

**Aufklärung von Resistenzmechanismen gegen Cisplatin
und PARP-Inhibitoren in Ovarialkarzinomzellen mit
besonderem Fokus auf Signalwegen der
Redox-Homöostase und DNA-Reparatur**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Philipp König

aus Köln

Bonn, Juni 2024

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

Gutachter/Betreuer: Prof. Dr. Gerd Bendas

Gutachter: Prof. Dr. Finn Hansen

Tag der Promotion: 15.11.2024

Erscheinungsjahr: 2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Theorie.....	2
2.1 Das Ovarialkarzinom	2
2.1.1 Histologische Unterteilung.....	2
2.1.2 Stadien und Leitlinientherapie	4
2.2 Cisplatin	6
2.2.1 Entdeckung und Einsatz in der Chemotherapie	7
2.2.2 Bioaktivierung und Wirkmechanismus.....	8
2.3 Chemoresistenz in der Therapie des Ovarialkarzinoms.....	10
2.3.1 Antioxidative Prozesse zur Entgiftung von Cisplatin	11
2.3.2 Signalwege und Proteine der DNA-Reparatur.....	12
2.3.3 Hitzeschockproteine.....	17
2.4 Neuartige Wirkstoffklassen als Alternativen oder Ergänzungen zu Cisplatin	18
2.4.1 Organische Goldverbindungen.....	19
2.4.2 PARPi.....	21
2.4.3 DNA <i>damage response</i> – Kinaseinhibitoren	24
2.4.4 Epigenetisch wirksame Arzneistoffe.....	27
3 Ziel der Arbeit	30
4 Material und Methoden	32
4.1 Materialien	32
4.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits	32
4.1.2 Inhibitoren und Zytostatika.....	34
4.1.3 Hergestellte Reagenzien und Lösungen.....	35
4.1.4 Antikörper	39
4.1.5 Primer.....	41
4.1.6 Verbrauchsmaterialien	41
4.1.7 Geräte	44
4.1.8 Software	47
4.2 Zellkultur.....	48
4.2.1 Zelllinien	48
4.2.2 Inkulturnahme	50
4.2.3 Subkultivierung.....	50

4.2.4	Kryokonservierung	51
4.2.5	Zellzahlbestimmung	51
4.3	MTT-Zellviabilitätsassay	52
4.3.1	Funktionsprinzip	52
4.3.2	Versuchsablauf	52
4.3.3	Kombinationsbehandlungen	53
4.3.4	Auswertung	55
4.4	Gold-Atomabsorptionsspektroskopie	56
4.5	ROS-Assay	56
4.6	Proteinexpressionsanalytik	57
4.6.1	Lysatgewinnung	57
4.6.2	BCA-Assay	58
4.6.3	SDS-Gelelektrophorese	59
4.6.4	Western Blot	60
4.7	Durchflusszytometrie	62
4.7.1	Zellzyklusanalyse	62
4.7.2	Apoptose-Assay	64
4.8	Quantitative <i>Real Time</i> Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	66
4.8.1	Probenvorbereitung	66
4.8.2	Temperaturprogramm und Auswertung	67
4.9	siRNA- <i>knockdown</i> von ATR	68
4.10	Statistische Auswertung	69
5	Ergebnisse und Diskussion	71
5.1	Einsatz von Goldverbindungen in Ovarialkarzinomzellen	71
5.1.1	Zytotoxizität der Goldverbindungen als Solobehandlung	71
5.1.2	Kombination der Goldverbindungen mit Cisplatin	73
5.1.3	Zelluläre Aufnahme der Goldverbindungen	74
5.1.4	Einfluss der Goldverbindungen auf das Redoxsystem	75
5.1.5	Beeinflussung des Zellzyklus durch die Goldverbindungen	79
5.1.6	Einfluss von ERK auf die Effektivität von Cisplatin und Gold(I)-Verbindungen	81
5.1.7	Zusammenfassung der Resistenzüberwindung durch organische Goldverbindungen	83
5.2	Rolle des <i>DNA damage response</i> Signalwegs in der Cisplatinresistenz von Ovarialkarzinomzellen	85
5.2.1	Einfluss von ATR auf die Chemoresistenz gegen Cisplatin	85

5.2.2	Beteiligung von <i>downstream</i> Effekten und Proteinen der ATR-Kinase in der Cisplatinresistenz.....	92
5.2.3	Einfluss der Helikase Schlafen11 auf die Cisplatinresistenz	99
5.2.4	Zusammenfassung der Resistenzüberwindung durch die Adressierung des DDR-Signalwegs.....	103
5.3	Untersuchung von Kreuzresistenzen gegen PARPi.....	104
5.3.1	Kreuzresistenz von Cisplatin und Niraparib	104
5.3.2	Zytotoxizität weiterer PARPi in den Ovarialkarzinomzelllinien.....	105
5.3.3	Expression von PARP1 und Effektivität eines PARP1-selektiven Inhibitors	106
5.3.4	Bedeutung von Slfn11 für die Resistenz gegen PARPi	108
5.3.5	Bedeutung der ATR- und den <i>downstream</i> Kinasen für die Resistenz gegen PARPi.....	110
5.3.6	Bedeutung der ATM-Kinase für die Resistenz gegen PARPi.....	114
5.3.7	Zelluläre Auswirkungen der ATM-Inhibition.....	118
5.3.8	Beeinflussung der HSP27-Aktivität durch ATM-Inhibition	120
5.3.9	Zusammenfassung der Resistenzen gegen PARPi und Strategien zu deren Überwindung.....	122
6	Zusammenfassung	124
	Literaturverzeichnis.....	126
	Abbildungsverzeichnis.....	169
	Tabellenverzeichnis.....	176

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	<i>p53-binding protein 1</i>
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
AKT	Proteinkinase B
ARID1A	<i>AT rich interactive domain 1A</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
BARD1	<i>BRCA1-associated RING domain protein 1</i>
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BRCA1/2	Brustkrebsgen 1/2
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDDP	cis-Diammindichloridoplatin(II)
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHK	<i>Checkpoint kinase</i>
CI	<i>Combination Index</i>
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTR1	<i>Copper Transporter 1</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNMT	DNA-Methyltransferase

Abkürzungsverzeichnis

ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
et al.	et alii
EU	Europäische Union
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G1/G2-Phase	<i>Gap 1/2-Phase</i>
ggf.	gegebenenfalls
GSH	Reduziertes Glutathion
h	Stunde
HDAC	Histondeacetylase
HR	Homologe Rekombination
HRP	Meerrettichperoxidase
HSF1	<i>Heat Shock Factor 1</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
k	Tausend
kd	<i>knockdown</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
log	Logarithmus
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mg	Milligramm
min	Minute

Abkürzungsverzeichnis

Mio.	Millionen
mL	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
MK2	<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2</i>
M-Phase	Mitose
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRP2	<i>Multidrug resistance-associated protein 2</i>
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NER	Nukleotid- Exzisionsreparatur
ng	Nanogramm
NHC	N-heterozyklischer Carben-Ligand
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomol pro Liter
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
p38	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
PAR	Poly(ADP-ribose)
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PARPi	PARP-Inhibitor
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α</i>
PIKK	Phosphoinositid-3-Kinase <i>related kinase</i>
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
Rad51	<i>DNA repair protein Rad51 homolog 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPA	<i>Replication Protein A</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SD	Standardabweichung
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Ser	Serin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Slfn11	Schlafen 11
S-Phase	Synthesephase
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline with Tween20</i>
TP53	Tumorprotein p53
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
u. a.	unter Anderem
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WEE1	<i>Mitosis inhibitor protein kinase WEE1</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	<i>Wild type</i>
z. T.	zum Teil
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

Der globale Anstieg der Gesamtbevölkerung sowie ihrer Lebenserwartung sorgt für eine stetig steigende Inzidenz der Krebserkrankungen. Nach Prognosen der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) der WHO erhöhen sich die Fallzahlen bis ins Jahr 2050 um 77 %, verglichen mit 2022 [1]. In den nach *Human Development Index* hochentwickelten Ländern haben Krebserkrankungen bereits den ersten Platz als Todesursache vor Vollendung des 70. Lebensjahres eingenommen [2].

Maligne Neoplasien der Eierstöcke können aus drei verschiedenen Geweben hervorgehen – den Keimzellen, der Stroma oder dem Epithel [3]. Das in dieser Arbeit thematisierte Ovarialkarzinom umfasst das Krankheitsbild letzteren Ursprungs und ist mit ca. 90 % aller Fälle der häufigste Tumor der Eierstöcke [4]. Obwohl die Zahl der Diagnosen seit den 1970er Jahren stetig sinkt, ist dieser Trend bei den Todesfällen erst seit Mitte der 2000er Jahre sichtbar [5]. Zu einer verbesserten Prognose können Vorsorge, die Behandlung in Spezialkliniken sowie Genomanalysen und darauf abgestimmte Therapien beitragen [6]. Trotz dieser Fortschritte sind die Überlebenschancen verglichen mit anderen Tumorentitäten weiterhin schlecht, da die Tumore häufig in einem fortgeschrittenen Stadium mit Metastasen diagnostiziert werden und zudem einer hohen Resistenzbildungsrate unterliegen. Solche robusten Klone entstehen meist nach einem initialen Ansprechen auf die platinhaltigen Zytostatika durch das Überleben einiger Zellen, welche in der Folge vor weiteren Behandlungen geschützt sind [7, 8].

Die Mechanismen hinter Entstehung und Ausprägung solcher Chemoresistenzen sind zahlreich und führen aufgrund eines Therapieversagens zum Tod der Patientinnen [8]. Um die Heilungsaussichten in solchen Fällen zu verbessern, ist die Erforschung neuer Wirkstoffe essenziell. Insbesondere für platinresistente Karzinome gibt es wenige Daten für den Einsatz neuer Therapeutika. Diese Arbeit soll mittels Testungen in Ovarialkarzinomzelllinien und ihren jeweiligen, cisplatinresistenten Subtypen einen Teil zum Verständnis der Chemoresistenzen sowie neue Ansätze für deren Überwindung beitragen.

2 Theorie

2.1 Das Ovarialkarzinom

Unter allen malignen, gynäkologischen Erkrankungen stellt das Ovarialkarzinom jene mit der höchsten Mortalitätsrate dar. Das Fünfjahresüberleben liegt trotz immer vielfältigeren Therapiemöglichkeiten bei unter 50 % [7, 9]. Dies ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass die Diagnose in den meisten Fällen im fortgeschrittenen Stadium des Tumors erfolgt, der dann zudem in andere Gewebe metastasiert ist [9, 10]. Ursächlich dafür ist der langfristig ohne bzw. mit unspezifischen Symptomen verlaufende Erkrankungsprozess [11, 12]. Die Erfolgsaussichten der Therapie werden ebenfalls durch die große Heterogenität innerhalb des Krankheitsbildes erschwert. So gibt es verschiedene histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms, die sich durch spezifische Charakteristika auf molekularer Ebene sowie unterschiedlichen Prognosen auszeichnen [13, 14]. Da die Identifizierung solcher Biomarker von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Behandlung sein kann, sollen diese im Folgenden in Bezug auf die histologische Unterteilung genauer besprochen werden.

2.1.1 Histologische Unterteilung

Das epitheliale Ovarialkarzinom wird oft vereinfacht als einheitliches Krankheitsbild dargestellt. Allerdings sind nach WHO fünf verschiedene Subtypen definiert, die sich histologisch unterscheiden lassen, da sie verschiedenen zellulären Ursprungs sind und auch in ihrem klinischen Bild z. T. stark variieren [15]. Die genaue Einordnung des Tumors in eine dieser fünf Klassen kann wichtige Aufschlüsse zum Ansprechen auf die Standardtherapie geben und könnte in Zukunft ggf. auch spezifische Wirkstoffe für die Behandlung inkludieren oder ausschließen [16]. Da sich die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien in drei dieser Klassen einordnen lassen, welche auch die am häufigsten diagnostizierten in der Klinik sind, sollen diese nun genauer vorgestellt werden [13]. Nicht besprochen werden der *low-grade* seröse sowie der muzinöse Subtyp, die nur einen kleinen Anteil der tatsächlichen Fälle ausmachen.

2.1.1.1 High-grade seröses Ovarialkarzinom

Dieses Karzinom stellt mit etwa 70 % aller Fälle den mit Abstand am häufigsten diagnostizierten Subtyp dar. Er zeichnet sich durch einen geringen Differenzierungsgrad sowie aggressives Wachstum aus und bedingt für die betroffenen Patientinnen lediglich eine 25 %-ige Überlebenschance in den ersten fünf Jahren nach der Diagnose [14, 17]. Die hohe Sterblichkeit ist allen voran der Symptomfreiheit bis ins fortgeschrittene Krankheitsstadium geschuldet, in dem der Tumor nicht mehr auf die Ovarien beschränkt, sondern bereits in das umliegende Gewebe ausgebreitet ist [17]. Des Weiteren besteht eine große Wahrscheinlichkeit auf die Bildung eines behandlungsresistenten Rezidivs, obwohl ein Großteil der Tumore auf die initiale Therapie anspricht [18, 19]. Wie jeder Subtyp zeichnet sich das *high-grade* seröse Ovarialkarzinom durch spezielle Mutationen aus. So tritt in über 95 % der Fälle ein Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens TP53 auf, der sich in einem deregulierten Zellzyklus sowie unterdrückter Apoptose äußert [20, 21]. Außerdem kommen Mutationen in BRCA1 oder BRCA2 bei etwa einem Fünftel der Patientinnen vor, die zwar eine Tumorbildung begünstigen, allerdings auch eine zielgerichtete Therapie mit PARP-Inhibitoren (PARPi) ermöglichen, die das progressionsfreie Überleben deutlich verlängert [20, 22].

2.1.1.2 Endometrioides Ovarialkarzinom

Auf diesen Subtyp des Ovarialkarzinoms entfallen in etwa 10 % der klinischen Fälle [13]. Im Gegensatz zum *high-grade* serösem Subtyp erfolgt die Diagnose meistens in einem frühen Krankheitsstadium. Des Weiteren sind die Tumorzellen in der Regel ausdifferenziert, was die Prognose der Patientinnen begünstigt [23]. Allerdings gilt auch bei diesem Subtyp, dass sich eine Diagnose im fortgeschrittenen Stadium negativ auf die Überlebenschance auswirkt [24]. Bei wenig ausdifferenzierten Tumoren fällt die histologische Abgrenzung zum *high-grade* serösem Subtyp schwer, es können jedoch molekulare Marker zur Beurteilung hinzugezogen werden [25]. Im endometrioiden Ovarialkarzinom findet man keine omnipräsenten Mutationen wie die des TP53 im *high-grade* serösen Typ, die in nahezu jedem Fall nachweisbar sind. Stattdessen gibt es mehrere, verschiedene Gene, in denen Veränderungen in ähnlicher Häufigkeit auftreten [26]. Die Identifizierung solcher Mutationen kann auch in diesem Subtyp in Zukunft für

eine individuell angepasste Therapie von Bedeutung sein. So kommt in etwa einem Viertel der Fälle eine Variante des KRAS vor, die mit neuen, selektiven Inhibitoren gezielt adressiert werden könnte [26, 27].

2.1.1.3 Klarzelliges Ovarialkarzinom

Dieser Subtyp macht wie der vorangegangene etwa 10 % aller Fälle des Ovarialkarzinoms aus [13]. Er wird zu einem Großteil frühzeitig entdeckt und kann in diesem Stadium durch eine operative Entfernung mit einer günstigen Prognose einhergehen, wenn kein Tumorgewebe verbleibt [28, 29]. Im Gegensatz zu den beiden anderen beschriebenen Subtypen weist das klarzellige Ovarialkarzinom allerdings eine relativ ausgeprägte intrinsische Chemoresistenz auf. So sprechen nur in etwa 30 % der Tumore auf eine platinbasierte Behandlung an [28, 30]. Des Weiteren ist die Prognose im fortgeschrittenen Stadium sehr schlecht, sodass die Patientinnen im Mittel innerhalb eines Jahres nach der Diagnose versterben [14]. Auf molekularer Ebene zeichnen sich klarzellige Ovarialkarzinome durch die Expression der Wildtypen von p53 und BRCA1/2 aus [31]. Charakteristisch sind Mutationen des Tumorsuppressors ARID1A sowie im Onkogen PIK3CA, die häufig miteinander einhergehen [31, 32]. Beide Varianten bieten vielversprechende Angriffspunkte für gezielte Therapien mit neuen Wirkstoffen, die präklinisch untersucht werden, um langfristig der hohen Resistenzrate entgegenzuwirken [33, 34].

2.1.2 Stadien und Leitlinientherapie

Das Ovarialkarzinom wird nach der FIGO in vier verschiedene Stadien eingeteilt, die zudem noch eigene Unterklassifizierungen haben. Ihre Häufigkeit sowie deren Definition und Auswirkungen auf die Überlebenschancen sind in Abbildung 1 dargestellt [35].

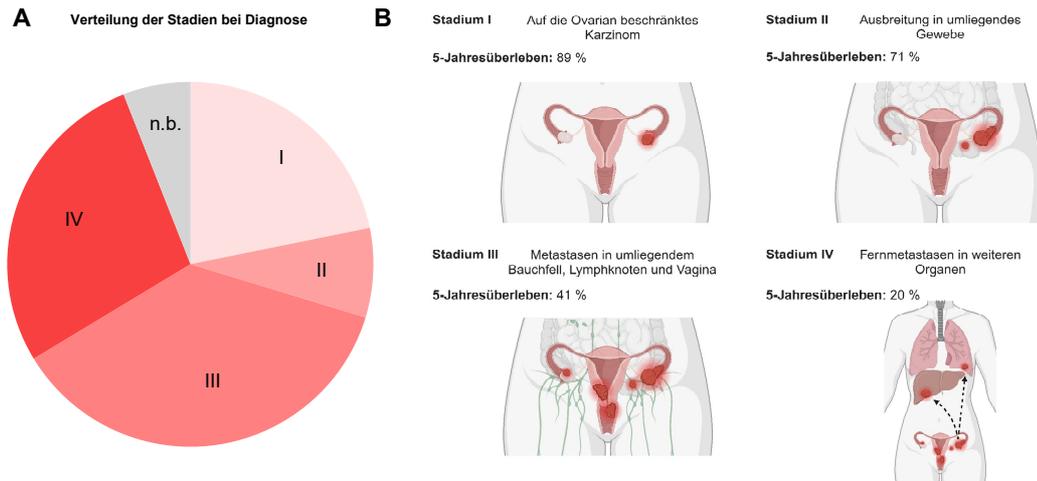


Abbildung 1: Darstellung der Häufigkeit der einzelnen Stadien des epithelialen Ovarialkarzinoms bei Diagnosestellung zwischen 2007 und 2013 (A), Definition der einzelnen Stadien [35] sowie das 5-Jahresüberleben (B). Zahlenwerte aus: [4]. Erstellt mit BioRender.com.

Die Standardtherapie des Ovarialkarzinoms beginnt mit einer größtmöglichen operativen Entfernung des Tumors sowie einer Untersuchung des umliegenden Gewebes auf Metastasen während des Eingriffs. Hierbei sollten zudem Biopsien von auffälligen Stellen entnommen werden. Für Patientinnen mit einem Tumor im Frühstadium (FIGO I) kann diese Operation auch unter Erhaltung der Fertilität durchgeführt werden [36]. Anschließend erfolgt eine Chemotherapie bestehend aus einer Kombination von Carboplatin und Paclitaxel, die intravenös alle drei Wochen für sechs Behandlungszyklen appliziert wird. Diese kann auch als platinbasierte Monotherapie erfolgen, sollte es sich um einen Tumor der FIGO Stufe I handeln. Im Falle eines *low-grade* Karzinoms kann sie auch komplett entfallen, wenn es operativ vollständig entfernt werden konnte [37].

Für Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (FIGO II – IV) wird der Vorteil einer neoadjuvanten Therapie diskutiert [38]. Diese sieht zunächst eine Chemotherapie über drei Behandlungszyklen und anschließender operativen Tumorentfernung vor. Danach wird die Behandlung mit Carboplatin und Paclitaxel über weitere drei Zyklen fortgesetzt. Eine Empfehlung für dieses Vorgehen gibt es nach aktueller Studienlage allerdings nicht, außer der Tumor wird initial als inoperabel eingeschätzt [36].

Bei fortgeschrittenen Tumoren der FIGO Stadien III – IV ist zudem eine Erhaltungstherapie indiziert. Diese sieht ein platinfreies Intervall vor, das durch die

Behandlung mit Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper, der gegen VEGF gerichtet ist und die Angiogenese des Tumors verhindert, überbrückt wird. Des Weiteren können verschiedene Vertreter aus der Klasse der PARPi eingesetzt werden. Die Auswahl hängt von den genauen genetischen Gegebenheiten der Patientin ab. Liegt eine Mutation in den BRCA-Genen vor, kommt Olaparib zum Einsatz, auch in Kombination mit Bevacizumab. Ist dies oder ein anderer Defekt im DNA-Reparatursignalweg der homologen Rekombination (HR) nicht gegeben, werden die PARP-Enzyme mittels Niraparib adressiert [39, 40].

Ein Großteil der Patientinnen erleidet, trotz initialem Ansprechen auf die Therapie, ein Rezidiv der Erkrankung. Diese werden nach Zeitpunkt des Auftretens nach Beendigung der Chemotherapie in ein platin sensitives (frühestens sechs Monate nach Abschluss) oder in ein platinresistentes (innerhalb von sechs Monaten nach Abschluss) eingeteilt [41]. Für ersteres erfolgt die Rezidivtherapie wieder mit einer Kombinationsbehandlung aus Carboplatin und Paclitaxel. Letzteres kann auch durch andere Zytostatika wie Gemcitabin oder pegyliertes, liposomales Doxorubicin ausgetauscht werden. Des Weiteren besteht die Option Bevacizumab für eine Tripeltherapie hinzuzuziehen. PARPi sind auch nach einer zweiten Chemotherapie als Erhaltungsmedikation indiziert, wenn der Tumor erneut auf die Platinbehandlung anspricht. Im Falle eines resistenten Rezidivs können Paclitaxel, Gemcitabin, pegyliertes, liposomales Doxorubicin oder Topotecan als Monotherapie eingesetzt werden, da die Gabe von Carboplatin entfällt [40, 41]. Die Erwartung einer Heilung ist in solchen Fällen nahezu aussichtslos. Das durchschnittliche Überleben eines platinresistenten Rezidivs liegt bei lediglich 12 - 14 Monaten [42]. Deshalb sind die Erforschung und Entwicklung neuer Wirkstoffe und Therapien, welche die Prognose der Patientinnen mit einem vermeintlich unbehandelbaren Tumor verbessern, von besonderer Bedeutung.

2.2 Cisplatin

Bei Cisplatin handelt es sich um ein klassisches Zytostatikum, dessen Wirkspektrum vor allem schnell proliferierende Zellen und Gewebe umfasst. Zu solchen zählen maligne, entartete Tumorzellen wie die eines Ovarialkarzinoms, welche bei einer Chemotherapie adressiert werden sollen. Der große Nachteil einer

solchen Behandlung ist die Unselektivität der Zytostatika, welche auch zahlreiche gesunde Zellen schädigen und deshalb z. T. verheerende Nebenwirkungen haben [43].

In Abschnitt 2.1.2 ist beschrieben, dass in der Standardtherapie des Ovarialkarzinoms Carboplatin als Mittel der Wahl eingesetzt wird. Dies ist u. a. damit zu begründen, dass das Nebenwirkungsprofil durch geringere Oto- und Nephrotoxizität sowie weniger Nausea und Emesis dem des Cisplatin überlegen ist [43, 44]. Der antineoplastische Effekt beider Verbindungen ist allerdings identisch, da Carboplatin ein Prodrug des Cisplatin darstellt und sich ihre Wirkformen demnach gleichen [45]. In den durchgeführten *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit wird stets mit Cisplatin gearbeitet, da der Wirkeintritt deutlich schneller erfolgt als beim Prodrug Carboplatin, was für zelluläre Arbeiten von Vorteil ist. Des Weiteren ist *in vivo* eine vierfach höhere Dosis von Carbo- als von Cisplatin zur Erzielung gleicher Effekte notwendig [46]. Die Neigung zur Resistenzbildung von Tumoren gegenüber beiden Substanzen ist jedoch ähnlich ausgeprägt, weswegen die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen auch unter Verwendung des Cisplatin aussagekräftig und praxisrelevant ist [47–49].

2.2.1 Entdeckung und Einsatz in der Chemotherapie

Bereits im 19. Jahrhundert gelang die erste Synthese von cis-Diammindichloridoplatin(II) (cDDP oder Cisplatin) durch Michele Peyrone, weshalb die Verbindung zunächst als Peyrone's Chlorid bezeichnet wurde [50]. Das zytostatische Potential wurde allerdings erst in den 1960er Jahren, zufällig, bei dem Versuch die Zellteilung von Colibakterien durch Anlegen eines elektrischen Felds zu hemmen, entdeckt. Da sich die Zellen aber auch nach Abschalten des Stroms nicht mehr teilten, erkannte man, dass dies nicht der alleinige Grund für die Hemmung des Wachstums sein konnte. Rosenberg et al. schlussfolgerten, dass vielmehr Platinionen, die aus der vermeintlich inerten Elektrode herausgelöst wurden, durch die Bildung von löslichen Komplexen mit ebenso anwesenden Ammoniumionen eine zytostatische Wirkung entfalteten. Die Bakterien dehnten sich allerdings noch um ihre bis zu 300-fache Größe aus, was zu der Schlussfolgerung führte, dass nur die Zellteilung, aber nicht das Wachstum

gehemmt wird [51]. In nachfolgenden Arbeiten der Gruppe um Barnett Rosenberg wurden diese antiproliferativen Effekte an Sarkom- und leukämischen Zellen im Mausversuch nachgewiesen [52]. In den 1970er Jahren folgten die ersten Tests von verschiedenen Platinverbindungen am Menschen. Schließlich erfolgte die Zulassung von Cisplatin durch die amerikanische *Food and Drug Administration* für die Behandlung von Eierstock- und Hodenkrebs, die bis heute Bestand hat [53]. Besonders bei letzterem sind die erzielten Effekte sehr gut und ein Großteil der Patienten (ca. 90 %) erreicht eine komplette Heilung. Deshalb sind trotz der immer mehr zugelassenen, auch deutlich selektiveren Wirkstoffen zur Behandlung maligner Erkrankungen, platinhaltige Substanzen nicht aus der Chemotherapie wegzudenken [54, 55].

2.2.2 Bioaktivierung und Wirkmechanismus

Das hydrolyseempfindliche Cisplatin wird mittels Infusion appliziert und gelangt zunächst in den Extrazellulärraum, wo es durch die hohe Chloridionenkonzentration stabil vorliegt. Allerdings werden dort etwa zwei Drittel der applizierten Dosis an Thiolreste von Cysteinen des Albumins gebunden und inaktiviert [56, 57]. Da es sich um einen ungeladenen Komplex handelt, in dem ein zweifach positiv geladenes Platinatom von zwei negativ geladenen Chlorido- und zwei neutralen Amminliganden koordinativ gebunden wird, kann Cisplatin durch passive Diffusion in die Zellen gelangen [56, 58]. Des Weiteren wird es aktiv durch den CTR1 in die Zellen transportiert [59]. Intrazellulär liegen deutlich weniger Chloridionen vor, weshalb diese Liganden in einer nukleophilen Substitutionsreaktion hydrolysiert werden. Dadurch bilden sich einfach oder zweifach positiv geladene Aquakomplexe, welche die hochaktiven, zytostatischen Wirkformen des Cisplatins darstellen. Die entstandene Gesamtladung des Komplexes verleiht ihm eine hohe Acidität, weshalb aus Deprotonierungen Hydroxido- bzw. Dihydroxidokomplexe hervorgehen, die ebenfalls toxisch sind. Das resultierende Mengenverhältnis der genannten Verbindungen zueinander ist vom pH-Wert sowie der Konzentration an Chloridionen abhängig [45, 56, 60].

Durch die Elektrophilie der positiv geladenen Aquakomplexe reagieren sie vornehmlich mit nukleophilen *targets* in der Zelle. Dazu zählen einige thiolhaltige

werden, die Transkription ist blockiert. Dies endet zumeist in einem Arrest des Zellzyklus und final in der Apoptose, dem programmierten Zelltod [54].

Um dies zu erreichen, ist die *cis*-Stellung der beiden Aqualiganden unabdingbar, weshalb das *trans*-Isomer des Cisplatins eine deutlich geringere Wirksamkeit aufweist [52]. Insgesamt bindet allerdings nur etwa ein Prozent des in die Zelle gelangten Wirkstoffs an die DNA als sein eigentliches Ziel. Der Großteil reagiert bereits vor dem Eintritt in den Zellkern mit Proteinen im Zytoplasma, dem Zytoskelett, Phospholipiden oder der RNA [72].

2.3 Chemoresistenz in der Therapie des Ovarialkarzinoms

Nahezu 80 % aller fortgeschrittenen Ovarialkarzinome, die initial auf die platinbasierte Chemotherapie ansprechen, kehren als resistentes Rezidiv wieder und machen eine weitere Behandlung mit den zuvor eingesetzten Wirkstoffen unmöglich [73]. In diesem Falle spricht man von einer erworbenen Resistenz. Sie ist von einer intrinsischen Platintoleranz zu unterscheiden, welche bereits bei der initialen Therapie zu geringen Behandlungserfolgen führt [74]. Die Mechanismen hinter solchen Chemoresistenzen sind zahlreich und treten häufig auch in Kombination miteinander auf [75].

So können resistente Zellen durch verminderte Expression des CTR1 verhindern, dass Cisplatin in das Zytoplasma gelangt [76]. Mittels gesteigertem Efflux durch ABC-Transporter wie MRP2 sorgen sie auf dem umgekehrten Weg dafür, dass der Wirkstoff aus den Zellen herausgepumpt wird [77]. Darüber hinaus kann eine Resistenz durch die Deregulierung proapoptotischer Proteine sowie den Vollstreckern des programmierten Zelltods, den Caspasen, vermittelt werden [78]. Außerdem gibt es proliferationsfördernde Signalwege wie die PI3K-AKT-Route oder die verschiedenen MAPK-Wege, deren Inhibierung eine Cisplatinresistenz überwinden kann [79, 80]. Bei letzteren sind insbesondere die ERK-vermittelten Effekte auf die Apoptose hervorzuheben [81, 82]. Gegen beide genannten Routen sind in den letzten Jahren Wirkstoffe entwickelt worden, die einzelne Proteine wie PI3K oder MEK gezielt inhibieren und sich in klinischen Studien zur Behandlung von Ovarialkarzinomen befinden [83, 84].

Im Vordergrund dieser Arbeit stehen zwei weitere Resistenzmechanismen, die genauer besprochen werden sollen – eine gesteigerte Entgiftung zytotoxischer Wirkstoffe durch antioxidative Prozesse sowie Signalwege der Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur, welche es Zellen ermöglicht, platinbasierte Schäden am Erbgut zu erkennen und sie anschließend zu tolerieren oder zu beseitigen.

2.3.1 Antioxidative Prozesse zur Entgiftung von Cisplatin

Tumore weisen typischerweise höhere Level an intrazellulären ROS als gesundes Gewebe auf [85]. Dies bedingt allerdings auch eine gesteigerte Kapazität diese zu entgiften oder zu tolerieren. Ein essenzieller Bestandteil des antioxidativen Systems ist der Transkriptionsfaktor Nrf2, der durch oxidativen Stress aktiviert wird [86]. Er fördert die Produktion von Glutathion (GSH), einem antioxidativen Tripeptid, welches Cisplatin mit Hilfe einer Transferase an ein Cystein koppeln und anschließend aus der Zelle befördern kann [87, 88]. Gesteigerte Reservoirs an GSH sind ein häufiges Phänomen in cisplatinresistenten Tumorzellen und konnten in vorangegangenen Arbeiten für die hier untersuchten W1CR-Zellen nachgewiesen werden [89, 90].

Ein weiteres Kompartiment der oxidativen Stressbewältigung ist das Thioredoxin-System. Es ist wie Glutathion essentiell für die Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase und dient ebenfalls der Entgiftung erhöhter Mengen an ROS [91]. Das Effektormolekül Thioredoxin (Trx), dessen Thiolgruppen zweier Cysteine zu Disulfiden oxidiert werden können, ist dabei ein Ersatz für erschöpfte Reserven an GSH [92, 93]. Im reduzierten Zustand bindet und inaktiviert es zunächst die proapoptotische ASK1. Wird Trx durch große Mengen intrazellulärer ROS in seine oxidierte Form überführt, löst es sich von ASK1, was anschließend zur Einleitung der Apoptose über JNK und p38 führt [94–96].

GSH und Trx haben gemeinsam, dass sie von entsprechenden Reduktasen (GSHR bzw. TrxR) unter dem Verbrauch von NADPH aus ihren oxidierten Formen generiert werden [93]. Für beide Redoxwege gilt außerdem, dass eine gesteigerte Aktivität bzw. erhöhte Mengen der reduzierenden Moleküle mit einer Cisplatinresistenz und daraus folgenden schlechten Prognosen in der Klinik

einhergehen [97–100]. Damit stellen diese Enzyme sowie die Stoffwechselwege zur Gewinnung von Reduktionsmitteln wie NADPH interessante *targets* zur Überwindung einer Chemoresistenz dar.

2.3.2 Signalwege und Proteine der DNA-Reparatur

ROS sorgen nicht nur für oxidativen Stress innerhalb des Zytoplasmas, sondern können ebenso Schäden an der DNA verursachen [101, 102]. Da die Verknüpfung der Basen des Erbguts auch der wichtigste apoptoseinduzierende Mechanismus des Cisplatins ist, verwundert es nicht, dass resistente Krebszellen in den Signalwegen der DNA-Reparatur eine gesteigerte Leistungsfähigkeit vorweisen [103]. Eine Studie über molekulare Marker einer Cisplatinresistenz in diversen Krebszelllinien, Tumormodellen und Patientengeweben sieht eine große Anzahl an Genen oder Proteinen aus Signalwegen der DNA-Reparatur beteiligt. In den vorderen Plätzen finden sich dabei die HR, der DNA *damage response* (DDR)-Weg und die damit eng verknüpfte Regulierung des Zellzyklus. Des Weiteren ist die Interstrang-*crosslink* Reparatur der mit Abstand wichtigste *GO Term* unter den biologischen Prozessen der chemoresistenten Proben [104]. Ein genauerer Überblick dieser Signalwege und ihre Relevanz in der Vermittlung einer Resistenz in Ovarialkarzinomen soll im Folgenden gegeben werden.

2.3.2.1 Erkennung beschädigter DNA und Regulierung des Zellzyklus

Der erste Schritt zur Beseitigung von DNA-Schäden, die durch Cisplatin hervorgerufen werden, ist deren Registrierung und die anschließende Einleitung eines Arrests des Zellzyklus sowie Reparatursignalwegen [105]. Diese wichtigen Prozesse werden maßgeblich durch drei Serin-/Threoninkinasen aus der Klasse der PIKK geleitet, die als Hauptsensoren für beschädigtes Erbgut und replikativen Stress gesehen werden [106].

Von diesen ist zunächst die *Ataxia Telangiectasia and Rad3 related* (ATR)-Kinase zu nennen, dessen Expression im Gegensatz zu den anderen beiden PIKK für die Entwicklung eines Organismus überlebenswichtig ist [107]. Dass sie zudem onkogene Eigenschaften hat, zeigt ein Mausversuch, in dem ein *knockout* von ATR eine Tumorbildung in diesen Tieren verhindert [108]. Sie überwacht die

Replikationsgabel während der S-Phase des Zellzyklus, in der die Verdopplung des Erbguts stattfindet [109]. Des Weiteren wird ATR in einem mehrstufigen Prozess durch diverse Formen von DNA-Schäden und replikativem Stress aktiv (Abb. 3). Dabei erfolgt zunächst die Anlagerung von mehreren Molekülen des *Replication Protein A* (RPA) an einen Einzelstrang, was wiederum die Bindung von ATRIP mit der daran gebundenen ATR-Kinase folgen lässt. Sobald dieser Komplex gebildet wird, beginnt die nachgeschaltete zelluläre Stressabwehr, vermittelt durch ATR, die auch als DDR bekannt ist [105, 110, 111].

So aktiviert sie zunächst die *Checkpoint-kinase 1* (CHK1), welche anschließend durch die Inhibierung von CDK1 bzw. CDK2 einen Arrest in der G2- oder S-Phase des Zellzyklus bewirkt [112, 113]. Dadurch hat die Zelle Zeit mittels Reparatursignalwegen die durch Cisplatin verursachten *crosslinks* der DNA zu beseitigen [114]. Außerdem wird verhindert, dass sie vorzeitig (nach der G2-Phase) die Mitose einleitet, obwohl noch beschädigtes Erbgut vorliegt, was zum Zelltod während dieses Prozesses führen würde [115]. Die CHK1 phosphoryliert überdies die Kinase WEE1, welche ebenfalls durch CDK1-Inhibition einen Arrest am G2-/M-*checkpoint* induziert [116, 117]. ATR kann zudem BRCA1 aktivieren, welches als zentrales Protein der HR *downstream* die Reparatur von Doppelstrangbrüchen initiiert, was für das Überleben cisplatininduzierter Schäden von großer Bedeutung ist [118, 119].

