175. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-175>.
- [132] Chisholm CL, Wang H, Wong AH-H, Vazquez-Ortiz G, Chen W, Xu X, et al. Ammonium tetrathiomolybdate treatment targets the copper transporter ATP7A and enhances sensitivity of breast cancer to cisplatin. *Oncotarget* 2016;7:84439–52. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12992>.
- [133] Martínez-Balibrea E, Martínez-Cardús A, Musulén E, Ginés A, Manzano JL, Aranda E, et al. Increased levels of copper efflux transporter ATP7B are associated with poor outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Int J Cancer* 2009;124:2905–10. <https://doi.org/10.1002/ijc.24273>.
- [134] Fang T, Chen W, Sheng Y, Yuan S, Tang Q, Li G, et al. Tetrathiomolybdate induces dimerization of the metal-binding domain of ATPase and inhibits platination of the protein. *Nat Commun* 2019;10:186. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08102-z>.
- [135] Yaneff A, Sahores A, Gómez N, Carozzo A, Shayo C, Davio C. MRP4/ABCC4 As a New Therapeutic Target: Meta-Analysis to Determine cAMP Binding Sites as a Tool for Drug Design. *Curr Med Chem* 2019;26:1270–307. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171229133259>.
- [136] Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, Keppler D. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res* 1994;54:4833–6.
- [137] Keppler D. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2011:299–323. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4_8).
- [138] Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, et al. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 1996;56:4124–9.
- [139] Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1295–302. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.16.1295>.
- [140] Surowiak P, Materna V, Kaplenko I, Spaczynski M, Dolinska-Krajewska B, Gebarowska E, et al. ABCC2 (MRP2, cMOAT) can be localized in the nuclear membrane of ovarian carcinomas and correlates with resistance to cisplatin and clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2006;12:7149–58. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0564>.
- [141] Ushijima R, Takayama K, Izumi M, Harada T, Horiuchi Y, Uchino J, et al. Immunohistochemical expression of MRP2 and clinical resistance to platinum-based chemotherapy in small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2007;27:4351–8.



- [142] Yamasaki M, Makino T, Masuzawa T, Kurokawa Y, Miyata H, Takiguchi S, et al. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in chemoresistance and clinical outcome in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2011;104:707–13. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606071>.
- [143] Zimmermann T, Burda JV. Cisplatin interaction with amino acids cysteine and methionine from gas phase to solutions with constant pH. *Interdiscip Sci* 2010;2:98–114. <https://doi.org/10.1007/s12539-010-0094-x>.
- [144] 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* 1992;66:1109–15.
- [145] 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. *Onco Targets Ther* 2015;8:2319–27. <https://doi.org/10.2147/OTT.S88661>.
- [146] 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* 1993;268:20116–25.
- [147] 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* 1988;9:1283–7. <https://doi.org/10.1093/carcin/9.7.1283>.
- [148] 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 USA* 1992;89:3070–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.3070>.
- [149] Masters JR, Thomas R, Hall AG, Hogarth L, Matheson EC, Cattar AR, et al. Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. *Eur J Cancer* 1996;32A:1248–53. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(96\)00033-0](https://doi.org/10.1016/0959-8049(96)00033-0).
- [150] Byun S-S, Kim SW, Choi H, Lee C, Lee E. Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU Int* 2005;95:1086–90. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05472.x>.
- [151] Cadoni E, Valletta E, Caddeo G, Isaia F, Cabiddu MG, Vascellari S, et al. Competitive reactions among glutathione, cisplatin and copper-phenanthroline complexes. *J Inorg Biochem* 2017;173:126–33. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.05.004>.
- [152] Aoyama K, Nakaki T. Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2013;14:21021–44. <https://doi.org/10.3390/ijms141021021>.
- [153] Rocha CRR, Garcia CCM, Vieira DB, Quinet A, de Andrade-Lima LC, Munford V, et al. Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells

- in vitro and in vivo. *Cell Death Dis* 2015;6:e1727. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.101>.
- [154] Ma M-Z, Chen G, Wang P, Lu W-H, Zhu C-F, Song M, et al. Xc- inhibitor sulfasalazine sensitizes colorectal cancer to cisplatin by a GSH-dependent mechanism. *Cancer Lett* 2015;368:88–96. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.031>.
- [155] Wang S-F, Wung C-H, Chen M-S, Chen C-F, Yin P-H, Yeh T-S, et al. Activated Integrated Stress Response Induced by Salubrinal Promotes Cisplatin Resistance in Human Gastric Cancer Cells via Enhanced xCT Expression and Glutathione Biosynthesis. *Int J Mol Sci* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113389>.
- [156] Drayton RM, Dudzic E, Peter S, Bertz S, Hartmann A, Bryant HE, et al. Reduced expression of miRNA-27a modulates cisplatin resistance in bladder cancer by targeting the cystine/glutamate exchanger SLC7A11. *Clin Cancer Res* 2014;20:1990–2000. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2805>.
- [157] Zheng Z-G, Xu H, Suo S-S, Xu X-L, Ni M-W, Gu L-H, et al. The Essential Role of H19 Contributing to Cisplatin Resistance by Regulating Glutathione Metabolism in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Sci Rep* 2016;6:26093. <https://doi.org/10.1038/srep26093>.
- [158] Liu C-W, Hua K-T, Li K-C, Kao H-F, Hong R-L, Ko J-Y, et al. Histone Methyltransferase G9a Drives Chemotherapy Resistance by Regulating the Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2017;16:1421–34. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0567-T>.
- [159] Chen HHW, Kuo MT. Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs* 2010;2010. <https://doi.org/10.1155/2010/430939>.
- [160] Zhou J, Kang Y, Chen L, Wang H, Liu J, Zeng S, et al. The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Front Pharmacol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00343>.
- [161] Kimura T, Kambe T. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int J Mol Sci* 2016;17:336. <https://doi.org/10.3390/ijms17030336>.
- [162] Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, et al. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res* 1991;51:3237–42.
- [163] Yamamoto M, Tsujinaka T, Shiozaki H, Doki Y, Tamura S, Inoue M, et al. Metallothionein expression correlates with the pathological response of patients with esophageal cancer undergoing preoperative chemoradiation therapy. *Oncology* 1999;56:332–7. <https://doi.org/10.1159/000011988>.
- [164] Tariba B, Živković T, Krasnići N, Marijić VF, Erk M, Gamulin M, et al. Serum metallothionein in patients with testicular cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:813–20. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2702-2>.

- [165] Ferry KV, Hamilton TC, Johnson SW. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1305–13. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(00\)00441-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(00)00441-x).
- [166] 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* 1992;84:1512–7. <https://doi.org/10.1093/jnci/84.19.1512>.
- [167] Li Q, Yu JJ, Mu C, Yunmbam MK, Slavsky D, Cross CL, et al. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2000;20:645–52.
- [168] 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* 1994;94:703–8. <https://doi.org/10.1172/JCI117388>.
- [169] Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Lenz HJ, Hayashi K, et al. 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* 1998;16:309–16. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.1.309>.
- [170] 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. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0>.
- [171] Song L, McNeil EM, Ritchie A-M, Astell KR, Gourley C, Melton DW. Melanoma cells replicate through chemotherapy by reducing levels of key homologous recombination protein RAD51 and increasing expression of translesion synthesis DNA polymerase  $\zeta$ . *BMC Cancer* 2017;17:864. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3864-6>.
- [172] Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002;108:171–82. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00615-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00615-3).
- [173] Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005;434:917–21. <https://doi.org/10.1038/nature03445>.
- [174] Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C, et al. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* 2008;451:1116–20. <https://doi.org/10.1038/nature06633>.
- [175] Edwards SL, Brough R, Lord CJ, Natrajan R, Vatcheva R, Levine DA, et al. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature* 2008;451:1111–5. <https://doi.org/10.1038/nature06548>.
- [176] Gachechiladze M, Škarda J, Soltermann A, Joerger M. RAD51 as a potential surrogate marker for DNA repair capacity in solid malignancies. *International Journal of Cancer* 2017;141:1286–94. <https://doi.org/10.1002/ijc.30764>.
- [177] Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of

- poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:411–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3376>.
- [178] Ratnam K, Low JA. Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin Cancer Res* 2007;13:1383–8. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2260>.
- [179] Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005;434:913–7. <https://doi.org/10.1038/nature03443>.
- [180] Edwards SL, Brough R, Lord CJ, Natrajan R, Vatcheva R, Levine DA, et al. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature* 2008;451:1111–5. <https://doi.org/10.1038/nature06548>.
- [181] Helleday T. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol* 2011;5:387–93. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.07.001>.
- [182] Zhang J, Kan Y, Tian Y, Wang Z, Zhang J. Effects of poly (ADP-ribosyl) polymerase (PARP) inhibitor on cisplatin resistance & proliferation of the ovarian cancer C13\* cells. *Indian J Med Res* 2013;137:527–32.
- [183] Michels J, Vitale I, Galluzzi L, Adam J, Olaussen KA, Kepp O, et al. Cisplatin Resistance Associated with PARP Hyperactivation. *Cancer Res* 2013;73:2271–80. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3000>.
- [184] Hoppe MM, Tan DS, Lim DG, Karnezis A, Huntsman D, Steel J, et al. Abstract B04: RAD51 expression as a biomarker of homologous recombination deficiency in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2017;16:B04–B04. <https://doi.org/10.1158/1538-8514.SYNTHLETH-B04>.
- [185] Bassett E, Vaisman A, Tropea KA, McCall CM, Masutani C, Hanaoka F, et al. Frameshifts and deletions during in vitro translesion synthesis past Pt-DNA adducts by DNA polymerases beta and eta. *DNA Repair (Amst)* 2002;1:1003–16. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(02\)00150-7](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(02)00150-7).
- [186] Zhao Y, Biertümpfel C, Gregory MT, Hua Y-J, Hanaoka F, Yang W. Structural basis of human DNA polymerase  $\eta$ -mediated chemoresistance to cisplatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:7269–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202681109>.
- [187] Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 1998;4:1–6.
- [188] Rocha CRR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB, Menck CFM. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo)* 2018;73:e478s. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s>.
- [189] Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 1996;56:3087–90.