Ein weiteres Sensorprotein der genomischen Stabilität ist die *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM)-Kinase, die primär durch Doppelstrangbrüche der DNA aktiviert wird [120]. Zu Beginn des Zellzyklus werden durch beschädigtes Erbgut von ATM zunächst die CHK2 und nachfolgend p53 aktiviert, was durch die Inhibierung von CDKs einen Arrest am G1-*checkpoint* zur Folge hat [121–123]. In anderen Phasen des Zellzyklus wird p53 zudem durch die ATR-CHK1 Route phosphoryliert [124, 125]. Es kann die Zelle anschließend in Seneszenz versetzen oder die Apoptose induzieren, weshalb p53 als Tumorsuppressor zu sehen ist. Da ein Funktionsverlust einen Überlebensvorteil bietet, weisen diverse Tumorentitäten gehäuft Mutationen in diesem Gen auf [126]. Besonders in HGSOc ist die Quote mit über 90 % sehr hoch [20]. Durch den Funktionsverlust des G1-*checkpoints* und der proapoptischen Eigenschaften von p53, korrelieren solche Mutationen häufig

mit einer Behandlungsresistenz des Tumors [127–130]. Umgekehrt führt eine bestimmte *gain of function* Mutation zu einem besseren Ansprechen gegenüber Cisplatin und PARPi [131].

Darüber hinaus werden durch ATM einige DNA-Reparatursignalwege vermittelt. So wird bspw. via CHK2 die Basenexzisionsreparatur (BER) zur Behebung von Einzelstrangbrüchen der DNA initiiert [132]. Zudem werden Proteine der beiden Reparatursignalwege für Doppelstrangbrüche HR (BRCA1) und NHEJ (53BP1) aktiviert, die als funktionelle Gegenspieler anzusehen sind [106, 133].

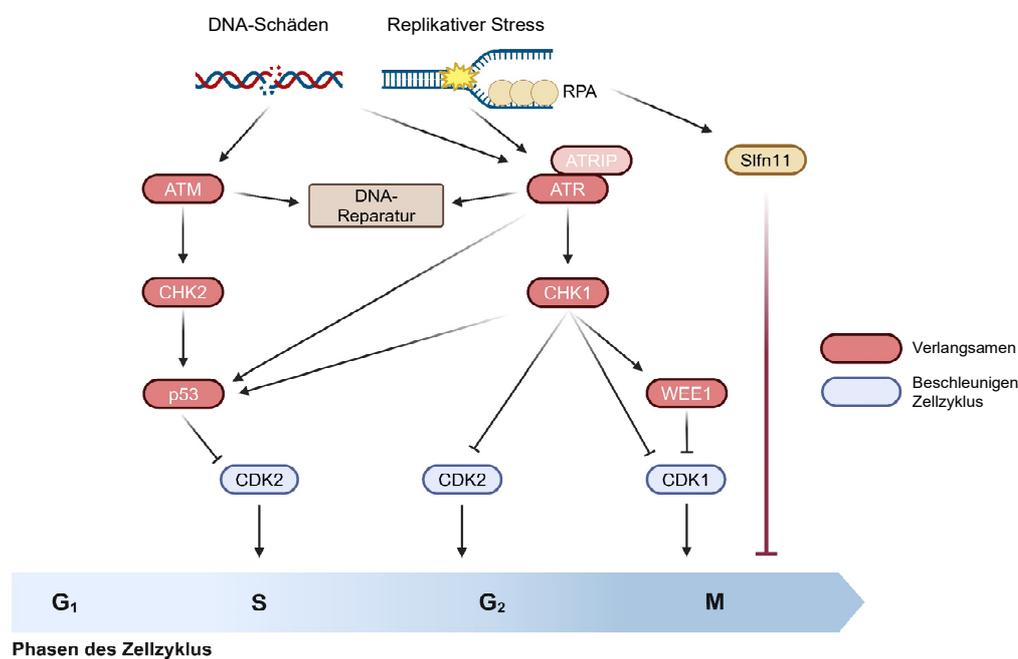


Abbildung 3: Übersicht der Zellzykluskontrolle durch die Sensorkinasen ATM und ATR sowie Slfn11 in Folge von DNA-Schäden und replikativem Stress. Modifiziert nach [134]. Erstellt mit BioRender.com.

Abschließend gehört auch die DNA-PK zu den drei besagten Serin-/Threoninkinasen und leitet nach ihrer Aktivierung durch Ku80 das NHEJ zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen ein, was jedoch fehleranfälliger als die HR ist [135–137]. Zusätzlich kann sie durch die ATM-Kinase phosphoryliert werden, die damit auch indirekt das NHEJ initiiert [138].

2.3.2.2 Schlafen 11

Die DNA/RNA Helikase Schlafen 11 (Slfn11) ist ein neuerer und weniger erforschter Marker diverser Tumorentitäten für das Ansprechen auf DNA-schädigende Substanzen [139–141].

Slfn11 bindet in Folge replikativen Stresses, wie er u. a. von Cisplatin und PARPi ausgelöst wird, an DNA-gekoppeltes RPA und entfernt es vom Erbgut. Dies führt zu einem irreversiblen Arrest des Zellzyklus und der Replikation, was schließlich in der Apoptose endet (Abb. 3) [142, 143]. Der Prozess läuft unabhängig und trotz der protektiven Eigenschaften von ATR ab, die lediglich einen reversiblen Arrest in der S-Phase induziert [144]. Der Name „Schlafen“ wird auch im englischen Sprachgebrauch verwendet und deutet bereits darauf hin, dass die Expression der Helikase in chemoresistenten Tumorzellen durch epigenetische Mechanismen unterdrückt wird [143, 145]. Zu diesen zählen die Histondeacetylierung durch HDACs, die Methylierung des Promotors durch DNMTs oder die Histonmethylierung durch EZH2 [145–147]. Solche Slfn11-negative Tumore durchlaufen nach Exposition stressinduzierender Verbindungen keinen irreversiblen Arrest des Zellzyklus, sondern setzen die Replikation nach ATR-vermitteltem *checkpoint* der S-Phase und anschließender DNA-Reparatur fort [114, 144, 148]. Diese Eigenschaft sichert ihnen das Überleben trotz zytotoxischen Einflüssen und kann eine Resistenz gegen Cisplatin und PARPi verursachen [140, 145, 148].

2.3.2.3 Homologe Rekombination

Die HR ist neben dem NHEJ der Hauptsignalweg für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA. Sie unterscheiden sich vor allem darin, dass die HR ein Schwesterchromatid als Vorlage für die Synthese des reparierten DNA-Strangs verwendet und somit nahezu fehlerfrei abläuft [137]. Da ein solches *template* nur in der S- oder G2-Phase des Zellzyklus, also während oder nach Verdopplung des Erbguts, vorhanden ist, kann die HR nur zu diesen Zeitpunkten stattfinden [149, 150]. Sie wird nach der Erkennung von Doppelstrangbrüchen durch ATM und ATR über die Aktivierung und nachfolgende Anlagerung von BRCA1 an die DNA, als Teil eines Proteinkomplexes, eingeleitet [151, 152]. Anschließend schneiden Nukleasen am 5'-Ende einige Nukleotide aus und

erzeugen damit einen Überhang des 3'-Endes [153, 154]. An dieses Stück einzelsträngiger DNA des 3'-Endes lagert sich das RPA an, was in der Folge, BRCA1/2-vermittelt, durch die Rekombinase Rad51 ersetzt wird [155, 156]. Diese sorgt danach für die Rekrutierung und Anlagerung eines homologen Stücks DNA, welches als Vorlage für die Synthese des vollständig reparierten Strangs mittels einer Polymerase dient [157, 158].

Die Bedeutung beider BRCA-Proteine ist für die Entstehung und den Behandlungserfolg eines Ovarialkarzinoms enorm. So haben Frauen mit einer Mutation in den BRCA-Genen eine deutlich höhere Neigung zur Tumorbildung, da die protektiven Eigenschaften des HR-Signalwegs für das Genom entfallen und Schäden bei der Replikation z. T. unkorrigiert auf Tochterzellen vererbt werden [159]. Die Diagnose einer solchen *loss of function* Mutation ist für die Therapie jedoch von Vorteil, da dysfunktionale BRCA-Proteine mit einer Sensitivität gegenüber Cisplatin und PARPi einhergehen [22, 160, 161]. Im Gegenzug führen erhöhte Level des Wildtyp-BRCA1 zu einer Chemoresistenz [162].

2.3.2.4 Poly(ADP-ribose)-Polymerasen

Die Klasse der PARP-Enzyme umfasst nach heutigem Kenntnisstand 17 Vertreter mit verschiedenen Aufgaben in der Zelle [163]. Für die hier besprochene DNA-Reparatur sind v. a. die Subtypen PARP1 und PARP2 verantwortlich, wobei Aufgaben und Funktionalität des ersteren besser bekannt sind [164, 165].

Die Identifizierung von DNA-Schäden aktiviert PARP1, was daraufhin PAR-Ketten aus NAD⁺ synthetisiert, die an das Enzym selbst binden oder auf andere Proteine übertragen werden [166, 167]. Die Verknüpfung von PAR mit Akteuren der DNA-Reparatur sorgt für ihre Bewegung zum beschädigten Erbgut und der Ausbildung von Protein-Protein-Komplexen [168, 169]. So kommen PARP1 wichtige regulatorische Rollen in einigen Signalwegen zu. Zunächst fördert es via des NER-Wegs die Reparatur von Intrastrang-*crosslinks*, die von Cisplatin erzeugt werden [170, 171]. Zudem ist PARP1 ein wichtiger Teil der BER, welche v. a. bei der Korrektur durch ROS oxidiertes DNA-Basen von Bedeutung ist [172]. Das Enzym übernimmt außerdem Aufgaben in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen [165, 173]. Mittels PARylierung des Nukleasekomplexes und dessen anschließender Lokalisierung zum Erbgut sorgt es für den ersten Schritt der HR [174]. BARD1,

das Partnerprotein von BRCA1, ist ebenfalls ein Substrat von PARP1, wodurch indirekt auch die BRCA-vermittelten Prozesse gestartet werden [175]. In der nachgeschalteten Signalkaskade nimmt PARP1 eine bivalente Rolle ein, da es auch Berichte über eine inhibitorische Wirkung auf die HR gibt [176]. Zudem fördert es via PARylierung der DNA-PK die Doppelstrangreparatur über das NHEJ, welche dadurch auch unabhängig des regulären Initiators, dem Ku-Komplex, aktiv wird und die Schadenskorrektur vermittelt [177]. Zudem ist PARP1 auch ein wichtiger Überwacher der Replikationsgabel und kann sie nach Entdeckung von Läsionen stabilisieren [178].

Die zentrale Rolle in der Regulierung diverser Signalwege der DNA-Reparatur sowie der Überwachung der Replikation machen die PARP-Enzyme zu einem attraktiven Ziel für die Behandlung von Tumorzellen [179]. Deren Überexprimierung wird zudem mit einer Resistenz gegen Cisplatin in Verbindung gebracht. In vitro lässt sich in einigen Entitäten eine Sensitivierung gegen Cisplatin mit dem Einsatz von PARPi erreichen [180–182]. Diese neue Arzneistoffklasse wird in Kapitel 2.4.2 genauer vorgestellt.

2.3.3 Hitzeschockproteine

Proteine, die zu dieser Klasse gehören, sind so genannte Chaperone. Ihre Aufgabe besteht in erster Linie darin, für die korrekte Faltung anderer Proteine zu sorgen und diese auch unter Stressbedingungen aufrecht zu erhalten [183]. Sie tragen überdies zur Entstehung von Tumoren bei und liegen in malignen Geweben häufig überexprimiert vor [184, 185].

Die HSPs werden anhand ihres Molekulargewichts in verschiedene Klassen eingeteilt. In Krebszellen sind HSP70 (HSPA), HSP27 (HSPB) sowie HSP90 (HSPC) von größerer Bedeutung und haben gemeinsam, dass ihre Transkription vom HSF1 gesteuert wird [185, 186]. Im Rahmen dieser Arbeit sind diese Proteine ebenfalls von Interesse, da sie die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Mechanismen der Chemoresistenz beeinflussen können.

HSP27 wirkt oxidativem Stress entgegen, indem es Glutathion in seiner reduzierten Form erhält [187]. Des Weiteren inhibiert es diverse Proteine, die an der Einleitung

sowie Ausführung der Apoptose beteiligt sind [188–191]. Somit sichert HSP27 das Überleben von Krebszellen unter zytostatischer Behandlung, was auch einer der Mechanismen der hier untersuchten, cisplatinresistenten W1CR-Zellen ist [192, 193]. Auch HSP70 und HSP90 wirken inhibierend auf die Signalkaskaden des programmierten Zelltods und können Effekte, ähnlich denen des HSP27, erzielen [194–196].

Neben diesen antiapoptotischen Aktivitäten greifen die genannten HSPs auch in Prozesse der DNA-Reparatur ein. So sind zunächst regulatorische Einflüsse auf die PIKK des DNA *damage response* Signalwegs bekannt. Die ATM-Kinase kann bspw. mit HSP27 interagieren. Beide Proteine scheinen sich dabei gegenseitig in ihrer Aktivität zu beeinflussen und die Phosphorylierung des Chaperons durch ATM erfolgt sowohl direkt, als auch indirekt über die p38-MK2-Route [197–199]. Des Weiteren unterstützt HSP90 die Rekrutierung von Proteinen der ATR-CHK1-Route zu beschädigten DNA-Stücken [200, 201]. Die nachgeschaltete HR kann ebenfalls durch die HSP27-vermittelte ATM-Aktivierung sowie einer Förderung der BRCA-Proteine durch HSP90 verstärkt ablaufen [197, 202, 203]. Auch die von PARP1 eingeleitete BER und das NER stehen in Zusammenhang mit einer positiven Beeinflussung durch HSP70, was mit einigen der beteiligten Faktoren wechselwirken kann [204, 205].

Alle diese HSP-geförderten Prozesse könnten im Falle ihrer Überexpression zu einer verbesserten Reparatur cisplatininduzierter Schäden führen. Generell verdeutlichen die grob dargestellten Einflüsse der HSPs auf diverse zelluläre Prozesse die Bedeutung der Untersuchung der Chaperone in chemoresistenten Zellen. Für diese Arbeit ist dabei besonders die Regulierung der HSPs durch Akteure des DDR-Signalwegs von Interesse.

2.4 Neuartige Wirkstoffklassen als Alternativen oder Ergänzungen zu Cisplatin

Die hohe Resistenzbildungsrate des Ovarialkarzinoms erfordert die stetige Erforschung neuer Therapieoptionen [73]. Von besonderem Interesse ist dabei die Entwicklung von Wirkstoffen, die gezielt Schwachstellen bzw. Resistenzmarker

des Tumors angreifen, ohne dabei die gesunden Teile des Körpers zu schädigen. In diesem Abschnitt werden Verbindungen vorgestellt, die den zuvor beschriebenen Mechanismen entgegenwirken und damit Potential zur Resistenzüberwindung liefern.

2.4.1 Organische Goldverbindungen

Neben den jahrelang erfolgreich eingesetzten Platinverbindungen ist die Untersuchung weiterer Metalloverbindungen für die Behandlung maligner Erkrankungen ein großes Forschungsfeld [206]. Dabei stellen sich besonders organische Goldverbindungen als vielversprechende Substanzen heraus, da einige Vertreter *in vitro* eine hohe Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen aufweisen, gesundes Gewebe jedoch weniger schädigen [207]. Zudem gibt es Hinweise, dass eine Platinresistenz mit dem Einsatz solcher Verbindungen überwunden werden kann [208, 209]. Dafür ursächlich ist der primäre Wirkmechanismus der nachfolgend genauer besprochenen Goldverbindungen – die Inhibition der Thioredoxinreduktase (TrxR) [210–213]. Da sie ein Teil der Abwehr oxidativen Stresses ist, adressieren diese Verbindungen den in 2.3.1 beschriebenen Mechanismus cisplatinresistenter Ovarialkarzinomzellen.

2.4.1.1 Gold(I)-Phosphine

Die Leitsubstanz der zytotoxischen Goldverbindungen ist das Auranofin. Es ist die Weiterentwicklung von Aurothiomalat bzw. Aurothioglucose und zeichnet sich im Gegensatz zu seinen Vorgängern durch seine orale Verfügbarkeit sowie ein geringeres Nebenwirkungsspektrum aus [214]. Auranofin wird seit den 1970er Jahren zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt, findet heute allerdings nur noch als Reservemittel des Methotrexats Verwendung [215, 216]. Zu jener Zeit wurde auch das zytotoxische Potential erkannt und erste Untersuchungen zur Behandlung von Tumorzellen starteten [217]. Auranofin wirkt über die kovalente Bindung an Thiolreste, insbesondere an Cystein und Selenocystein im aktiven Zentrum der TrxR [210, 218, 219]. Da sie unter normalen Bedingungen oxidiertes Trx wieder reduzieren soll, schwindet durch ihre Blockade die Kapazität oxidativen Stress abzuwehren [220]. Zudem inhibiert Auranofin die TrxR der

Mitochondrien und permeabilisiert zusätzlich ihre Membran, was zu einem Ausstrom von Cytochrom C und nachfolgender Einleitung der Apoptose führt [211, 221]. Der Phosphinrest scheint für die zytotoxische Wirkung entscheidend zu sein, da er auch beim Eintritt in die Zelle erhalten bleibt und Analoga mit anderen Liganden eine deutlich geringere Effektivität aufweisen. Der Zuckerrest des Auranofins wird indes abgespalten [222, 223]. Betrachtet man die Struktur des neuartigen Gold(I)-Phosphins UB-1, so ist ersichtlich, dass das Pharmakophor identisch geblieben und der Zucker einem lipophileren Rest gewichen ist (Abb. 4). Diese Verbindung weist ebenfalls zytotoxische Effekte mit IC_{50} -Werten im einstelligen mikromolaren Bereich in Mamma- und Kolonkarzinomzellen auf [212].

2.4.1.2 Biscarbengold(I)-NHC-Komplexe

Die große *in vitro* Wirksamkeit des Auranofins ist nur begrenzt auf *in vivo* Versuche übertragbar, da es einer starken Eliminierung durch die Bindung an Serumalbumin unterliegt [224, 225]. Dies führte zur Entwicklung der NHC-Gold-Komplexe, von denen sich eine geringere Affinität zu Albumin sowie eine einfachere Synthese als die der Phosphinderivate versprochen wurde [226, 227]. Als Vertreter dieser Klasse an Goldverbindungen wird in dieser Arbeit das MC3 untersucht, welches auch ein selektiver TrxR-Inhibitor ist und zudem eine deutlich geringere Affinität zu Albumin aufweist als Auranofin [228]. Es wirkt *in vitro* antiproliferativ gegen Kolon-, Mamma- und Pankreaskarzinomzellen mit IC_{50} -Werten im hohen, nanomolaren Bereich, während das Wachstum der gesunden Gewebe entstammenden HEK-293-Zellen erst in höheren Konzentrationen beeinträchtigt wird [213, 228].

Aufgrund des großen Wirkspektrums dieser Verbindungen sollen sie im Rahmen dieser Arbeit in chemoresistenten Ovarialkarzinomzellen untersucht und die zugrundeliegenden Mechanismen ihrer hohen Effektivität ergründet werden.

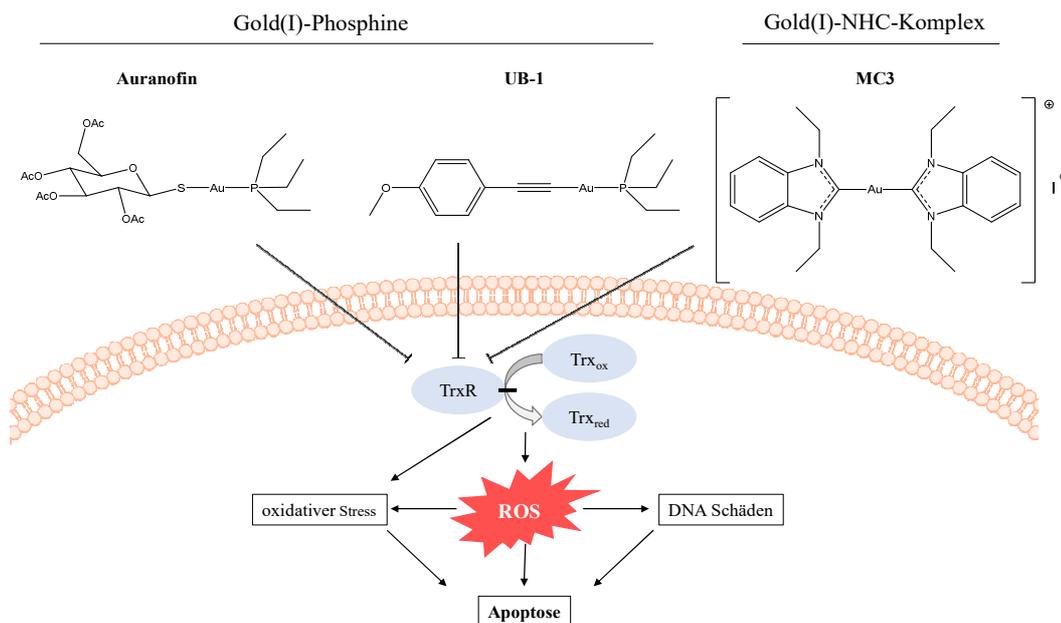


Abbildung 4: Strukturformeln der verwendeten Goldverbindungen und ihr postulierter Wirkmechanismus.

2.4.2 PARPi

Wegen der großen Bedeutung der PARP-Enzyme in zahlreichen zellulären Abläufen, insbesondere der DNA-Reparatur, ist das therapeutische Potential einer Inhibierung dieser Proteine zur Behandlung maligner Erkrankungen schon länger bekannt [179, 229, 230]. Olaparib erlangte im Jahr 2014 als erster PARPi die Zulassung in der EU. Seine Indikationen sind die Erhaltungstherapien von BRCA-mutierten Mamma- und platinsensitiven *high-grade* Ovarialkarzinomen, bei letzterem auch in Kombination mit Bevacizumab. Mittlerweile sind drei weitere Vertreter auf den Markt gekommen. Das 2017 zugelassene Niraparib weist auch eine Wirksamkeit bei Patientinnen mit BRCA-Wildtyp auf, die der des Placebos signifikant überlegen ist [39, 231–233]. Mit Rucaparib und Talazoparib (Zulassungen 2018 und 2019 in der EU) sind noch weitere PARPi für die Therapie BRCA-mutierter Ovarial- bzw. Mammakarzinome im Einsatz, die sich in ihrer Effektivität und ihrem Nebenwirkungsprofil geringfügig von den anderen beiden Vertretern unterscheiden und eine patientenorientierte Auswahl des Wirkstoffs ermöglichen [233–236]. Zudem befinden sich PARP1-selektive Inhibitoren wie

NMS-P118 in präklinischen Untersuchungen, die ebenso antiproliferative Effekte zeigen wie die zuvor genannten, unselektiven Vertreter [237].

Ein großer Vorteil dieser Arzneistoffklasse ist ihre orale Verfügbarkeit, was den Klinikaufenthalt einer intravenösen Applikation wie von Cisplatin entfallen lässt. Durch die Therapieerfolge der PARPi in den genannten Indikationen werden sie zunehmend für weitere maligne Erkrankungen zugelassen oder befinden sich in diversen klinischen Studien [238–240].

2.4.2.1 Wirkungsmechanismus

Die vier zugelassen PARPi haben gemeinsam, dass sie unspezifisch die Subtypen PARP1 und PARP2 inhibieren sowie ihre zytotoxische Wirkung über zwei verschiedene Mechanismen entfalten. Zunächst konkurrieren sie mit dem natürlichen Substrat der PARP-Enzyme, NAD^+ , um den Platz im aktiven Zentrum, wodurch die Bildung der PAR-Ketten unterbunden wird. Dadurch kann die PARylierung der Proteine und die damit einhergehende Aktivierung *downstream* nicht erfolgen. Das im NAD^+ enthaltene Nikotinamid ist als einzelne Verbindung ebenfalls ein schwacher Inhibitor und gehört zusammen mit dem 3-Aminobenzamid zur ersten Generation der PARPi. Sie weisen im Gegensatz zu den medizinisch genutzten Vertretern allerdings eine deutlich geringere Affinität zu den Enzymen auf. Beim Betrachten der Strukturformeln der zugelassenen PARPi (Abb. 5) wird ersichtlich, dass jedes Molekül eine Benzamid-Teilstruktur enthält, die dem Nikotinamid sehr ähnlich ist [45, 229, 241].

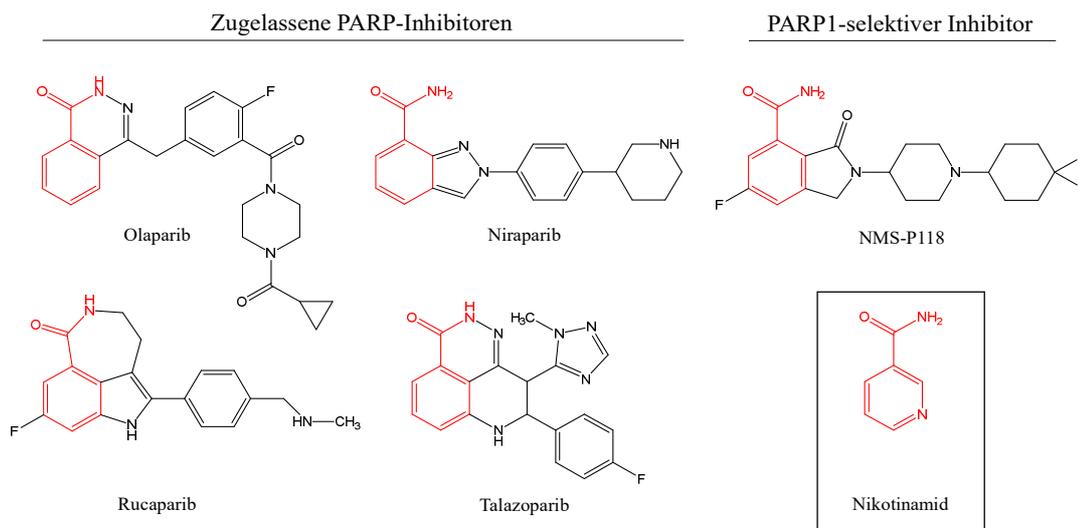


Abbildung 5: Übersicht der Strukturformeln der zugelassen sowie des PARP1-selektiven Inhibitors. In Rot eingezeichnet ist der Benzamid-Teil jedes Moleküls, der sich vom natürlichen Substrat der PARP-Enzyme, dem Nikotinamid des NAD^+ , ableitet. Modifiziert nach [241].

Der zweite Wirkmechanismus ist das *PARP-Trapping*. Darunter wird die Fähigkeit der Inhibitoren verstanden, das Enzym an der beschädigten DNA festzuhalten. Da dessen Funktion durch die Besetzung des aktiven Zentrums blockiert ist, kann die PARP-vermittelte Reparatur des Erbguts nicht stattfinden. Einzelstrangbrüche werden während der Replikation zu Doppelstrangbrüchen. Wenn, wie für den Einsatz der meisten PARPi Voraussetzung, eine BRCA-Mutation vorliegt, können diese dann nicht über die HR repariert werden und die Tumorzelle leitet die Apoptose ein [45, 242]. Diesen Synergismus aus gezieltem Angreifen eines Proteins unter Ausnutzung eines Defekts in einem notwendigen Korrektursignalweg bezeichnet man als Synthetische Letalität [243, 244]. Von den zugelassenen Vertretern ist das *PARP-Trapping* bei Talazoparib mit Abstand am stärksten ausgeprägt, was der großen Struktur mit zwei Stereozentren zugeschrieben wird. Niraparib hat darauffolgend ein größeres Potential als Olaparib und Rucaparib, die sich in dieser Fähigkeit nahezu gleichen. Die Ausprägung der Inhibitoren die PARP-Enzyme an der DNA zu halten, korreliert zudem mit der Zytotoxizität in den meisten Zelllinien [245, 246].

2.4.2.2 Resistenzmechanismen

Wie bei den meisten Zytostatika gibt es auch gegen PARPi Chemoresistenzen, die entweder intrinsisch vorliegen oder mit fortschreitender Behandlungsdauer

aufzutreten. Einige Tumore erlangen bspw. die Fähigkeit die Wirkstoffe über Effluxpumpen wie das P-Glykoprotein aus den Zellen zu befördern [247–249]. Des Weiteren führen Mutationen im PARP1-Gen zum Verlust des Enzyms oder zu einer Veränderung seiner Proteinstruktur, die es PARPi unmöglich machen an ihr Ziel zu binden [250, 251]. BRCA-mutierte Tumore, die i. d. R. gut auf eine PARPi-Therapie ansprechen, können durch Sekundärmutationen in diesen Genen die Funktionsfähigkeit dieser Proteine zurückerlangen und somit die induzierten DNA-Schäden via HR reparieren [252, 253]. Dies gelingt auch durch ein gleichzeitiges Ausschalten des 53BP1-Gens, wodurch die alternative Doppelstrangbruchreparatur über das NHEJ unterdrückt wird und eine BRCA-unabhängige Aktivierung der HR erfolgt [254, 255]. Des Weiteren kann eine Stabilisierung der Replikationsgabel in Abwesenheit der Protektoren BRCA1/2 zu einer Rad51-vermittelten HR führen und damit eine PARPi-Resistenz verursacht werden [256]. Über einen ähnlichen Mechanismus schützen sich Tumore, welche die Expression von Slfn11 herunterreguliert oder ausgeschaltet haben (S. 2.3.2.2). Zudem hat in ihnen der über ATR und CHK1 eingeleitete Zellzyklusarrest eine Bedeutung in der Abwehr PARPi-induzierter Schäden [148, 257–259]. Anhand dieser Mechanismen ergeben sich einige potentielle Angriffspunkte PARPi-resistenter Zellen, die mit neuen, selektiven Inhibitoren gezielt adressiert werden können.

2.4.3 DNA damage response – Kinaseinhibitoren

Die Entwicklung selektiver Inhibitoren für die Kinasen des DNA *damage response* Signalweges, beschrieben in Abschnitt 2.3.2.1, hat in den letzten Jahren stetig an Forschungsinteresse dazugewonnen. Der Einsatz solcher Verbindungen bei platinresistenten Ovarialkarzinomen erscheint logisch, da die Schädigung des Erbguts der primäre Wirkmechanismus ist [103]. Zudem ist das Ziel, analog der PARPi, das Prinzip der Synthetischen Letalität zu nutzen. Es soll den Zellen also eine Kompensation genommen werden, die sie aufgrund von Mutationen oder epigenetischen Deregulierungen für das Überleben zytotoxischen Stresses benötigen [244]. Einige Vertreter dieser Wirkstoffklassen werden zurzeit bereits in klinischen Studien untersucht, Daten für den Einsatz in platinresistenten

Ovarialkarzinomen sind jedoch rar [260]. Die in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitoren richten sich gegen die Proteine ATM, ATR, CHK1 und WEE1.

2.4.3.1 ATM-Inhibitor AZD1390

Die ATM-Kinase spielt eine wichtige Rolle in der Erkennung von Doppelstrangbrüchen sowie der anschließenden Einleitung des Zellzyklusarrests und entsprechender Reparatursignalwege (S. 2.3.2.1) [106, 120, 133]. AZD1390 ist ein hochselektiver Inhibitor, dessen IC_{50} für ATM im hohen, picomolaren Bereich liegt. Er verhindert die Phosphorylierung von ATM sowie der *downstream* geschalteten Proteine CHK2 und p53 [261, 262]. Ein generelles Phänomen unter ATM-Inhibitoren ist die geringe Toxizität als Solotherapie. Ihre antitumoralen Effekte kommen nur in Kombinationsbehandlungen mit Bestrahlung oder Zytostatika zur Geltung. Zudem korreliert eine verminderte ATM-Expression mit einer Sensitivität gegen PARPi [261, 263–265]. Aufgrund seiner guten Wirksamkeit *in vitro* werden mittlerweile Probanden für klinische Studien gegen u. a. Lungenkarzinome (NCT04550104) und Glioblastome (NCT03423628) gesucht [266].

2.4.3.2 ATR-Inhibitor Elimusertib

Für das Auftreten von replikativem Stress und DNA-Schäden ist die ATR-Kinase ein Hauptsensor sowie wichtiger Mediator der zellulären Gegenreaktion (S. 2.3.2.1) [106]. Wegen dieser zentralen Funktion ist die Entwicklung von ATR-Inhibitoren für die Tumorthapie schon etwas fortgeschrittener als bspw. gegen ATM [260]. Sie schaden besonders malignen Zellen, da diese einen hohen Replikationsstress aufweisen und durch die Blockade von ATR verfrüht in die Mitose übergehen [267, 268]. So befinden sich einige Vertreter wie Berzosertib (VX970) bereits in Phase II Studien, auch in Kombination mit Cisplatin [269]. Im Gegensatz dazu ist das in dieser Arbeit verwendete Elimusertib (BAY 1895344) oral verfügbar und in Zellversuchen potenter wirksam [270, 271]. Es unterdrückt die Phosphorylierung von ATR bereits nach kurzer Behandlungsdauer mit einer IC_{50} im niedrigen, nanomolaren Bereich sowie auch die, der nachgeschalteten CHK1. Zudem zeigt es eine hohe antitumorale Aktivität als Solo- oder in Kombinationsbehandlung mit u. a. PARPi [270–272]. In einer klinischen Phase I Studie, die einige solide

Tumorentitäten, v. a. Brust-, Darm- und Prostatakarzinome, umfasst, ist die Wirksamkeit auch *in vivo* belegt, insbesondere beim Vorliegen einer ATM-Mutation [273]. Für die Behandlung mit Elimusertib, auch in Kombination mit Niraparib laufen weitere klinische Studien (bspw. NCT04267939), die auch Ovarialkarzinompatientinnen umfassen [274].

2.4.3.3 CHK1-Inhibitor SCH900776

Der Einsatz von Inhibitoren der ATR *downstream* geschalteten CHK1 führt ebenfalls zum Ausfall des S-Phasen *checkpoints* und einer frühzeitigen Initiierung der Replikation [113, 275]. Dies scheint auf den ersten Blick ein noch gezielterer Angriff gestresster Zellen zu sein, als der der *upstream* Sensorkinase ATR. Buisson et al. berichten jedoch, dass im Falle einer ATR-Inhibierung die CHK1 noch über andere Proteine wie bspw. die DNA-PK aktiviert werden kann. Dieser Reservemechanismus, der gesunde Zellen schützt, entfällt jedoch bei direkter CHK1-Blockade. Daraus resultieren *in vivo* stärkere Nebenwirkungen als unter ATR-Inhibierung [267]. Des Weiteren interagieren CHK1-Inhibitoren auch mit anderen Proteinen der *checkpoint*-Kontrolle wie CHK2 und CDK2, was ebenfalls zu einer höheren Toxizität beiträgt [276]. Das hier verwendete SCH900776 (MK-8776) ist Gegenstand einiger klinischen Studien als Solotherapie oder in Kombination mit den Antimetaboliten Gemcitabin oder Cytarabin u. a. in fortgeschrittenen Tumoren [277, 278]. Daten zum Einsatz in chemoresistenten Ovarialkarzinomen sind jedoch rar.

2.4.3.4 WEE1-Inhibitor Adavosertib

WEE1 ist *downstream* der CHK1 der direkte zelluläre Regulator der CDK1, welche den Eintritt in die Mitose vermittelt. Sie kann einen Arrest am *G2-checkpoint* als Reaktion auf DNA-Schäden vermitteln [279]. Da viele Tumore einen dysfunktionalen G1-Arrest aufgrund von Mutationen bspw. des p53 aufweisen, sind sie unter zytotoxischem Einfluss besonders auf diesen Kontrollpunkt vor der Mitose angewiesen [280]. Demzufolge erscheint die spezifische Inhibierung der WEE1-Kinase als erfolgsversprechende, tumorselektive Behandlungsmöglichkeit [281, 282]. Zudem gibt es Belege, dass Ovarialkarzinome die Expression der WEE1-Kinase als Reaktion auf eine Chemotherapie erhöhen [283]. Der in dieser

Arbeit verwendete, hochpotente Inhibitor Adavosertib (AZD1775), mit einer IC_{50} für WEE1 im einstelligen, nanomolaren Bereich, durchläuft bereits klinische Testungen. In den Phase II Studien mit Ovarialkarzinompatientinnen bringt der Zusatz von Adavosertib zur Chemotherapie eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens, auch in platinresistenten Karzinomen [284–286].

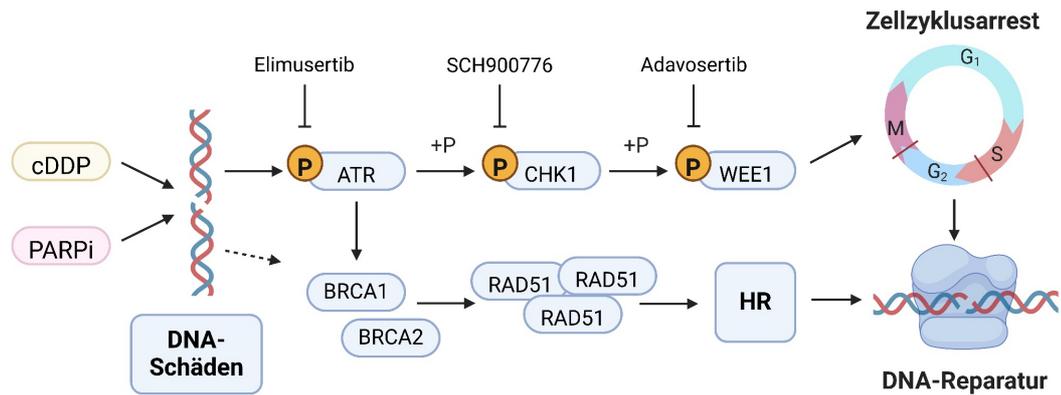


Abbildung 6: Vereinfachte Übersicht der zellulären Reaktion auf die Cisplatin- und PARPi-induzierten DNA-Schäden sowie die Angriffspunkte der verwendeten, selektiven DDR-Inhibitoren. Erstellt mit BioRender.com.