- [190] Bassett E, Vaisman A, Tropea KA, McCall CM, Masutani C, Hanaoka F, et al. Frameshifts and deletions during in vitro translesion synthesis past Pt-DNA adducts by DNA polymerases beta and eta. *DNA Repair (Amst)* 2002;1:1003–16. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(02\)00150-7](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(02)00150-7).
- [191] Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, et al. The Role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 Defects in Cisplatin and Oxaliplatin Resistance: Correlation with Replicative Bypass of Platinum-DNA Adducts. *Cancer Res* 1998;58:3579–85.
- [192] Kim EK, Choi E-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:396–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>.
- [193] Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;75:50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>.
- [194] Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16:103–19. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805>.
- [195] Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang Q, Tian L, Wang Y, et al. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003;278:19245–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208134200>.
- [196] Persons DL, Yazlovitskaya EM, Cui W, Pelling JC. Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res* 1999;5:1007–14.
- [197] Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Ikegami H, Kimura A, Matsuoka T, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line. *J Biol Chem* 1999;274:31648–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31648>.
- [198] 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* 2002;63:1423–30. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)00908-5](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)00908-5).
- [199] Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:39435–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004583200>.
- [200] 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* 2017;80:235–42. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3355-0>.

- [201] Seino M, Okada M, Sakaki H, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, et al. Time-staggered inhibition of JNK effectively sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel. *Oncol Rep* 2016;35:593–601. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4377>.
- [202] Yamamoto M, Suzuki S, Togashi K, Sanomachi T, Seino S, Kitanaka C, et al. AS602801, an Anticancer Stem Cell Candidate Drug, Reduces Survivin Expression and Sensitizes A2780 Ovarian Cancer Stem Cells to Carboplatin and Paclitaxel. *Anticancer Res* 2018;38:6699–706. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13038>.
- [203] Martini E, Schneider E, Neufert C, Neurath MF, Becker C. Survivin is a guardian of the intestinal stem cell niche and its expression is regulated by TGF- $\beta$ . *Cell Cycle* 2016;15:2875–81. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1231286>.
- [204] Šuštić T, van Wageningen S, Bosdriesz E, Reid RJD, Dittmar J, Liefstink C, et al. A role for the unfolded protein response stress sensor ERN1 in regulating the response to MEK inhibitors in KRAS mutant colon cancers. *Genome Med* 2018;10. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0600-z>.
- [205] Ojha R, Amaravadi RK. Targeting the unfolded protein response in cancer. *Pharmacol Res* 2017;120:258–66. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.04.003>.
- [206] Galmiche A, Sauzay C, Chevet E, Pluquet O. Role of the unfolded protein response in tumor cell characteristics and cancer outcome. *Curr Opin Oncol* 2017;29:41–7. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000339>.
- [207] Gao F, Liu W-J. Advance in the study on p38 MAPK mediated drug resistance in leukemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016;20:1064–70.
- [208] Liu C-L, Chen S-F, Wu M-Z, Jao S-W, Lin Y-S, Yang C-Y, et al. The molecular and clinical verification of therapeutic resistance via the p38 MAPK-Hsp27 axis in lung cancer. *Oncotarget* 2016;7:14279–90. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7306>.
- [209] Grossi V, Peserico A, Tezil T, Simone C. p38 $\alpha$  MAPK pathway: a key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World J Gastroenterol* 2014;20:9744–58. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9744>.
- [210] Igea A, Nebreda AR. The Stress Kinase p38 $\alpha$  as a Target for Cancer Therapy. *Cancer Res* 2015;75:3997–4002. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0173>.
- [211] Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2007;11:191–205. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.12.013>.
- [212] Han X, Chen H, Zhou J, Steed H, Postovit L-M, Fu Y. Pharmacological Inhibition of p38 MAPK by SB203580 Increases Resistance to Carboplatin in A2780cp Cells and Promotes Growth in Primary Ovarian Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19082184>.
- [213] Muranen T, Selfors LM, Hwang J, Gallegos LL, Coloff JL, Thoreen CC, et al. ERK and p38 MAPK Activities Determine Sensitivity to PI3K/mTOR Inhibition via Regulation of MYC and YAP. *Cancer Res* 2016;76:7168–80.

- 5472.CAN-16-0155.
- [214] Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 2017;169:381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>.
- [215] 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* 2002;62:4132–41.
- [216] Ignatoski KMW, 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* 2000;82:666–74. <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.0979>.
- [217] Pinto-Leite R, Botelho P, Ribeiro E, Oliveira PA, Santos L. Effect of sirolimus on urinary bladder cancer T24 cell line. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:3. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-3>.
- [218] Wu X, Obata T, Khan Q, Highshaw RA, De Vere White R, Sweeney C. The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. *BJU Int* 2004;93:143–50. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.2004.04574.x>.
- [219] Garcia JA, Danielpour D. Mammalian target of rapamycin inhibition as a therapeutic strategy in the management of urologic malignancies. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1347–54. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2408>.
- [220] Ikeguchi M, Kaibara N. Changes in survivin messenger RNA level during cisplatin treatment in gastric cancer. *Int J Mol Med* 2001;8:661–6. <https://doi.org/10.3892/ijmm.8.6.661>.
- [221] Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Yagihashi A, Hirata K, et al. Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients. *Cancer Science* 2004;95:44–51. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03169.x>.
- [222] Lee S, Choi E-J, Jin C, Kim D-H. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecologic Oncology* 2005;97:26–34. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.11.051>.
- [223] Wu H, Cao Y, Weng D, Xing H, Song X, Zhou J, et al. Effect of tumor suppressor gene PTEN on the resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines and related mechanisms. *Cancer Lett* 2008;271:260–71. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.06.012>.
- [224] Wu H, Wang K, Liu W, Hao Q. PTEN overexpression improves cisplatin-resistance of human ovarian cancer cells through upregulating KRT10 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;444:141–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.014>.
- [225] Wu C, Wangpaichitr M, Feun L, Kuo MT, Robles C, Lampidis T, et al. Overcoming cisplatin resistance by mTOR inhibitor in lung cancer. *Mol Cancer* 2005;4:25. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-4-25>.

- [226] Thallinger C, Poepl W, Pratscher B, Mayerhofer M, Valent P, Tappeiner G, et al. CCI-779 plus cisplatin is highly effective against human melanoma in a SCID mouse xenotransplantation model. *Pharmacology* 2007;79:207–13. <https://doi.org/10.1159/000101008>.
- [227] Yardley DA. Combining mTOR Inhibitors with Chemotherapy and Other Targeted Therapies in Advanced Breast Cancer: Rationale, Clinical Experience, and Future Directions. *Breast Cancer (Auckl)* 2013;7:7–22. <https://doi.org/10.4137/BCBCR.S10071>.
- [228] Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG, Levrero M, et al. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999;399:806–9. <https://doi.org/10.1038/21690>.
- [229] Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, et al. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res* 2000;60:5988–94.
- [230] Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994;266:807–10. <https://doi.org/10.1126/science.7973635>.
- [231] O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, et al. 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* 1997;57:4285–300.
- [232] Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998;16:3158–68. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.9.3158>.
- [233] Hernandez-Valencia J, Garcia-Villa E, Arenas-Hernandez A, Garcia-Mena J, Diaz-Chavez J, Gariglio P. Induction of p53 Phosphorylation at Serine 20 by Resveratrol Is Required to Activate p53 Target Genes, Restoring Apoptosis in MCF-7 Cells Resistant to Cisplatin. *Nutrients* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/nu10091148>.
- [234] Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* 2008;14:2519–26. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2223>.
- [235] Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 2009;9:665–74. <https://doi.org/10.1038/nrc2714>.
- [236] Sebens S, Schafer H. The tumor stroma as mediator of drug resistance--a potential target to improve cancer therapy? *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13:2259–72. <https://doi.org/10.2174/138920112802501999>.
- [237] Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LBA, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, et al. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI



- contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* 2003;3:377–86. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00058-8](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00058-8).
- [238] Ismail RS, Baldwin RL, Fang J, Browning D, Karlan BY, Gasson JC, et al. Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells. *Cancer Res* 2000;60:6744–9.
- [239] Januchowski R, Wojtowicz K, Sujka-Kordowska P, Andrzejewska M, Zabel M. MDR gene expression analysis of six drug-resistant ovarian cancer cell lines. *Biomed Res Int* 2013;2013:241763. <https://doi.org/10.1155/2013/241763>.
- [240] Wantoch von Rekowski K, König P, Henze S, Schlesinger M, Zawierucha P, Januchowski R, et al. The Impact of Integrin-Mediated Matrix Adhesion on Cisplatin Resistance of W1 Ovarian Cancer Cells. *Biomolecules* 2019;9:788. <https://doi.org/10.3390/biom9120788>.
- [241] Fu H-L, Valiathan RR, Arkwright R, Sohail A, Mihai C, Kumarasiri M, et al. Discoidin Domain Receptors: Unique Receptor Tyrosine Kinases in Collagen-mediated Signaling. *J Biol Chem* 2013;288:7430–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.444158>.
- [242] Hastings JF, Skhinas JN, Fey D, Croucher DR, Cox TR. The extracellular matrix as a key regulator of intracellular signalling networks. *British Journal of Pharmacology* 2019;176:82–92. <https://doi.org/10.1111/bph.14195>.
- [243] Sainio A, Järveläinen H. Extracellular matrix-cell interactions: Focus on therapeutic applications. *Cellular Signalling* 2020;66:109487. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109487>.
- [244] Piva MBR, Jakubzig B, Bendas G. Integrin Activation Contributes to Lower Cisplatin Sensitivity in MV3 Melanoma Cells by Inducing the Wnt Signalling Pathway. *Cancers (Basel)* 2017;9. <https://doi.org/10.3390/cancers9090125>.
- [245] Baltés F, Pfeifer V, Silbermann K, Caspers J, Wantoch von Rekowski K, Schlesinger M, et al.  $\beta$ 1-Integrin binding to collagen type 1 transmits breast cancer cells into chemoresistance by activating ABC efflux transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2020;1867:118663. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118663>.
- [246] Damiano JS. Integrins as novel drug targets for overcoming innate drug resistance. *Curr Cancer Drug Targets* 2002;2:37–43. <https://doi.org/10.2174/1568009023334033>.
- [247] Damiano JS, Hazlehurst LA, Dalton WS. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and gamma-irradiation. *Leukemia* 2001;15:1232–9. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402179>.
- [248] Nakagawa Y, Nakayama H, Nagata M, Yoshida R, Kawahara K, Hirosue A, et al. Overexpression of fibronectin confers cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) against 5-FU in oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2014;44:1376–84. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2265>.

- [249] Yan L, Wang C, Lin B, Liu J, Liu D, Hou R, et al. Lewis y enhances CAM-DR in ovarian cancer cells by activating the FAK signaling pathway and upregulating Bcl-2/Bcl-XL expression. *Biochimie* 2015;113:17–25. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.01.013>.
- [250] El Azreq M-A, Naci D, Aoudjit F. Collagen/ $\beta$ 1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner. *Mol Biol Cell* 2012;23:3473–84. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-02-0132>.
- [251] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707–12. <https://doi.org/10.1126/science.2470152>.
- [252] 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* 2001;3:245–52. <https://doi.org/10.1038/35060032>.
- [253] Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2003;278:9100–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210284200>.
- [254] Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010;40:280–93. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>.
- [255] Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y. Heat shock protein 27 was up-regulated in cisplatin resistant human ovarian tumor cell line and associated with the cisplatin resistance. *Cancer Lett* 2001;168:173–81. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(01\)00532-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(01)00532-8).
- [256] Ren A, Yan G, You B, Sun J. Down-regulation of mammalian sterile 20-like kinase 1 by heat shock protein 70 mediates cisplatin resistance in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:2266–74. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6248>.
- [257] Ren J-H, He W-S, Nong L, Zhu Q-Y, Hu K, Zhang R-G, et al. Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy. *Cancer Biother Radiopharm* 2010;25:75–80. <https://doi.org/10.1089/cbr.2009.0701>.
- [258] Yu H, Su J, Xu Y, Kang J, Li H, Zhang L, et al. p62/SQSTM1 involved in cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by clearing ubiquitinated proteins. *Eur J Cancer* 2011;47:1585–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.01.019>.
- [259] Shen D-W, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev* 2012;64:706–21. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005637>.
- [260] Arts HJ, Hollema H, Lemstra W, Willemse PH, De Vries EG, Kampinga HH, et al. Heat-shock-protein-27 (hsp27) expression in ovarian carcinoma: relation in response to chemotherapy and prognosis. *Int J Cancer* 1999;84:234–8. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990621\)84:3<234::aid-ijc6>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990621)84:3<234::aid-ijc6>3.0.co;2-9).
- [261] Liu JR, Opipari AW, Tan L, Jiang Y, Zhang Y, Tang H, et al. Dysfunctional apoptosome

- activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance. *Cancer Res* 2002;62:924–31.
- [262] Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 1998;79:468–75. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19981023\)79:5<468::aid-ijc4>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19981023)79:5<468::aid-ijc4>3.0.co;2-z).
- [263] Belfi CA, Chatterjee S, Gosky DM, Berger SJ, Berger NA. Increased sensitivity of human colon cancer cells to DNA cross-linking agents after GRP78 up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:361–8. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0472>.
- [264] Huang TG, Ip SM, Yeung WS, Ngan HY. Changes in p21WAF1, pRb, Mdm-2, Bax and Bcl-2 expression in cervical cancer cell lines transfected with a p53 expressing adenovirus. *Eur J Cancer* 2000;36:249–56. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(99\)00247-6](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(99)00247-6).
- [265] Brozovic A, Simaga S, Osmak M. Induction of heat shock protein 70 in drug-resistant cells by anticancer drugs and hyperthermia. *Neoplasma* 2001;48:99–103.
- [266] McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 2006;46:249–79. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2006.01.004>.
- [267] Saraswathy M, Gong S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnol Adv* 2013;31:1397–407. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.06.004>.
- [268] Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* 2008;14:2519–26. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2223>.
- [269] Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 1999;93:1658–67.
- [270] Kraus AC, Ferber I, Bachmann S-O, Specht H, Wimmel A, Gross MW, et al. In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways. *Oncogene* 2002;21:8683–95. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205939>.
- [271] Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 2009;9:665–74. <https://doi.org/10.1038/nrc2714>.
- [272] Dalton WS. The tumor microenvironment as a determinant of drug response and resistance. *Drug Resist Updat* 1999;2:285–8. <https://doi.org/10.1054/drup.1999.0097>.
- [273] Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, et al. 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* 1999;5:662–8. <https://doi.org/10.1038/9511>.
- [274] Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer* 2004;90:561–5. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601576>.
- [275] Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med* 2003;9:1158–65. <https://doi.org/10.1038/nm909>.
- [276] Hazlehurst LA, Enkemann SA, Beam CA, Argilagos RF, Painter J, Shain KH, et al. Genotypic and phenotypic comparisons of de novo and acquired melphalan resistance in an isogenic multiple myeloma cell line model. *Cancer Res* 2003;63:7900–6.
- [277] Folgiero V, Avetrani P, Bon G, Di Carlo SE, Fabi A, Nisticò C, et al. Induction of ErbB-3 Expression by  $\alpha 6\beta 4$  Integrin Contributes to Tamoxifen Resistance in ER $\beta$ 1-Negative Breast Carcinomas. *PLoS One* 2008;3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001592>.
- [278] Yao ES, Zhang H, Chen Y-Y, Lee B, Chew K, Moore D, et al. Increased  $\beta 1$  Integrin Is Associated with Decreased Survival in Invasive Breast Cancer. *Cancer Res* 2007;67:659–64. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2768>.
- [279] Oshita F, Kameda Y, Ikehara M, Tanaka G, Yamada K, Nomura I, et al. Increased expression of integrin beta1 is a poor prognostic factor in small-cell lung cancer. *Anticancer Res* 2002;22:1065–70.
- [280] Vuoristo M, Vihinen P, Vlaykova T, Nylund C, Heino J, Pyrhönen S. Increased gene expression levels of collagen receptor integrins are associated with decreased survival parameters in patients with advanced melanoma. *Melanoma Res* 2007;17:215–23. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e328270b935>.
- [281] Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LBA, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, et al. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* 2003;3:377–86. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00058-8](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00058-8).
- [282] Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, et al. 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* 1999;5:662–8. <https://doi.org/10.1038/9511>.
- [283] Recher C, Ysebaert L, Beyne-Rauzy O, Mansat-De Mas V, Ruidavets J-B, Cariven P, et al. Expression of focal adhesion kinase in acute myeloid leukemia is associated with enhanced blast migration, increased cellularity, and poor prognosis. *Cancer Res* 2004;64:3191–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3005>.
- [284] Park CC, Zhang HJ, Yao ES, Park CJ, Bissell MJ. Beta1 integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 2008;68:4398–405. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6390>.