2.4.4 Epigenetisch wirksame Arzneistoffe

Epigenetische Modifizierungen sind sowohl für Entstehung, als auch Resistenzbildung von Tumoren wichtiger Bestandteil. Ein Beispiel für ersteres ist die Promotormethylierung der BRCA-Gene und für letzteres das in Abschnitt 2.3.2.2 beschriebene Ausschalten der Helikase Slfn11 [145, 159]. Es gibt bereits Belege für den Einsatz epigenetischer Inhibitoren gegen DNA-Methyltransferasen (DNMT), Histonmethyltransferasen oder Histondeacetylasen (HDAC), der zur Sensitivierung resistenter Zellen u. a. via der Re-Expression von Slfn11 führt [145–147].

Aus der erstgenannten Klasse wird in dieser Arbeit das Decitabin (5-Aza-2'-desoxycytidin) verwendet. Es wird nach Eintritt in die Zelle zunächst in sein Nukleotid überführt und in die DNA verbaut. Anschließend bindet das aktive 5-Aza-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat kovalent an mehrere Subtypen der DNMTs, blockiert dadurch deren Funktion und induziert eine Hypomethylierung der DNA.

Dadurch können zuvor methylierte Stellen wieder abgelesen und transkribiert werden [287]. Decitabin ist in der EU seit 2012 für die Behandlung der akuten, myeloischen Leukämie zugelassen. In Studien zu Ovarialkarzinompatientinnen weist es als Solotherapie keine antitumorale Wirkung auf, führt jedoch zu einer Sensitivierung gegenüber Cisplatin [288, 289].

Tazemetostat (EPZ-6438) ist ein selektiver Inhibitor der Histonmethyltransferase EZH2, die als onkogen eingestuft wird und deren Überexpression mit einer schlechten Prognose in einigen Tumorentitäten einhergeht [290–293]. Sie methyliert das Histon H3 und verhindert dadurch die Transkription von Tumorsuppressorgenen, was einen Überlebensvorteil sichert [294, 295]. Tazemetostat blockiert diesen Prozess und trägt zu einer Sensitivierung maligner Zellen bei [290]. Es ist in der EU für die Behandlung des folliculären Lymphoms zugelassen. Studien für die Behandlungen weiterer, maligner Erkrankungen, auch in Kombination mit anderen Wirkstoffen, laufen derzeit [296, 297].

HDACs deacetylieren die Lysinreste von u. a. Histonen und beeinflussen damit die Transkription bestimmter Gene. Maligne Zellen können über diesen Mechanismus die Expression von Tumorsuppressorproteinen unterdrücken und sich damit einen Überlebensvorteil sichern. Somit kann man mittels HDAC-Inhibierung erreichen, dass die zuvor unzugänglichen Areale der DNA wieder abgelesen werden [298–300]. Einige HDAC-Inhibitoren sind bereits für die Behandlung maligner Erkrankungen zugelassen. Zu ihnen zählen Vorinostat und Panobinostat, die allerdings unselektive Hemmer mehrerer Vertreter der vier Klassen umfassenden Enzymgruppe sind [301, 302]. Das in dieser Arbeit verwendete Entinostat (MS-275) ist lediglich ein Inhibitor der HDAC-Klasse I, der proliferationsfördernde und antiapoptische Effekte zugeschrieben sind [303, 304]. Es wirkt in präklinischen Untersuchungen antitumoral sowie sensitivierend gegen PARPi und Cisplatin [146, 305, 306]. Zudem ist bereits eine Studie der Phase II zu einer Kombinationsbehandlung in Mammakarzinompatientinnen erfolgreich absolviert [307].

In dieser Arbeit werden die drei vorgestellten Inhibitoren gegen die jeweiligen Enzyme der epigenetischen Regulierung eingesetzt, um eine Sensitivierung cisplatinresistenter Zellen über einen in Abbildung 7 dargestellten Mechanismus zu erzielen.

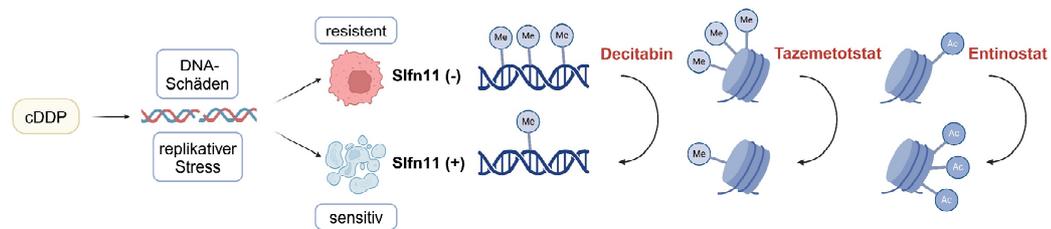


Abbildung 7: Überblick der Konsequenz einer epigenetisch unterdrückten Slfn11-Expression als Resistenzmechanismus gegen Cisplatin sowie der Einsatz von Inhibitoren gegen DNMTs (Decitabin), EZH2 (Tazemetostat) und HDACs (Entinostat) zur Reversion des Slfn11-negativen Phänotyps. Erstellt mit BioRender.com.

3 Ziel der Arbeit

Die Indikation, in der seit Jahren die meisten Arzneistoffe zugelassen werden, ist die Therapie maligner Erkrankungen [308]. Trotz dieses enormen finanziellen und wissenschaftlichen Aufwands sind die erzielten Fortschritte in einigen Tumorentitäten wie dem Ovarialkarzinom überschaubar. Behandlungsresistente Rezidive treten in einem Großteil der Patientinnen auf, deren Diagnose in einem fortgeschrittenen Stadium erfolgt [73]. Da in solchen Fällen nur noch palliative Maßnahmen ergriffen werden können, soll diese Arbeit einen Beitrag in der Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen und ihrer Überwindung in einer Reihe cisplatinresistenter Ovarialkarzinomzellen leisten.

Dafür wird mit zahlreichen, neuartigen Inhibitoren gearbeitet, die bisher nur im zellulären Kontext erforscht wurden oder schon Teil erster klinischen Studien sind. Im Vordergrund stehen zwei Mechanismen, die als ursächlich für eine erhöhte Cisplatinintoleranz bekannt sind – die gesteigerte Entgiftung durch antioxidative Prozesse und eine verbesserte DNA-Reparatur. Ersteres wird mittels organischen Goldverbindungen adressiert, die über eine Hemmung der TrxR oxidativen Stress auslösen. Zudem kommen selektive Inhibitoren verschiedener Kinasen des DDR-Signalwegs zum Einsatz, die zur Aufklärung der zellulären Gegenreaktion auf platininduzierte DNA-Schäden beitragen.

Zusätzlich wird die Fragestellung einer Kreuzresistenz zwischen Cisplatin und den neuartigen PARPi adressiert, da diese bisher nur für die Therapie platinsensitiver Patientinnen zugelassen sind. Des Weiteren sollen Resistenzmechanismen gegen die Behandlung mit PARPi aufgeklärt und Ansätze für deren Überwindung in den verschiedenen Ovarialkarzinomzellen gefunden werden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem vermeintlichen Resistenzmarker Slfn11, seiner unterdrückten Expression in resistenten Zellen sowie epigenetischen Interaktionen, um diese wieder zu erhöhen und damit eine Sensitivierung gegen Cisplatin und PARPi zu erzielen.

Für die genannten Fragestellungen sollen mittels Kombinationsbehandlungen Synergien aufgedeckt und die zugrundeliegenden Abläufe auf Gen- oder Proteinebene ergründet werden. Die dadurch ermittelten Schwachstellen von resistenten Tumorzellen könnten zukünftig für gezielte Angriffe in der klinischen Behandlung dienen und somit die Nebenwirkungen einer unselektiven Chemotherapie vermeiden. Die gewonnen Erkenntnisse sollen langfristig dazu beitragen das Behandlungsspektrum für Patientinnen mit einem cisplatinresistenten Ovarialkarzinom zu erweitern und die Prognose in solchen Fällen zu verbessern.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Annexin Binding Buffer	BioLegend Inc. San Diego, USA
ATR siRNA (h)	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
Bacillo1® AF	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
CASY®ton	Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland
Cell Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific GmbH Langenselbold, Deutschland
Clarity Western™ Luminol	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Clarity Western™ Peroxid-Lösung	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Control siRNA-A	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe Deutschland
DNase/RNase-Free Water	Zymo Research Irvine, CA, USA
DPBS	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
EDTA- Lösung 0,02 %	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim am Albuch, Deutschland
FITC-Annexin V	BioLegend Inc. San Diego, USA
Fötales Kälberserum	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
Gigasept® Instru AF	Schülke & Mayr GmbH Norderstedt, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Glycin	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Guava [®] Instrument Cleaning Fluid (ICF)	Luminex Corporation Austin, TX, USA
Halt [™] Protease Inhibitor Cocktail (100×)	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
Isopropanol 100 %	Merck Chemicals GmbH Schwalbach, Deutschland
Kohlenstoffdioxid	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Laemmli-Probenpuffer, 2× Konzentrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co.KG Karlsruhe, Deutschland
MAK143 Fluorimetric Intracellular ROS Kit	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Melsept [®] SF	B. braun AG Melsungen, Deutschland
Methanol	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Janssen GmbH Neuss, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 U; 10 mg/mL)	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
Pierce [™] BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Power SYBR [®] Green RNA-to-CT [™] 1-Step Kit	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc.) Waltham, USA
Precision Plus Protein [™] Unstained Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Precision Protein [™] StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Propidiumiodid	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA

Bezeichnung	Hersteller
RNase A	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
RPMI-1640 [®] Nährmedium	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
Salzsäure 1 M	Carl Roth GmbH & Co.KG Karlsruhe, Deutschland
siRNA Transfection Medium	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
siRNA Transfection Reagent	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
Sterillium [®]	Bode Chemie GmbH Hamburg, Deutschland
TRI Reagent [®]	Zymo Research Irvine, CA, USA
TRIS-Base	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Trypsin 0,05 %/EDTA 0,02 % in PBS w/o: Ca and Mg, w: Phenol red Tween [®] 20	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland

4.1.2 Inhibitoren und Zytostatika

Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren und Zytostatika

Verbindung	Target	Hersteller
Adavosertib (AZD1775)	WEE1	Selleck Chemicals Houston, TX, USA
Auranofin	TrxR	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
AZD1390	ATM	MedChemExpress EU Sollentuna, Sweden
Cisplatin	DNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Decitabin	DNMT	Hölzel Diagnostika Handels GmbH Köln, Deutschland
Elimusertib-HCl (BAY1895344)	ATR	Selleck Chemicals Houston, TX, USA
Entinostat	HDAC	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH Eching, Deutschland

Verbindung	Target	Hersteller
MC3	TrxR	Synthetisiert in der Arbeitsgruppe von Prof. Ott, TU Braunschweig
Niraparib-HCl	PARP	MedChemExpress EU Sollentuna, Sweden
Olaparib	PARP	MedChemExpress EU Sollentuna, Sweden
Rucaparib-H ₃ PO ₄	PARP	MedChemExpress EU Sollentuna, Sweden
SCH772984	ERK 1/2	Hycultec GmbH Beutelsbach, Germany
SCH900776 (MK-8776)	CHK1	Selleck Chemicals Houston, TX, USA
Tazemetostat	EZH2	Abcam plc Cambridge, UK
UB-1	TrxR	Synthetisiert in der Arbeitsgruppe von Prof. Ott, TU Braunschweig

4.1.3 Hergestellte Reagenzien und Lösungen

4.1.3.1 Inhibitor- und Zytostatikalösungen

Tabelle 3: Hergestellte Lösungen der Inhibitoren und Zytostatika

Reagenz	Inhaltsstoffe	Zusammensetzung
Adavosertib-Stammlösung [10 mM]	Adavosertib DMSO	5 mg 0,999 mL
Adavosertib-Arbeitslösung [1 µM]	Adavosertib-Stammlösung PBS	2 µL ad 20 mL
Adavosertib-Arbeitslösung [0,1 µM]	Adavosertib-Stammlösung PBS	0,2 µL ad 20 mL
Auranofin-Stammlösung [1 mM]	Auranofin DMSO	4,63 mg 6,824 mL
Auranofin-Arbeitslösung [1 µM]	Auranofin-Stammlösung PBS	10 µL ad 10 mL
AZD1390-Stammlösung [10 mM]	AZD1390 DMSO	5 mg 1,047 mL
AZD1390-Arbeitslösung [25 µM]	AZD1390-Stammlösung PBS	50 µL ad 20 mL
AZD1390-Arbeitslösung [10 µM]	AZD1390-Stammlösung PBS	20 µL ad 20 mL
Cisplatin-Stammlösung [5 mM]	Cisplatin PBS	15 mg 10 mL

Material und Methoden

Reagenz	Inhaltsstoffe	Zusammensetzung
Decitabin-Stammlösung [10 mM]	Decitabin DMSO	10 mg 4,382 mL
Decitabin-Arbeitslösung [10 µM]	Decitabin-Stammlösung PBS	10 µL ad 10 mL
Elimusertib-HCl- Stammlösung [10 mM]	Elimusertib-HCl DMSO	10 mg 2,428 mL
Elimusertib-HCl- Arbeitslösung [10 µM]	Elimusertib-HCl- Stammlösung PBS	10 µL ad 10 mL
Elimusertib-HCl- Arbeitslösung [0,1 µM]	Elimusertib-HCl- Arbeitslösung [10 µM] PBS	100 µL ad 10 mL
Elimusertib-HCl- Arbeitslösung [0,01 µM]	Elimusertib-HCl- Arbeitslösung [10 µM] PBS	10 µL ad 10 mL
Entinostat-Stammlösung [10 mM]	Entinostat DMSO	10 mg 2,657 mL
Entinostat- Arbeitslösung [1 µM]	Entinostat-Stammlösung PBS	1 µL ad 10 mL
MC3-Stammlösung [1 mM]	MC3 DMSO	3,82 mg 5,681 mL
MC3-Arbeitslösung [0,1 µM]	MC3-Stammlösung PBS	1 µL ad 10 mL
Niraparib-HCl- Stammlösung [10 mM]	Niraparib-HCl DMSO	10 mg 2,802 mL
Niraparib-HCl- Arbeitslösung [10 µM]	Niraparib-HCl- Stammlösung PBS	10 µL ad 10 mL
Olaparib-Stammlösung [10 mM]	Olaparib DMSO	10 mg 2,302 mL
Rucaparib-H ₃ PO ₄ - Stammlösung [10 mM]	Rucaparib-PO ₄ ³⁻ DMSO	10 mg 2,373 mL
SCH772984-Stammlösung [10 mM]	SCH772984 DMSO	5 mg 851 µL
SCH772984-Arbeitslösung [10 µM]	SCH772984-Stammlösung PBS	10 µL ad 10 mL
SCH772984-Arbeitslösung [1 µM]	SCH772984-Stammlösung PBS	1 µL ad 10 mL
SCH900776-Stammlösung [10 mM]	SCH900776 DMSO	10 mg 2,658 mL

Reagenz	Inhaltsstoffe	Zusammensetzung
SCH900776-Arbeitslösung [10 µM]	SCH900776-Stammlösung PBS	20 µL ad 20 mL
SCH900776-Arbeitslösung [1 µM]	SCH900776-Stammlösung PBS	2 µL ad 20 mL
Tazemetostat-Stammlösung [10 mM]	Tazemetostat DMSO	5 mg 0,873 mL
Tazemetostat-Arbeitslösung [50 µM]	Tazemetostat-Stammlösung PBS	50 µL ad 10 mL
UB-1-Stammlösung [1 mM]	UB-1 DMSO	3 mg 6,722 mL

4.1.3.2 Sonstige Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 4: Sonstige hergestellte Lösungen, Puffer und Medien

Reagenz	Inhaltsstoffe	Zusammensetzung
Blockierungslösung	Magermilchpulver TBS-T	5 g ad 100 mL
Elektrophoresepuffer 10×	Glycin Tris-Base Aqua Millipore®	72 g 15 g 500 mL
Elektrophoresepuffer 1×	Elektrophoresepuffer 10×	100 mL
Ethanol 70 %	Aqua Millipore® Ethanol absolut Aqua Millipore®	ad 1000 mL 7 mL ad 10 mL
Kryo-Medium	DMSO FKS	5 mL 45 mL
Luminol-Peroxidlösung (1:1)	Clarity Western-Peroxidlösung Clarity Western-Luminollösung	4 mL 4 mL
Lysepuffer	PMSF-Stammlösung [0,3 mol/L] Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100×) Cell Extraction Buffer	34 µL 500 µL 10 mL
MTT-Lösung [5 mg/mL]	MTT DPBS-Puffer	50 mg ad 10 mL
PMSF-Stammlösung [0,3 mol/L]	PMSF DMSO	250 mg 4,783 mL

Material und Methoden

Reagenz	Inhaltsstoffe	Zusammensetzung
Proteinstandardlösung [0,2 mg/mL]	BSA	2 mg
Stripping-Puffer	Aqua Millipore®	ad 10 mL
	Glycin	15 g
	SDS	1 g
	Tween®-20	10 mL
	Aqua Millipore®	800 mL
	pH-Einstellung mit 1 M Salzsäure auf 2,2	q.s.
	TBS Puffer 10×	Natriumchlorid
TRIS-Base		6,06 g
Aqua Millipore®		ad 500 mL
pH-Einstellung mit 1 M Salzsäure auf 7,3		q.s.
TBS Puffer 1×		TBS Puffer 10x Aqua Millipore®
TBS-T Puffer	TBS Puffer 10x	100 mL
	Tween®-20	2 mL
	Aqua Millipore®	ad 1000 mL
Transferpuffer 10×	Glycin	72 g
	Tris-Base	15 g
	Aqua Millipore®	ad 500 mL
	Transferpuffer 1×	Transferpuffer 10× Aqua Millipore®
Zellmedium	Fötale Kälberserum	50 mL
	Penicillin/Streptomycin- Lösung	5 mL
	[10.000 I.E./mL, 10 mg/mL]	500 mL
	RPMI-1640® Nährmedium	
Zellmedium 2×	Fötale Kälberserum F7524	6 mL
	Penicillin/Streptomycin- Lösung	0,6 mL
	[10.000 I.E./mL, 10 mg/mL]	30 mL
	RPMI-1640® Nährmedium	
Zellmedium <i>antibiotic-free</i>	Fötale Kälberserum F7524	50 mL
	RPMI-1640® Nährmedium	500 mL

4.1.4 Antikörper

4.1.4.1 Primäre Antikörper

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper

Target	Wirt	Hersteller
α -Tubulin	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
ATR	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
pATR	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
BRCA1	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
pBRCA1	Kaninchen	Cell Signaling Technology Frankfurt am Main, Deutschland
CHK1	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
pCHK1	Kaninchen	Cell Signaling Technology Frankfurt am Main, Deutschland
ERK 1/2	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
pERK 1/2	Kaninchen	Cell Signaling Technology Frankfurt am Main, Deutschland
GAPDH	Maus	GeneTex Irvine, USA
HSF1	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
HSP27	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
pHSP27	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
HSP70	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
Nrf2	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
PARP1	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
Rad51	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland
Slfn11	Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland

Target	Wirt	Hersteller
Trx	Kaninchen	Cell Signaling Technology Frankfurt am Main, Deutschland

4.1.4.2 Hergestellte Lösungen der primären Antikörper

Tabelle 6: Hergestellte Lösungen der primären Antikörper nach Hersteller sortiert

Hersteller des primären Antikörpers	Inhaltsstoffe	Zusammensetzung
Santa Cruz Biotechnology Inc.	Primärer Antikörper	50 µL
	BSA	500 mg
	Natriumazid	10 mg
	TBS-T	10 mL
Cell Signaling Technology	Primärer Antikörper	10 µL
	BSA	500 mg
	Natriumazid	10 mg
	TBS-T	10 mL

4.1.4.3 Sekundäre Antikörper

Alle aufgelisteten Antikörper sind zusätzlich mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, die für eine Signalerzeugung im Western Blot erforderlich ist.

Tabelle 7: Verwendete sekundäre Antikörper

Target	Wirt	Hersteller
Kaninchen-IgG	Ziege	Southern Biotechnology Associates, Inc Birmingham, Alabama, USA
Maus-IgG	Ziege	Southern Biotechnology Associates, Inc Birmingham, Alabama, USA
Maus-IgGκ BP	Rekombinant	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Deutschland

4.1.4.4 Hergestellte Lösungen der sekundären Antikörper

Tabelle 8: Hergestellte Lösungen der sekundären Antikörper nach Hersteller

Hersteller des sekundären Antikörpers	Inhaltsstoffe	Zusammensetzung
Santa Cruz Biotechnology Inc.	Sekundärer Antikörper	2 µL
	Magermilchpulver	500 mg
	Steptactin	0,5 µL
	TBS-T	10 mL
Southern Biotechnology Associates, Inc	Sekundärer Antikörper	1,5 µL
	Magermilchpulver	500 mg
	Steptactin	0,5 µL
	TBS-T	10 mL

4.1.5 Primer

Tabelle 9: Verwendete Primer; angegebene Sequenzen beziehen sich auf den Forward- (F) und Reversed-Primer (R)

Target	Sequenz (5'-3')	Hersteller
Human β-Actin	F: GGACTTCGAGCAAGAGATGG	Biomol GmbH; Hamburg, Deutschland
	R: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	
Human GAPDH	F: GAGTCAACGGATTTGGTCGT	Biomol GmbH; Hamburg, Deutschland
	R: TTGATTTTGGAGGGATCTCG	
Human Slfn11	F: AGCCTGACAACCGAGAAATGGG	OriGene Technologies GmbH; Herford, Deutschland
	R: GGAGTACTACTGGTCTGCTAAGG	

4.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96-PCR plate full-skirted, low profile, white, with sealing film	Brand GmbH&Co. Wertheim, Deutschland
CASY [®] cups	Schäfe System GmbH Reutlingen, Deutschland
CELLSTAR [®] Röhrchen 15 mL, steril	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR [®] Röhrchen 50 mL, steril	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Direct-zol TM RNA Miniprep	Zymo Research Europe GmbH Freiburg, Deutschland
Einmalspritzen NORM-JECT [®] (20 mL)	Henke-Sass, Wolf GmbH Tuttlingen, Deutschland
Eppendorf [®] Safe-Lock Tubes 1,5 mL, PCR clean, farblos	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Filterpapier	Sartorius Stedim Biotech Göttingen, Deutschland
Isopore TM Membranfilter (0,1 µm)	Millipore GmbH Schwalbach, Deutschland
Kryoröhrchen PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Microseal [®] „B“ Film für PCR Platten	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Mini-Protean [®] TGX Stain-Free TM Elektrophorese Gel 10 %, 10/12 Wells	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Mini-Protean [®] TGX Stain-Free TM Elektrophorese Gel 12 %, 10/12 Wells	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Mini-Protean [®] TGX Stain-Free TM Elektrophorese Gel 4-20 %, 10/12 Wells	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Mini-Protean [®] TGX Stain-Free TM Elektrophorese Gel 7,5 %, 10/12 Wells	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Multiply [®] -Pro Gefäß 0,5 ml, PP DNase/RNase-free	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Nunc TM F96 MicroWell TM	Thermo Fisher Scientific GmbH
Polystyrolplatte, schwarz	Langensfeld, Deutschland
Parafilm [®]	Pechiney plastic packaging Menasha, USA
Pipettenspitzen (5 mL), Plastibrand [®] , natur	BRAND GmbH & Co.KG Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen RAININ Tips LTS 1000 µL	Mettler-Toledo GmbH Oakland, USA
Pipettenspitzen RAININ Tips LTS 20 µL	Mettler-Toledo GmbH Oakland, USA
Pipettenspitzen RAININ Tips LTS 250 µL	Mettler-Toledo GmbH Oakland, USA
Pipettenspitzen SurPhob Gelloader 200 µl	Biozym Scientific GmbH Oldendorf, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen TipOne® 10/20 µL, natur	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne® 1000 µL, natur	Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne® 200 µL, gelb	Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland
Pipettierreservoirs, PS, 50 mL	Ratiolab GmbH Dreireich, Deutschland
Pipettierreservoirs, PS, 50 mL, steril	Ratiolab GmbH Dreireich, Deutschland
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäß (0,6 mL)	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 mL) braun	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (2,0 mL)	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
RNaseZap™	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Sapphire PCR Reaktionsgefäße (0,2 mL), natur	Greiner Bio-One, GmbH Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter (0,2 µm)	Whatman GmbH Dassel, Deutschland
TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 96 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
U-Platten Microplatte, 96-Well, PS, U-Boden, transparent	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
VWR Blotting Pad 707	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Zellkulturflasche T175 (175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche T25 (25 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche T75 (75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zellstoff	Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, USA
Zymo-Spin™ IIC Column	Zymo Research Irvine, CA, USA

4.1.7 Geräte

Tabelle 11: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Accu-Jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH Balingen-Frommern, Deutschland
Analysenwaage Mettler Toledo Classic Plus AB135-S	Mettler-Toledo GmbH Giessen, Deutschland
Autoklav Systec V-95	Systec GmbH Linden, Deutschland
Becherglas 500 mL	BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
ChemiDoc™ XRS + System	Bio-Rad Laboratories München, Deutschland
CO ₂ -Incubator MCO-170AICUV-P	Panasonic Healthcare Corporation Tokio, Japan
Colibri Microvolume Spectrometer	Berthold Technologies Bad Wildbad, Deutschland
Guava® easyCyte HT 11 Flow Cytometer	EMD Millipore Corporation Hayward, CA, USA
Freezer ultra-Low Temperature MDF- DU502VH-PE	PHC Europe B. V. Etten-Leur, Niederlande
Freezer ultra-Low Temperature MDF- 1156-PE	PHC Europe B. V. Etten-Leur, Niederlande

Gerät	Hersteller
Heizplatte ARE Heating magnetic stirrer	VELP scientifica Usmate Belate, Italien
Inkubationshaube TH 15	Edmund Bühler GmbH Bodelshausen, Deutschland
Laborschüttler KS-15	Edmund Bühler GmbH Hechingen, Deutschland
Laminar-Air-Flow-Werkbank Heraeus Herasafe HSP 12	Heraeus Holding GmbH Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop Wilovert Standard HF/K	Helmut Hund GmbH Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG Kelheim, Deutschland
Messkolben BLAUBRAND® Klasse A (50 mL)	Carl Roth GmbH & Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Messkolben BLAUBRAND® Klasse A (100 mL)	Carl Roth GmbH & Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Messkolben BLAUBRAND® Klasse A (250 mL)	Carl Roth GmbH & Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Blotting Module	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Multiskan® EX	Thermo Scientific GmbH Langenselbold, Deutschland
Multiwellreader FLUOstar™ OPTIMA	BMG Labtech GmbH Offenburg, Deutschland
Pinzette	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Pipette (2,5 µl) Research®	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipette (10 µl) Research®	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipette (20 µl) Research®	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipette (100 µl) Research®	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipette (200 µl) Research®	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipette (1000 µl) Research®	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

Gerät	Hersteller
Pipette (5000 µl) Research [®]	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipette Mehrkanal-Mikroliterpipette Transferpipette [®] -8 electronic	BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Pipette Mehrkanal-Mikroliterpipette Transferpipette [®] -12 electronic	BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Pipette RAININ Pipet-Lite [™] XLS+ (0,1-2 µl)	Mettler-Toledo GmbH Leverkusen, Deutschland
Pipette RAININ Pipet-Lite [™] L- 2XLS+ (0,5-10 µl)	Mettler-Toledo GmbH Leverkusen, Deutschland
Pipette RAININ Pipet-Lite [™] L- 2XLS+ (2-20 µl)	Mettler-Toledo GmbH Leverkusen, Deutschland
Pipette RAININ Pipet-Lite [™] L- 2XLS+ (10-100 µl)	Mettler-Toledo GmbH Leverkusen, Deutschland
Pipette RAININ Pipet-Lite [™] L- 2XLS+ (20-200 µl)	Mettler-Toledo GmbH Leverkusen, Deutschland
Pipette RAININ Pipet-Lite [™] L- 2XLS+ (100-1000 µl)	Mettler-Toledo GmbH Leverkusen, Deutschland
Präzisionswaage Kern PCB	Kern & Sohn GmbH Balingen-Frommern, Deutschland
Purelab [®] Plus Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater Celle, Deutschland
Realtime PCR CFX Opus 96	Bio-Rad Laboratories München, Deutschland
Spatel	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer comfort (IsoTherm 1,5 mL)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Trans-Blot [®] Turbo [™] Transfer System	Bio-Rad Laboratories München, Deutschland
Trockenschrank 60°C	Heraeus Holding GmbH Hanau, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex [®] Super RK 103 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG Berlin, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific industries New York, USA
Vortex ZX3	VELP scientifica Usmate Belate, Italien
Wasseraufbereitungsanlage Elix	Millipore GmbH Schwalbach, Deutschland

Gerät	Hersteller
Zellzähler CASY® 1 Model TT	Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Mikro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland

4.1.8 Software

Tabelle 12: Verwendete Software

Software	Hersteller
Ascent Software™ v2.6	Thermo Labsystems Oy 1996-2002
Bio-Rad CFX Maestro 2.2	Bio-Rad Laboratories München, Deutschland
BioRender®	Biorender 2022 Toronto, Kanada
ChemDraw 20.1	Perkin Elmer LAS GmbH Rodgau, Deutschland
Citavi 6.11.0	Swiss Academic Software GmbH; Wädenswil, Schweiz
CompuSyn®	ComboSyn, Inc. Paramus, NJ, USA
FlowJo™ V10	Becton, Dickinson and Company Ashland, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc La Jolla, USA
GuavaSoft	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Image Lab v5.2.1™	Bio-Rad Laboratories Hercules, USA
Microsoft® Excel 2016 für Windows	Microsoft Corporation Redmond, USA
Microsoft® PowerPoint 2016 für Windows	Microsoft Corporation Redmond, USA
Microsoft® Word 2016 für Windows	Microsoft Corporation Redmond, USA
Microsoft® Windows 10	Microsoft Corporation Redmond, USA

Software	Hersteller
Optima v.2.20R2	BMG Labtech GmbH Ortenberg, Deutschland
Sciebo 4.2.0	ownCloud GmbH Nürnberg, Deutschland
ZEN Mikroskopie Software	Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, Deutschland

4.2 Zellkultur

Alle im Folgenden beschriebenen Zelllinien wurden in entsprechenden Kulturflaschen mit RPMI1640-Medium mit dem Zusatz von 10 % FKS sowie 1 % einer Mischung der Antibiotika Penicillin und Streptomycin in einem Brutschrank bei konstanten 37 °C sowie 5 % CO₂ kultiviert. Mit regelmäßigen, lichtmikroskopischen Kontrollen wurde die Konfluenz des Zellrasens überprüft und verbrauchtes Zellmediums durch frisches ausgetauscht. Zum Schutz vor Mutationen der Zellen, welche die weiteren Arbeiten beeinflusst hätten, wurden die Zelllinien jeweils nur über 15 Passagen kultiviert.

Jegliche Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgten zur Vermeidung einer Kontamination mit Fremdorganismen unter einer sterilen *Laminar-Airflow*-Werkbank. Jegliche Geräte zur Verwendung für die Arbeiten wurden vor dem Einbringen in die Werkbank mit einer 60 %-igen Isopropanollösung desinfiziert. Zudem wurden die Zellkulturen regelmäßig auf die Anwesenheit von Mykoplasmen überprüft. Die Zelllinien mit einer erworbenen Cisplatinresistenz erhielten zu ihrer Aufrechterhaltung in regelmäßigen Abständen den Zusatz von 3 µM Cisplatin zum Zellmedium. Anschließend wurde die Zelllinie für eine weitere Passage ohne Zytostatikum kultiviert, um die nachfolgenden Versuche nicht durch dessen Anwesenheit zu manipulieren.

4.2.1 Zelllinien

4.2.1.1 A2780 und A2780cis

Die A2780-Zellen und ihr cisplatinresistenter Subtyp A2780cis entstammen dem Primärtumor einer unbehandelten Patientin und wurden von der ECACC erworben

(Katalognr.: A2780: 93112519; A2780cis: 93112517) [309]. Sie sind histologisch nicht spezifiziert, nach neueren Genomanalysen jedoch dem Subtyp des endometrioiden Ovarialkarzinoms zuzuordnen [310]. In diesen Zellen liegen keine Mutationen im TP53- sowie den BRCA-Genen vor. Zudem weisen sie eine Überexpression von PARP1 auf [311]. Mit beiden Zelllinien wurde mittels siRNA-Transfektion ein *ATR-knockdown* erzeugt, was in Abschnitt 4.9 genauer beschrieben wird.

4.2.1.2 W1 und W1CR

Die Ovarialkarzinomzelllinie W1 entstammt einer 54-jährigen Patientin mit der Diagnose eines serösen Adenokarzinoms der FIGO Stufe III. Zudem war der Tumor schlecht ausdifferenziert und mit einem *grading* von drei klassifiziert, was diese Zelllinie dem Subtyp des HGSOC zuzuordnen lässt [312]. Der cisplatinresistente Subtyp W1CR wurde durch die Exposition inkrementell steigender Konzentrationen (final: 1000 ng/mL) von Cisplatin erzeugt [313]. Beide Klone wurden dankenswerterweise von Prof. Radosław Januchowski (*Poznań University of Medical Sciences/ University of Zielona Góra*) zur Verfügung gestellt. Mit beiden Zelllinien wurde mittels siRNA-Transfektion ein *ATR-knockdown* erzeugt, was in Abschnitt 4.9 genauer beschrieben wird.

4.2.1.3 Kuramochi und Kuramochi^rCDDP²⁰⁰⁰

Die Kuramochi-Zellen wurden von Dr. Florian Rothweiler und Prof. Jindrich Cinatl aus dem Universitätsklinikum Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt. Sie wurden ursprünglich einer japanischen Patientin entnommen [314]. Nachträgliche Untersuchungen der Histologie sowie des Genoms lassen die Kuramochi-Zellen dem Subtyp des HGSOC zuordnen. Sie weisen eine HGSOC-typische Mutation von p53 sowie von BRCA2 auf. Zudem liegt in ihnen PARP1 überexprimiert vor [311]. Nach Domcke et al. sind sie von 47 untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien jene mit der höchsten Übereinstimmung des HGSOC-Subtyps [315]. Der cisplatinresistente Subtyp Kuramochi^rCDDP²⁰⁰⁰ entstammt der Sammlung resistenter Krebszelllinien (RCCL) der Universität Kent (Großbritannien) von u. a. Prof. Martin Michaelis [316, 317]. Die Resistenzzüchtung erfolgte final mit 2000 ng/mL Cisplatin.

4.2.1.4 EFO21

Die EFO21-Zellen wurden ebenfalls von Dr. Florian Rothweiler und Prof. Jindrich Cinatl aus dem Universitätsklinikum Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt. Sie wurden ursprünglich als seröses Adenokarzinom klassifiziert, sind nach genomischer Analyse allerdings eher dem klarzelligen Ovarialkarzinom zugehörig [310, 318]. Sie weisen eine p53-Mutation sowie Überexpressionen von ATM und PARP1 auf [311]. Zudem haben sie eine deutlich höhere Toleranz gegen Cisplatin als die anderen Wildtypzellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden und dienen deshalb als Modell für intrinsisch resistente Tumore.

4.2.2 Inkulturnahme

Die Zelllinien wurden in Kryokonservaten (*Backups*) in einem *Ultrafreezer* bei -150 °C aufbewahrt. Für die Inkulturnahme wurde das entsprechende *Backup* aufgetaut und die darin befindliche Zellsuspension schnellstmöglich in eine Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium pipettiert. Je nach Zelllinie und Zellzahl in den *Backups* wurden die Zellen in einer kleinen (25 cm³) oder mittelgroßen (75 cm³) Flasche angezogen und beim Erreichen von ca. 80 % Konfluenz in die nächstgrößere überführt, bis sie schließlich in der größtmöglichen Ausführung (175 cm³) aufbewahrt wurden.

4.2.3 Subkultivierung

Wenn der Zellrasen eine Konfluenz von ca. 80 % erreichte, wurde zur Vorbeugung von Selektionen oder dem Absterben eine Subkultivierung vorgenommen. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer EDTA-Trypsin-Lösung für 2 – 5 min (je nach Zelllinie) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator vom Flaschenboden abgelöst. Danach wurden sie mit Zellmedium herausgespült und für 4 min bei 450 × g und 4 °C zentrifugiert. Schließlich konnte der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert werden. Abschließend konnten die Zellen gezählt und für nachfolgende Experimente verwendet oder ein entsprechend kleiner Anteil von ihnen in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt werden.

4.2.4 Kryokonservierung

Zur Aufbewahrung der Zellen über einen längeren Zeitraum erfolgte die Herstellung von *Backups*, die dann im *Ultrafreezer* bei -150 °C lagerten. Dafür wurden sie wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben aus den Flaschen gelöst und pelletiert. Anschließend wurden sie gezählt und je 2 Mio. Zellen pro *Backup* in Kryomedium resuspendiert und in Kryogefäße aliquotiert. Da das Kryomedium toxisches DMSO enthält, wurden sie danach umgehend eingefroren. Für die Herstellung der *Backups* wurden bevorzugt niedrig passagierte Zellen verwendet, um ihre originalen Eigenschaften aufrecht zu erhalten.