- [285] Park CC, Zhang H, Pallavicini M, Gray JW, Baehner F, Park CJ, et al. Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res* 2006;66:1526–35. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3071>.
- [286] M A, B G. Structure and Biological Activity of the Extracellular Matrix. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 1998;76. <https://doi.org/10.1007/s001090050215>.
- [287] B G, Jp S, Ad B. Environmental Sensing Through Focal Adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009;10. <https://doi.org/10.1038/nrm2593>.
- [288] P L, Vm W, Z W. The Extracellular Matrix: A Dynamic Niche in Cancer Progression. *The Journal of Cell Biology* 2012;196. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>.
- [289] Mw P, Jk M, Vm W. The Extracellular Matrix Modulates the Hallmarks of Cancer. *EMBO Reports* 2014;15. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>.
- [290] Ja E, S N. The Extracellular Matrix in Tumor Progression and Metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 2019;36. <https://doi.org/10.1007/s10585-019-09966-1>.
- [291] Pa SB, Jw V den H. Zymographic Techniques for the Analysis of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors. *BioTechniques* 2005;38. <https://doi.org/10.2144/05381RV01>.
- [292] Reunanen N, Kähäri V. Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion. *Landes Bioscience*; 2013.
- [293] Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures into Future Successes. *Mol Cancer Ther* 2018;17:1147–55. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0646>.
- [294] Gonzalez-Avila G, Sommer B, Mendoza-Posada DA, Ramos C, Garcia-Hernandez AA, Falfan-Valencia R. Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2019;137:57–83. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.02.010>.
- [295] Clause KC, Barker TH. Extracellular Matrix Signaling in Morphogenesis and Repair. *Curr Opin Biotechnol* 2013;24:830–3. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.011>.
- [296] Wells RG. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* 2008;47:1394–400. <https://doi.org/10.1002/hep.22193>.
- [297] Cox TR, Rumney RMH, Schoof EM, Perryman L, Høye AM, Agrawal A, et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* 2015;522:106–10. <https://doi.org/10.1038/nature14492>.
- [298] Chang J, Lucas MC, Leonte LE, Garcia-Montolio M, Singh LB, Findlay AD, et al. Pre-clinical evaluation of small molecule LOXL2 inhibitors in breast cancer. *Oncotarget* 2017;8:26066–78. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15257>.

- [299] Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:697–706. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.015>.
- [300] Fridman R, Giaccone G, Kanemoto T, Martin GR, Gazdar AF, Mulshine JL. Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6698–702.
- [301] Mayorca-Guiliani AE, Madsen CD, Cox TR, Horton ER, Venning FA, Erler JT. ISDoT: in situ decellularization of tissues for high-resolution imaging and proteomic analysis of native extracellular matrix. *Nature Medicine* 2017;23:890–8. <https://doi.org/10.1038/nm.4352>.
- [302] Te O, Y K, Rj F, K P, R T, V Q, et al. Integrin Cytoplasmic Domains Mediate Inside-Out Signal Transduction. *The Journal of Cell Biology* 1994;124. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.6.1047>.
- [303] Sh K, J T, S G. Extracellular Matrix and Cell Signalling: The Dynamic Cooperation of Integrin, Proteoglycan and Growth Factor Receptor. *The Journal of Endocrinology* 2011;209. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0377>.
- [304] Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
- [305] Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 1998;76:253–65. <https://doi.org/10.1007/s001090050215>.
- [306] Wang H, Stefanovic B. Role of LARP6 and nonmuscle myosin in partitioning of collagen mRNAs to the ER membrane. *PLoS ONE* 2014;9:e108870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108870>.
- [307] Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1531–46. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>.
- [308] Jenkins CL, Raines RT. Insights on the conformational stability of collagen. *Nat Prod Rep* 2002;19:49–59. <https://doi.org/10.1039/a903001h>.
- [309] Kollagene. Wikipedia 2020.
- [310] Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix Metalloproteinases: A Review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1993;4:197–250. <https://doi.org/10.1177/10454411930040020401>.
- [311] Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays* 2007;29:1001–10. <https://doi.org/10.1002/bies.20636>.
- [312] Heino J, Huhtala M, Käpylä J, Johnson MS. Evolution of collagen-based adhesion systems. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:341–8. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.021>.

- [313] Leitinger B, Hohenester E. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* 2007;26:146–55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.10.007>.
- [314] Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 2006;119:3901–3. <https://doi.org/10.1242/jcs.03098>.
- [315] Eble JA, Kassner A, Niland S, Mörgelin M, Grifka J, Grässel S. Collagen XVI harbors an integrin alpha1 beta1 recognition site in its C-terminal domains. *J Biol Chem* 2006;281:25745–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509942200>.
- [316] Carafoli F, Bihan D, Stathopoulos S, Konitsiotis AD, Kvensakul M, Farndale RW, et al. Crystallographic insight into collagen recognition by discoidin domain receptor 2. *Structure* 2009;17:1573–81. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.10.012>.
- [317] Flynn LA, Blissett AR, Calomeni EP, Agarwal G. Inhibition of collagen fibrillogenesis by cells expressing soluble extracellular domains of DDR1 and DDR2. *J Mol Biol* 2010;395:533–43. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.073>.
- [318] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673–87. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00971-6).
- [319] Bouvard D, Pouwels J, De Franceschi N, Ivaska J. Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:430–42. <https://doi.org/10.1038/nrm3599>.
- [320] Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028–32. <https://doi.org/10.1126/science.285.5430.1028>.
- [321] Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res* 2010;339:269–80. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>.
- [322] Danen EHJ. Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects. Landes Bioscience; 2013.
- [323] Humphries MJ, Symonds EJH, Mould AP. Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13:236–43. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(03\)00035-6](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(03)00035-6).
- [324] Larson RS, Corbi AL, Berman L, Springer T. Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J Cell Biol* 1989;108:703–12. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.2.703>.
- [325] De Franceschi N, Hamidi H, Alanko J, Sahgal P, Ivaska J. Integrin traffic - the update. *J Cell Sci* 2015;128:839–52. <https://doi.org/10.1242/jcs.161653>.
- [326] Tiwari S, Askari JA, Humphries MJ, Bulleid NJ. Divalent cations regulate the folding and activation status of integrins during their intracellular trafficking. *J Cell Sci* 2011;124:1672–80. <https://doi.org/10.1242/jcs.084483>.
- [327] Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massagué J. Regulation of cell adhesion

- receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem* 1989;264:380–8.
- [328] Springer TA, Wang J-H. The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. *Adv Protein Chem* 2004;68:29–63. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)68002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)68002-8).
- [329] Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:288–300. <https://doi.org/10.1038/nrm2871>.
- [330] Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010;10:9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>.
- [331] Horton ER, Byron A, Askari JA, Ng DHJ, Millon-Frémillon A, Robertson J, et al. Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol* 2015;17:1577–87. <https://doi.org/10.1038/ncb3257>.
- [332] Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2018;18:533–48. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>.
- [333] Legate KR, Wickström SA, Fässler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev* 2009;23:397–418. <https://doi.org/10.1101/gad.1758709>.
- [334] Slack-Davis JK, Atkins KA, Harrer C, Hershey ED, Conaway M. Vascular cell adhesion molecule-1 is a regulator of ovarian cancer peritoneal metastasis. *Cancer Res* 2009;69:1469–76. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2678>.
- [335] Landen CN, Kim T-J, Lin YG, Merritt WM, Kamat AA, Han LY, et al. Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of alphavbeta3 integrin in ovarian cancer. *Neoplasia* 2008;10:1259–67. <https://doi.org/10.1593/neo.08740>.
- [336] Élez E, Kocáková I, Höhler T, Martens UM, Bokemeyer C, Van Cutsem E, et al. Abituzumab combined with cetuximab plus irinotecan versus cetuximab plus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: the randomised phase I/II POSEIDON trial. *Ann Oncol* 2015;26:132–40. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu474>.
- [337] Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong Y-K, et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:1100–8. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70379-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70379-1).
- [338] Leitinger B. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int Rev Cell Mol Biol* 2014;310:39–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800180-6.00002-5>.