4.2.5 Zellzahlbestimmung

Da die meisten der durchgeführten Experimente die Einstellung einer genauen Zellzahl im Sinne der Vergleichbarkeit voraussetzten, mussten die Zellen zunächst quantifiziert werden. Dafür wurden die aus den Kulturflaschen gelösten Zellen (siehe 4.2.3) in 10 mL Medium resuspendiert und anschließend 20 μL dieser Suspension in ein CASY[®]-Röhrchen mit 10 mL vorgelegtem, sterilfiltriertem CASY[®]-Ton pipettiert. Nun konnte die Zellsuspension am CASY[®] 1 Modell TT vermessen werden. Dieses saugt die Zellen mittels einer Kapillare an einer Pore vorbei. An beiden Seiten jener Pore befinden sich Elektroden in einer Elektrolytlösung. Durch die vorbeifließenden Zellen wird an ihnen, in Abhängigkeit des Volumens und der daraus resultierenden, verdrängten Elektrolytmenge, eine Veränderung des elektrischen Widerstands ausgelöst. Diese kann über eine Messung der elektrischen Spannung detektiert werden, die mit Größe und Menge der Zellen korreliert. Somit können die Zellen nicht bloß quantifiziert, sondern anhand ihres Durchmessers auch in eine lebendige und in eine tote Fraktion separiert werden. In folgenden Versuchsabläufen wurde dann stets mit der Zahl vitaler Zellen weitergearbeitet, die noch auf die gesamte Anzahl in der ursprünglich hergestellten Suspension hochgerechnet werden musste.

4.3 MTT-Zellviabilitätsassay

4.3.1 Funktionsprinzip

Das MTT-Salz ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) ist ein gelber, wasserlöslicher Farbstoff, welcher durch Reduktasen stoffwechselaktiver Zellen in das violette, wasserunlösliche Formazan umgesetzt wird. Gibt man eine bestimmte Menge MTT zu einer Zellkultur, korreliert die Menge des entstehenden Formazans mit der Viabilität der Zellen [319, 320]. Die Messung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm, was nahezu dem Absorptionsmaximum des Formazans entspricht, welches zuvor in DMSO gelöst wurde. Zudem erfolgte eine Hintergrundmessung bei 690 nm, deren Werte von der Absorptionsmessung subtrahiert wurden. Es resultierte eine sigmoidal verlaufende Viabilitätskurve, an deren Wendepunkt der IC₅₀-Wert abgelesen werden konnte. Dieser beschreibt die Konzentration einer Behandlung, bei der 50 % der Zellen absterben.

4.3.2 Versuchsablauf

Zunächst wurden die Zellen wie in 4.2.3 beschrieben aus ihren Kulturflaschen gelöst, pelletiert und gezählt (4.2.5). Anschließend erfolgte die Aussaat in durchsichtige 96-*well* Platten mit einer Konzentration von 10.000 Zellen/*well* für W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen sowie 5.000 Zellen/*well* für Kuramochi/Kuramochi¹CDDP²⁰⁰⁰ und EFO21. Die variierenden Zahlen sind der unterschiedlichen Durchmesser der jeweiligen Zelllinien geschuldet. Die Zellen wurden in je 80 µL Medium in den inneren 60 *wells* kultiviert. Die äußeren *wells* enthielten nur 90 µL PBS als Verdunstungsschutz (Siehe Abbildung 8). Nun wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 10 µL einer Zytostatikallösung in von links nach rechts halblogarithmisch steigenden Konzentrationen (für Cisplatin bspw. 10^{-7,5} – 10⁻⁴ mol/L) in jedes *well* außer der ersten und letzten Reihe. In diese erfolgte die Zugabe von 10 µL PBS als Negativkontrolle sowie von DMSO als Totkontrolle. Jede Konzentration wurde als technisches Triplikat gemessen. Zudem erfolgte die Zugabe von weiteren 10 µL PBS in jedes *well*, um ein Gesamtvolumen von 100 µL

zu erzielen, wenn keine Kombinationsbehandlung (Siehe 4.3) vorgenommen wurde. Anschließend inkubierten die Zellen für 72 h im Brutschrank. Schließlich wurden 20 μL einer auf 5 mg/mL eingestellten MTT-Lösung in jedes *well* pipettiert und für 1-2 h inkubiert, da die einzelnen Zelllinien den Farbstoff unterschiedlich schnell umsetzten. Wegen der Wasserunlöslichkeit der entstandenen Formazankristalle, mussten die Platten auf einer Zellstoffunterlage ausgeklopft und die am Plattenboden haftenden, violetten Kristalle anschließend in 200 μL DMSO gelöst werden. Nun konnten die Platten am Multiwellreader Multiscan EX[®] bei 570 nm und 690 nm vermessen werden.

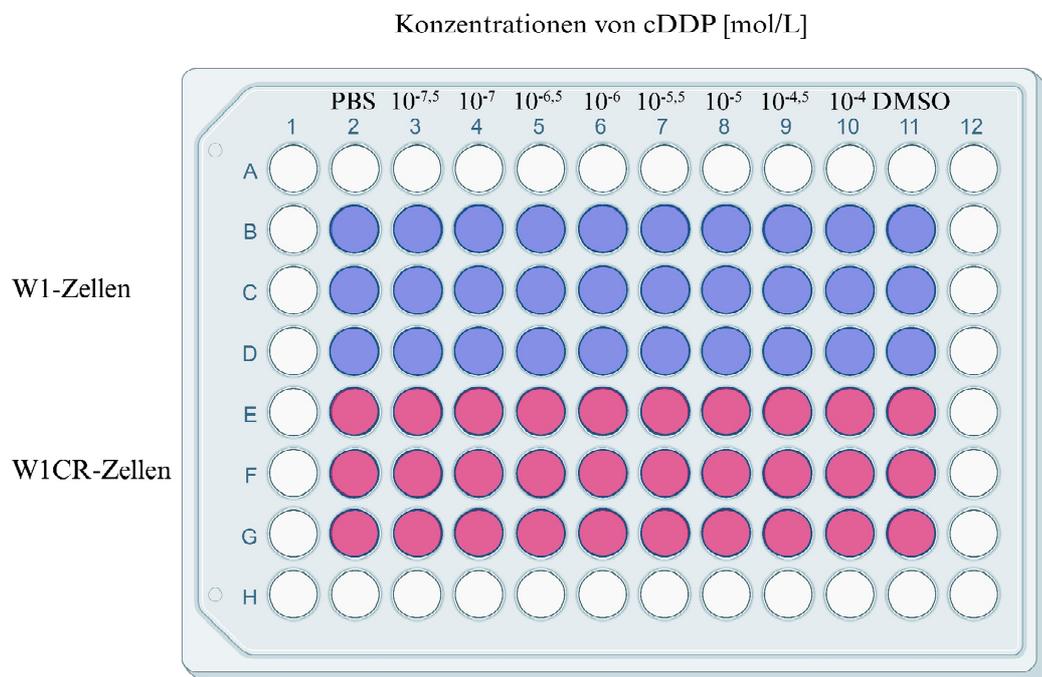


Abbildung 8: Belegung einer Platte des MTT-Assays am Beispiel von W1- und W1CR-Zellen unter Cisplatinbehandlung. Erstellt mit BioRender.com.

4.3.3 Kombinationsbehandlungen

Um auf Synergien, additive oder antagonistische Effekte zwischen zwei Substanzen zu testen, wurden zahlreiche Kombinationsbehandlungen durchgeführt. Dafür erfolgte die Vorbehandlung der ausplattierten Zellen mit 10 μL einer Inhibitorlösung mit fixer Konzentration in allen *wells* 4 h vor der Zytostatikabehandlung. Dafür entfiel die Zugabe der 10 μL PBS, abgesehen von

der Negativkontrolle. Die eingesetzte Konzentration des jeweiligen Inhibitors wurde durch eine vorangegangene Bestimmung der IC₅₀-Werte als Monobehandlung ermittelt. Sie wurde stets so gewählt, dass die entsprechende Substanz in der eingesetzten Dosis keine oder eine nur geringfügig toxische Wirkung aufwies, um vorrangig synergistische Effekte aufzudecken.

4.3.3.1 Vorbehandlung mit Goldverbindungen oder DDR-Inhibitoren

Für die Untersuchungen der Kombinationen aus Goldverbindungen und den Inhibitoren des DDR-Signalwegs mit Cisplatin oder PARPi wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, folgenden Konzentrationen zur Vorbehandlung eingesetzt:

Tabelle 13: Verwendete Verbindungen, ihr zelluläres Ziel und ihre eingesetzte Konzentration für die subtoxische Vorbehandlung

Verbindung	Target	Konzentration [μ M]
Auranofin	TrxR	0,1
MC3	TrxR	0,01
UB-1	TrxR	1
SCH772984	ERK 1/2	0,1 und 1
AZD1390	ATM	1 und 2,5
Elimusertib	ATR	0,01 und 0,001
SCH900776	CHK1	1 und 0,1
Adavosertib	WEE1	0,1 und 0,01

4.3.3.2 Vorbehandlung mit epigenetisch wirksamen Substanzen

Diese Vorbehandlungen zielten darauf ab, die Reexpression der Helikase Slfn11 zu induzieren. Deshalb wurde bei diesen Verbindungen bereits in der Zellkultur mit der Vorbehandlung begonnen. Die Konzentration, die in die Kulturflaschen gegeben wurde, war höher als die letztendlich in die Platten pipettierte und richtete sich ebenfalls nach der Toxizität als Monobehandlung. Folgende Mengen wurden verwendet:

Tabelle 14: Verwendete epigenetisch wirksame Verbindungen, ihr zelluläres Ziel und ihre eingesetzte Konzentration für die Vorbehandlung in der Kulturflasche und Platte

Verbindung	Target	Konzentration in Flaschen [μM]	Konzentration in Platten [μM]
Decitabin	DNMT	5	1
Entinostat	HDAC	1	0,1
Tazemetostat	EZH2	10	5

4.3.4 Auswertung

Alle Messungen der IC_{50} von Cisplatin oder den jeweiligen PARPi und Goldverbindungen, ob in Kombination oder als Monobehandlung, wurden mindestens als biologisches Triplikat durchgeführt, bei dem zusätzlich jede eingesetzte Konzentration in einem technischen Triplikat vorlag. Die Erstellung der resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurven erfolgte mit der Software GraphPad Prism 8 durch nicht-lineare Regression und eine Vier-Parameter-Gleichung. Dafür wurde zunächst die Absorption gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des eingesetzten Wirkstoffs aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Normalisierung bei der die höchste Absorption der jeweiligen Messung als 100 % Viabilität festgelegt wurde. Anhand der resultierenden sigmoiden Kurve konnte am Wendepunkt der IC_{50} -Wert errechnet werden. Für die Tests auf statistische Signifikanz wurde der entsprechende pEC_{50} -Werts verwendet. Diesen erhielt man durch die Berechnung des negativ dekadischen Logarithmus des IC_{50} -Werts.

Zur Ermittlung der Effektivität einer Kombinationsbehandlung wurde der *Combination Index* (CI) nach Chou-Talalay mit der Software CompuSyn errechnet [321]. Ist dieser größer eins, handelte es sich um einen Antagonismus. $\text{CI} = 1$ stellte einen additiven Effekt und $\text{CI} < 1$ einen Synergismus dar. Zudem wurden diese Werte und weitere grafische Darstellungen von Kombinationsbehandlungen mit SynergyFinder Plus errechnet [322].

4.4 Gold-Atomabsorptionsspektroskopie

Mittels dieser Methode wurde die zelluläre Aufnahme der Goldverbindungen in W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen ermittelt. Dafür wurden je 2 Mio. Zellen in Kulturflaschen ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit 0,1 μM Auranofin oder 0,01 μM MC3 für 72 h. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit einer 0,02 % EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst und pelletiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgten zwei Waschschrte mit je 1 mL PBS und anschließender Zentrifugation. Der Überstand wurde nun erneut abgesaugt und die Zellpellets bei -20 °C aufbewahrt und schließlich zur Arbeitsgruppe von Prof. Ingo Ott an die TU Braunschweig verschickt. Dort erfolgte die Vermessung des intrazellulären Goldgehalts bezogen auf das Gesamtprotein mittels eines *High-Resolution continuum source* Atomabsorptionsspektrometers in Triplikaten. Der genaue Versuchsablauf für diese Messung ist in [323] beschrieben.

4.5 ROS-Assay

Die Bildung von intrazellulären ROS unter der Behandlung mit den Goldverbindungen sowie Cisplatin wurde in W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen mittels eines fluorimetrischen Assays untersucht (MAK143). Dafür wurden jeweils 15.000 Zellen/*well* in eine schwarze 96-*well* Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit 0,1 μM Auranofin, 0,01 μM MC3 oder 1 μM cDDP als subtoxische Dosen oder mit der jeweiligen IC_{50} der einzelnen Substanzen sowie PBS als Negativkontrolle in technischen Duplikaten. Die Messungen erfolgten nach 4 h und 24 h Inkubationszeit am FLUOstar™ OPTIMA bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Fluoreszenzemission von 520 nm. Das Kit enthielt einen Farbstoff, der eine Stunde vor der ersten Messung in jedes *well* gegeben wurde und dort mit den entstanden ROS zu einem fluoreszierenden Produkt reagierte. Dieses konnte dann bei den genannten Wellenlängen detektiert werden. Für die Auswertung wurde jeweils der Quotient der Fluoreszenzintensität nach 24 h und

nach 4 h berechnet, um den intrazellulären Anstieg der ROS unter den einzelnen Behandlungen zu ermitteln.

4.6 Proteinexpressionsanalytik

4.6.1 Lysatgewinnung

Für die Quantifizierung der Expressionen einzelner Proteine unter verschiedenen Einflüssen wurden die Zellen in Kulturflaschen ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten die Behandlungen mit den in Tabelle 15 aufgelisteten Wirkstoffen in den dort angegebenen Konzentrationen. Für die Behandlungen zur Untersuchung der Proteinexpressionen wurden jeweils subtoxische Konzentrationen der genannten Verbindungen eingesetzt, um während der Inkubation keine Selektion unter der Zellpopulation vorzunehmen. Die Inkubationszeit betrug, wenn in den Abbildungen im Kapitel 5 nicht anders gekennzeichnet, stets 24 h.

Tabelle 15: Eingesetzte Verbindungen, deren zelluläres Target und die verwendete Konzentration für die Generierung von Zelllysaten

Verbindung	Target	Konzentration [μM]
Auranofin	TrxR	0,1
MC3	TrxR	0,01
cDDP	DNA	1
AZD1390	ATM	10
Elimusertib	ATR	0,01
Niraparib	PARP	1
Decitabin	DNMT	1 und 5
Entinostat	HDAC	0,1; 1 und 5
Tazemetostat	EZH2	5 und 10

Danach wurden die Zellen mittels EDTA vom Flaschenboden abgelöst, da Trypsin aufgrund seiner proteolytischen Eigenschaften für die nachfolgenden Experimente ungeeignet war. Nach einer Zentrifugation erfolgte ein Waschschrift mit PBS, gefolgt von erneuter Zentrifugation und gründlichem Absaugen des Überstands.

Nun wurde frisch hergestellter Lysepuffer auf das verbliebene Zellpellet pipettiert. Das zugegebene Volumen war dabei abhängig von der im Pellet enthaltenen Zellzahl. Der Lysepuffer bestand hauptsächlich aus *Cell Extraction Buffer*, der für die Auflösung der Zellmembran sowie die Präzipitation von DNA und RNA sorgte. Die ebenfalls enthaltenen Komponenten PMSF und der *Protease Inhibitor Cocktail* verhinderten unterdessen, dass intrazelluläre Proteasen die gewünschten Proteine abbauen. Zudem wurde ab der Zugabe des Lysepuffers dauerhaft auf Eis gearbeitet, um einer Denaturierung des Proteoms vorzubeugen. Die nun gelösten Zellpellets wurden in Eppendorf Gefäße überführt und auf dem Thermomixer für eine halbe Stunde bei 4 °C und 800 Umdrehungen pro Minute lysiert. Schließlich wurde die Suspension bei $16.000 \times g$ für 10 min zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

4.6.2 BCA-Assay

Für die nachfolgenden Untersuchungen der Proteinexpression der in 4.6.1 gewonnen Proben musste zunächst ihr Gesamtproteingehalt bestimmt werden. Dafür wurden aus jedem Lysat vier Verdünnungen hergestellt (1:10, 1:20, 1:50 und 1:100) von denen je 20 µL als Duplikat in eine 96-well Platte pipettiert wurden. Zusätzlich musste eine Kalibriergeraden aus sechs Proteinstandards unterschiedlicher Konzentration angefertigt werden, aus der beim Auswerten die zu analysierenden Proben quantifiziert werden konnten. Zur Überprüfung ihrer Güte gab es zusätzlich drei Qualitätskontrollen definierten Proteingehalts, deren Messwerte um nicht mehr als 5 % von ihrer tatsächlichen Konzentration abweichen sollten. Die sechs Standards, drei Qualitätskontrollen und Milliporewasser als Negativkontrolle wurden ebenfalls zu je 20 µL als Duplikat in die Platte pipettiert. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte anschließend durch die Zugabe von 200 µL des Bicinchoninsäure (BCA)-Reagenz und einstündiger Inkubation bei 60 °C im Trockenschrank. Das Reagenz besteht zu 50 Teilen aus der BCA und zu einem Teil aus einer Kupfer(II)-sulfat Lösung. Das Messprinzip beruht auf einer Reduktion des Cu^{2+} durch bestimmte Aminosäuren im Lysat. Das entstandene Cu^+ bildet mit der BCA einen Chelatkomplex, dessen Absorption bei 570 nm am

Multiskan EX[®] Plattenreader vermessen werden konnte. Dabei korrelierten die Absorptionswerte mit enthaltenem Protein [324].

4.6.3 SDS-Gelelektrophorese

Bevor die jeweiligen Zielproteine detektiert werden konnten, mussten die Lysate zunächst mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Es standen vorgefertigte Gele unterschiedlicher Polyacrylamidkonzentration zur Auswahl. Für größere Proteine wurde ein dünneres 7,5 %-Gel verwendet, für kleine Proteine ein konzentrierteres 12 %-Gel und für alle anderen Zielproteine 10 %-Gele.

Bei der Durchführung wurden zunächst die aus dem BCA-Assay errechneten Konzentrationen genutzt, um die Volumina der einzelnen Proben zu errechnen, die 20 µg Gesamtprotein entsprachen. Diese wurden dann zu gleichen Teilen mit Laemmli-2×-Puffer versetzt, für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend weitere 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beides bewirkte die Denaturierung größerer Proteinkomplexe, wobei der Puffer zusätzlich die Reduktion von Disulfidbrücken durch das enthaltene β-Mercaptoethanol induziert. Zusätzlich enthielten sowohl Gel als auch Laemmli-Puffer SDS, was sich in konstanten Mengen an die Proteine anlagert, diese entfaltet und mit dessen negativer Ladung die der Aminosäuren überdeckt. Nachdem die Proben und ein Größenstandard in die Geltaschen pipettiert und eine Spannung von 200 V angelegt wurde, wanderten die Proteine aufgrund des resultierendem, gleichen Masse-Ladungsverhältnis in Richtung Anode. Durch die gleiche Gesamtladung erfolgte ihre Auftrennung dabei nur nach der Molekülmasse. Die Proben passierten zunächst das grobmaschige Sammelgel, in dem sie zu einer dünnen Bande aufkonzentriert wurden. Die Einengung erfolgte zwischen den im Laufpuffer enthaltenen Chloridionen sowie Glycin, das aufgrund des pH-Werts als Zwitterion vorlag und deshalb hinter den negativ geladenen Proben blieb. Anschließend wanderten alle Komponenten in das engmaschigere Trenngel, wo sich die Protein-SDS-Komplexe nach ihrer Masse auftrennten [325]. Für die Orientierung der jeweiligen Masse lief in einer Geltasche ein Größenstandard mit. Zudem enthielt der Laemmli-Puffer Bromphenolblau, wodurch man die Lauffront sehen und den Stromfluss rechtzeitig, vor dem

Durchlaufen des Gels, unterbrechen konnte. Die Laufzeit der Gele variierte je nach Acrylamidkonzentration zwischen 30 und 50 min.

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel entnommen, in Transferpuffer gelegt und eine *stainfree* Detektion am ChemiDoc™ XRS+ System durchgeführt. Diese basiert auf der Wechselwirkung von Trihalo-Komponenten des Gels mit Tryptophanen der Proteine des Lysats. Durch die Anregung mit UV-Strahlen wurde ein Fluoreszenzsignal erzeugt, dessen Intensität mit der gesamten Proteinmenge in der jeweiligen Geltasche korreliert. Bei der Auswertung des fertigen Western Blots wurde das entstandene Bild für die Normalisierung der Zielproteinmenge genutzt.

4.6.4 Western Blot

Dieses Verfahren diente im Anschluss an die SDS-PAGE der Visualisierung und nachfolgender Quantifizierung der Zielproteine. Dafür erfolgte zunächst die Übertragung des Gels auf eine PVDF-Membran. Diese musste aufgrund ihrer hohen Lipophilie in Methanol gelegt werden, um die Benetzbarkeit zu erhöhen. Anschließend erfolgten Waschschrte in demineralisiertem Wasser und Transferpuffer. Dann konnten die Proteine aus dem Gel mit einem vorgefertigten Programm des Trans-Blot® Turbo™ Systems auf die Membran übertragen werden. Dafür wurde in dessen Einsätze zunächst ein mit Transferpuffer benetztes Filterpapier gelegt, gefolgt von Membran und Gel sowie einem weiteren Filterpapier. Bei der Reihenfolge war zu beachten, dass die Membran auf Anoden- und das Gel auf Kathodenseite lag, da die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe nach Anlegen der Spannung erneut Richtung Anode wanderten. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran in 50 mL einer Blockierungslösung gelegt und für eine Stunde geschüttelt. Das darin enthaltene Milchpulver sorgte für eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Darauf folgten drei Waschschrte mit TBS-T und die Zugabe des primären Antikörpers, der gegen ein Epitop des Zielproteins gerichtet ist. Zudem wurde in die Lösung ein Antikörper gegen ein *housekeeping* Protein wie GAPDH oder α -Tubulin zugegeben. Diese Detektion diente der zusätzlichen Kontrolle einer identischen Beladung aller Geltaschen sowie des gleichmäßigen Transfers auf die Membran, da vorausgesetzt wird, dass diese *housekeeping* Proteine in allen Zelllinien annähernd gleich

exprimiert werden. Die Lösung der primären Antikörper inkubierte zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler und anschließend über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C [326].

Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte à 10 min mit TBS-T und die anschließende Zugabe des sekundären Antikörpers. Dieser bindet an den primären Antikörper, der mit dem Zielprotein verknüpft zudem mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, welche die nachfolgende Detektionsreaktion katalysiert. Nach 1,5 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgten drei Waschschrte mit TBS-T und schließlich die lichtgeschützte Zugabe einer Luminol-Peroxid Lösung zur Membran. Diese Kombination induzierte durch die Katalyse der HRP des sekundären Antikörpers eine Oxidation des Luminols zu einem Phthalat [325]. Dies konnte dann wiederum als Chemolumineszenz am ChemiDoc™ XRS+ System vermessen werden. Zudem wurde der Lösung des sekundären Antikörpers StrepTactin-HRP zugesetzt, was den mitgelaufenen Größenstandard visualisierte. Anhand dieser Tasche konnte bei der Auswertung des Versuchs die Identifizierung der Bande des Zielproteins erfolgen.

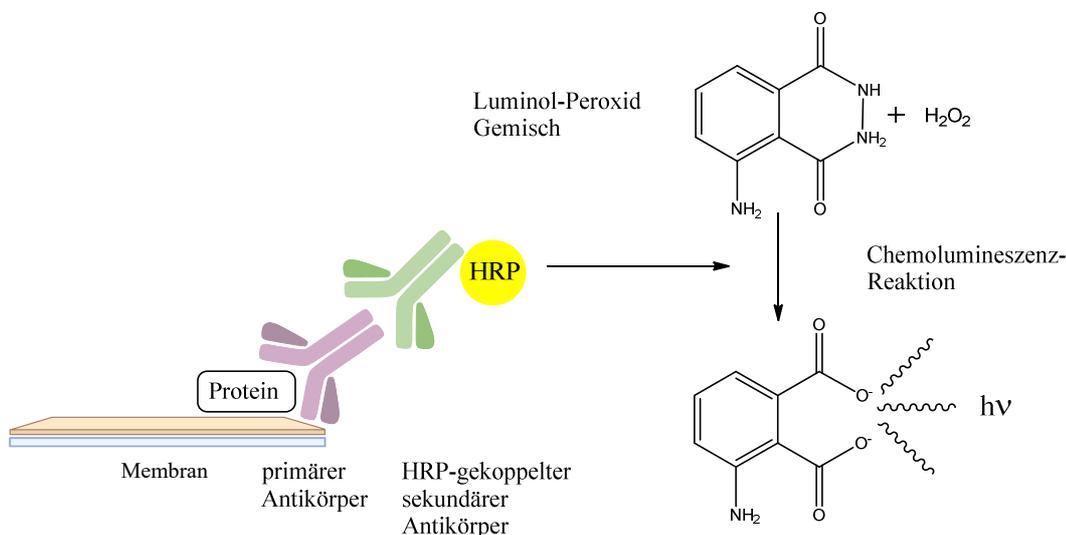


Abbildung 9: Detektionsprinzip des Western Blots

Da der Western Blot ein semi-quantitatives Verfahren ist, wurden zur Auswertung der Pixeldichten stets Normalisierungen der Zielbanden auf das gesamte Protein der jeweiligen Tasche (aus der *stainfree*-Messung) durchgeführt [326, 327]. Anschließend wurden die erhaltenen Werte noch ins Verhältnis zu einer Kontrolle gesetzt, die meist eine unbehandelte wt-Zelllinie war. Die dargestellten

Histogramme der normalisierten Proteinexpression, die aus den Pixeldichten bestimmt wurde, enthalten jeweils mindestens die Daten eines Triplikats. Außerdem werden exemplarische Bilder der Banden des Zielproteins sowie eines *housekeeping* Proteins aus demselben Experiment gezeigt.

4.7 Durchflusszytometrie

Diese Methode basiert auf der Vermessung einzelner Zellen, die durch monochromatische Laser bestrahlt werden. Das in dieser Arbeit verwendete Flow Cytometer Guava easyCyte 11HT verfügt über einen violetten ($\lambda = 405 \text{ nm}$) und einen blauen Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$). Dieses Verfahren wurde verwendet, um mit Fluoreszenzfarbstoffen behandelte Tumorzellen zu vermessen. Durch die Laserbestrahlung werden die Fluorophore angeregt und deren Emission mit den Detektoren des Geräts vermessen. Dafür saugt eine Kapillare die Zellsuspension zunächst aus den jeweiligen *wells* einer 96er-Platte in den Bereich des Lasers. Die Erfassung der Zellmorphologie erfolgt zunächst durch eine Messung des Streulichts mittels *Forward Scatter* (FSC) zur Größenbestimmung und durch den *Side Scatter* (SSC), welcher die Granularität der Zellen analysiert. Die Auftragung dieser beiden Parameter gegeneinander in einem Dotplot ermöglicht das Selektieren der zu untersuchenden Hauptpopulation, das sog. Gating (Siehe Abbildungen 10 und 11). In den weiteren Schritten wurden dann zusätzlich die Zelldupletts herausortiert und mit der resultierenden Population die Untersuchung der Farbtintensitäten unter verschiedenen Behandlungen fortgesetzt. Wenn mehrere Farbstoffe gleichzeitig genutzt werden, kann es zu einem *Spillover*-Effekt kommen, was die Überschneidung der Emissionsspektren bedeutet. Dies könnte zu falsch positiven Doppelsignalen einiger Zellen führen und muss durch eine Kompensation von *wells*, in denen nur jeweils einzelgefärbten Proben sind, in der Auswertung berücksichtigt werden.

4.7.1 Zellzyklusanalyse

Für die Einteilung einer Population in die einzelnen Phasen des Zellzyklus unter verschiedenen Behandlungen wurden zunächst jeweils 2 Mio. Zellen in

Kulturflaschen ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten die Behandlungen mit den Konzentrationen, wie sie in Tabelle 16 aufgeführt sind oder mit PBS als Negativkontrolle. Nach weiteren 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen aus den Flaschen gelöst, zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung durch die tropfenweise Zugabe einer 70 %-igen Ethanollösung zum Zellpellet unter dauerhaftem Vortexen. Nun inkubierten die Zellen für 30 min bei 4 °C im Kühlschrank. Nach erneuter Zentrifugation, Absaugen des Überstands und einer Rehydratisierung der Zellen mit PBS erfolgte die Zugabe von 50 µg/mL einer RNase-Lösung, die anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubierte. Danach wurden 3 µM des roten Farbstoffs Propidiumiodid (PI) hinzugegeben und für weitere 15 min lichtgeschützt inkubiert. Schließlich wurden die Zellsuspensionen noch zu je 150 µL als technisches Triplikat in eine durchsichtige 96-well Platte pipettiert und am Durchflusszytometer vermessen.

Tabelle 16: Verwendete Substanzen für die Zellzyklusanalyse, deren zelluläres Target und die eingesetzten Konzentrationen

Verbindung	Target	Konzentration [µM]
Auranofin	TrxR	0,1 und 1
MC3	TrxR	0,01 und 0,1
cDDP	DNA	1 und 2
AZD1390	ATM	1
Elimusertib	ATR	0,01
Niraparib	PARP	1

Das Messprinzip beruht auf einer Interkalation des PI in die DNA der Zellen. Somit kann anhand der Signalstärke ein Rückschluss auf den DNA-Gehalt der Zelle und somit der Phase des Zellzyklus getroffen werden. Befinden sich diese in der G1-Phase, erzeugt der Farbstoff ein einfaches Signal. Haben sie ihr Erbgut verdoppelt oder befinden sich bereits in der Zellteilung (G2/M-Phase), wird ein annähernd doppelt so starkes Signal pro Zelle generiert. Alle Zellen, die gerade im Prozess der DNA-Verdopplung sind (S-Phase), befinden sich in den resultierenden Plots im Übergang der beiden anderen Populationen, zwischen einfachem und doppeltem Signal (Abbildung 10). Die Zugabe der RNase verhindert dabei verfälschte

Ergebnisse durch eine zusätzliche Anfärbung der RNA [328, 329]. Die Auswertung erfolgte mittels der Software FlowJo™ V10, wo zunächst die Hauptpopulation durch das Setzen eines Gates in der Auftragung des FSC gegen den SSC erfasst wurde. Nachfolgend konnten einzelne Zellen durch Gates in der Auftragung von Fläche gegen Höhe des SSC herausortiert werden. Nun wurde die Einteilung in die Zellzyklusphasen durch eine in der Software hinterlegte Analyse durchgeführt, die auf dem Watson Pragmatic-Modell basierte [330]. Die Erfassung des PI-Signals erfolgte über den gelben Kanal.

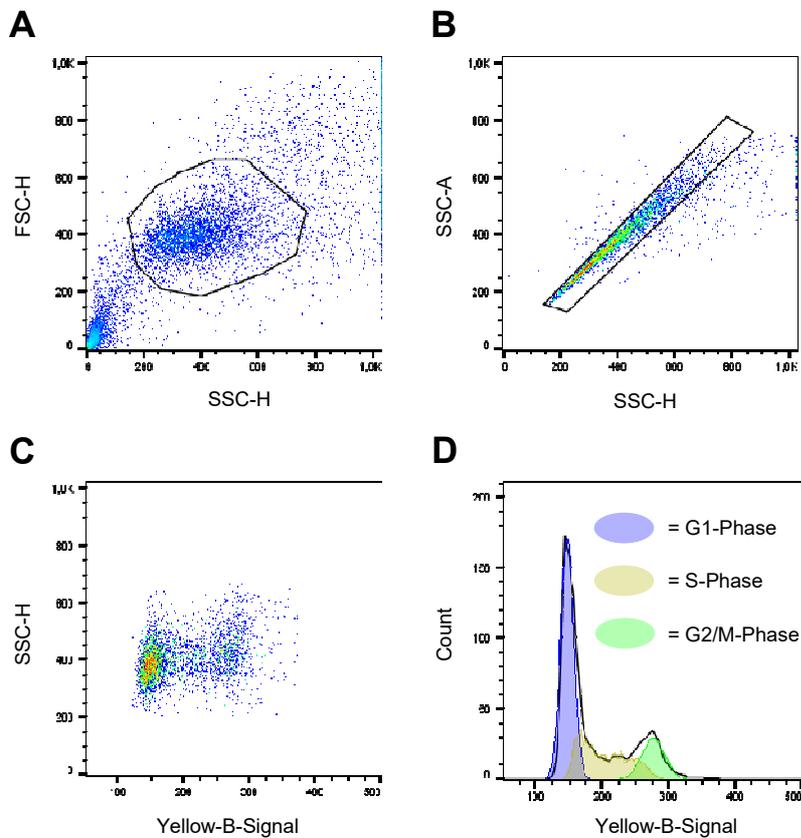


Abbildung 10: Gating-Strategie sowie resultierende Dotplots des Zellzyklus-Assays. Zunächst wurde die Hauptpopulation (A) und anschließend die einzelnen Zellen (B) durch entsprechende Gates herausortiert. Die Auftragung gegen den gelben Kanal erbrachte dann die Einteilung in die Phasen des Zellzyklus (C), die mittels Watson Pragmatic-Modell quantifiziert wurden (D).

4.7.2 Apoptose-Assay

Dieser Assay wurde verwendet, um die Zellen nach unterschiedlicher Behandlung in die Populationen: lebendig, früh-apoptotisch, spät-apoptotisch und nekrotisch einzuteilen und diente als Bestätigung der Befunde des MTT-Assays. Dafür wurden

200 k Zellen pro *well* in eine 6-*well* Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit zytotoxischen Wirkstoffen oder mit PBS als Negativkontrolle. Nach 72 h wurde das Medium mit den darin befindlichen, toten Zellen in Eppendorf Gefäße überführt und bei $450 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit den verbliebenen, lebendigen Zellen vereinigt, die in der Zwischenzeit mit Trypsin vom Plattenboden abgelöst wurden. Nach erneuter Zentrifugation und Absaugen des Überstands erfolgte ein Waschschrift mit PBS. Das im Anschluss erhaltene Pellet wurde in 1 mL Annexin Binding Buffer resuspendiert. Nun wurden 250 μL der Negativkontrolle abgetrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um daraus die Totkontrolle zu generieren. Dafür wurde der entnommene Teil der unbehandelten Population für 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei $450 \times g$ und die Resuspendierung in Annexin Binding Buffer. Schließlich wurden die Zellen zu je 150 μL pro *well* in eine durchsichtige 96-*well* Platte mit U-Boden ausgesät. Die Färbung erfolgte durch die Zugabe von 2,5 μL FITC-gekoppeltem Annexin V und 3,33 μL PI pro *well*. Für die Kontrollen wurden die Zellen entweder mit keinem, einem oder beiden Farbstoffen versetzt. Des Weiteren gab es *wells*, die nur unbehandelte Proben enthielten sowie solche mit einer 50:50-Zusammensetzung aus unbehandelten und den hitzebehandelten Totkontrollen. Dies diente der Zuordnung der Zellen in die oben beschriebenen Populationen, welche in den Dotplots durch das Anlegen von Quadranten erfolgte.

Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo™ V10. In den aus der Messung resultierenden Plots wurden zunächst nach einem ähnlichen Vorgehen, wie in 4.7.1 beschrieben, Gates gesetzt. Jedoch wurde ein größerer Gesamtanteil der Population analysiert (Abbildung 11 A), da bei diesem Versuch auch die toten Zellen erfasst werden sollten. Nachdem anschließend die einzelnen Zellen heraussortiert waren, erfolgte die Auftragung der beiden Farbstoffe gegeneinander mittels des nah-Infrarotkanals (y-Achse) und des grünen Kanals (x-Achse). Dabei galt, dass Zellen, die nur ein grünes Signal aufwiesen (Q3), in der frühen Phase der Apoptose sind. Annexin V bindet an Phosphatidylserine der Zellmembran, was allerdings nur gelingt, wenn sie in Richtung Extrazellulärraum zeigen. Dies ist wiederum einer der ersten Schritte der Einleitung der Apoptose [331]. Durch das gekoppelte FITC

konnte dieser Prozess durch ein grünes Signal erfasst werden. Lag zusätzlich ein rotes Signal vor (Q2), gehörten die Zellen der spät-apoptotischen oder nekrotischen Population an, da PI erst in die Zelle gelangt, wenn die Membran bereits deutlich aufgelockert ist. Ist lediglich ein rotes und kein grünes Signal vorhanden (Q1), unterliegen die Zellen nur der Nekrose. Waren sie unbeschädigt, wiesen sie kein Farbsignal auf und waren dementsprechend der lebendigen Population zuzuordnen (Q4) [332].

Durch die Kontrollen der einzeln angefärbten, unbehandelten Proben sowie der Totkontrollen konnten nun die Quadranten gesetzt werden und die Zellen in die jeweilige Population eingeteilt werden (Abbildung 11 C).

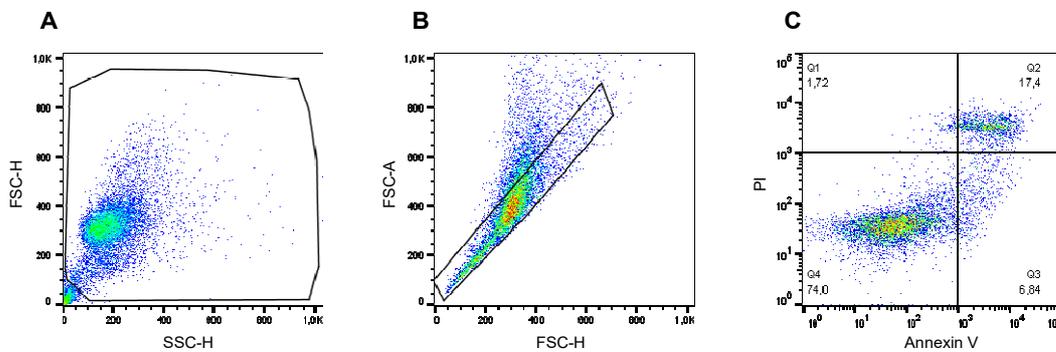


Abbildung 11: Gating-Strategie des Annexin V-PI-Assays. Zunächst wurde ein Gate für die Hauptpopulation gesetzt und der Zellschrott (unten links) exkludiert (A). Anschließend erfolgte die Erfassung einzelner Zellen (B). Schließlich wurden beide Farbstoffe gegeneinander aufgetragen und die Zellen durch das Anlegen der Quadranten in die entsprechenden Populationen geteilt (C).