- [339] Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1997;1:13–23. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80003-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80003-9).
- [340] Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, Kleer CG, Fridman R. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2012;31:295–321. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9346-z>.
- [341] Curat CA, Eck M, Dervillez X, Vogel WF. Mapping of epitopes in discoidin domain receptor 1 critical for collagen binding. *J Biol Chem* 2001;276:45952–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104360200>.
- [342] Leitinger B. Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2. *J Biol Chem* 2003;278:16761–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301370200>.
- [343] Carafoli F, Bihan D, Stathopoulos S, Konitsiotis AD, Kvensakul M, Farndale RW, et al. Crystallographic Insight into Collagen Recognition by Discoidin Domain Receptor 2. *Structure* 2009;17:1573–81. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.10.012>.
- [344] Vogel W, Brakebusch C, Fässler R, Alves F, Ruggiero F, Pawson T. Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta(1) integrin. *J Biol Chem* 2000;275:5779–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5779>.
- [345] Dengjel J, Akimov V, Olsen JV, Bunkenborg J, Mann M, Blagoev B, et al. Quantitative proteomic assessment of very early cellular signaling events. *Nat Biotechnol* 2007;25:566–8. <https://doi.org/10.1038/nbt1301>.
- [346] Slack BE, Siniaia MS, Blusztajn JK. Collagen type I selectively activates ectodomain shedding of the discoidin domain receptor 1: involvement of Src tyrosine kinase. *J Cell Biochem* 2006;98:672–84. <https://doi.org/10.1002/jcb.20812>.
- [347] Vogel WF. Ligand-induced shedding of discoidin domain receptor 1. *FEBS Lett* 2002;514:175–80. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02360-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02360-8).
- [348] Rowe RG, Weiss SJ. Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cell-stroma interface. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009;25:567–95. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175315>.
- [349] Hayashida K, Bartlett AH, Chen Y, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Anat Rec (Hoboken)* 2010;293:925–37. <https://doi.org/10.1002/ar.20757>.
- [350] Lemeer S, Bluwstein A, Wu Z, Leberfinger J, Müller K, Kramer K, et al. Phosphotyrosine mediated protein interactions of the discoidin domain receptor 1. *J Proteomics* 2012;75:3465–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.10.007>.
- [351] Lu KK, Trcka D, Bendeck MP. Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src. *Cardiovasc Pathol* 2011;20:71–6. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2009.12.006>.

- [352] Suh HN, Han HJ. Collagen I regulates the self-renewal of mouse embryonic stem cells through  $\alpha 2\beta 1$  integrin- and DDR1-dependent Bmi-1. *J Cell Physiol* 2011;226:3422–32. <https://doi.org/10.1002/jcp.22697>.
- [353] Das S, Ongusaha PP, Yang YS, Park J-M, Aaronson SA, Lee SW. Discoidin domain receptor 1 receptor tyrosine kinase induces cyclooxygenase-2 and promotes chemoresistance through nuclear factor-kappaB pathway activation. *Cancer Res* 2006;66:8123–30. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1215>.
- [354] Ongusaha PP, Kim J, Fang L, Wong TW, Yancopoulos GD, Aaronson SA, et al. p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop. *EMBO J* 2003;22:1289–301. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg129>.
- [355] Dejmek J, Dib K, Jönsson M, Andersson T. Wnt-5a and G-protein signaling are required for collagen-induced DDR1 receptor activation and normal mammary cell adhesion. *Int J Cancer* 2003;103:344–51. <https://doi.org/10.1002/ijc.10752>.
- [356] Iwai LK, Chang F, Huang PH. Phosphoproteomic analysis identifies insulin enhancement of discoidin domain receptor 2 phosphorylation. *Cell Adh Migr* 2013;7:161–4. <https://doi.org/10.4161/cam.22572>.
- [357] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012;490:61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>.
- [358] Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017;168:960–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>.
- [359] Zhang Y, Kwok-Shing Ng P, Kucherlapati M, Chen F, Liu Y, Tsang YH, et al. A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations. *Cancer Cell* 2017;31:820–832.e3. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.04.013>.
- [360] Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163–75. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00808-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00808-5).
- [361] Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KVP, Erdjument-Bromage H, et al. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 2003;11:895–904. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00114-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00114-x).
- [362] Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002;110:177–89. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00833-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00833-4).
- [363] Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 2013;497:217–23. <https://doi.org/10.1038/nature12122>.
- [364] Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, et al. DEPTOR

- is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 2009;137:873–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.046>.
- [365] Vander Haar E, Lee S-I, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 2007;9:316–23. <https://doi.org/10.1038/ncb1547>.
- [366] Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020;21:183–203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>.
- [367] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274–93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>.
- [368] Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenö P, et al. PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS ONE* 2007;2:e1217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001217>.
- [369] Wu JJ, Liu J, Chen EB, Wang JJ, Cao L, Narayan N, et al. Increased mammalian lifespan and a segmental and tissue-specific slowing of aging after genetic reduction of mTOR expression. *Cell Rep* 2013;4:913–20. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.030>.
- [370] Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:307–18. <https://doi.org/10.1038/nrm2672>.
- [371] Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002;4:648–57. <https://doi.org/10.1038/ncb839>.
- [372] Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 2002;4:658–65. <https://doi.org/10.1038/ncb840>.
- [373] Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* 2003;13:1259–68. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00506-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00506-2).
- [374] Oshiro N, Takahashi R, Yoshino K, Tanimura K, Nakashima A, Eguchi S, et al. The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem* 2007;282:20329–39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702636200>.
- [375] Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends Biochem Sci* 2011;36:320–8. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>.
- [376] Carrière A, Cargnello M, Julien L-A, Gao H, Bonneil E, Thibault P, et al. Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr Biol* 2008;18:1269–77. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.078>.

- [377] Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:630–42. <https://doi.org/10.1038/nrm3658>.
- [378] Palotai R, Szalay MS, Csermely P. Chaperones as integrators of cellular networks: changes of cellular integrity in stress and diseases. *IUBMB Life* 2008;60:10–8. <https://doi.org/10.1002/iub.8>.
- [379] Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009;14:105–11. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0068-7>.
- [380] Tóth ME, Gombos I, Sántha M. Heat shock proteins and their role in human diseases. *Acta Biologica Szegediensis* 2015;59:121–41.
- [381] Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988;22:631–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>.
- [382] Yu AL, Fuchshofer R, Birke M, Kampik A, Bloemendal H, Welge-Lüssen U. Oxidative Stress and TGF- $\beta$ 2 Increase Heat Shock Protein 27 Expression in Human Optic Nerve Head Astrocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:5403–11. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1478>.
- [383] Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005;10:86–103. <https://doi.org/10.1379/CSC-99r.1>.
- [384] Stope MB, Weiss M, Preuss M, Streitbürger A, Ritter CA, Zimmermann U, et al. Immediate and transient phosphorylation of the heat shock protein 27 initiates chemoresistance in prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2014;32:2380–6. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3492>.
- [385] Arrigo A-P, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, et al. Hsp27 (HspB1) and  $\alpha$ B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett* 2007;581:3665–74. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.033>.
- [386] Baldwin AJ, Hilton GR, Lioe H, Bagnéris C, Benesch JLP, Kay LE. Quaternary dynamics of  $\alpha$ B-crystallin as a direct consequence of localised tertiary fluctuations in the C-terminus. *J Mol Biol* 2011;413:310–20. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.017>.
- [387] Delbecq SP, Klevit RE. One size does not fit all: the oligomeric states of  $\alpha$ B crystallin. *FEBS Lett* 2013;587:1073–80. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.021>.
- [388] Katsogiannou M, Andrieu C, Rocchi P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Front Genet* 2014;5:346. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00346>.
- [389] Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, Guimond A, Landry J. HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J Biol Chem* 1999;274:9378–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9378>.

- [390] Kostenko S, Moens U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:3289–307. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0086-3>.
- [391] Döppler H, Storz P, Li J, Comb MJ, Toker A. A phosphorylation state-specific antibody recognizes Hsp27, a novel substrate of protein kinase D. *J Biol Chem* 2005;280:15013–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400575200>.
- [392] Thériault JR, Lambert H, Chávez-Zobel AT, Charest G, Lavigne P, Landry J. Essential role of the NH<sub>2</sub>-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J Biol Chem* 2004;279:23463–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402325200>.
- [393] Gusev NB, Bogatcheva NV, Marston SB. Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry Mosc* 2002;67:511–9. <https://doi.org/10.1023/a:1015549725819>.
- [394] Matsushima-Nishiwaki R, Takai S, Adachi S, Minamitani C, Yasuda E, Noda T, et al. Phosphorylated Heat Shock Protein 27 Represses Growth of Hepatocellular Carcinoma via Inhibition of Extracellular Signal-regulated Kinase. *J Biol Chem* 2008;283:18852–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801301200>.
- [395] Rajesh Y, Mandal M. Regulation of Extracellular Matrix Remodeling and Epithelial-Mesenchymal Transition by Matrix Metalloproteinases: Decisive Candidates in Tumor Progression. In: Chakraborti S, Dhalla NS, editors. *Proteases in Physiology and Pathology*, Singapore: Springer; 2017, p. 159–94. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2513-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2513-6_9).
- [396] Rajesh Y, Biswas A, Mandal M. Glioma progression through the prism of heat shock protein mediated extracellular matrix remodeling and epithelial to mesenchymal transition. *Experimental Cell Research* 2017;359:299–311. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.08.032>.
- [397] Sincevičiūtė R, Vaitkienė P, Urbanavičiūtė R, Steponaitis G, Tamašauskas A, Skiriūtė D. MMP2 is associated with glioma malignancy and patient outcome. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11:3010–8.
- [398] Liang C, Xu Y, Ge H, Li G, Wu J. The clinicopathological and prognostic value of HSP27 in hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotargets Ther* 2018;11:1293–303. <https://doi.org/10.2147/OTT.S154227>.
- [399] Rajesh Y, Banerjee A, Pal I, Biswas A, Das S, Dey KK, et al. Delineation of crosstalk between HSP27 and MMP-2/MMP-9: A synergistic therapeutic avenue for glioblastoma management. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2019;1863:1196–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.04.015>.
- [400] Sarto C, Binz PA, Mocarelli P. Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis* 2000;21:1218–26. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:6<1218::AID-ELPS1218>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1218::AID-ELPS1218>3.0.CO;2-H).
- [401] Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of