4.8 Quantitative *Real Time* Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

4.8.1 Probenvorbereitung

Die Quantifizierung der Genexpression von Slfn11 unter den Einflüssen epigenetisch wirksamer Stoffe erfolgte mittels qPCR. Dafür wurden die Zellen zunächst zu je 2 Mio. in Kulturflaschen ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit Decitabin, Entinostat, Tazemetostat oder PBS als Negativkontrolle für 24 h. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet für die Extraktion der mRNA weiterverarbeitet. Die Isolierung erfolgte mit dem Direct-zol Miniprep Kit nach den Anweisungen des Herstellers.

Währenddessen musste eine Kontamination der Proben durch biologisches Material wie Hautschuppen, Haare oder Speichel unbedingt vermieden werden, da mRNA äußerst labil ist. Zudem wurden spezielle Gefäße verwendet, die frei von DNasen und RNasen waren.

Nach der Isolierung aus den Zellen wurde der mRNA-Gehalt mit dem Colibri Microvolume Spectrometer quantifiziert und zudem auf Verunreinigungen durch Proteine getestet. Für die qPCR wurden schließlich 25 ng RNA pro *well* von jeder Probe verwendet, die als technische Duplikate in eine spezielle, qPCR-geeignete Platte pipettiert wurden. Zu den Proben wurden eine Reverse Transkriptase, die Primer, Nukleotide, eine DNA-Polymerase sowie der Farbstoff SYBR[®] Green I gegeben. Schließlich konnte die Messung am CFX Opus 96 mit einem vorher festgelegten Temperaturprogramm erfolgen.

4.8.2 Temperaturprogramm und Auswertung

Die PCR fand nun in einem automatisierten Prozess statt, bei dem zunächst die Synthese von cDNA durch die Reverse Transkriptase erfolgte. Dieser Prozess wurde für eine halbe Stunde bei 48 °C durchgeführt, ehe die Temperatur auf 95 °C erhöht und für 10 min aufrechterhalten wurde. Dieser Schritt diente der Denaturierung doppelsträngiger cDNA zu DNA-Einzelsträngen. Die Primer konnten sich im nächsten Schritt, dem *Annealing*, an ihr jeweiliges, komplementäres Stück anlagern. In der Folge wurden bei der Elongation durch die DNA-Polymerasen aus dem Nukleotidreservoir wieder doppelsträngige cDNA-Stücke hergestellt. Diese Schritte erfolgten in einem Zeitfenster von 1 min bei 60 °C. Der Ablauf von Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation wurde im Anschluss noch weitere 49 × wiederholt. Dabei verdoppelte sich die vorliegende Menge der Gene, gegen die sich die Primer richteten, bei jedem Zyklus [333]. Da dies auch abhängig von der Qualität der Primer ist, musste zudem eine Primereffizienz aufgenommen werden. Dafür wurden fünf 1:10-Verdünnungen derselben Probe vermessen und über eine Ausgleichsgerade ein Korrekturfaktor für den jeweiligen Primer ermittelt.

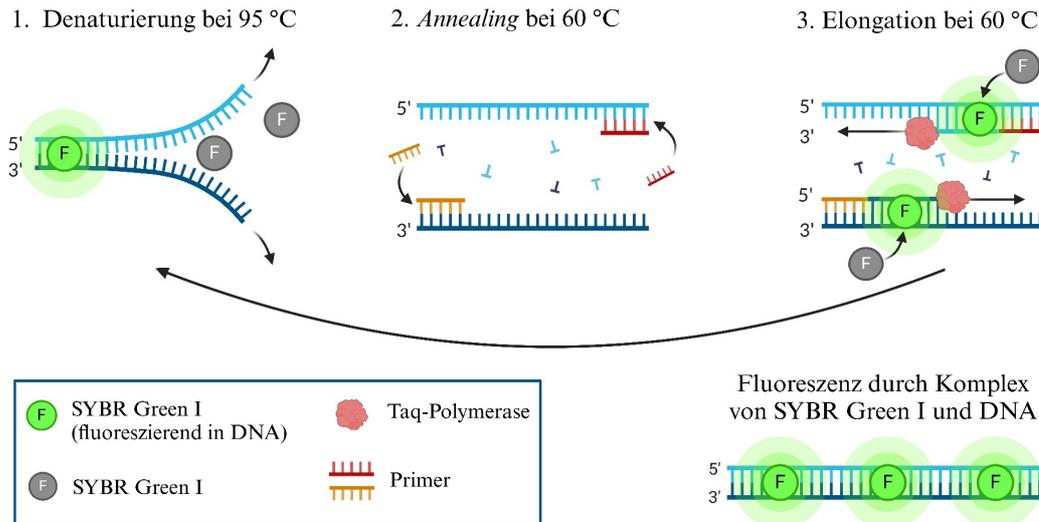


Abbildung 12: Temperaturprogramm und Detektionsprinzip der qPCR. Erstellt mit BioRender.com

Für die Quantifizierung der Genexpression der Proben ist der interkalierende Farbstoff SYBR[®]-Green I erforderlich. Dieser bildet während der Elongation einen Komplex mit der doppelsträngigen cDNA, der unter Anregung mit blauem Licht eine Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich emittiert [334]. Der Zyklus, in dem dieses Signal einen gewissen Schwellenwert überschreitet, wird als Messwert *C_q* (*quantitative cycle*) festgehalten, mit dem die Proben im Anschluss verglichen werden können. Wie beim Western Blot werden in diesem Versuch von jeder Probe *housekeeping* Gene (β -Actin und GAPDH) quantifiziert, auf deren Menge die Expression des Zielgens (*Slfn11*) bezogen wird. Die Vergleiche der unterschiedlich behandelten Proben miteinander erfolgten mit der Software Bio-Rad CFX Maestro 2.2 mittels der $\Delta\Delta C_q$ -Methode [335, 336].

4.9 siRNA-*knockdown* von ATR

Für einen temporären *knockdown* der ATR-Kinase in W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen wurde eine Transfektion mit *small interfering* RNA (siRNA) durchgeführt. Sie bestehen nur aus wenigen Nukleotiden und liegen zunächst doppelsträngig vor. Nach Eintritt in die Zelle wird sie zunächst in einzelsträngige siRNA überführt und bildet dann mit mehreren Proteinen den RNA-induzierten *Silencing*-Komplex (RISC) aus. Dieser sucht anschließend nach einem komplementären Stück mRNA. Sobald es ausfindig gemacht ist, erfolgt dessen

Abbau durch den RISC. Danach dissoziiert er und steht für eine erneute Degradation zur Verfügung. Auf diese Weise wird die Expression des Zielproteins posttranskriptionell unterdrückt. Da die siRNA allerdings nicht stabil in das Genom eingebaut wird, sondern als fremdes Erbgut in der Zelle verweilt, wird sie nach einiger Zeit abgebaut und der Wildtyp entwickelt sich zurück [337, 338].

Für die durchgeführten Experimente wurden 300 k Zellen pro *well* in eine 6-*well* Platte mit antibiotikafreiem Medium ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die siRNA gegen das Zielprotein sowie ein Transfektionsreagenz dazugegeben. Von beiden Komponenten wurden zunächst je 6 µL in 100 µL Transfektionsmedium pipettiert. Die beiden Lösungen wurden anschließend vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gemisch auf 1 mL mit Transfektionsmedium aufgefüllt und in das entsprechende *well* pipettiert. Nach demselben Verfahren wurden Zellen eines *well*s mit einer Kontroll-siRNA behandelt, die keinen *knockdown* erzeugen sollte. Sie diente lediglich zur Bestätigung, dass die Behandlung selbst keinen Einfluss auf die Zellen hat. Die transfizierten Zellen wurden schließlich für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde 1 mL von Kulturmedium mit der doppelten Menge an FKS und Penicillin/Streptomycin in jedes *well* gegeben. Nach weiteren 24 h Inkubationszeit wurde das Medium aus jedem *well* abgesaugt und durch 1 mL frisches Standardmedium ersetzt. Am nächsten Tag konnten die Zellen dann geerntet und für weitere Experimente verarbeitet werden. Zur Kontrolle der *knockdown*-Effizienz wurden aus je einem *well* direkt Lysate hergestellt und ein Western Blot durchgeführt.

4.10 Statistische Auswertung

Die Zusammenfassungen der Daten aus den Einzelversuchen sowie deren statistische Analyse erfolgte mit der Software GraphPad Prism 8. Dargestellt sind stets die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung (SD) in Form von Fehlerbalken oder als Zahlenwert. Als Test auf statistische Signifikanz zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Die statistische Analyse mehrerer Behandlungen miteinander erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey Post-

hoc Test. Wurden diese Vergleiche nur auf eine Kontrolle bezogen, wurde stattdessen ein One-Way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Test durchgeführt. Die Ergebnisse der statistischen Tests sind mittels Asteriskus wie folgt gekennzeichnet: ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ und ****: $p < 0,0001$.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Einsatz von Goldverbindungen in Ovarialkarzinomzellen

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die zytotoxische Behandlung der Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und W1 sowie ihrer cisplatinresistenten Subtypen A2780cis und W1CR mit organischen Goldverbindungen untersucht. Die Fragestellung ist zunächst, ob eine Kreuzresistenz zwischen den verschiedenen, metallhaltigen Wirkstoffklassen existiert oder inwieweit eine Cisplatinresistenz durch Goldverbindungen überwunden werden kann. Im weiteren Verlauf dieser Versuchsreihe sollen die zugrundeliegenden Mechanismen der Wirkung von Goldverbindungen in den genannten Zelllinien genauer betrachtet werden.

5.1.1 Zytotoxizität der Goldverbindungen als Solobehandlung

Als Ausgangspunkt der Untersuchungen ist zunächst von Bedeutung, dass die resistenten Subtypen eine 4,5× (A2780cis) bzw. eine 3,5× (W1CR) erhöhte Cisplatinintoleranz, verglichen mit ihren jeweiligen Wildtypen, aufweisen. Das etablierte Gold(I)-Phosphin Auranofin ist in allen vier Zelllinien deutlich aktiver als Cisplatin (Abb. 13 A, B). Während im W1-Zellpaar kein Unterschied zwischen den beiden Subtypen hinsichtlich des IC₅₀-Werts von Auranofin zu erkennen ist, haben die A2780cis-Zellen eine nahezu dreifach höhere Toleranz als ihr Wildtyp. Dennoch ist die Goldverbindung auch bei ihnen um den Faktor zehn effektiver als Cisplatin. Betrachtet man die IC₅₀-Werte des in der Arbeitsgruppe Ott entworfenen Gold(I)-Phosphins UB-1 ist festzustellen, dass dieses deutlich weniger zytotoxisch als Auranofin ist (Abb. 13 C, D). Auffällig ist, dass die A2780cis-Zellen auch gegen UB-1 eine etwa 3,5× höhere Toleranz als ihr Wildtyp aufweisen. Das W1-Zellpaar hat hingegen ähnliche IC₅₀-Werte, die jedoch im Gegensatz zu Auranofin mit denen der A2780cis vergleichbar sind und somit auch deutlich über denen der A2780-Zellen liegen.

Die dritte untersuchte Goldverbindung, MC3, ist, anders als die zwei zuvor besprochenen, ein Biscarben-Komplex und hat in allen untersuchten Zelllinien eine deutlich höhere Toxizität als die Gold(I)-Phosphine. Mit IC₅₀-Werten im mittleren, nanomolaren Bereich, die in allen vier Zelllinien vergleichbar sind, übertrifft es die

Wirkung des Cisplatins um ein Vielfaches, ungeachtet der Resistenz dagegen (Abb. 13 E, F).

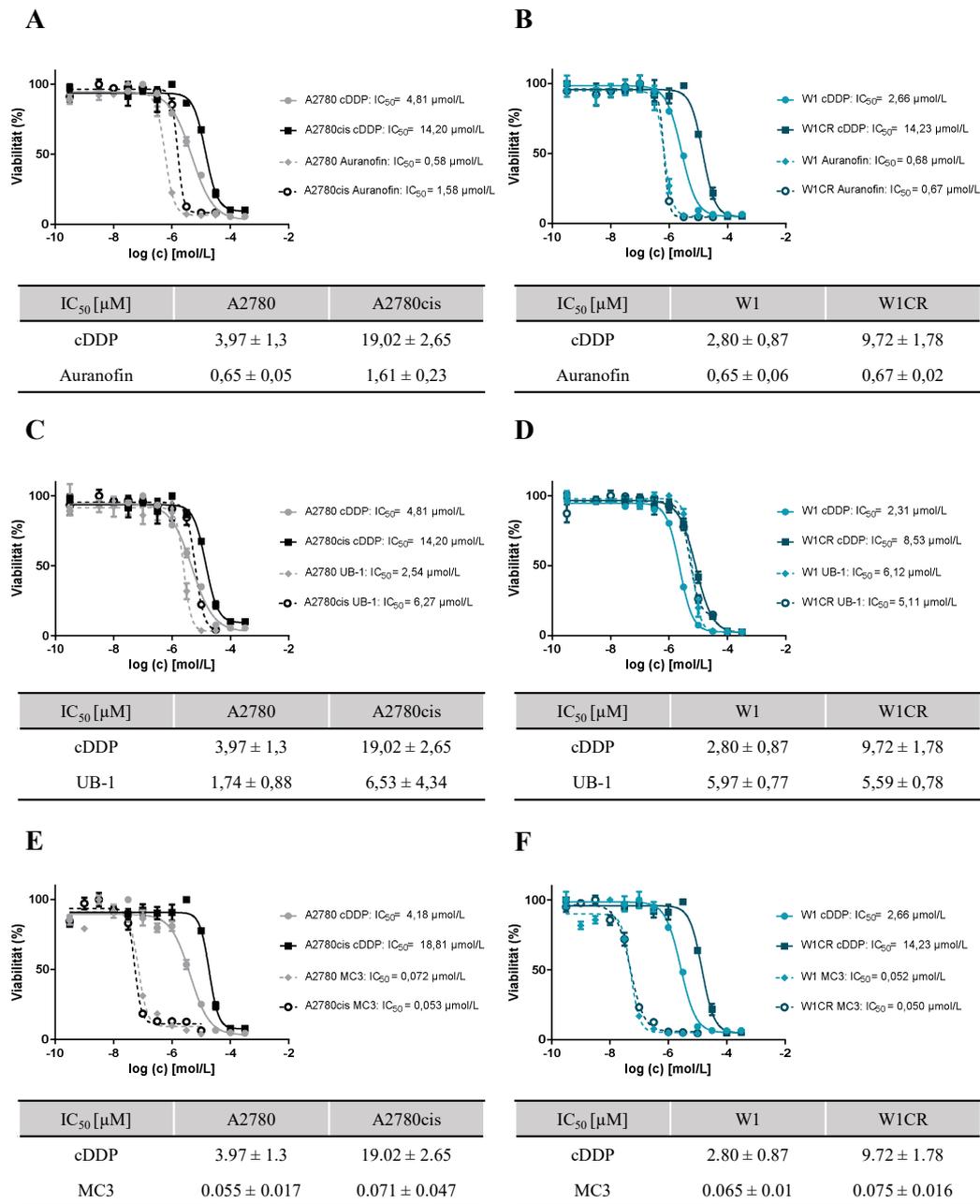


Abbildung 13: Zellviabilität unter dem Einfluss der Goldverbindungen und Cisplatin. Gezeigt sind exemplarische Dosis-Wirkungskurven einer Messung unter Behandlung mit Auranofin (A und B), UB-1 (C und D) sowie MC3 (E und F) jeweils im Vergleich zu Cisplatin in den Zellpaaren A2780/A2780cis und W1/W1CR. In den Tabellen unter den Kurven sind die gemittelten IC₅₀-Werte ± SD (n = 4) aufgelistet [339].

Diese Daten zeigen, dass die Hemmung der zellulären TrxR durch die Goldverbindungen eine hohe Wirksamkeit entfaltet, auch in cisplatinintoleranten

Zellen. Zudem weisen die A2780cis-Zellen eine Kreuzresistenz gegen die Gold(I)-Phosphine auf.

5.1.2 Kombination der Goldverbindungen mit Cisplatin

Wegen der hohen Effektivität der Goldverbindungen in den Zellen wurde als nächstes überprüft, ob sich die Resistenz gegen Cisplatin auch durch Kombinationsbehandlungen überwinden lässt. Dafür wurden die Zellen 4 h vor der Cisplatinzugabe mit einer subtoxischen Menge der Goldverbindungen vorbehandelt. Wie in Abb. 14 jedoch zu erkennen ist, führt keine der drei untersuchten Kombinationen zu einer Sensitivierung in einer der vier Zelllinien. In den A2780-Zellen kommt es sogar zu einer signifikanten Erhöhung des IC₅₀-Werts von Cisplatin bei der Vorbehandlung mit Auranofin und UB-1. Da der berechnete *Combination Index* (CI) bei allen Behandlungen über eins liegt, ist zusätzlich bestätigt, dass es keine Synergie zwischen den untersuchten Substanzen gibt [321]. Die einzige Ausnahme stellen MC3-vorbehandelte A2780-Zellen dar, wo zumindest ein additiver Effekt erzeugt wird.

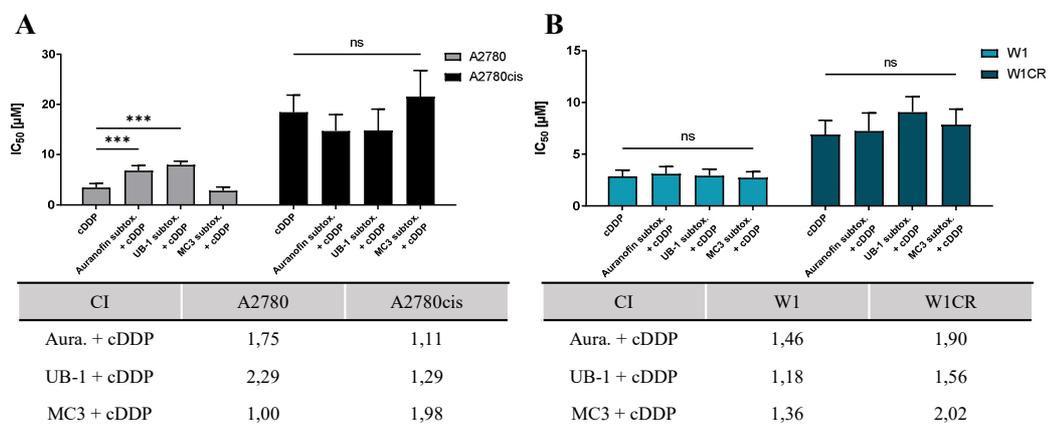


Abbildung 14: Gemittelte IC₅₀-Werte ± SD von Cisplatin als alleinige Behandlung oder in Kombination mit den Goldverbindungen in subtoxischen Mengen in A2780/A2780cis-Zellen (A) und W1/W1CR-Zellen (B). Als Vorbehandlung wurden Auranofin mit [0,1 µM], UB-1 mit [1 µM] und MC3 mit [0,01 µM] eingesetzt (n = 4). Als Test auf statistische Signifikanz wurde für jede Zelllinie eine One-Way ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's Test durchgeführt, die Kontrolle ist dabei die Solobehandlung mit Cisplatin; ***: p < 0,001. In der Tabelle unter den Histogrammen sind die ermittelten CI-Werte aufgelistet. Es gilt, dass CI < 1 = Synergismus, CI = 1 = additiver Effekt und CI > 1 = Antagonismus [321, 339].

Diese Daten zeigen, dass Cisplatin und die Goldverbindungen keinen vergleichbaren Wirkmechanismus aufweisen und auch keine Synergie beim gemeinsamen Einsatz beider Substanzklassen besteht. Da sich Auranofin und UB-1 im Zusammenhang erster Zytotoxizitätsmessungen ähnlich verhalten, und die Werte von letzterem einer hohen Standardabweichung unterliegen, wird im Folgenden nur noch mit Auranofin, stellvertretend für die Substanzklasse der Gold(I)-Phosphine, weitergearbeitet.

5.1.3 Zelluläre Aufnahme der Goldverbindungen

Als erster mechanistischer Einblick in die Wirkweise der Goldverbindungen in den vier untersuchten Zelllinien wurde mittels AAS ihr intrazellulärer Gehalt nach einer 72-stündigen Inkubation bestimmt. Es fällt beim Betrachten der Daten sofort auf, dass die beiden Wildtyp-Zelllinien einen deutlich höheren intrazellulären Goldgehalt als ihre cisplatinresistenten Subtypen aufweisen, obwohl alle mit derselben Menge behandelt wurden (Abb. 15). Zudem ist ersichtlich, dass beide Goldverbindungen im A2780-Zellpaar stärker akkumulieren als im W1-Zellpaar.

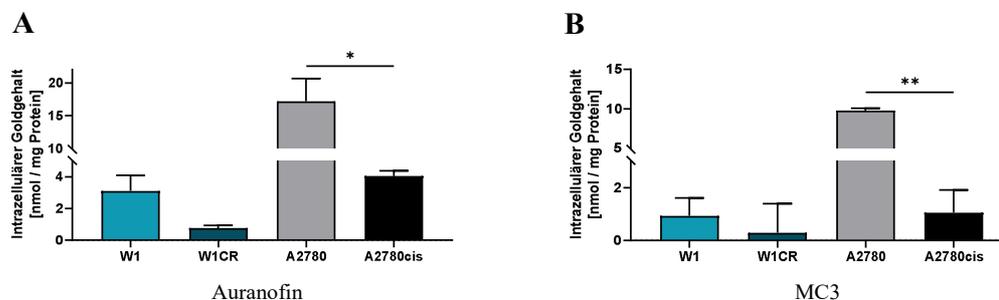


Abbildung 15: Intrazellulärer Goldgehalt nach einer Behandlung über 72 h mit 0,1 μM Auranofin (A) oder 0,01 μM MC3 (B) in A2780/A2780cis- und W1/W1CR-Zellen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SD eines $n = 3$. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte mittels t-Test und wegen der stark abweichenden SD mit nachfolgender Korrektur nach Welch. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ [339].

Diese Daten heben die starke Wirkung der Goldverbindungen in den resistenten Zellen hervor, da sie trotz einer geringeren intrazellulären Konzentration dieselbe Wirkung entfalten wie in den jeweiligen Wildtypen. Die einzige Ausnahme bilden Auranofin-behandelte A2780cis-Zellen, da sie in den Viabilitätstests eine höhere Toleranz aufweisen als die anderen drei Zelllinien (Abb. 13). Im Vergleich zu ihrem Wildtyp besteht dabei eine Korrelation zwischen dem IC_{50} -Wert und der

gemessenen intrazellulären Goldkonzentration, da diese nur ca. ein Viertel derer der A2780-Zellen beträgt. Vergleicht man den Gehalt jedoch mit den ebenfalls cisplatinresistenten W1CR-Zellen, weisen diese wesentlich geringere Goldmengen auf. Trotzdem ist Auranofin für die W1CR-Zellen deutlich toxischer als für die A2780cis-Zellen, sodass keine exakte Korrelation zwischen intrazellulärem Gehalt und IC_{50} -Werten zu bestehen scheint. Beim Biscarbengold(I) MC3 wird eine ähnliche Datenlage der intrazellulären Goldakkumulation wie bei Auranofin ersichtlich. Unter MC3-Behandlung wird jedoch in allen vier Zelllinien ein vergleichbarer IC_{50} -Wert gemessen. Diese Befunde legen nahe, dass erhöhter Efflux und verminderter Influx in den cisplatinresistenten Zellen zwar auftreten, diese Prozesse aber wahrscheinlich nicht zur höheren Toleranz der A2780cis-Zellen gegen Auranofin führen. Eine weitere Erklärung für die reduzierten Goldmengen in den resistenten Subtypen ist eine Entgiftung durch Glutathion, welches sowohl in A2780cis-Zellen, als auch W1CR-Zellen höher exprimiert wird als in den jeweiligen Wildtypen [89, 340].

5.1.4 Einfluss der Goldverbindungen auf das Redoxsystem

Der postulierte Wirkmechanismus der organischen Goldverbindungen besteht in der Hemmung der TrxR und einem dadurch induzierten Verbrauch des reduzierenden Trx. Dies hat zur Folge, dass ROS in der Zelle akkumulieren und oxidativer Stress ausgelöst wird [211, 220]. Um die hohe Effektivität der Goldverbindungen in den vier Zelllinien genauer zu ergründen, wurden nun Untersuchungen zum Redoxsystem angestellt.

5.1.4.1 Intrazelluläre ROS-Bildung unter Behandlung mit Cisplatin und Goldverbindungen

Zunächst wurde ein Assay durchgeführt, mit dem die Menge intrazellulärer ROS bestimmt werden konnte. Das in Abb. 16 dargestellte Histogramm zeigt den Anstieg intrazellulärer ROS unter den genannten Behandlungen nach 4 h und 24 h. Dabei sind von allen Verbindungen sowohl gleiche Konzentrationen für alle Zellen gewählt worden (subtoxische Mengen), sowie die individuellen IC_{50} für eine Analyse der einzelnen Zelllinien unter starken Stressbedingungen.

Bei den unbehandelten Zellen wird zunächst ersichtlich, dass das A2780-Zellpaar deutlich höhere ROS-Mengen produziert als das W1-Zellpaar. Zudem liegen in den A2780cis-Zellen noch einmal deutlich höhere Mengen als in ihrem Wildtyp vor, während sich W1- und W1CR-Zellen nicht voneinander unterscheiden. Von den untersuchten Substanzen zeichnet sich MC3 insgesamt als stärkerer ROS-Induktor aus. Die Effekte von Auranofin und Cisplatin sind dagegen kaum zu erkennen. Lediglich in den A2780cis-Zellen ist unter ihrer Behandlung ein signifikanter Anstieg zu erkennen. Dagegen sind die resistenten W1CR effektiver in der Abwehr oxidativen Stresses und erfahren unter keiner Behandlung einen Anstieg der ROS.

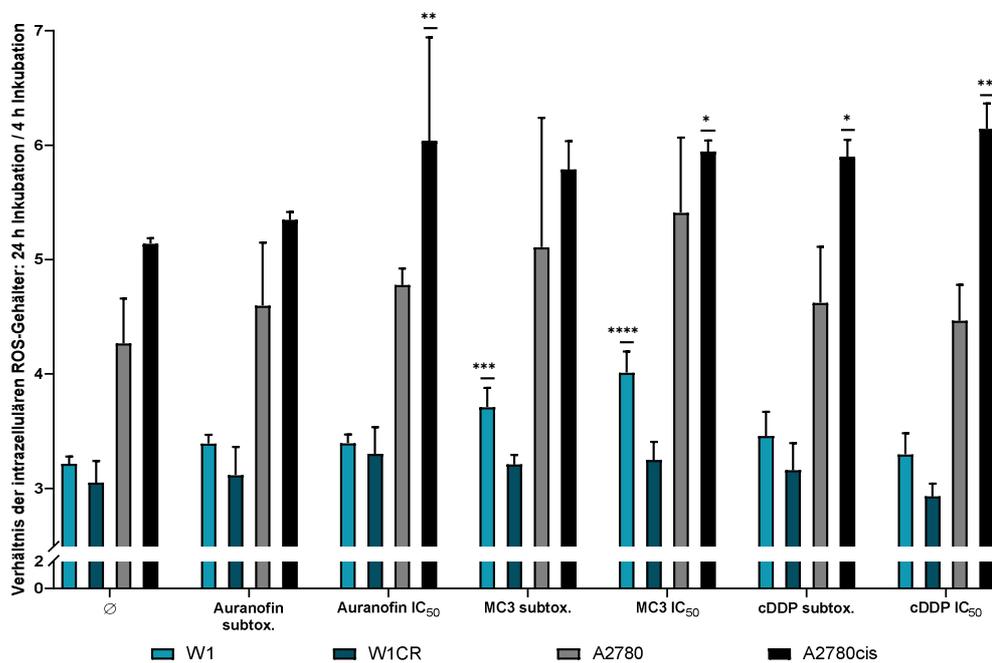


Abbildung 16: Intrazellulärer ROS-Gehalt als Verhältnis nach 24 h und nach 4 h Behandlung. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test für jede Zelllinie mit der unbehandelten Probe als Kontrolle. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$ [339].

Diese Daten geben zunächst Aufschluss über den unterschiedlich regulierten Redoxhaushalt in den beiden Zellpaaren, können jedoch keine genaue Auskunft über den Mechanismus hinter der hohen Effektivität der Goldverbindungen geben.

5.1.4.2 Expression von Proteinen des Redoxsystems

Für die weitere Untersuchung des Redoxsystems in den vier Zelllinien wurden die Expressionen einiger an der Abwehr oxidativen Stresses beteiligter Proteine untersucht. Von diesen ist als erstes Nrf2 zu nennen, welches eine zentrale Rolle in

der Initiierung einer antioxidativen Reaktion der Zelle spielt [86]. Beim Vergleich der beiden Zellpaare ist zu erkennen, dass sich W1- und W1CR-Zellen in ihrer intrinsischen Expression von Nrf2 nicht unterscheiden. Im Gegensatz dazu haben die A2780cis-Zellen, verglichen mit ihrem Wildtyp, signifikant erhöhte Level (Abb. 17 A).

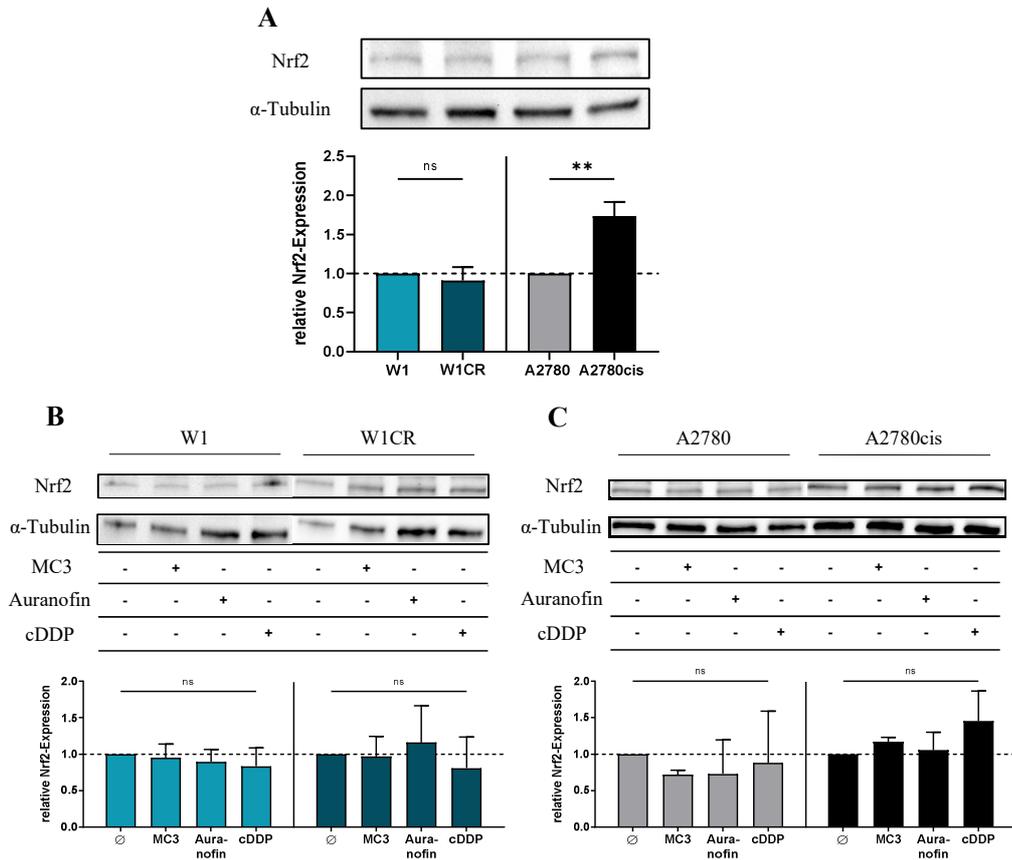


Abbildung 17: Relative Expression von Nrf2 in unbehandelten W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen (A) sowie unter Behandlung mit MC3 [0,01 μ M], Auranofin [0,1 μ M] und cDDP [1 μ M] in W1/W1CR-Zellen (B) und A2780/A2780cis-Zellen (C). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats ($n = 3$), dessen relative Expressionen in den Histogrammen unter den Bildern dargestellt sind. Die Werte der Proteinexpression wurden auf die unbehandelte Wildtypzelle (A) oder auf die jeweilige unbehandelte Zelle (B und C) normalisiert. Als Test auf statistische Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test (A) oder eine One-Way ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's Test (B und C) durchgeführt. **: $p < 0,01$ [339].

Unter den jeweiligen Behandlungen sind kaum Veränderungen in der Nrf2-Expression zu verzeichnen. Lediglich die A2780cis-Zellen reagieren auf cDDP mit einer leichten Erhöhung des antioxidativen Regulators. Insgesamt geben diese Daten jedoch Aufschluss darüber, dass die A2780cis-Zellen ihrer intrinsisch hohen intrazellulären ROS-Werte (Abb. 16) mit einer verstärkten Expression des

antioxidativen Nrf2 begegnen. Für die anderen Zellen scheint es dagegen weniger von Bedeutung zu sein.

Das nächste Protein, dessen Expression untersucht wurde, ist das Trx und damit die Komponente des Redoxsystems, welche durch die TrxR-Hemmung direkt von den Goldverbindungen adressiert werden sollte (Abb. 4).

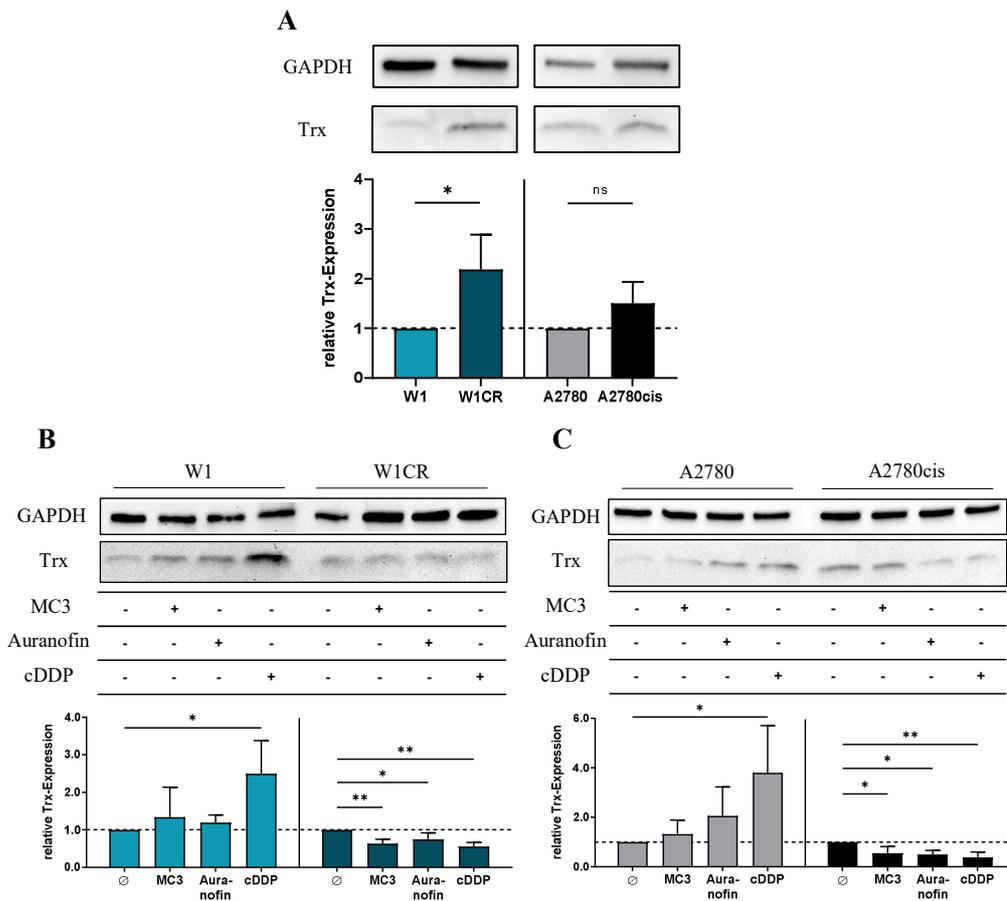


Abbildung 18: Relative Expression von Trx in unbehandelten W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen (A) sowie unter Behandlung mit MC3 [0,01 μ M], Auranofin [0,1 μ M] und cDDP [1 μ M] in W1/W1CR-Zellen (B) und A2780/A2780cis-Zellen (C). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats ($n = 3$), dessen relative Expressionen in den Histogrammen unter den Bildern dargestellt sind. Die Werte der Proteinexpression wurden auf die unbehandelte Wildtypzelle (A) oder auf die jeweilige unbehandelte Zelle (B und C) normalisiert. Als Test auf statistische Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test (A) oder eine One-Way ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's Test (B und C) durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ [339].