- disease and therapeutic target. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5:7. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-7>.
- [402] Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 2006;5:2592–601. <https://doi.org/10.4161/cc.5.22.3448>.
- [403] Acunzo J, Katsogiannou M, Rocchi P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1),  $\alpha$ B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1622–31. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.002>.
- [404] Januchowski R, Wojtowicz K, Sujka-Kordowska P, Andrzejewska M, Zabel M. MDR gene expression analysis of six drug-resistant ovarian cancer cell lines. *Biomed Res Int* 2013;2013:241763. <https://doi.org/10.1155/2013/241763>.
- [405] CASY\_CellCounter-Analyzer\_OLS.pdf n.d.
- [406] Dingermann T, Zündorf I, Winckler T, Mahler H-C. *Gentechnik - Biotechnik: Lehrbuch und Kompendium für Studium und Praxis. 2., völlig neu bearbeitete Auflage.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsges.; 2010.
- [407] Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophysical Chemistry* 2002;97:159–72. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00057-1).
- [408] Davis HE, Rosinski M, Morgan JR, Yarmush ML. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J* 2004;86:1234–42. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74197-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74197-1).
- [409] Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 1977;37:3639–43.
- [410] Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 2009;4:309–24. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>.
- [411] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [412] 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. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7).
- [413] Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J Biomol Screen* 2004;9:506–15. <https://doi.org/10.1177/1087057104265386>.
- [414] Andrews PA, Velury S, Mann SC, Howell SB. cis-Diamminedichloroplatinum(II)

- accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1988;48:68–73.
- [415] Motulsky H, Christopoulos A. *Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression* n.d.:351.
- [416] Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 1994;32:5–8. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:5>.
- [417] MAN0011430\_Pierce\_BCA\_Protein\_Asy\_UG.pdf n.d.
- [418] Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik*. 3rd ed. Berlin Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012.
- [419] Niessner R, Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen*. 6., vollst. überarb. erw. Aufl. 2013. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2013.
- [420] Welz B, Sperling M. *Atomabsorptionsspektrometrie*. 4. vollständig überarbeitete. Weinheim Berlin New York Chichester: Wiley-VCH; 1997.
- [421] Pd Y, Bl P. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Current pharmaceutical design* 2009;15. <https://doi.org/10.2174/138161209787846766>.
- [422] Yi X-Y, Wayner EA, Kim Y, FISH AJ. Adhesion of Cultured Human Kidney Mesangial Cells to Native Entactin: Role of Integrin Receptors. *Cell Adhesion and Communication* 1998;5:237–48. <https://doi.org/10.3109/15419069809040294>.
- [423] Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KUE, Fisher LW, Fedarko NS. Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLINGs): Multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:212–26. <https://doi.org/10.1038/nrc2345>.
- [424] Mirza M, Shaughnessy E, Hurley JK, Vanpatten KA, Pestano GA, He B, et al. Osteopontin-c is a selective marker of breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122:889–97. <https://doi.org/10.1002/ijc.23204>.
- [425] Sofeu Feugaing DD, Götte M, Viola M. More than matrix: the multifaceted role of decorin in cancer. *Eur J Cell Biol* 2013;92:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.08.004>.
- [426] Rudzińska M, Parodi A, Soond SM, Vinarov AZ, Korolev DO, Morozov AO, et al. The Role of Cysteine Cathepsins in Cancer Progression and Drug Resistance. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20143602>.
- [427] Duong LT, Wesolowski GA, Leung P, Oballa R, Pickarski M. Efficacy of a Cathepsin K Inhibitor in a Preclinical Model for Prevention and Treatment of Breast Cancer Bone Metastasis. *Mol Cancer Ther* 2014;13:2898–909. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0253>.
- [428] Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG. A requirement for caveolin-1 and

- associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 1998;94:625–34. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81604-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81604-9).
- [429] Wong J, Smith LB, Magun EA, Engstrom T, Kelley-Howard K, Jandhyala DM, et al. Small molecule kinase inhibitors block the ZAK-dependent inflammatory effects of doxorubicin. *Cancer Biol Ther* 2013;14:56–63. <https://doi.org/10.4161/cbt.22628>.
- [430] Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 2016;17:868. <https://doi.org/10.3390/ijms17060868>.
- [431] Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 2010;397:3173–8. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>.
- [432] Hehlhans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775:163–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.09.001>.
- [433] Schultze A, Fiedler W. Therapeutic potential and limitations of new FAK inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19:777–88. <https://doi.org/10.1517/13543784.2010.489548>.
- [434] Brami-Cherrier K, Gervasi N, Arsenieva D, Walkiewicz K, Bouterin M-C, Ortega A, et al. FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. *EMBO J* 2014;33:356–70. <https://doi.org/10.1002/embj.201386399>.
- [435] Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994;269:5241–8.
- [436] Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005;15:28–32. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290260>.
- [437] Pfankuchen DB. Beitrag zur Aufklärung der Chemoresistenz in A2780cis Ovarialkarzinomzellen und der durch Tinzaparin induzierten chemosensitivierenden Mechanismen 2018.
- [438] Wang Z, Zhang B, Wang M, Carr BI. Persistent ERK phosphorylation negatively regulates cAMP response element-binding protein (CREB) activity via recruitment of CREB-binding protein to pp90RSK. *J Biol Chem* 2003;278:11138–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209108200>.
- [439] Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1161–76. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.002>.
- [440] Gadiya M, Chakraborty G. Signaling by discoidin domain receptor 1 in cancer metastasis. *Cell Adh Migr* 2018;12:315–23. <https://doi.org/10.1080/19336918.2018.1520556>.
- [441] Concannon CG, Orrenius S, Samali A. Hsp27 Inhibits Cytochrome c-Mediated Caspase



Activation by Sequestering Both Pro-caspase-3 and Cytochrome c. Gene Expr  
2018;9:195–201.

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Statistiken zur weltweiten krebsbedingten Sterblichkeitsrate von Frauen aller Altersgruppen im Jahr 2018 [14].	3
<b>Abbildung 2:</b> Struktur von Cisplatin ([SP-4-2]-Komplex) als Keilstrichformel (links) und als 3D Model (rechts).	7
<b>Abbildung 3:</b> Bioaktivierung von Cisplatin; modifiziert nach YOTSUYANAGI et al.[58].	9
<b>Abbildung 4:</b> Übersicht der möglichen Platin-DNA-Addukte; modifiziert nach Esteban-Fernández et al. [59].	10
<b>Abbildung 5:</b> Übersicht der Cisplatinresistenzen unterteilt in pre-target, on-target, post-target und off-target.	18
<b>Abbildung 6:</b> Schematisch stark vereinfachte Darstellung der MAPK- Signalwege.	25
<b>Abbildung 7:</b> Übersicht einer EMDR im Kontext der MRD; modifiziert nach Meads et al. [271].	30
<b>Abbildung 8:</b> Darstellung der Collagen Struktur. Drei $\alpha$ -Helices (dargestellt in grün, rot und blau) verdrehen sich zu einer Tripelhelix [309].	33
<b>Abbildung 9:</b> Übersicht der Integrin-Familie; modifiziert nach Barzcyk et al. [321].	34
<b>Abbildung 10:</b> Aufbau beider Integrin-Untereinheiten: A. Struktur der $\alpha$ -Untereinheit B. Struktur der $\beta$ -Untereinheit; modifiziert nach Springer und Wang [328].	35
<b>Abbildung 11:</b> Vereinfachte Schematische Darstellung des Integrin Signalweges.	37
<b>Abbildung 12:</b> Übersicht des Aufbaus von DDR1, modifiziert nach Leitinger [338].	39
<b>Abbildung 13:</b> Aufbau der mTORC1 (links) schematisch (rechts) im 3D Model; modifiziert nach Grace Y Liu et al. [366].	42
<b>Abbildung 14:</b> Struktur von Rapamycin.	42
<b>Abbildung 15:</b> Vereinfachte Übersicht des mTOR Signalweges.	44
<b>Abbildung 16:</b> Schematischer Aufbau von HSP27; modifiziert nach Katsogiannou et al. [388].	46
<b>Abbildung 17:</b> Prinzip der lentiviral-vermittelten shRNA Zelltransduktion.	69
<b>Abbildung 18:</b> Pipettierschema einer 96-Well-Platte für die Transduktion von W1 und W1CR Zellen.	72
<b>Abbildung 19:</b> Prinzip der siRNA vermittelten Zelltransfektion.	73
<b>Abbildung 20:</b> Reduktive Spaltung des gelben Farbstoffes MTT in violette Formazan.	77
<b>Abbildung 21:</b> Pipettierschema einer 96-Well-Platte für den MTT-assay.	78
<b>Abbildung 22:</b> Struktur von Resazurin und dem rosa fluoreszierenden Resorufin, das aus der Reduktion lebensfähiger Zellen resultiert.	79
<b>Abbildung 23:</b> BCA-assay Reaktion mit Struktur des gefärbten BCA-Komplexes.	81
<b>Abbildung 24:</b> Übersicht des Pipettierschemas einer 96-Well-Platte für den BCA-assay.	82
<b>Abbildung 25:</b> Reaktion der Meerrettichperoxidase katalysierten Luminolreaktion.	85

- Abbildung 26:** Schematischer Aufbau der AAS. \_\_\_\_\_ 88
- Abbildung 27:** Dargestellt ist die Viabilität nach 72 h mittels MTT-assays von W1- und W1CR Zellen, zur Ermittlung der EC50 von Cisplatin. Der Graph repräsentiert jeweils einen Versuch in Triplikaten. \_\_\_\_\_ 93
- Abbildung 28:** Lichtmikroskopische Betrachtung der W1 (links) und W1CR Zellen (rechts) ohne Cisplatin (oben) und unter 72 h Cisplatin (1  $\mu$ M) Einfluss (unten). \_\_\_\_\_ 94
- Abbildung 29:** Streudiagramm der hoch- und runterregulierten Gene (Vervielfachung  $>5 / <-5$ ) in den resistenten W1CR Zellen im Vergleich zu W1 Zellen, beide Zelllinien jeweils in einem unbehandelten Zustand. \_\_\_\_\_ 95
- Abbildung 30:** Sehnendiagramm, welches eine Zuordnung zwischen deregulierten Genen von W1CR Zellen und beeinflussten GO-Termen darstellt. \_\_\_\_\_ 96
- Abbildung 31:** Durch Zelladhäsion vermittelte Cisplatinresistenz (CAM-DR) in W1 und W1CR Zellen, induziert durch Collagen Bindungen. Eine exemplarische Viabilitätskurve (links) und ein Balkendiagramm (rechts), welches die Mittelwerte eines n=3 Datensatzes widerspiegelt. \_\_\_\_\_ 98
- Abbildung 32:** Lichtmikroskopische Betrachtung der W1 (links) und W1CR Zellen (rechts) mit Collagen (oben) und mit Collagen unter 72 h Cisplatin (1  $\mu$ M) Einfluss (unten). \_\_\_\_\_ 100
- Abbildung 33:** Streudiagramm der hoch- und runterregulierten Gene (Vervielfachung  $>3 / <-3$ ) in den cisplatinempfindlichen W1 Zellen im Vergleich zu W1 Zellen, die auf Collagen kultiviert wurden. \_\_\_\_\_ 101
- Abbildung 34:** Streudiagramm der hoch- und runterregulierten Gene (Vervielfachung  $>3 / <-3$ ) in den resistenten WCR1 Zellen im Vergleich zu WCR1 Zellen, die auf Collagen kultiviert wurden. \_\_\_\_\_ 101
- Abbildung 35:** Sehnendiagramm, welches eine Zuordnung zwischen deregulierten Genen von W1CR Zellen unter Einfluss von Collagen und der beeinflussten Go-Termen darstellt. \_\_\_\_\_ 103
- Abbildung 36:** Analyse der intrazellulären Platinkonzentration mittels fAAS in W1 und W1CR Zellen mit und ohne Collagen Behandlung, nach einer Inkubationszeit von 72 h mit 1  $\mu$ M Cisplatin (n=3). \_\_\_\_\_ 105
- Abbildung 37:** Analyse der Proteinexpression von MRP2 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten W1 Zellen als 100 % festgelegt (n=4). \_\_\_\_\_ 106
- Abbildung 38:** Quantifizierung des freien Glutathions in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h (n=3). \_\_\_\_\_ 107
- Abbildung 39:** Analyse der Proteinexpression von CTR1 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten W1 Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 108
- Abbildung 40:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von W1 Zellen (links) und W1CR Zellen (rechts) Sphäroiden. \_\_\_\_\_ 109
- Abbildung 41:** Zytotoxizität von Cisplatin nach 72 h Inkubationszeit im 2D und 3D Modell in W1 Zellen (links) und W1CR Zellen (rechts). Die Graphen repräsentieren jeweils einen Versuch in Triplikaten. \_\_\_\_\_ 110

- Abbildung 42:** Zytotoxizität von Cisplatin nach 72 h im 2D und 3D Modell in W1 Zellen und W1CR Zellen. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte aller Daten dar (n=3). \_\_ 110
- Abbildung 43:** Exemplarische Detektion der  $\beta$ 1-Integrin und GAPDH Proteinbanden von W1 und W1CR Zelllysaten, sowie die jeweiligen  $\beta$ 1-Integrin knock-down Lysate und entsprechende scramble Kontrollzelllysate (n=3). \_\_\_\_\_ 112
- Abbildung 44:** Lichtmikroskopische Betrachtung der W1 (oben) und W1CR Zellen (unten) als  $\beta$ 1-Integrin knock-down (links) und als scramble Variante (rechts). \_\_\_\_\_ 113
- Abbildung 45:** Durch Zelladhäsion vermittelte Cisplatinresistenz in W1 (links) und W1CR (rechts)  $\beta$ 1-Integrin knock-down und scramble Zellen, induziert durch Collagenbindungen (n=3). \_\_\_\_\_ 114
- Abbildung 46:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer ILK-Inhibitor Präinkubation (n=3). \_\_\_\_\_ 116
- Abbildung 47:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 sc und W1  $\beta$ 1-kd Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer ILK-Inhibitor Präinkubation (n=2). \_\_\_\_\_ 117
- Abbildung 48:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1CR sc und W1CR  $\beta$ 1-kd Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer ILK-Inhibitor Präinkubation (n=2). \_\_\_\_\_ 117
- Abbildung 49:** Analyse der Proteinexpression von ILK in unbehandelten W1 und W1  $\beta$ 1-kd Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100% festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 118
- Abbildung 50:** Analyse der Proteinexpression von ILK in unbehandelten W1CR und W1CR  $\beta$ 1-kd Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 118
- Abbildung 51:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer FAK-Inhibitor Präinkubation (n=3). \_\_\_\_\_ 120
- Abbildung 52:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 sc und W1  $\beta$ 1-kd Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer FAK-Inhibitor Präinkubation (n=3). \_\_\_\_\_ 121
- Abbildung 53:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1CR sc und W1CR  $\beta$ 1-kd Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer FAK-Inhibitor Präinkubation (n=2). \_\_\_\_\_ 121
- Abbildung 54:** Analyse der Proteinexpression von FAK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 122
- Abbildung 55:** Analyse der Proteinexpression von p-FAK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=2). \_\_\_\_\_ 122

- Abbildung 56:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer PI3K-Inhibitor Präinkubation (n=3). \_\_\_\_\_ 124
- Abbildung 57:** Analyse der Proteinexpression von PI3K in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 125
- Abbildung 58:** Analyse der Proteinexpression von p-PI3K in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 125
- Abbildung 59:** Analyse der Proteinexpression von PTEN in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=4). \_\_\_\_\_ 126
- Abbildung 60:** Analyse der Proteinexpression von p-PTEN in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=4). \_\_\_\_\_ 126
- Abbildung 61:** Analyse der Proteinexpression von AKT in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 128
- Abbildung 62:** Analyse der Proteinexpression von p-AKT in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=4). \_\_\_\_\_ 128
- Abbildung 63:** Analyse der Proteinexpression von p-GSK3 $\beta$  in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=2). \_\_\_\_\_ 129
- Abbildung 64:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer 10 nM mTOR-Inhibitor Präinkubation (n=3). \_\_\_\_\_ 130
- Abbildung 65:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer 100 nM mTOR-Inhibitor Präinkubation (n=3). \_\_\_\_\_ 130
- Abbildung 66:** Analyse der Proteinexpression von mTOR in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 131
- Abbildung 67:** Analyse der Proteinexpression von p-mTOR in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 131