Beim Vergleich der unbehandelten Zelllinien ist zunächst zu erkennen, dass die resistenten Subtypen mehr Trx als ihre jeweiligen Wildtypen exprimieren (Abb. 18 A). Unter den Behandlungen mit den Goldverbindungen und cDDP werden ebenfalls Ähnlichkeiten zwischen beiden Zellpaaren deutlich. Während die Wildtypzellen insbesondere auf eine Cisplatinbehandlung mit einem starken

Anstieg der Trx-Expression reagieren, verbrauchen die resistenten Subtypen ihre intrinsisch größeren Reservoirs unter dem Einfluss der stressinduzierenden Wirkstoffe (Abb. 18 B, C). Dass die Wildtypzellen in dieser Form auf die Behandlung mit Cisplatin reagieren, lässt zudem Rückschlüsse auf die Prozesse bei der Resistenzgewinnung in diesen Zellen ziehen. So könnte sich durch die ständige Exposition gegenüber dem Zytostatikum die intrinsisch erhöhte Trx-Expression in den Zelllinien A2780cis und W1CR manifestiert haben.

Es kann nun zusammengefasst werden, dass die W1CR-Zellen aufgrund des Verbrauchs ihrer Trx-Reservoirs durch den postulierten Wirkmechanismus der Goldsubstanzen, die TrxR-Hemmung, absterben. Die A2780cis-Zellen weisen eine verbesserte Redoxbalance auf, da zusätzlich die Nrf2-Expression erhöht ist. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen mit den Goldsubstanzen wurde nur noch mit dem A2780-Zellpaar gearbeitet, um den genauen Wirkmechanismus in ihnen zu ergründen und die Ursachen der erhöhten Toleranz der A2780cis-Zellen gegen Auranofin aufzudecken.

5.1.5 Beeinflussung des Zellzyklus durch die Goldverbindungen

Um die Effekte der Goldverbindungen tiefgründiger zu untersuchen, wurde betrachtet wie sie sich, verglichen mit Cisplatin, auf den Zellzyklus auswirken. Dafür wurden die A2780- und A2780cis-Zellen jeweils mit zwei Konzentrationen der verwendeten Substanzen sowie mit PBS als Negativkontrolle behandelt.

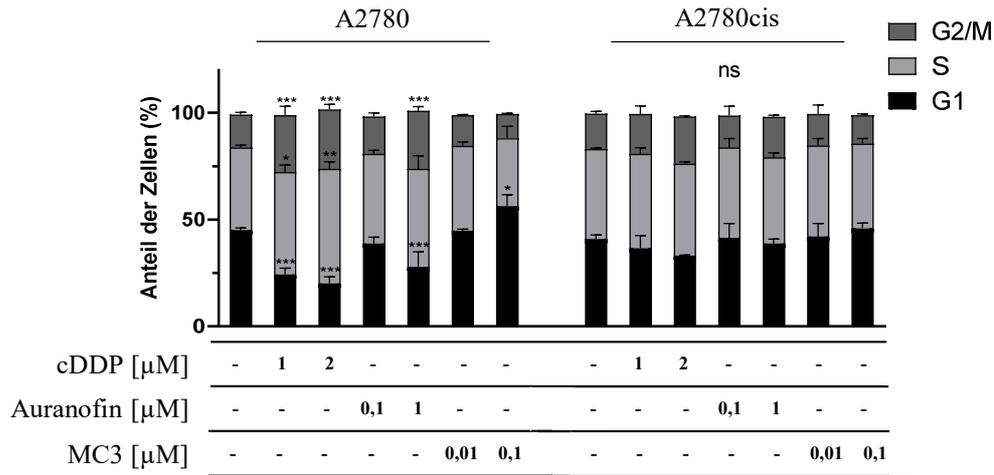


Abbildung 19: Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus unter den angegebenen Behandlungen. Statistische Signifikanz wurde mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test ermittelt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [339].

Die Daten zeigen zunächst, dass sich die beiden Varianten in ihrer intrinsischen Zellzyklusregulierung nicht voneinander unterscheiden. Unter den angezeigten Behandlungen erfahren nur die A2780-Zellen eine Veränderung ihrer Phasenverteilung. So induzieren sowohl cDDP als auch Auranofin signifikante Verlängerungen der S- und G2-Phasen. MC3 erzeugt dagegen einen Arrest in der G1-Phase und verkleinert damit den Anteil der sich vermehrenden Zellen in S- und G2/M-Phase (Abb. 19). Diese Daten deuten, wie bereits in den Zellviabilitätsmessungen festgestellt, auf Unterschiede in der Wirkweise von MC3 und Auranofin hin.

Um die Einflüsse der Goldverbindungen auf die Zellzykluskontrolle weiter zu ergründen, wurden die *upstream* Kinasen, die in den verschiedenen Phasen einen Arrest induzieren können, durch selektive Inhibitoren adressiert. Ein weiterer kausaler Zusammenhang besteht darin, dass diese Kinasen zudem in der Einleitung von DNA-Reparatursignalwegen beteiligt sind. Des Weiteren zeigten vorangegangene Arbeiten, dass Gold-Biscarbene auch mit der DNA wechselwirken können [341, 342].

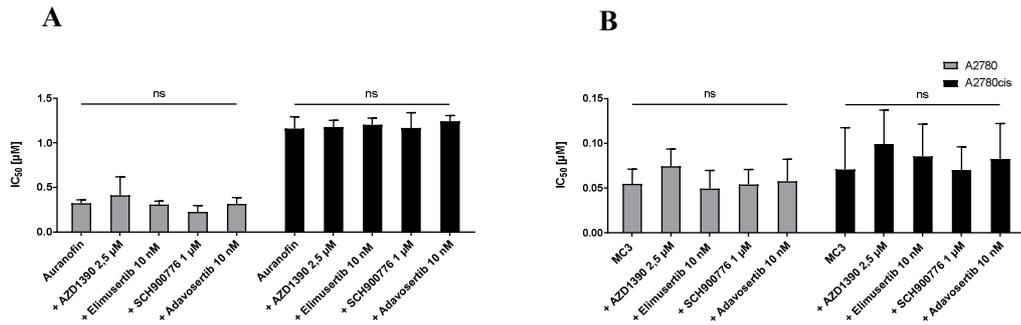


Abbildung 20: IC₅₀-Werte der Behandlung von A2780/A2780cis-Zellen mit Auranofin (A) oder MC3 (B) als Monobehandlung oder in Kombination mit den angezeigten Inhibitoren. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD eines $n = 4$ dargestellt. Als Test auf statistische Signifikanz wurde eine One-Way ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's Test durchgeführt [339].

Die Kombinationsbehandlungen mit subtoxischen Mengen von ATM-, ATR-, CHK1- und WEE1-Inhibitoren erwirken keine Veränderung im Ansprechen auf die Goldverbindungen (Abb. 20). Ebenso bleibt die höhere Toleranz der A2780cis-Zellen gegen Auranofin unter diesen Bedingungen erhalten. Dies spricht gegen eine Aktivierung der genannten Kinasen unter dem Einfluss der Goldverbindungen.

5.1.6 Einfluss von ERK auf die Effektivität von Cisplatin und Gold(I)-Verbindungen

Da auch der Einfluss von DNA-Reparaturenzymen nicht die Erklärung für den Unterschied in der Wirkweise von Platin- und Goldverbindungen lieferte, wurde als nächstes das Überlebens-*signaling* der ERK-MAPK-Route untersucht.

Neben den proliferationsfördernden Eigenschaften ist zudem beschrieben, dass ERK die Aktivität von Nrf2 positiv beeinflussen und dadurch indirekt die Expression antioxidativer Gene und Proteine vermitteln kann (Abb. 22) [343]. Dafür wurde zunächst die Expression des Proteins im Gesamten sowie im aktivierten Zustand (phosphoryliert) unter den Behandlungen mit Gold(I)-Verbindungen sowie Cisplatin und PBS als Negativkontrolle untersucht (Abb. 21 A).

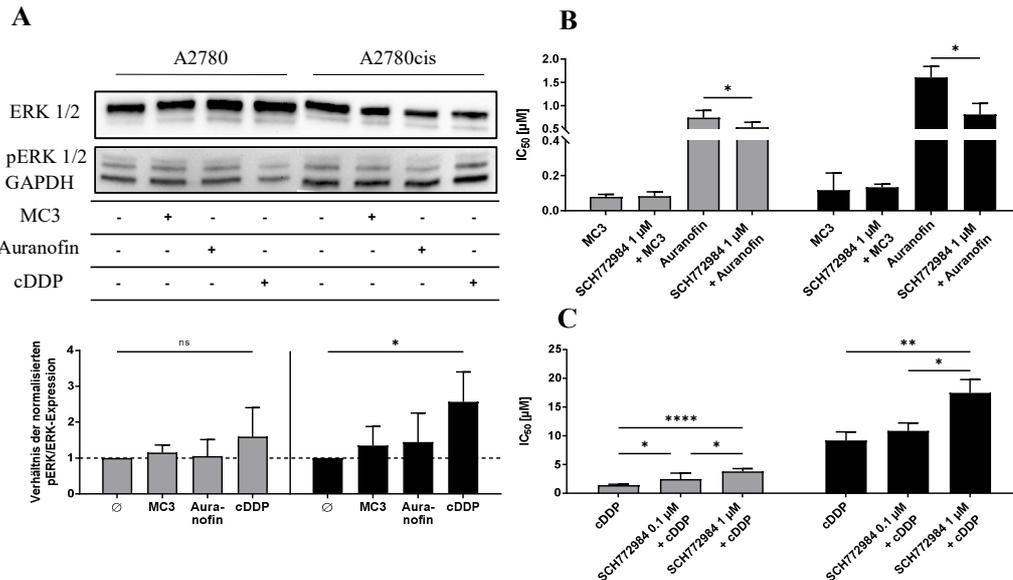


Abbildung 21: Expressionen von ERK 1/2 und pERK 1/2 in A2780/A2780cis-Zellen sowie unter Behandlung mit MC3 [0,01 µM], Auranofin [0,1 µM] und cDDP [1 µM] (A). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats (n = 3) und das Verhältnis der relativen Expressionen von pERK 1/2 und ERK 1/2. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test. Außerdem ist die Kombinationsbehandlung von SCH772984 mit den Goldverbindungen (B) und Cisplatin (C) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 [339].

Anhand der Expressionsdaten (Abb. 21 A) wird ersichtlich, dass nur in den A2780cis-Zellen eine signifikante Aktivierung von ERK durch Cisplatin induziert wird und damit auf einen möglichen Resistenzmechanismus hinweist. Zudem korrelieren diese Befunde mit der Expression des *downstream* geschalteten Nrf2 unter diesen Bedingungen. Um diese Erkenntnisse mechanistisch zu verifizieren, wurden die Zellen in einem Kombinationsbehandlungsversuch mit dem ERK-Inhibitor (ERKi) SCH772984 vorbehandelt. Die resultierenden Daten decken eine bivalente Rolle ERKs in der Regulierung der Apoptose auf. Während dessen Inhibition für die Wirksamkeit von MC3 keinen zusätzlichen Nutzen erbringt, kann der IC₅₀-Wert von Auranofin signifikant reduziert und dadurch auch die Resistenz der A2780cis gegen das Gold(I)-Phosphin überwunden werden (Abb. 21 B). In Kombination mit Cisplatin tritt ein gegenteiliger Effekt des ERKi auf und die Toxizität des Zytostatikums wird konzentrationsabhängig, signifikant reduziert (Abb. 21 C). Eine Erklärung der verschiedenen Folgen der ERK-Inhibition stellt die in Abhängigkeit zur Aktivitätsdauer geschaltete Funktion der MAPK dar. Es ist beschrieben, dass eine dauerhafte Aktivierung die vermeintlich schützende Rolle

von ERK umkehrt und ein pro-apoptotisches *signaling* induziert [344–346]. Dieser Prozess trifft auf die A2780/A2780cis-Zellen zu, da unter dem Einfluss von Cisplatin ein Anstieg der Expression von pERK detektiert wird und der ERKi vor dessen Toxizität schützt

5.1.7 Zusammenfassung der Resistenzüberwindung durch organische Goldverbindungen

Der zurückliegende Abschnitt dieser Arbeit verdeutlicht, dass organische Goldverbindungen ein hohes Potential zur Behandlung von Ovarialkarzinomen im zellulären Kontext aufweisen. Dabei tritt besonders das Biscarbengold(I) MC3 mit einer 100-fach höheren Effektivität als das Standardzytostatikum Cisplatin in Erscheinung und wirkt dabei gleichermaßen gegen die chemoresistenten Klone. Die Gold(I)-Phosphine Auranofin und UB-1 sind ebenfalls potente Wirkstoffe. In den A2780cis-Zellen besteht jedoch, verglichen mit den anderen Zelllinien, eine leichte Toleranz gegen sie. Dies verdeutlicht zudem eine unterschiedliche Wirkweise der beiden Klassen an Goldverbindungen.

Die betrachteten Signalwege für die Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen hinter ihrer hohen Potenz sind in Abbildung 22 dargestellt. Es besteht zunächst keine Korrelation der Effektivität zur intrazellulär vorliegenden Wirkstoffmenge, was Effluxpumpen wie MRP2 zuzuschreiben ist, die in den A2780cis-Zellen auf Genebene hochreguliert sind [347]. Des Weiteren zeigt die Entstehung von ROS, dass das A2780-Zellpaar ein höheres Level an oxidativem Stress gewohnt ist, als die W1/W1CR-Zellen. In der Trx-Expression gleichen sich die beiden Wildtyp- und resistenten Zellen. Da die A2780cis zudem über erhöhte Nrf2-Level verfügen, können sie den Verbrauch des reduzierenden Trx besser kompensieren als die W1CR-Zellen, die damit dem postulierten Wirkmechanismus der Goldverbindungen unterliegen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse sowie der erhöhten Toleranz der A2780cis-Zellen gegen Auranofin wurden die *upstream*-Prozesse in diesem Zellpaar detaillierter untersucht. Die durch gebildete ROS nachfolgend induzierten DNA-Schäden sind für die hohe Effektivität der Goldverbindungen dabei nicht ursächlich. In den Fokus

rückt ERK 1/2, welche den antioxidativen Transkriptionsfaktor Nrf2 zu aktivieren vermag und dadurch für die erhöhten Level in den A2780cis-Zellen verantwortlich ist. Der Einsatz des ERKi demonstriert die Rolle der MAPK als wichtigen Apoptoseregulator. Während sie vor der Toxizität von Auranofin schützt, fördert sie den Zelltod unter Cisplatinbehandlung durch ihre anhaltende Aktivität.

Trotz der zuvor beschriebenen Erkenntnisse, konnten die zugrundeliegenden Wirkmechanismen der Goldverbindungen nicht restlos aufgeklärt werden. Die präsentierten Daten sind in einer Publikation festgehalten [339]. Die untersuchten Substanzen stellen dennoch vielversprechende Ansätze für eine Therapie behandlungsresistenter Ovarialkarzinomen dar und sollten in nachfolgenden in vivo Versuchen genauer erforscht werden.

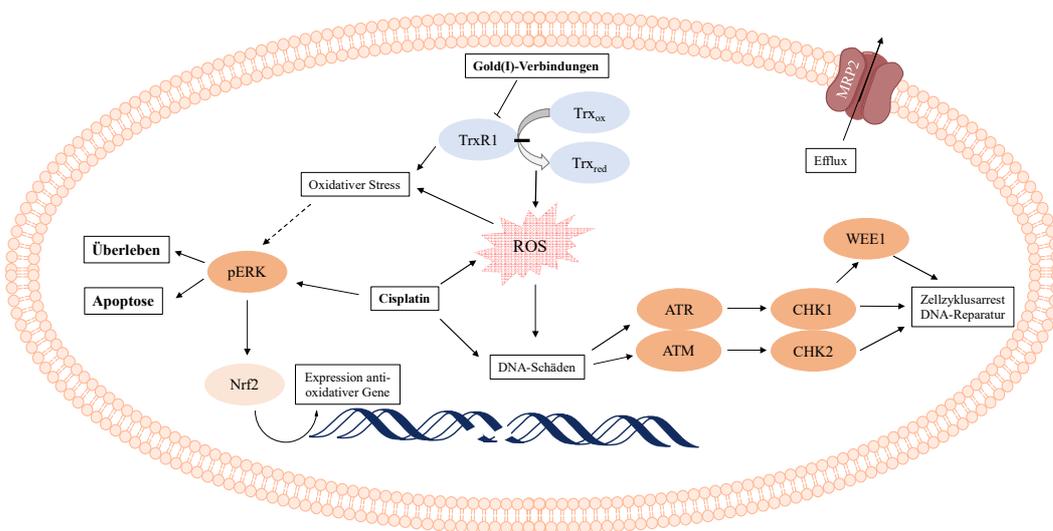


Abbildung 22: Übersicht der Signalwege, welche für die Erforschung der Wirkweise von Goldverbindungen untersucht wurden [339].

5.2 Rolle des *DNA damage response* Signalwegs in der Cisplatinresistenz von Ovarialkarzinomzellen

Die im Abschnitt 5.1.5 beschriebene Inhibierung wichtiger Kinasen der DNA-Schadenserkennung und -reparatur erbrachte in Kombination mit den Goldverbindungen keinen zusätzlichen Effekt, da dies nicht ihrem Wirkmechanismus in den Zellen entsprach. Da die DNA jedoch das primäre intrazelluläre Ziel des Cisplatins ist und ein bekannter Resistenzmechanismus gegen dessen Wirksamkeit eine gesteigerte DNA-Reparatur darstellt, wurden die genannten Kinaseinhibitoren auch in Kombination mit dem Zytostatikum getestet [103].

5.2.1 Einfluss von ATR auf die Chemoresistenz gegen Cisplatin

Zunächst wurde der Einfluss der ATR-Kinase untersucht, da sie als Sensor von DNA-Schäden direkt in die zelluläre Antwort platinbasierter Schäden involviert ist [348].

5.2.1.1 Zellviabilitäts- und Apoptoseassays mit Elimusertib

Mit einer Solobehandlung der Zellen mit dem hochselektiven ATRi Elimusertib wurde zunächst getestet, wie abhängig die vier Zelllinien A2780/A2780cis und W1/W1CR von ATR sind [271]. Die hohe Toxizität von Elimusertib im mittleren bis hohen nanomolaren Bereich unterstreicht die Bedeutung von ATR für Tumorzellen (Abb. 23 A). Dass eine alleinige Inhibierung einen so starken Effekt erzielt, liegt womöglich auch an ihrer Rolle in der Bekämpfung replikativen Stresses [106]. Durch die ATR-Inhibierung können darauffolgende Arreste der Replikationsgabel nicht mehr revidiert werden, und es kommt zur Apoptose. Auffällig ist zudem, dass die W1CR-Zellen einen signifikant höheren IC₅₀-Wert als ihr Wildtyp aufweisen und den entstehenden Stress besser kompensieren können.

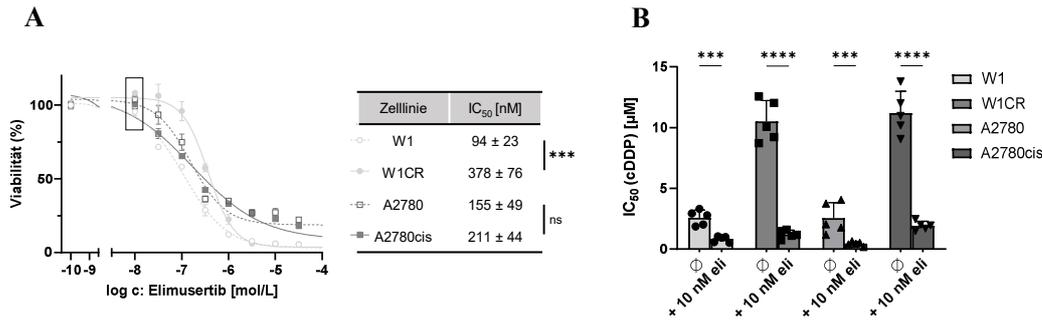


Abbildung 23: Exemplarische Dosis-Wirkungskurve der Behandlung von W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen mit Elimusertib sowie die ausgewählte Konzentration für eine Kombinationsbehandlung (schwarzes Rechteck). In der Tabelle daneben sind die gemittelten IC₅₀-Werte ± SD des biologischen Triplikats gelistet (A). Gemittelte IC₅₀-Werte ± SD der Kombinationsbehandlung von Cisplatin mit Elimusertib (eli) eines n = 5 (B). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Aus den resultierenden Dosis-Wirkungskurven wurde mit 10 nM eine Konzentration für die Kombinationsbehandlungen gewählt, die alleine keine toxische Wirkung entfaltet. Anhand der nachfolgenden Untersuchungen wird ersichtlich, dass die Zugabe von Elimusertib zu einer kompletten Sensitivierung gegenüber Cisplatin in allen Zellen führt. Zusätzlich liegen die IC₅₀-Werte der resistenten Klone bei der Kombinationsbehandlung unter denen der nur mit Cisplatin behandelten Wildtypen (Abb. 23 B).

Zur detaillierteren Analyse dieser Erkenntnisse wurde der Anteil apoptotischer Zellen unter diesen Behandlungen mittels des Annexin V/PI-Assays ermittelt.

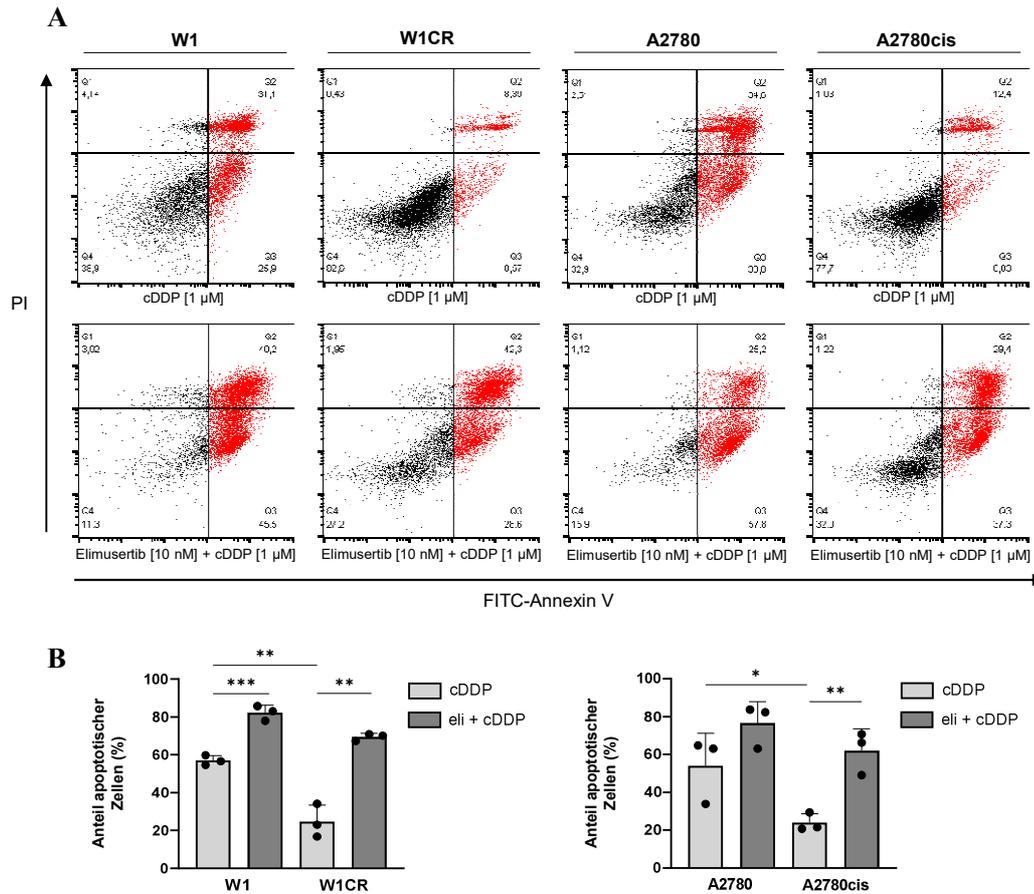


Abbildung 24: Darstellung des Apoptose-Assays in Form von repräsentativen Dotplots unter den angegebenen Behandlungen. Die in Rot eingezeichneten Zellen sind entweder früh- (Q3) oder spät-apoptotisch (Q2) (A). Gemittelte Werte \pm SD des Anteils apoptotischer Zellen des biologischen Triplikats ($n = 3$) (B). Als Test auf statistische Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die Ergebnisse in Abb. 24 bestätigen die Resultate der Zellviabilitätsassays und verdeutlichen den starken Effekt des Elimusertibs auf die Überwindung einer Cisplatinresistenz. Es wird zunächst bestätigt, dass die resistenten Subtypen unter alleiniger Behandlung mit cDDP, wie zu erwarten war, einen signifikant geringeren Anteil apoptotischer Zellen haben als ihre jeweiligen Wildtypen. Jedoch ist der Anstieg dieser Fraktionen durch die Zugabe von Elimusertib in W1CR- und A2780cis-Zellen deutlich stärker als bei den Wildtypen und übertrifft zudem deren Werte unter der Standardtherapie.

5.2.1.2 Expression von ATR unter Elimusertib- und Cisplatinbehandlung

Als nächstes wurde die Proteinexpression unter den zuvor getesteten Behandlungen in den Zellen betrachtet. Dafür wurden zunächst die Expressionen von ATR und dessen aktivierter Form pATR mittels Western Blot untersucht.

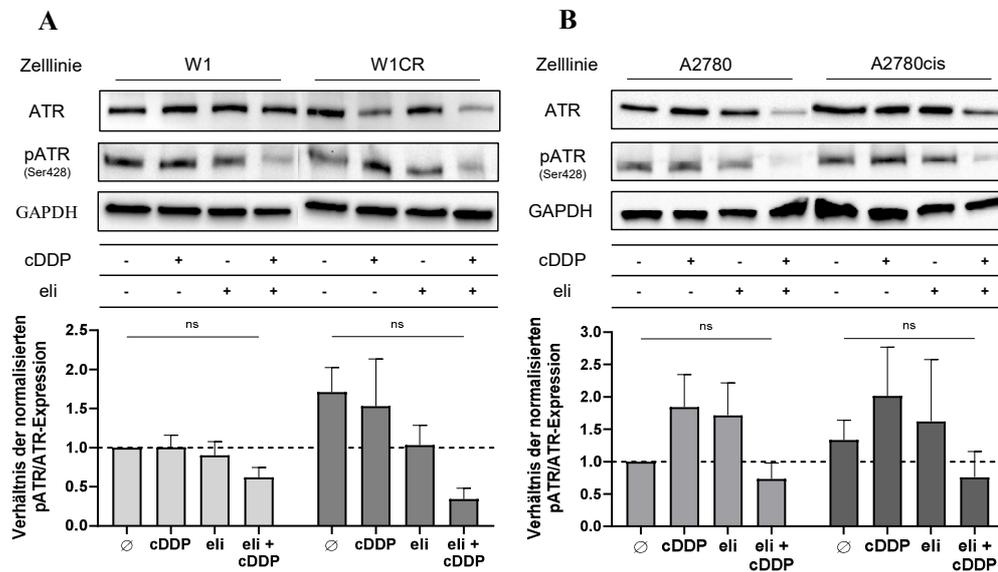


Abbildung 25: Expressionen von ATR und pATR in W1/W1CR- (A) und A2780/A2780cis-Zellen (B) unter den angegebenen Behandlungen: cDDP [1 μ M] und eli [10 nM]. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats (n = 3) und das Verhältnis der relativen Expressionen von pATR und ATR. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey Test.

Die resultierenden Daten zeigen zunächst, dass ATR in den W1CR-Zellen aktiver ist als im Wildtyp W1, während das A2780-Zellpaar ein sehr ähnliches Expressionsverhalten zeigt. Cisplatin führt nur in letzterem zu einem leichten Anstieg der ATR-Aktivität. Die Synergie zwischen Cisplatin und Elimusertib verdeutlicht sich in der Kombination beider Wirkstoffe, da die Aktivierung von ATR, wenn auch nicht signifikant, nur in diesen Proben unterdrückt wird (Abb. 25).

5.2.1.3 Transienter *knockdown* von ATR

Um die Bedeutung der ATR-Kinase für die Cisplatinresistenz noch genauer zu untersuchen, wurde ein transienter *knockdown* mittels siRNA in den W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen durchgeführt. Dies soll ebenfalls ausschließen, dass die durchschlagende Wirkung von Elimusertib durch *off-target*-Effekte verursacht wird.

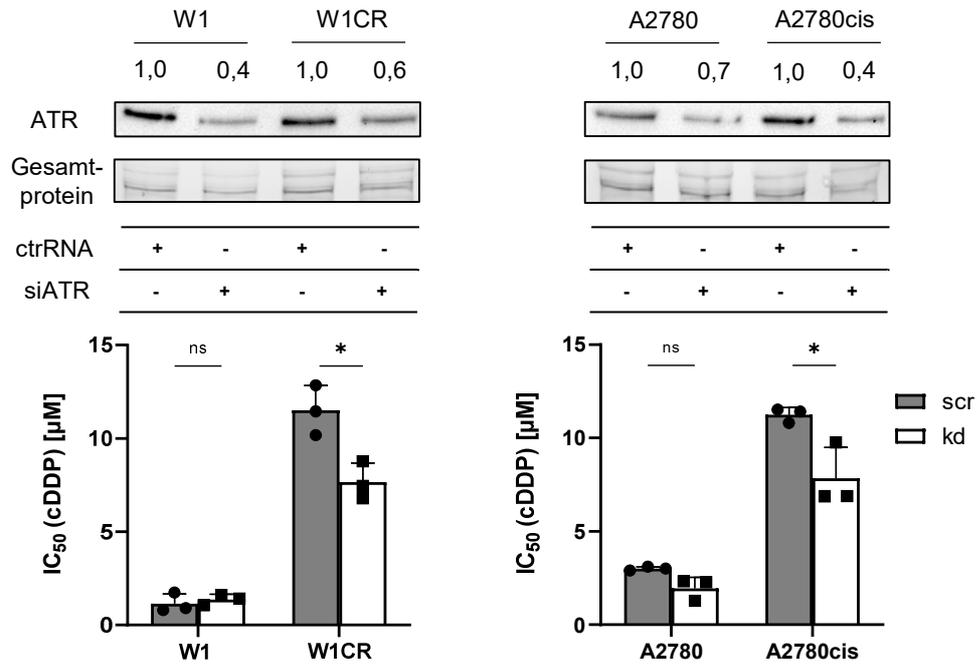


Abbildung 26: Exemplarische Western Blots von ATR in W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen unter Behandlung mit Kontroll-siRNA (ctr) oder ATR *knockdown*-siRNA (siATR). Über den Bildern ist die relative Expression von ATR unter den jeweiligen Bedingungen angegeben. Die Histogramme repräsentieren die Mittelwerte \pm SD der IC₅₀-Werte von Cisplatin unter der Behandlung mit Kontroll-siRNA (scr) oder ATR *knockdown*-siRNA (kd). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. *: $p < 0,05$.

Der siRNA-*knockdown* hat in den Zellen nicht zu einer kompletten Herunterregulierung der ATR-Expression geführt. Dennoch sind Auswirkungen auf die Cisplatin-toleranz zu erkennen. Besonders ersichtlich werden sie in den beiden resistenten Subtypen W1CR und A2780cis, die ein signifikantes Absinken der IC₅₀-Werte durch die reduzierten ATR-Level erfahren (Abb. 26). Dies verdeutlicht die Bedeutung der Kinase für die Abwehr platinbasierter DNA-Schäden in chemoresistenten Zellen und bestätigt zudem, dass die Wirkung des Elimusertibs tatsächlich der Inhibition von ATR zuzuschreiben ist.

5.2.1.4 Resistenzüberwindung mit Elimusertib in weiteren Zelllinien

Neben den zwei bisher beschriebenen Zellpaaren wurden die Versuche der Kombinationsbehandlung von Elimusertib um das Zellpaar der Kuramochi und ihrem cisplatinresistenten Subtyp Kuramochi^{cDDP²⁰⁰⁰} sowie die EFO21-Zellen erweitert. Für einen ersten Vergleich wurde zunächst die Expression von ATR in allen sieben Zelllinien untersucht.

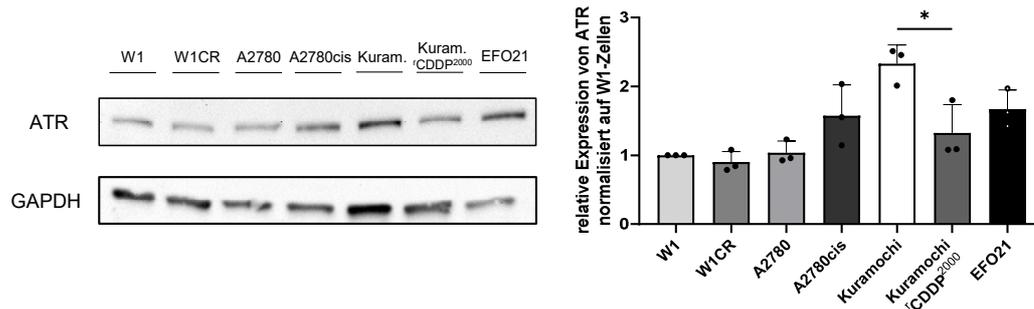


Abbildung 27: Exemplarischer Western Blot der Expression von ATR in den gekennzeichneten Zelllinien. Zudem ist der Mittelwert \pm SD der relativen Expression eines biologischen Triplikats ($n = 3$) auf W1-Zellen normalisiert dargestellt. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels ungepaartem t-Test zwischen den jeweiligen Zellpaaren. *: $p < 0,05$.

Die Ergebnisse der Western Blots spiegeln ein sehr heterogenes Expressionsmuster von ATR in den einzelnen Zellpaaren wider. Während zwischen den W1- und W1CR-Zellen kein Unterschied besteht, exprimieren die resistenten A2780cis-Zellen etwas mehr als ihr Wildtyp. Beim Kuramochi-Zellpaar ist das umgekehrte Phänomen zu beobachten – der Wildtyp weist signifikant höhere ATR-Level als die resistente Variante auf. Die EFO21-Zellen, welche in den folgenden Untersuchungen durch eine intrinsische Cisplatinresistenz in Erscheinung treten, haben eine den A2780cis-Zellen vergleichbare ATR-Expression.

Als nächstes wurde auch in den drei verbliebenen Zelllinien getestet, ob eine Kombination mit Elimusertib die Effektivität von Cisplatin ebenso steigern kann, wie es in den beiden zuvor untersuchten Zellpaaren W1/W1CR und A2780/A2780cis aufgetreten ist.

Auch in diesen drei Zelllinien hat die gewählte Elimusertib-Konzentration von 10 nM alleine keine Auswirkungen auf die Viabilität (Abb. 28 A). Zusätzlich wurde mit 1 nM eine noch geringere Menge des ATRi als Vorbehandlung getestet. Die Kombination mit Cisplatin sorgt auch in diesen Zellen für eine deutliche Effektivitätssteigerung des Zytostatikums, die zudem konzentrationsabhängig der eingesetzten Elimusertib-Dosis ist. Dabei werden sowohl die resistent gezüchteten Kuramochi^{rCDDP²⁰⁰⁰}-, als auch die intrinsisch resistenten EFO21-Zellen (IC_{50} -Werte vergleichbar mit denen der resistenten Subtypen) hoch signifikant sensitiviert.

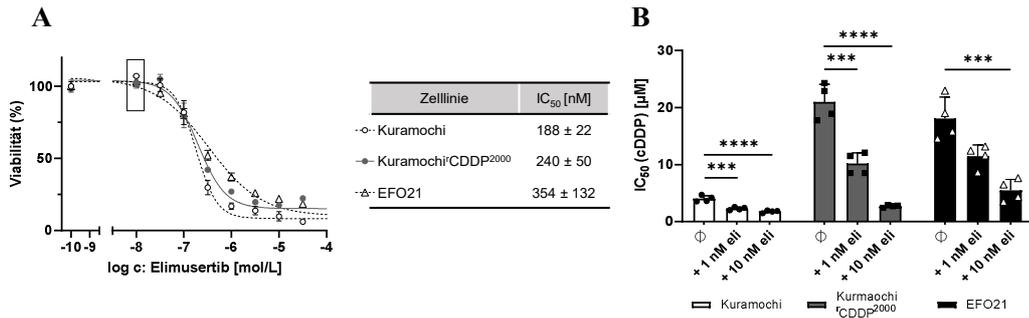


Abbildung 28: Exemplarische Dosis-Wirkungskurve der Behandlung des Kuramochi-Zellpaares und der EFO21-Zellen mit Elimusertib sowie die 10 nM der Kombinationsbehandlung als schwarzes Rechteck eingezeichnet. In der Tabelle daneben sind die gemittelten IC₅₀-Werte ± SD des biologischen Triplikats gelistet (A). Gemittelte IC₅₀-Werte ± SD der Kombinationsbehandlung von Cisplatin mit Elimusertib (eli) eines n = 4 (B). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001.

Für eine mathematische Bestätigung der beobachteten Synergie zwischen Elimusertib und Cisplatin wurde zusätzlich der Kombinationsindex (CI) kalkuliert. Dies erfolgte mittels SynergyFinder Plus [322]. Die angezeigten CI-Werte in der Heatmap (Abb. 29) wurden jeweils aus der Kombination fixer Konzentrationen der beiden Wirkstoffe errechnet, von denen pro Zelllinie jeweils vier dargestellt sind.