- Abbildung 68:** Datensatz des humanen Proteom Profiler Kinase Aktivitätsarrays von W1 und W1CR Zellen nach Cisplatinzugabe (1  $\mu\text{M}$ ) mit oder ohne zusätzlicher Collagenbehandlung. \_\_\_\_\_ 133
- Abbildung 69:** Analyse der Proteinexpression von p-DDR/DDR in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 136
- Abbildung 70:** Analyse der mRNA Expression von MEK in W1 (links) und W1CR Zellen (rechts), dargestellt als faktorielle Deregulierung gegenüber den unbehandelten W1 Zellen (=1) unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. \_\_\_\_\_ 137
- Abbildung 71:** Analyse der Proteinexpression von p-MEK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 138
- Abbildung 72:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer 0,5  $\mu\text{M}$  MEK-Inhibitor Präinkubation (n=3). \_\_\_\_\_ 139
- Abbildung 73:** Analyse der Proteinexpression von ERK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 140
- Abbildung 74:** Analyse der Proteinexpression von p-ERK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 140
- Abbildung 75:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer 10 nM ERK-Inhibitor Präinkubation (n=3). \_\_\_\_\_ 141
- Abbildung 76:** Analyse der Proteinexpression von CREB in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100% festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 142
- Abbildung 77:** Analyse der Proteinexpression von p-CREB in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 142
- Abbildung 78:** Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, unter Einfluss von Collagen und/oder einer 100 nM CREB-Inhibitor Präinkubation (n=3). \_\_\_\_\_ 143
- Abbildung 79:** Analyse der mRNA Expression von JNK in W1 (links) und W1CR Zellen (rechts) im Bezug auf unbehandelte W1 Zellen (=1) unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. \_\_\_\_\_ 144
- Abbildung 80:** Analyse der Proteinexpression von JNK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1  $\mu\text{M}$ ) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). \_\_\_\_\_ 145

<b>Abbildung 81:</b> Analyse der Proteinexpression von p-JNK in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1 $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). _____	145
<b>Abbildung 82:</b> Analyse der Proteinexpression von HSP27 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1 $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). _____	146
<b>Abbildung 83:</b> Analyse der Proteinexpression von p-HSP27 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1 $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). _____	147
<b>Abbildung 84:</b> Exemplarische Detektion der HSP27 und GAPDH Proteinbanden der W1CR transfizierten Zelllysate (n=3). _____	148
<b>Abbildung 85:</b> Dargestellt sind die EC50-Werte von Cisplatin nach 72 h von W1 und W1CR Zellen, sowie W1CR HSP27 siRNA und W1CR scramble siRNA transfizierten Zellen (n=3). _____	149
<b>Abbildung 86:</b> Analyse der Proteinexpression von Caspase 9 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1 $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). _____	150
<b>Abbildung 87:</b> Analyse der Proteinexpression von Caspase 3 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1 $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). _____	150
<b>Abbildung 88:</b> Analyse der mRNA Expression von MMP-9 in W1 (links) und W1CR Zellen (rechts)dargestellt als faktorielle Änderung gegenüber unbehandelten W1 Zellen sowie unter Einfluss von Cisplatin (1 $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. _____	151
<b>Abbildung 89:</b> Analyse der Proteinexpression von MMP9 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1 $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). _____	152
<b>Abbildung 90:</b> Analyse der mRNA Expression von MMP2 in W1 (links) und W1CR Zellen (rechts in Relation zu unbehandelten W1 Zellen sowie unter Einfluss von Cisplatin (1 $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. _____	153
<b>Abbildung 91:</b> Analyse der Proteinexpression von MMP2 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1 $\mu$ M) und/oder Collagen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). _____	153
<b>Abbildung 92:</b> Analyse der Proteinexpression von MMP2 in unbehandelten W1 und W1CR Zellen, sowie unter Einfluss von Cisplatin (1 $\mu$ M) und/oder Collagen, sowie Rapamycin (10 nM) nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für die relative Pixeldichtenbestimmung wurden die unbehandelten Zellen als 100 % festgelegt (n=3). _____	154
<b>Abbildung 93:</b> Schematische vereinfachte Darstellung der untersuchten Signalproteine und hemmende Ansätze im Zusammenhang der vernetzten molekularen Signalmechanismen. _____	155

## 8.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Inkubationsansätze der Lysate für den Proteome Profiler. _____	87
<b>Tabelle 2:</b> Temperaturprogramm der RF-AAS während einer Messung. _____	89
<b>Tabelle 3:</b> Herstellung der Kalibriergerade durch den Autosampler für einen Kalibrierbereich von 5,0 – 50,0 ng/mL. _____	90
<b>Tabelle 4:</b> Inkubationsansätze der Lysate für den Glutathion-assay. _____	92

## 8.3 Formelverzeichnis

<b>Formel 1:</b> Berechnung der gewünschten Collagenkonzentration (AL). _____	75
<b>Formel 2:</b> Berechnung der erforderlichen Masse von Collagen (AL) für eine Platte. _____	75
<b>Formel 3:</b> Berechnung des benötigten Volumens der Collagen (SL). _____	75
<b>Formel 4:</b> Berechnung des pEC <sub>50</sub> -Wertes. _____	80



## 8.4 Danksagung

Mein erster und ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerd Bendas, für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Promotionsarbeit und die Überlassung des interessanten Themas. Darüber hinaus danke ich ihm für seine engagierte Betreuung, für die stete Diskussionsbereitschaft und immerwährende Unterstützung, sowie für die mir gewährten Freiheiten, welche ich sehr zu schätzen gewusst habe. Generell bin ich für seine positive Art und das freundschaftliche Arbeitsumfeld sehr dankbar.

Frau PD Dr. Anya Staal danke ich sehr für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens. Weiterhin möchte ich ihr und Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde für die kollegiale Zusammenarbeit zwischen unseren Arbeitskreisen danken.

Prof. Dr. Gabriele König und Prof. Dr. Andreas Gansäuer möchte ich herzlich für ihre Mitwirkung an der Prüfungskommission danken.

Prof. Radoslaw Januchowski gilt ein besonderer Dank für die Bereitstellung der W1 und W1CR Ovarialkarzinomzellen. Außerdem möchte ich ihm und Dr. Piotr Zawierucha für die Durchführung und Auswertung der *gene array* Daten, sowie für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken.

Frau PD Dr. Anke Schiedel danke ich für ihre kompetente Unterstützung bei allen Fragen rund um das Thema lentivirale Transduktion. Des Weiteren danke ich ihr für das Engagement als Praktikumsleiterin des 1. Semesters. Gemeinsam mit den Assistenten des 1. Semesters, denen ich hiermit ebenfalls danke, hatte ich eine schöne und besonders unterhaltsame Zeit während der Betreuung der Studierenden.

Ein großer Dank geht an alle Mitglieder aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Bendas, für ihre Hilfe, die konstruktive Kritik, die vielen lustigen gemeinsamen Momente, den immerwährend fließenden Kaffee und unsere gemeinsamen Feierabend Runden. Mein Dank richtet sich nicht nur an die aktuellen Mitglieder der Arbeitsgruppe, sondern auch an alle ehemaligen, die mir so viel gezeigt und beigebracht haben. Ich danke ihnen allen aus tiefstem Herzen für die schöne gemeinsame Zeit. Die wundervollen Freundschaften, sind das Schönste, was ich aus dieser Zeit mitnehmen durfte. An dieser Stelle möchte ich auch Philipp König danken, der mir ein äußerst hilfsbereiter Masterant war und darüber hinaus ein Bürokollege, mit dem ich jeder Zeit wieder Lakritze teilen würde. Vielen lieben Dank für deine Hilfe.

Bedanken möchte ich mich auch bei all unseren technischen Assistenten, die uns tagtäglich zur Seite stehen. Insbesondere Svenja Henze möchte ich für ihre große Hilfe und die schöne Zusammenarbeit danken. Sie ist mir über die Zeit zu einer Freundin geworden.

Für das gewissenhafte Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift möchte ich Gernot Rieger herzlich danken.

Mein ganz persönlicher Dank richtet sich an meine wundervollen Eltern, Helena und Andreas Wantoch von Rekowski, die mich, seit ich denken kann, in all meinen Bestrebungen unterstützt haben und denen ich so Vieles in meinem Leben verdanke. Außerdem möchte ich meiner lieben Schwester Joanna danken, die mich in jeder Situation stets ermutigt hat. Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders bei meinem Verlobten Martin bedanken, für die wundervolle gemeinsame Zeit und seine unermüdliche und liebevolle Unterstützung.

## 8.5 Publikationsliste

Wantoch von Rekowski K, König P, Henze S, Schlesinger M, Zawierucha P, Januchowski R, Bendas G.

Insight into Cisplatin-Resistance Signaling of W1 Ovarian Cancer Cells Emerges mTOR and HSP27 as Targets for Sensitization Strategies.

Int J Mol Sci. 2020 Dec 3;21(23):E9240. doi: 10.3390/ijms21239240.

Baltes F, Pfeifer V, Silbermann K, Caspers J, Wantoch von Rekowski K, Schlesinger M, Bendas G.

$\beta_1$ -Integrin binding to collagen type 1 transmits breast cancer cells into chemoresistance by activating ABC efflux transporters.

Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2020 May;1867(5):118663.  
doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118663.

Wantoch von Rekowski K, König P, Henze S, Schlesinger M, Zawierucha P, Januchowski R, Bendas G.

The Impact of Integrin-Mediated Matrix Adhesion on Cisplatin Resistance of W1 Ovarian Cancer Cells.

Biomolecules. 2019 Nov 26;9(12):788. doi: 10.3390/biom9120788.

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

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

Molecules. 2017 May 3;22(5):728 doi: 10.3390/molecules22050728.