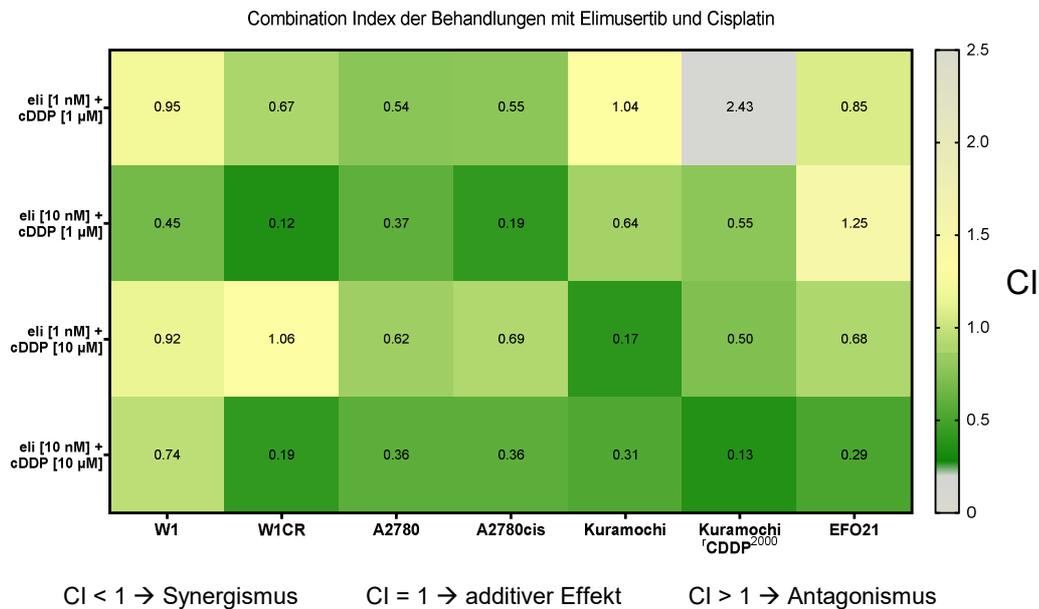


Abbildung 29: Heatmap der mittels SynergyFinder Plus kalkulierten CI-Werte für die Behandlungen mit Elimusertib und Cisplatin in den angegebenen Konzentrationen in den sieben untersuchten Zelllinien.

Die berechneten CI-Werte bestätigen die z. T. hochsignifikanten Sensitivierungen gegen Cisplatin durch die Zugabe subtoxischer Mengen des ATRi Elimusertib in den Zellviabilitätsassays. Lediglich bei der Behandlung der Kuramochi^rCDDP²⁰⁰⁰-Zellen mit beiden Substanzen in den niedrigen Konzentrationen wird ein Antagonismus kalkuliert. Dagegen ist für sie bei den restlichen drei Kombinationen ein starker Synergismus errechnet. Insgesamt fallen besonders die Kombinationen mit 10 nM Elimusertib mit Werten deutlich unter eins auf und bestätigen damit die durchschlagende Wirkung des ATRi.

Zusammenfassend zeigen diese Daten sowohl, dass erhöhte Level der ATR-Kinase nicht zwangsläufig eine Resistenz gegen Cisplatin anzeigen (Abb. 27), wohingegen sie aber einen sehr empfindlichen Angriffspunkt cisplatinresistenter Ovarialkarzinomzellen darstellt, die eine essentielle Rolle in der Reaktion auf die induzierten DNA-Schäden sowie des replikativen Stresses einnimmt.

5.2.2 Beteiligung von *downstream* Effekten und Proteinen der ATR-Kinase in der Cisplatinresistenz

Mit den folgenden Experimenten soll nun die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen hinter der Resistenzüberwindung durch Elimusertib erfolgen. Dafür wurde zunächst die Regulierung des Zellzyklus in den Zellpaaren W1/W1CR und A2780/A2780cis untersucht. Anschließend erfolgte eine genauere Analyse der Beteiligung von *downstream*-Kinasen an der Ausprägung der Cisplatinresistenz.

5.2.2.1 Einflüsse von Cisplatin und Elimusertib auf den Zellzyklus

Es ist bekannt, dass ATR durch das nachgeschaltete *signaling* Arreste in der S- und G2/M-Phase des Zellzyklus induziert [112, 113]. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Verteilung der Zellen auf die jeweiligen Phasen unter den Einflüssen von Cisplatin und Elimusertib analysiert.

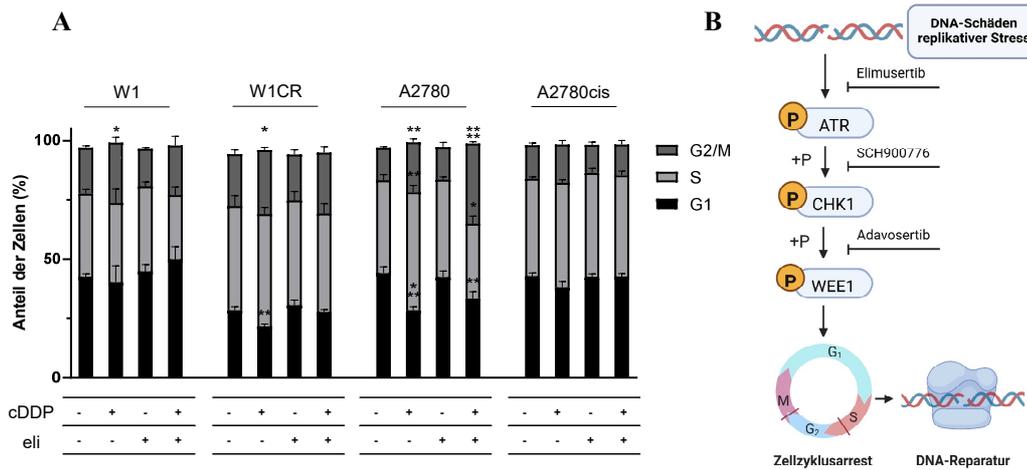


Abbildung 30: Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus unter den angegebenen Behandlungen (A). Cisplatin wurde mit [1 μ M] und Elimusertib mit [10 nM] eingesetzt. Statistische Signifikanz wurde mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test ermittelt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Übersicht des untersuchten Signalwegs, der durch die platinbasierten DNA-Schäden eingeleitet wird, mit den Angriffspunkten der nachfolgend eingesetzten Inhibitoren. Erstellt mit BioRender.com (B).

Die Auswirkungen der Behandlungen auf den Zellzyklus sind in den betrachteten Zelllinien sehr heterogen (Abb. 30 A). Beim Vergleich der W1-Zellen mit ihrem resistenten Subtyp W1CR fällt zunächst auf, dass letztere eine intrinsisch verlängerte S-Phase aufweisen. Auf Cisplatin reagieren beide mit einem signifikanten Anstieg der Zellen in G2/M-, zugunsten der G1-Phase. Die zusätzliche Inhibition von ATR führt zu einer leichten Verkürzung der S-Phase in den W1-Zellen, was für eine Beteiligung der Kinase in der Einleitung eines Arrests an diesem *checkpoint* spricht. Die W1CR-Zellen erfahren durch die zusätzliche ATR-Inhibition keine weitere Verschiebung der Phasen, verglichen mit den cDDP-einzelbehandelten Proben. Der Zellzyklus der A2780-Zellen wird durch die Kombinationsbehandlung stärker dereguliert. Cisplatin alleine induziert bereits signifikante Verlängerungen von S- und G2/M-Phase. Durch den Zusatz von Elimusertib verschiebt sich das Verhältnis noch weiter in Richtung eines Arrests in der G2/M-Phase. Auch bei diesen Zellen wird somit die regulatorische Rolle von ATR in der Einleitung des *checkpoints* der S-Phase ersichtlich. Ihr resistenter Subtyp A2780cis weist dagegen, wie schon in den Versuchen mit den Goldverbindungen (siehe 5.1.5), keine Veränderungen in der Regulierung des Zellzyklus unter den genannten Behandlungen auf.

5.2.2.2 Expression von CHK1 in W1- und A2780-Zellen

Das erste *downstream* Protein, welches von ATR in Reaktion auf replikativen Stress oder DNA-Schäden aktiviert wird, ist CHK1 [112]. Aus diesem Grund wurde zur Aufklärung der hohen Wirksamkeit des ATRi Elimusertib sowie dessen Einflüsse auf die Zellzyklusregulierung analysiert, wie das Aktivierungsmuster der Kinase beeinflusst wird.

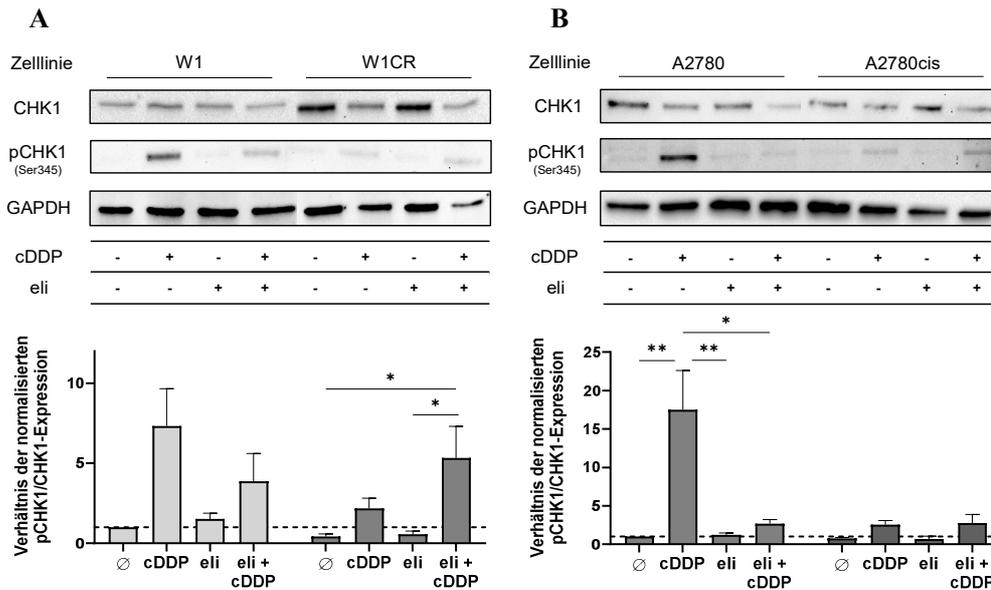


Abbildung 31: Expressionen von CHK1 und pCHK1 in W1/W1CR- (A) und A2780/A2780cis-Zellen (B) unter den angegebenen Behandlungen: cDDP [1 μ M] und eli [10 nM]. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats (n = 3) und das Verhältnis der relativen Expressionen von pCHK1 und CHK1. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01.

Diese Daten legen deutliche Unterschiede zwischen den cisplatinresistenten Zellen und ihren Wildtypen offen. Sowohl W1- als auch A2780-Zellen haben eine deutlich gesteigerte Aktivität von CHK1 unter dem Einfluss des Cisplatin, die in Kombination mit Elimusertib erheblich unterdrückt wird. In den resistenten Subtypen ist eine stark abweichende Regulierung der CHK1-Expression ersichtlich. Die platininduzierte Aktivierung ist bei beiden deutlich schwächer ausgeprägt und der ATRi vermittelt eher einen gegenteiligen Effekt als in den Wildtypen. Unter der Kombination aus Cisplatin und Elimusertib sind die Level aktivierter CHK1 vergleichbar oder sogar höher (W1CR), als in den Proben, die nur mit dem Zytostatikum inkubierten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass CHK1 in den chemoresistenten Zellen auch ATR-unabhängig aktiviert werden kann, und es nicht

durch ein geradliniges *signaling*, wie in Abb. 30 B dargestellt, vermittelt wird. Außerdem erklären diese Daten die weniger stark ausgeprägten Effekte von Elimusertib auf die Zellzyklusregulierung der beiden resistenten Subtypen.

5.2.2.3 Kombination von Cisplatin mit CHK1i und WEE1i

Die gegensätzlichen Auswirkungen des ATRi auf die Expression von CHK1 führten zur Fragestellung, wie die einzelnen Zellen auf eine Hemmung der Kinase selbst und der ihr nachgeschalteten WEE1 reagieren [279]. Dafür wurde zunächst die Toxizität der Inhibitoren SCH900776 (CHK1i) und Adavosertib (WEE1i) in einer Einzelbehandlung analysiert und anschließend Konzentrationen für die folgenden Kombinationsuntersuchungen ausgewählt, die alleine möglichst geringe Auswirkungen haben (Abb. 32).

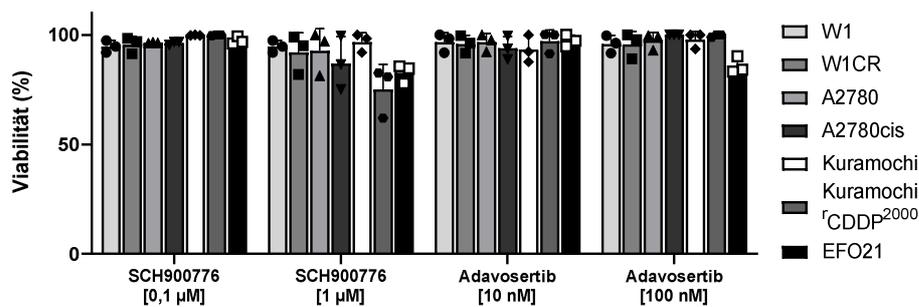


Abbildung 32: Mittelwerte \pm SD der relativen Viabilität der angegebenen Zelllinien unter der Behandlung mit SCH900776 [0,1 μ M] und [1 μ M] sowie Adavosertib [10 nM] und [100 nM] in Prozent, jeweils bezogen auf eine PBS-behandelte Negativkontrolle.

Die Daten in Abbildung 32 zeigen, dass die cisplatinresistenten Kuramochi^{rCDDP²⁰⁰⁰} am empfindlichsten auf den CHK1i reagieren und unter einer Einzelbehandlung mit der höheren Konzentration nur ca. 75 % der Viabilität ihrer Negativkontrolle aufweisen. Ähnliches gilt für die EFO21-Zellen, die nur geringfügig robuster gegen die CHK1-Inhibition sind. Mit diesen vier ermittelten Konzentrationen erfolgten nun die Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin, deren Ergebnisse in Abbildung 33 dargestellt sind.

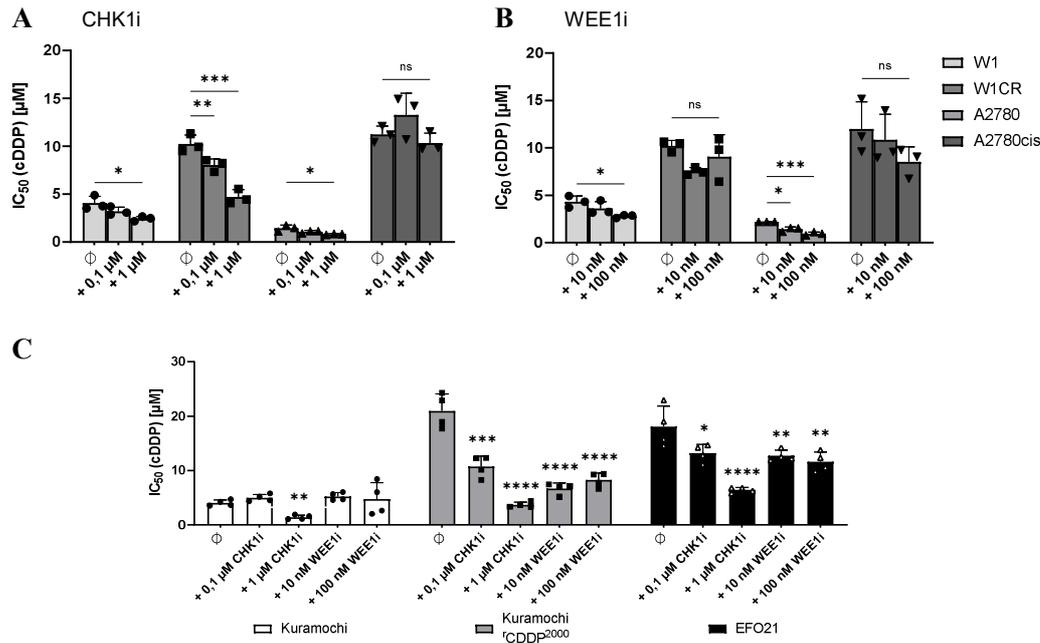


Abbildung 33: Gemittelte IC₅₀-Werte ± SD der Kombinationsbehandlung von Cisplatin mit SCH900776 (CHK1i) (A) und Adavosertib (WEE1i) (B) in W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen (n = 3) sowie in Kuramochi/Kuramochi^{CDDP2000}- und EFO21-Zellen (n = 4) (C). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001.

Die Inhibition der beiden ATR-*downstream* Kinasen CHK1 und WEE1 in Kombination mit Cisplatin beeinflusst die untersuchten Zelllinien auf unterschiedliche Weise. Dabei ist ein sensitivierender Effekt, unter Berücksichtigung der Verwendung einer höheren Dosis, von SCH900776 in mehr Zelllinien zu beobachten als von Adavosertib. So wird die Resistenz in W1CR-, Kuramochi^{CDDP2000}- und EFO21-Zellen durch eine CHK1-Inhibition konzentrationsabhängig überwunden, während die WEE1-Inhibition nur in den Kuramochi^{CDDP2000}-Zellen zu einem hochsignifikanten Effekt führt. Die EFO21-Zellen werden durch Adavosertib ebenso in ihrer Cisplatinintoleranz beeinflusst. Jedoch fällt auf, dass die Effekte des WEE1i keiner Konzentrationsabhängigkeit unterliegen. In W1CR-Zellen ist die höhere Dosis sogar weniger effektiv als eine Vorbehandlung mit 10 nM.

Diese Daten deuten auf eine unterschiedliche Bedeutung der *downstream* Proteine von ATR für die Abwehr platinbasierter Schäden in den verschiedenen Zelllinien auf. Beim Vergleich der CHK1-Aktivierung (Abb. 31) in A2780cis- und W1CR-Zellen wird bspw. ersichtlich, dass erstere diesen Signalweg in Reaktion auf

Cisplatin weniger durchlaufen als letztere. Folgerichtig ist die Inhibierung mit SCH900776 in den A2780cis-Zellen weniger effektiv als in den W1CR (Abb. 33).

Es kann nun insgesamt geschlussfolgert werden, dass die Inhibition von ATR einen stärkeren Synergismus mit Cisplatin hervorruft als die ihrer *downstream* Substrate CHK1 und WEE1. Zudem variiert die Regulierung dieses Signalwegs in den untersuchten Zelllinien und liefert nicht die vollständige Erklärung, warum Elimusertib universell zu einer kompletten Sensitivierung gegenüber Cisplatin führt.

5.2.2.4 Regulierung der homologen Rekombination durch ATR

Die ATR-Kinase beeinflusst nicht nur die Aktivität des DNA *damage response* *signalings*, sondern kann ebenso eine Schadensreparatur durch die homologe Rekombination induzieren [118]. Deshalb wurde zur weiteren Aufklärung des Wirkmechanismus von Elimusertib untersucht, wie die Expressionen wichtiger HR-Proteine beeinflusst werden. Zunächst wurde mit BRCA1 einer der Hauptinitiatoren des gesamten Signalwegs analysiert [156]. Die Untersuchungen wurden im W1- und A2780-Zellpaar durchgeführt, da bei ihnen die Wirksamkeit des ATRi v. a. bei letzterem von den Effekten der CHK1i und WEE1i abwich.

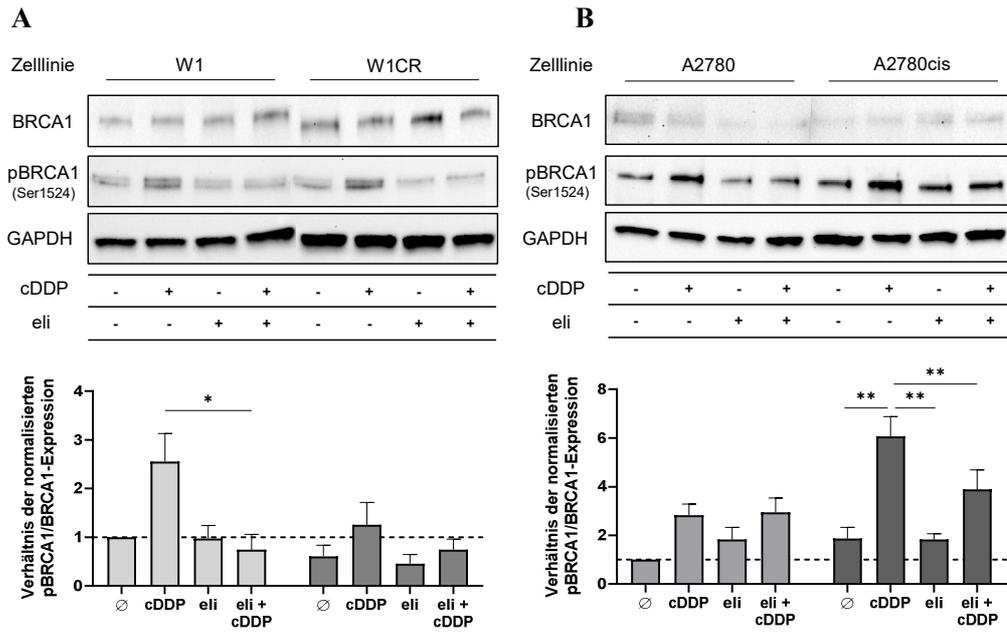


Abbildung 34: Expressionen von BRCA1 und pBRCA1 in W1/W1CR- (A) und A2780/A2780cis-Zellen (B) unter den angegebenen Behandlungen: cDDP [1 μ M] und eli [10 nM]. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats (n = 3) und das Verhältnis der relativen Expressionen von pBRCA1 und BRCA1. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01.

Cisplatin verursacht in allen vier Zellarten einen Anstieg der BRCA1-Aktivität, was, außer in A2780, durch Elimusertib verhindert wird (Abb. 34). Bei ihnen nimmt unter der Behandlung mit dem ATRi die Expression des gesamten, unphosphorylierten BRCA1 ebenso ab, weshalb der Quotient im Vergleich zu den cisplatinbehandelten Proben unverändert ist. Insgesamt wird mit der Hemmung der Einleitung der HR ein weiterer Wirkmechanismus von Elimusertib ersichtlich. Die Expressionsdaten der Rekombinase Rad51, die einen der Haupteffektoren dieses Signalwegs darstellt, bestätigen diese Befunde (Abb. 35).

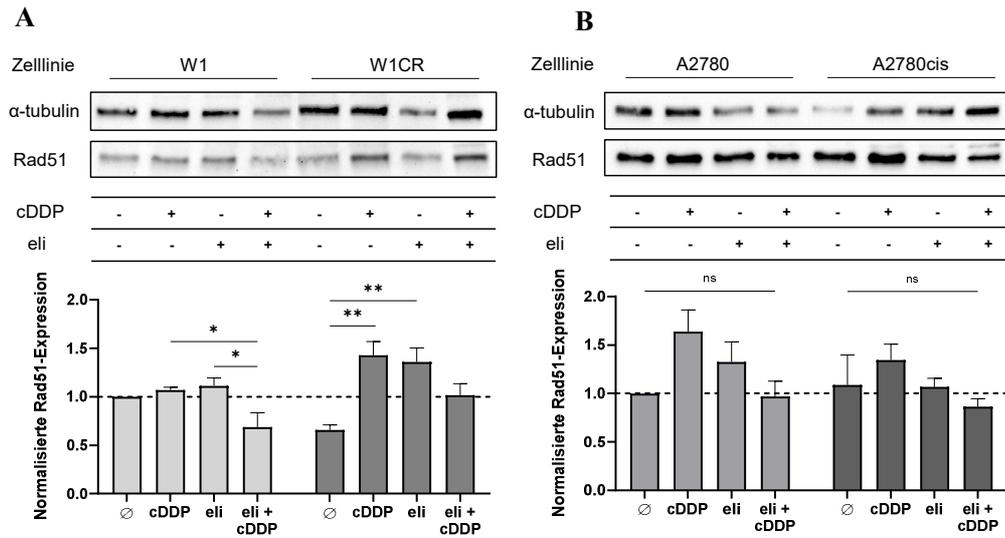


Abbildung 35: Expression von Rad51 in W1/W1CR- (A) und A2780/A2780cis-Zellen (B) unter den angegebenen Behandlungen: cDDP [1 µM] und eli [10 nM]. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot eines biologischen Quartetts (n = 4) und die auf die jeweilige unbehandelte Wildtypzelle normalisierten Rad51-Expressionen. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01.

Auch bei diesem Protein ist eine cisplatininduzierte Steigerung der Expression zu erkennen, die durch eine Kombination mit Elimusertib zurückgedrängt wird. Dadurch kann der starke Synergismus zwischen Cisplatin und ATRi sowohl mit einer in ihrer Ausprägung variierenden Hemmung der DDR-Proteine, als auch der Unterdrückung einer HR-vermittelten DNA-Reparatur begründet werden.

5.2.3 Einfluss der Helikase Schlafen11 auf die Cisplatinresistenz

Die Expression von Schlafen11 (Slfn11) gilt als Biomarker für das Ansprechen von Tumorzellen auf DNA-schädigende Substanzen wie Cisplatin. So steht eine Resistenz gegen dieses Zytostatikum in Verbindung mit epigenetisch unterdrückten Mengen der Helikase [139, 140]. Da ebenso beschrieben ist, dass Zellen, die sehr sensitiv auf eine Inhibierung von ATR reagieren, geringe Level an Slfn11 aufweisen, wurde dieser potentielle Biomarker in dieser Arbeit genauer untersucht [349]. Als erste Befunde in diesem Zusammenhang dienen die gesammelten Daten der Zytotoxizität des Cisplatins in den sieben analysierten Zelllinien und die jeweils zugehörigen, intrinsischen Proteinexpressionen von Slfn11.

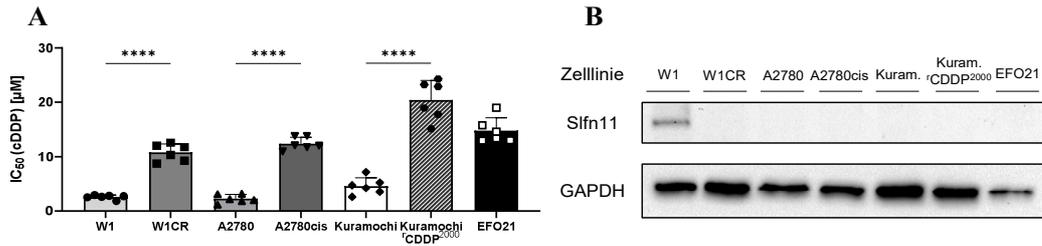


Abbildung 36: Gemittelte IC₅₀-Werte ± SD der Behandlung mit Cisplatin in den angezeigten Zelllinien (n = 6) (A). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. ****: p < 0,0001. In (B) ist ein exemplarischer Western Blot des biologischen Triplikats der Slfn11-Expression in den angezeigten Zelllinien dargestellt.

Die Daten in Abb. 36 offenbaren, dass eine unterdrückte Expression von Slfn11 nicht zwangsläufig mit einer Cisplatinresistenz einhergehen muss. Denn sowohl die sensitiven A2780-, als auch Kuramochi-Wildtypzellen weisen wie ihre resistenten Subtypen keine Slfn11-Expression auf, trotz einer signifikant höheren Empfindlichkeit gegenüber dem Zytostatikum. Lediglich beim W1-Zellpaar tritt der erwartbare Fall ein, dass die Wildtyp-Zelle ein Signal aufweist, das in der resistenten Variante unterdrückt wird. Diese unterliegt dadurch nicht mehr den proapoptischen Eigenschaften von Slfn11 in Reaktion auf DNA-Schädigungen [350]. In den nächsten Experimenten wurde versucht die Expression von Slfn11 mit epigenetisch wirksamen Verbindungen, die in Abschnitt 2.4.4 vorgestellt sind, zu induzieren und dadurch eine Sensitivierung gegenüber Cisplatin zu erzielen.

Die detaillierten Untersuchungen zur Rolle von Slfn11 als potentiellen Angriffspunkt einer antitumoralen Therapie wurden mit den Zellpaaren W1 und A2780 durchgeführt. Dies dient der Erforschung beider aufgetretener Szenarien, in denen sich Wildtyp- und resistente Zelle in ihren Slfn11-Level entweder unterscheiden oder beide eine unterdrückte Expression aufweisen.

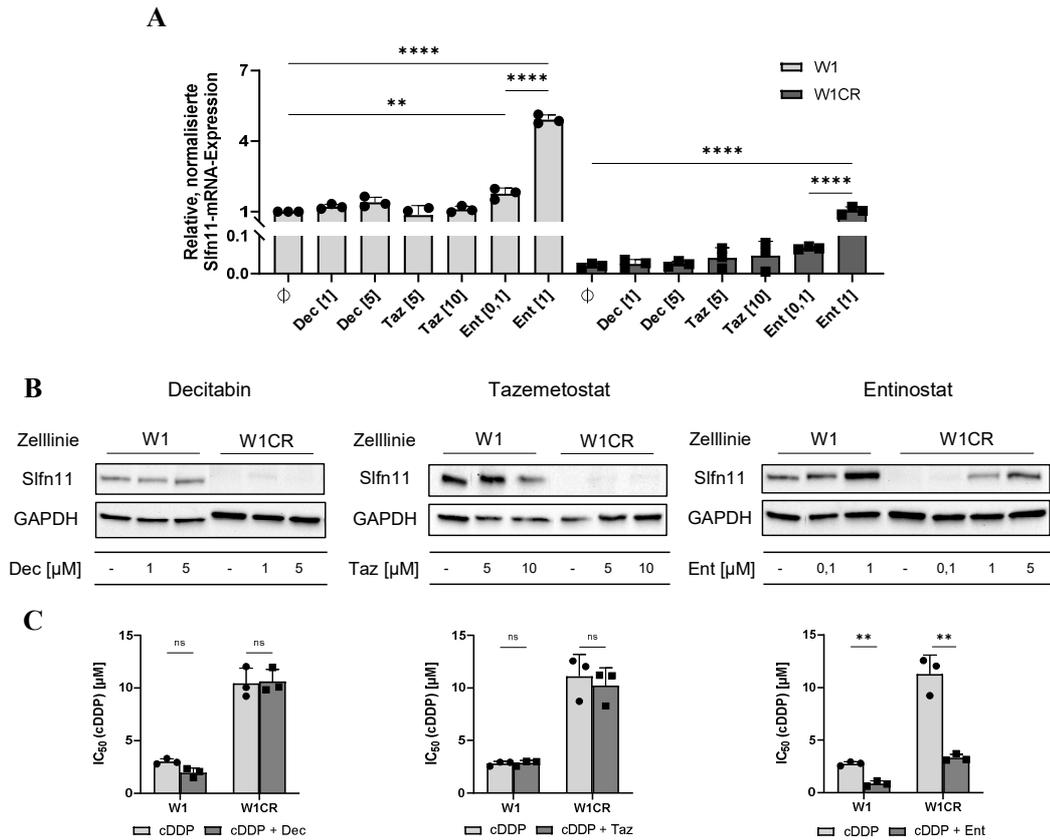


Abbildung 37: Mittelwerte \pm SD der relativen mRNA-Expression von Slfn11 im W1-Zellpaar unter Behandlung mit Decitabin (Dec), Tazemetostat (Taz) oder Entinostat (Ent), normalisiert auf unbehandelte W1-Zellen (A). Repräsentative Western Blots eines biologischen Triplikats der zuvor genannten Behandlungen im W1-Zellpaar (B). Mittelwerte \pm SD der IC_{50} -Werte von cDDP unter Vorbehandlung mit den genannten Substanzen (C). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Im W1-Zellpaar werden die Unterschiede zwischen beiden Subtypen auch mittels qPCR gemessener mRNA-Expression von Slfn11 ersichtlich (Abb. 37 A). Des Weiteren ist zu erkennen, dass von den drei untersuchten Wirkstoffen nur der HDAC-Inhibitor Entinostat imstande ist, die Slfn11-Level zu erhöhen. Dagegen scheint das *silencing* der Expression nicht durch DNA-Methyltransferasen oder die Histonmethyltransferase EZH2 vermittelt zu sein, da weder Decitabin noch Tazemetostat einen Effekt erzielen. Diese Befunde sind durch die detektierten Proteinexpressionen unter den jeweiligen Behandlungen bestätigt (Abb. 37 B). Die durchgeführten Viabilitätsassays deuten zudem auf eine Korrelation zwischen Slfn11-Expression und Cisplatinresistenz hin. Lediglich unter Vorbehandlung mit Entinostat, welches auch die einzige Verbindung ist, die die Expression beeinflusst, wird eine signifikante Sensitiverung gegen das Zytostatikum erzielt.

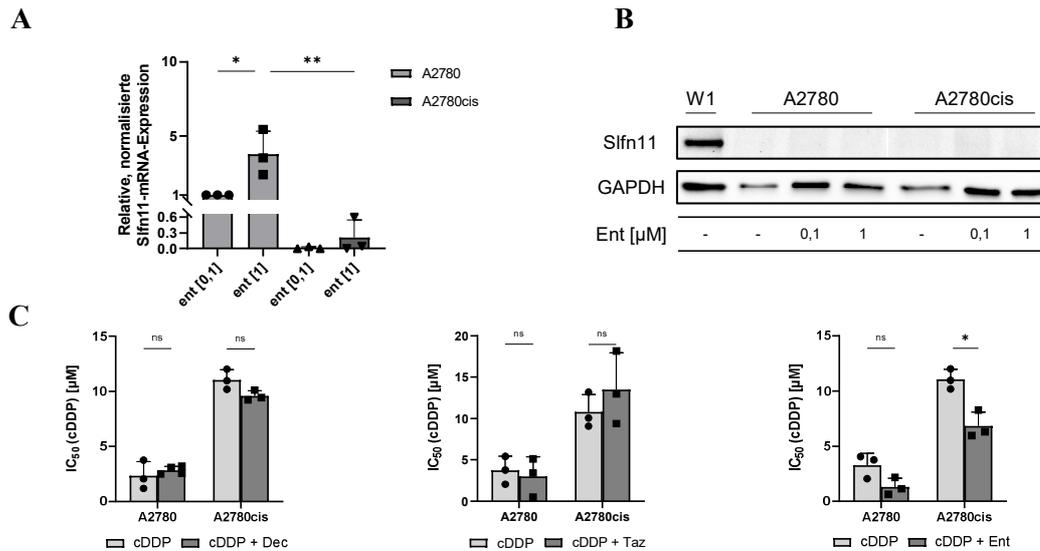


Abbildung 38: Mittelwerte \pm SD der relativen mRNA-Expression von Slfn11 im A2780-Zellpaar unter Behandlung mit Entinostat (Ent), normalisiert auf mit [0,1 μ M] behandelte A2780-Zellen (A). Repräsentativer Western Blot eines biologischen Triplikats der zuvor angezeigten Behandlungen, verglichen mit unbehandelten W1-Zellen (B). Mittelwerte \pm SD der IC₅₀-Werte von cDDP unter Vorbehandlung mit den angezeigten Substanzen (C). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: $p < 0,05$.

Bei Betrachtung der Messungen des A2780-Zellpaares muss zunächst beachtet werden, dass beide Varianten die Slfn11-Expression intrinsisch so stark unterdrücken, dass sie sogar auf mRNA-Ebene nicht detektierbar ist. Wie zuvor beobachtet, ist auch bei diesen Zellen lediglich Entinostat in der Lage eine Expression von Slfn11 zu erzeugen, die im Wildtyp deutlich stärker ausfällt als in der resistenten Variante (Abb. 38 A). Beim Betrachten des Western Blots (Abb. 38 B) ist jedoch ersichtlich, dass dies nicht auf Proteinebene übertragbar ist, da verglichen mit den W1-Zellen keine Banden zu erkennen sind. Dennoch entfaltet Entinostat eine sensitivierende Wirkung auf Cisplatin (Abb. 38 C). Diese geht womöglich auf andere Effekte des HDAC-Inhibitors zurück, welcher schließlich nicht selektiv die Expression von Slfn11 beeinflusst. Wie im W1-Zellpaar, erzeugen Decitabin und Tazemetostat weder einen Effekt auf die Expression von Slfn11, noch auf die IC₅₀-Werte des Zytostatikums.

5.2.4 Zusammenfassung der Resistenzüberwindung durch die Adressierung des DDR-Signalwegs

Es kann nun festgehalten werden, dass Slfn11 nicht als allgemeingültiger Biomarker einer Cisplatinresistenz fungieren kann. Zudem ist kein Zusammenhang zwischen seiner Expression und dem Ansprechen auf den ATRi Elimusertib zu erkennen, da alle Zellen, auch die Slfn11-exprimierenden W1, durch Elimusertib sensitiviert werden. Des Weiteren ist die Behandlung mit einem HDAC-Inhibitor der vielversprechendste epigenetische Weg, die Expression der Helikase zu induzieren und resistente Tumore zusätzlich zu sensitiveren. Jedoch kann dies nicht eindeutig auf die Beeinflussung der Slfn11-Level zurückgeführt werden, weshalb auch andere Mechanismen, wie eine Unterdrückung der HR, für dessen Wirksamkeit in Betracht gezogen werden müssen [351].

Insgesamt geht ATR in diesem Kapitel als ein Schlüsselpunkt der intrinsischen und erworbenen Cisplatinresistenz hervor, da alle Zellen einem starken Synergismus von Elimusertib und cDDP unterliegen. Einblicke in die beteiligten Signalwege zeigen, dass die zugrundeliegenden Mechanismen hinter der ATR-induzierten Abwehr des Zytostatikums heterogen reguliert sind. In manchen Zelllinien, wird der *downstream* geschaltete DDR-Weg konsequent durchlaufen und mit CHK1i und WEE1i ebenso eine Sensitivierung erreicht. Für andere Zelllinien, wie die A2780cis, scheint die ATR-vermittelte Aktivierung der HR von größerer Bedeutung zu sein. Insgesamt ist Elimusertib, v. a. unter Berücksichtigung der eingesetzten Dosen, der effektivste der hier eingesetzten DDR-Inhibitoren. Klinische Testungen, die bereits angelaufen sind, müssen nun beweisen, dass die Wirksamkeit auch in die Praxis übertragbar ist und zudem keine intolerablen Nebenwirkungen hervorruft [352]. In der Zukunft sollten Studien auch Patientinnen mit resistenten Tumoren beinhalten, um für diese Fälle eine vielversprechendere Behandlung als die bisher etablierten zu ermöglichen. Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten sind in einer Publikation erfasst, die sich zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit in Revision im Journal *BBA Molecular Basis of Disease* befand.

5.3 Untersuchung von Kreuzresistenzen gegen PARPi

Die Wirkstoffklasse der PARPi hat sich in den letzten Jahren in der Erhaltungstherapie eines platinsensitiven Ovarialkarzinoms etabliert. Sie werden meist jedoch nur eingesetzt, wenn der Tumor Mutationen in einem der BRCA-Gene oder des HR-Signalwegs aufweist [39]. Zudem treten auch gegen diese Verbindungen Resistenzen auf, die häufig mit einer erhöhten Toleranz gegen Cisplatin einhergehen [353, 354]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher wenig erforscht und Daten zu Testungen von PARPi in cisplatinresistenten Zellen gibt es kaum. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, wie sie auf eine Behandlung mit drei der zugelassenen Vertreter ansprechen und auftretende Resistenzen potentiell überwunden werden können.

5.3.1 Kreuzresistenz von Cisplatin und Niraparib

Die ersten Vortestungen der Wirksamkeit von PARPi im W1-Zellpaar erfolgten mit Niraparib, da dieser Vertreter auch für die Behandlung von Patientinnen mit BRCA-Wildtyp zugelassen ist [39, 231]. Außerdem wurde untersucht, ob eine Kombinationsbehandlung mit diesem PARPi die Cisplatinresistenz überwinden kann.

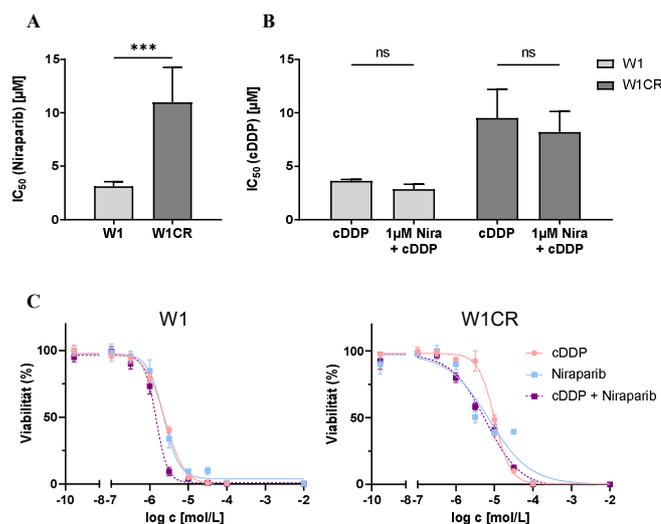


Abbildung 39: Mittelwerte ± SD der IC₅₀-Werte (n = 4) von Niraparib (A) und Cisplatin nach einer Vorbehandlung mit Niraparib (B) in W1- und W1CR-Zellen. Zudem sind exemplarische Dosis-Wirkungskurven des Ansprechens auf Cisplatin, Niraparib oder beiden zusammen in W1- und

W1CR-Zellen dargestellt (C). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Die Daten belegen eine signifikante Kreuzresistenz zwischen Cisplatin und Niraparib, da die W1CR-Zellen gegenüber dem PARPi eine ca. $3\times$ höhere Toleranz als ihr Wildtyp aufweisen (Abb. 39 A). Zudem ist ersichtlich, dass die IC_{50} -Werte von Cisplatin durch eine Vorbehandlung mit $1\ \mu\text{M}$ Niraparib, einer subtoxischen Menge, nicht beeinflusst werden. Die Dosis-Wirkungskurven einer gleichzeitigen Behandlung mit beiden Substanzen in der jeweils gleichen Dosis belegt diese Befunde ebenso. Insbesondere in den W1CR-Zellen ist keinerlei Verschiebung der Kurve zu erkennen. Bei den W1-Zellen halbiert sich die IC_{50} bei paralleler Behandlung. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die cisplatinresistente Zelle nicht durch eine gleichzeitige Gabe von PARPi sensitiviert wird. Damit ist auch die Rolle des BER, der DNA-Reparatursignalweg, welcher maßgeblich von PARP1 gesteuert wird, für die Cisplatinresistenz als untergeordnet anzusehen [172]. Des Weiteren bietet die enorme Toleranz der W1CR-Zellen gegen Niraparib Anlass für weitere Untersuchungen über deren Ursache. Dafür wurden zunächst weitere Zelllinien sowie zusätzliche PARPi für eine repräsentativere Datenlage hinzugezogen.

5.3.2 Zytotoxizität weiterer PARPi in den Ovarialkarzinomzelllinien

Um einen ersten Überblick der Wirkungen der drei zugelassenen PARPi Niraparib, Olaparib und Rucaparib in allen bisher verwendeten Zelllinien zu erhalten, wurden zunächst ihre IC_{50} -Werte bestimmt.

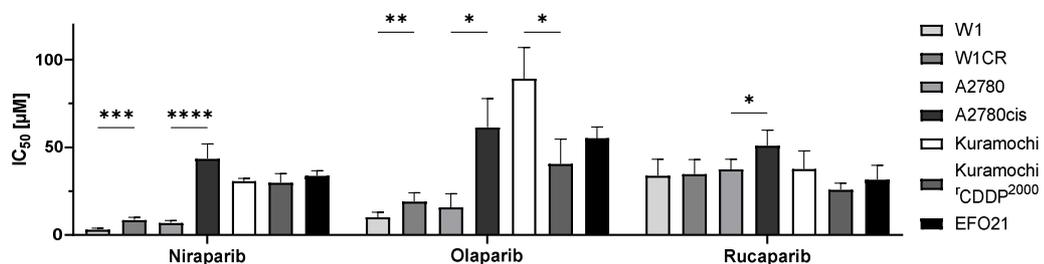


Abbildung 40: Mittelwerte \pm SD der IC_{50} -Werte ($n = 4$) von Niraparib, Olaparib und Rucaparib in den angezeigten Zelllinien (A). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Die Effektivität der drei PARPi ist in dem untersuchten Zelllinienspektrum äußerst heterogen (Abb. 40). Niraparib weist von ihnen in nahezu allen Zellen den geringsten, mittleren IC_{50} -Wert auf. Zudem sind bei diesem Vertreter Kreuzresistenzen im W1- und A2780-Zellpaar ersichtlich, in denen der cisplatinresistente Subtyp jeweils eine signifikant erhöhte Toleranz aufweist. Dieses Phänomen ist ebenso bei Olaparib festzustellen, welches in diesen vier Zelllinien jedoch weniger potent ist als Niraparib. Auffällig ist zudem die Umkehr der Kreuzresistenz im Kuramochi-Zellpaar unter Olaparibbehandlung. Zudem ist dieses Pärchen deutlich robuster gegen die beiden PARPi als das W1-Paar und die A2780-Zellen. Dies ist erstaunlich, denn Kuramochi-Zellen besitzen eine Mutation von BRCA2, welche seit der Entdeckung dieser Verbindungen als Marker für gutes Ansprechen gesehen wird und in der Praxis die diagnostische Voraussetzung für eine Behandlung mit einem der PARPi darstellt [311]. Die intrinsisch cisplatinresistenten EFO21-Zellen weisen bei allen drei PARPi IC_{50} -Werte vergleichbar zu denen der Kuramochi^rCDDP²⁰⁰⁰-Zellen auf und sprechen damit ebenfalls nicht gut auf diese Wirkstoffklasse an. Der dritte untersuchte Vertreter, Rucaparib, hat relativ vergleichbare IC_{50} -Werte in allen Zelllinien. Lediglich die A2780cis weisen einen signifikant erhöhten Wert, verglichen mit ihrem Wildtyp, auf. Trotz seiner insgesamt geringeren Aktivität kann festgehalten werden, dass Rucaparib der effektivste PARPi in den Kuramochi^rCDDP²⁰⁰⁰- und EFO21-Zellen ist. Dies verdeutlicht, dass jeder zugelassene PARPi unter bestimmten Umständen effektiver sein kann als die anderen. Es lässt sich in diesem Rahmen daher keine Aussage darüber treffen, welcher der Inhibitoren in der Praxis als Mittel der Wahl verwendet werden sollte.

5.3.3 Expression von PARP1 und Effektivität eines PARP1-selektiven Inhibitors

Für die Untersuchung einer Abhängigkeit des Ansprechens auf die einzelnen Vertreter der PARPi und der intrinsischen PARP1-Expression wurde diese in den sieben Zelllinien analysiert. Eine Unterdrückung dieser gilt als bestätigter Resistenzmechanismus [250, 251]. Sie ist vor allem für die Charakterisierung der cisplatinresistenten Zellen von Interesse, da durch Genomanalysen bereits bekannt

ist, dass sowohl A2780-, als auch Kuramochi- und EFO21-Zellen eine Überexpression des Enzyms aufweisen [311].

Die detektierten Ergebnisse liefern erste Aufschlüsse über die Ursachen des heterogenen Bildes der Viabilitätsdaten (Abb. 41 A). Die W1CR- und A2780cis-Zellen weisen jeweils signifikant höhere Level an PARP1 als ihre Wildtypen auf. Beim Kuramochi-Zellpaar ist die Datenlage umgekehrt und der resistente Subtyp hat eine signifikant verringerte PARP1-Expression, was wiederum die erhöhte Toleranz des Wildtyps gegenüber Olaparib erklärt. Generell korrelieren die relativen PARP1-Level in allen Zellen stark mit dem Ansprechen auf Olaparib, während auf Grundlage dieser Daten kein direkter Rückschluss auf die Effektivität der anderen beiden Vertreter gezogen werden kann.

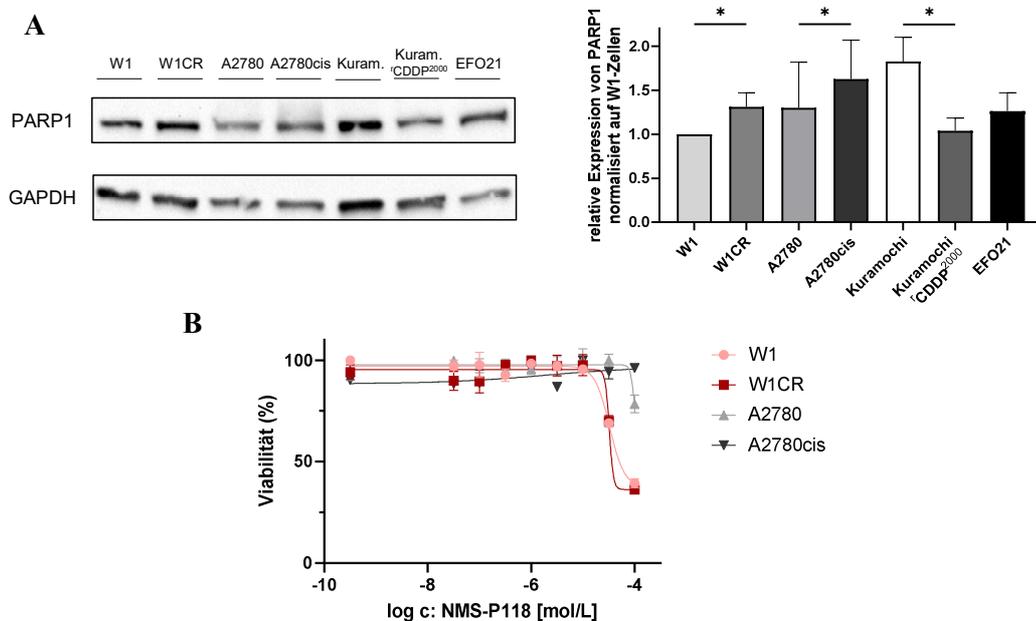


Abbildung 41: Exemplarischer Western Blot der Expression von PARP1 in den gekennzeichneten Zelllinien. Zudem ist der Mittelwert \pm SD der relativen Expression eines biologischen Triplikats ($n = 3$) auf W1-Zellen normalisiert dargestellt (A). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: $p < 0,05$. Exemplarische Dosis-Wirkungskurve eines $n = 3$ der Behandlung von W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen mit NMS-P118 (B).

Die zugelassenen PARPi sind allesamt unselektiv und inhibieren mit unterschiedlicher Potenz die verschiedenen Subtypen der Enzymklasse [355]. Um spezifisch die Rolle von PARP1 in der Kreuzresistenz zu ergründen, wurde nun mit NMS-P118 ein selektiver Inhibitor im W1- und A2780-Zellpaar getestet [237]. Die resultierenden Dosis-Wirkungskurven (Abb. 41 B) zeigen, dass nur in W1- und

W1CR-Zellen eine IC_{50} abgelesen werden kann, die sich im Mittel auf ca. 60 μM beläuft und damit deutlich über denen, der zugelassenen PARPi liegt. Die A2780-Zellen zeigen nur unter der allerhöchsten Konzentration ein leichtes Sinken der Viabilität, während ihr cisplatinresistenter Subtyp A2780cis gänzlich unbeeinflusst bleibt. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass PARP1 für das Überleben des W1-Zellpaares von größerer Bedeutung ist als für die A2780/A2780cis-Zellen, aber auch, dass eine alleinige Inhibition von PARP1 für eine effektive Behandlung von Ovarialkarzinomen nicht ausreichend ist.

5.3.4 Bedeutung von Slfn11 für die Resistenz gegen PARPi

Auf der Suche nach weiteren Biomarkern für ein Ansprechen auf die Behandlung mit einem PARPi sowie die Überwindung von Resistenzen gegen sie, rückte als nächstes die Helikase Slfn11 wieder in den Fokus. Sie wird nicht nur mit einer Resistenz gegen Cisplatin, sondern auch gegen die Klasse der PARPi in Verbindung gebracht [140]. Durch die Erkenntnisse aus Abschnitt 5.2.3 ist bereits bekannt, dass die unterdrückte Expression von Slfn11 nicht zwingend mit einer Cisplatinresistenz einhergehen muss (Abb. 36). Vergleicht man diese Daten mit den IC_{50} -Werten der einzelnen PARPi wird auch für die Resistenz gegen diese Substanzklasse kein einheitliches Bild ersichtlich. Gegen Niraparib und Olaparib ist mit W1 diejenige Zelllinie am empfindlichsten, die als einzige eine intrinsische Slfn11-Expression vorweist (Abb. 36, 40). Die anderen Zelllinien, bei denen die Helikase auf Proteinebene nicht detektiert werden konnte, zeigen unterschiedlich starke Ausprägungen einer Toleranz gegen diese beiden Vertreter. Bei Rucaparib scheint es dagegen keinerlei Korrelation mit den Slfn11-Leveln zu geben, da die W1-Zellen eine ähnliche IC_{50} wie alle anderen aufweisen.

Der Einfluss einer Re-Expression von Slfn11 durch die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Entinostat soll nun ein besseres Verständnis für den Zusammenhang der Helikase und den IC_{50} -Werten der drei PARPi liefern.

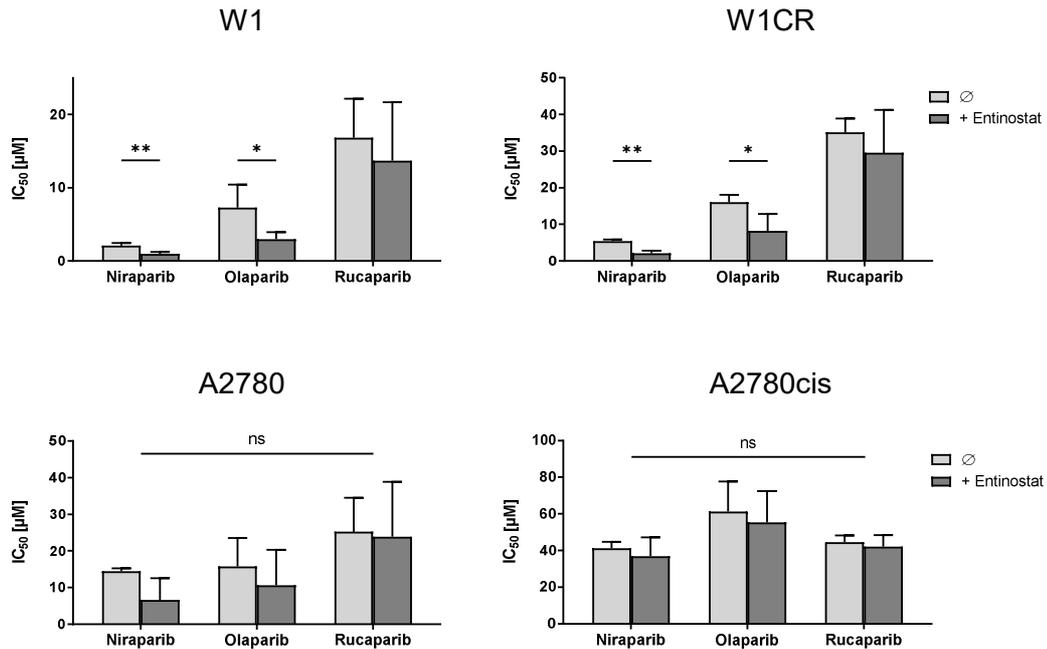


Abbildung 42: Mittelwerte \pm SD der IC₅₀-Werte der drei PARPi als Solobehandlung oder unter Vorbehandlung mit Entinostat [0,1 μ M] (n = 3) in W1-, W1CR-, A2780- und A2780cis-Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01.

Die in Abb. 42 dargestellten Daten zeigen, dass W1- und W1CR-Zellen durch die Vorbehandlung mit Entinostat, was in diesen Zellen eine Expression von Slfn11 verstärkt bzw. re-induziert (Abb. 37), signifikant gegen Niraparib und Olaparib sensitiviert werden. Bei Rucaparib tritt dieser Effekt nicht auf, was, wie in den zuvor interpretierten Daten darauf hindeutet, dass kein Zusammenhang zwischen Slfn11-Expression und dem Ansprechen auf diesen PARPi besteht. In den A2780-Zellen sind ähnliche Tendenzen zu erkennen, die jedoch nicht signifikant sind.

Dass die Sensitivierung durch Entinostat gegen Niraparib und Olaparib in diesen Zellen nicht so stark ist, wie in den zuvor besprochenen, liegt womöglich an der schwächeren Induzierung der Slfn11-Expression, die nur auf Genebene detektiert werden konnte (Abb. 38). In den A2780cis-Zellen wird keine Reduktion der IC₅₀-Werte erzielt, was auf die gänzlich fehlende Beeinflussung der Slfn11-Level zurückgeführt werden kann. Anhand dieser Erkenntnis ist auch ein Unterschied zwischen der Resistenz gegen Cisplatin und den PARPi ersichtlich. Gegen ersteres führt die HDAC-Inhibition ebenfalls zu einer Sensitivierung, was in den A2780cis-Zellen nicht auf einen Slfn11-bezogenen Mechanismus zurückzuführen ist (Abb. 38). Gegen die PARPi ist dieses Phänomen nicht aufgetreten und spricht

dafür, dass zumindest die Toleranz gegen Niraparib und Olaparib von einer unterdrückten Expression der Helikase vermittelt ist.

Zusammenfassend kann nun geschlussfolgert werden, dass die Kombinationsbehandlung aus Niraparib oder Olaparib mit Entinostat starke antitumorale Effekte, auch in cisplatinresistenten Zellen, erzielen kann. Diese hängen mit der durch den HDAC-Inhibitor induzierten, veränderten Expressionsregulation von Slfn11 zusammen. Die unterschiedliche Sensitivierung gegen die einzelnen PARPi ist möglicherweise von ihrer Befähigung zum PARP-*Trapping* beeinflusst. Diese ist bei Niraparib stärker ausgeprägt als bei den beiden anderen untersuchten Vertretern und die Entinostat-Vorbehandlung hat den größten Einfluss auf dessen IC₅₀-Werte [356]. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde in einer anderen Arbeit mit dem nochmal deutlich stärkeren PARP-*Trapper* Talazoparib geschlussfolgert [148]. Demzufolge sprechen auch die hier untersuchten cisplatinresistenten Tumorzellen besser auf eine Behandlung mit einem starken PARP-*Trapper* an, wenn die Helikase exprimiert wird.

Für die anderen untersuchten Verbindungen, Olaparib und Rucaparib, gilt, dass sie sich in dieser Fähigkeit nahezu gleichen [245, 246]. Die unterschiedlichen Folgen für die Resistenz gegen diese beiden Vertreter durch die HDAC-Inhibition stellt womöglich ihr unterschiedliches Wirkspektrum dar. So inhibiert Rucaparib neben den PARP-Enzymen auch einige Tankyrasen und hat in anderen Arbeiten ein breiteres Wirkspektrum als die beiden anderen Vertreter demonstriert [246, 355, 357]. Dies liefert auch eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede in den IC₅₀-Werten der sieben untersuchten Zelllinien. Während die Werte von Niraparib und Olaparib deutlichen Schwankungen unterliegen, sind die von Rucaparib weitestgehend konstant (Abb. 40), was auf dessen größere Unselektivität zurückzuführen ist.

5.3.5 Bedeutung der ATR- und den *downstream* Kinasen für die Resistenz gegen PARPi

Die durchschlagenden Effekte der Vorbehandlung mit subtoxischen Mengen des ATR-Inhibitors Elimusertib auf die Cisplatinresistenz der Ovarialkarzinome sollen

nun im Zusammenhang mit der Kreuzresistenz gegen die PARPi untersucht werden. Die ersten Versuche erfolgten zunächst mit Niraparib und dem W1- und A2780-Zellpaar.

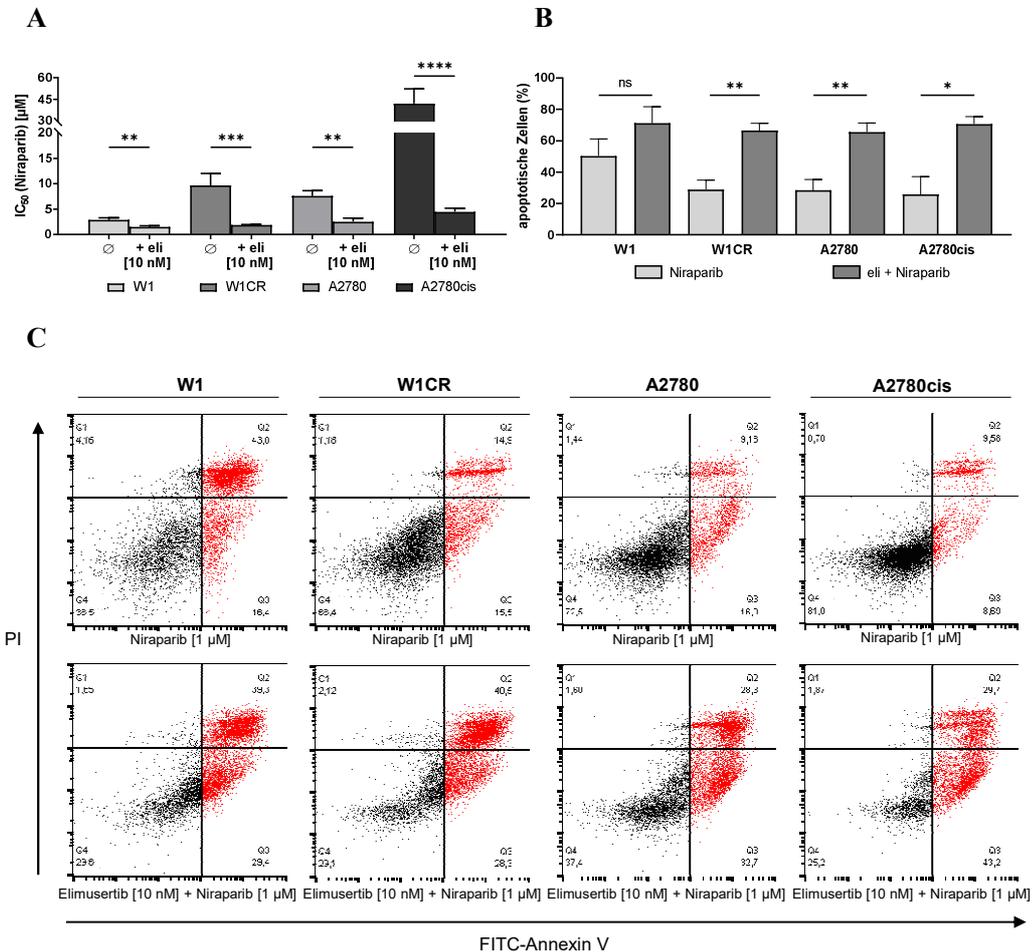


Abbildung 43: Gemittelte IC₅₀-Werte ± SD der Viabilitätsassays von Niraparib und der Kombination mit Elimusertib (eli) eines n = 3 (A). Gemittelte Werte ± SD des Anteils apoptotischer Zellen des Annexin V/PI-Assays eines biologischen Triplikats (n = 3) (B). Darstellung des Apoptose-Assays in Form von repräsentativen Dotplots. Die in Rot eingezeichneten Zellen sind entweder früh- (Q3) oder spät-apoptotisch (Q2) (C). Als Test auf statistische Signifikanz in (A) und (B) wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. *: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Die Daten des MTT-Assays (Abb. 43 A) zeigen eine hoch signifikante Sensitivierung gegen Niraparib durch die Behandlung mit Elimusertib. Ebenso ist eine komplette Resistenzüberwindung festzustellen, die insbesondere bei den hoch toleranten A2780cis-Zellen erwähnenswert ist. Sie erfahren eine etwa 8-fache Reduzierung ihres IC₅₀-Werts, welcher damit unterhalb des solobehandelten Wildtyps liegt. Die Befunde des Apoptose-Assays bestätigen die Ergebnisse der

Viabilitätsmessungen. Der Anteil apoptotischer Zellen wird durch die Zugabe des ATRi, außer in den bereits intrinsisch sensitiven W1-Zellen, signifikant erhöht und erreicht in allen Zelllinien ein ähnliches Niveau. Diese Daten belegen erneut die große Bedeutung von ATR für die cisplatinresistenten Zellen. Die Kinase ist auch für die Abwehr des von Niraparib induzierten replikativen Stresses sowie der entstehenden DNA-Schäden essentiell.

Für eine Generalisierbarkeit dieser Befunde wurden in weiteren Versuchen die Zelllinien EFO21 sowie das Kuramochi-Paar hinzugezogen. Des Weiteren wurden die Kombinationsbehandlungen auch mit Olaparib und Rucaparib durchgeführt und die anderen, zuvor verwendeten DDR-Inhibitoren SCH900776 (CHK1i) und Adavosertib (WEE1i) ebenfalls mit diesen drei PARPi getestet.

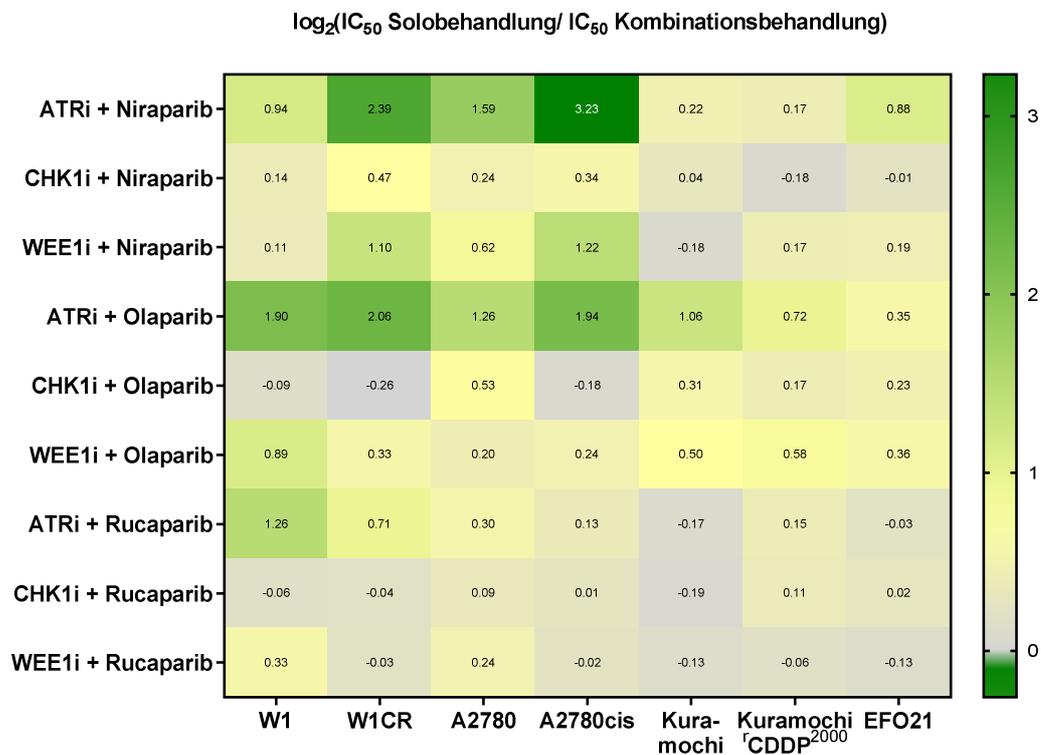


Abbildung 44: Übersicht des errechneten \log_2 -Verhältnisses aus den IC_{50} -Werten von Solo- und Kombinationsbehandlungen der angezeigten PARPi mit dem ATRi Elimusertib [10 nM], dem CHK1i SCH900776 [100 nM] oder dem WEE1i Adavosertib [10 nM] als Heatmap. Die Werte wurden mindestens aus biologischen Triplikaten ($n = 3$) erfasst.

Die Ergebnisse der Behandlungsschemata von allen Zelllinien sind in einer Übersicht in Abb. 44 als \log_2 -Verhältnis dargestellt. Dies bedeutet, dass der Wert 1 die Halbierung des IC_{50} -Werts durch eine Kombinationsbehandlung darstellt. Es ist zu erkennen, dass die größte Synergie der PARPi mit der ATR-Inhibition besteht

und damit Analogien zu den Versuchen mit Cisplatin deutlich werden. Hierbei ist auffällig, dass vor allem Niraparib und Olaparib von einer Co-Behandlung mit Elimusertib in ihrer Wirkung verstärkt werden, während dies für Rucaparib nur im W1-Zellpaar gilt. Die gleichzeitige Gabe des CHK1i oder WEE1i haben deutlich geringere sensitivierende Effekte. Lediglich die Kombination aus Niraparib und Adavosertib halbiert die IC₅₀-Werte der W1CR- und A2780cis-Zellen. Insgesamt werden v. a. diese beiden resistenten Subtypen sowie ihre Wildtypen von den Kombinationsbehandlungen sensitiviert. Beim Kuramochi-Zellpaar erzielt lediglich das Zusammenspiel von Olaparib mit dem ATRi Elimusertib einen Effekt, was aufgrund der vorliegenden BRCA2-Mutation bemerkenswert ist. Die EFO21-Zellen können durch die Inhibierungen des DDR-Signalwegs nicht nennenswert gegen die getesteten PARPi sensitiviert werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass auch die Substanzklasse der PARPi am besten durch die ATR-Inhibition in ihrer Wirkung verstärkt wird. Die *downstream* Kinasen CHK1 und WEE1 scheinen für die zelluläre Reaktion auf den induzierten Stress und die DNA-Schäden weniger bedeutend zu sein. Möglich erscheint, dass analog der Kombinationsexperimente mit Cisplatin die Inhibition von BRCA1 und damit des HR-Signalwegs durch Elimusertib, anstelle des unterdrückten DDR-*signalings*, zur Sensitivierung führt. Fraglich bleibt, wieso dies nicht in den BRCA2-mutierten Kuramochi-Zellen zu beobachten ist. Möglicherweise ist das HR-*signaling* aufgrund dieser Gegebenheiten gänzlich dereguliert und wird durch andere Signalwege kompensiert, weshalb der ATRi wenig Effekt zeigt. Die Theorie wird durch die Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin bestärkt, da die CHK1- und WEE1-Inhibition in diesem Zellpaar ähnlich starke Sensitivierungen wie die von ATR hervorrufen (Abb. 33). Dadurch scheint im Falle der Platinresistenz der Kuramochi^rCDDP²⁰⁰⁰-Zellen eher das DDR-*signaling* ursächlich zu sein, als die HR wie in anderen untersuchten Modellen.

Ob dies jedoch tatsächlich die zugrundeliegenden Mechanismen sind und warum durch diese drei Inhibitoren nicht alle Zelllinien in ähnlicher Weise sensitiviert werden, sollte das Ziel nachfolgender Untersuchungen sein. Zudem bleibt die Frage ungeklärt, worin die Unterschiede in der Resistenzvermittlung gegen die drei PARPi begründet sind. Scheint sie gegen Niraparib und Olaparib ähnlich reguliert

zu sein, wirken die vielversprechendsten Kombinationsbehandlungen mit Rucaparib kaum. Zum weiteren Verständnis für die unterschiedlich ausgeprägte PARPi-Resistenz rückt deshalb die nächste, regulatorische Kinase in der DNA-Schadenserkennung, ATM, als neues *target* in den Fokus der Untersuchungen.

5.3.6 Bedeutung der ATM-Kinase für die Resistenz gegen PARPi

Die ATM-Kinase steht wie die zuvor untersuchte ATR am Anfang der Signalkaskaden einiger DNA-Reparaturwege sowie der Zellzykluskontrolle. Sie kann u. a. die HR einleiten und bietet als Angriffspunkt deshalb Potential zur Sensitivierung gegen PARPi. Zudem ist bekannt, dass Tumore mit einer mutierten Variante dieser Kinase gut auf PARPi ansprechen [358]. Die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen mit dem selektiven ATMi AZD1390 sind in Abb. 45 dargestellt. Durch Viabilitätsuntersuchungen im Vorfeld wurde mit 1 μ M erneut eine Konzentration gewählt, die alleine keine toxische Wirkung entfaltet.

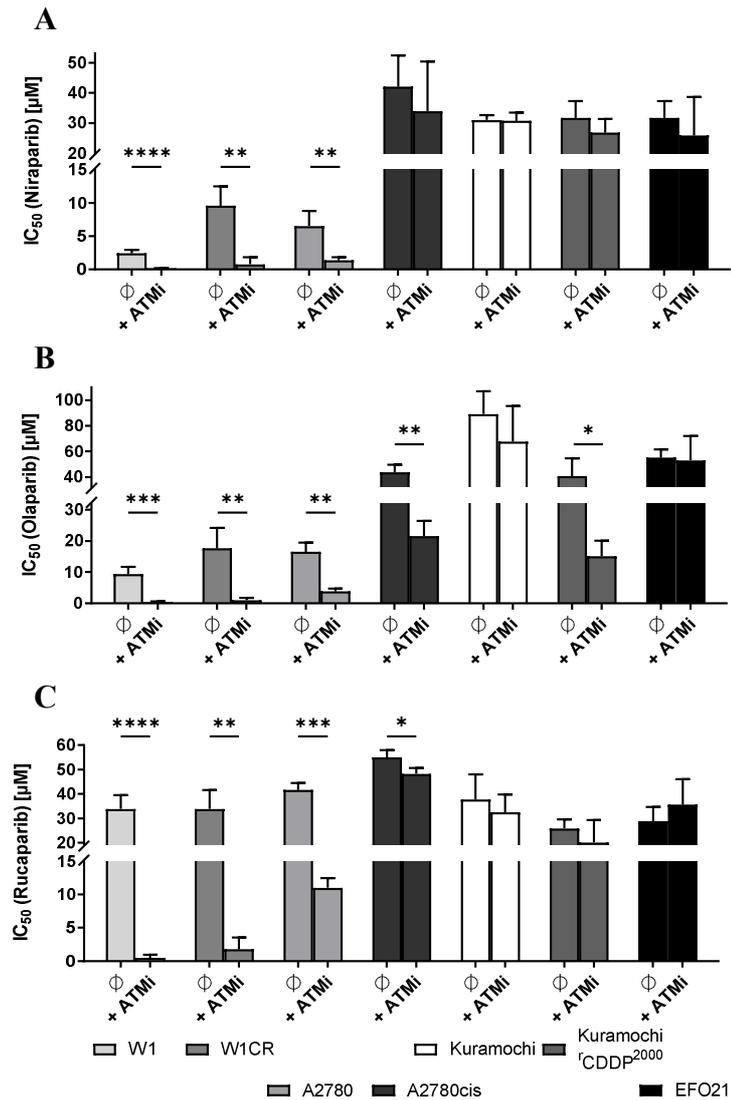


Abbildung 45: Gemittelte IC₅₀-Werte ± SD der Viabilitätsassays der Behandlungen mit Niraparib (A), Olaparib (B) oder Rucaparib (C) alleine oder mit AZD1390 (ATMi) [1 µM] (n = 3). Als Test auf statistische Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. *: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Die Daten zeigen erneut ein heterogenes Bild des Ansprechens auf die Kombinationsbehandlungen. Während die W1/W1CR- und A2780-Zellen gegen alle PARPi signifikant sensitiviert werden, zeigen die A2780cis-Zellen nur signifikante Veränderungen im Ansprechen auf Olaparib und Rucaparib, wobei diese bei letzterem sehr gering ausfällt. Auch in Kombination mit Niraparib ist ein Absinken des IC₅₀-Werts zu erkennen, was aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nicht signifikant ist. Bei der cisplatinresistenten Variante der Kuramochi-Zellen tritt ein solcher Effekt nur gegen Olaparib auf. In ihrem Wildtyp sowie den EFO21-Zellen ist dies bei keinem der untersuchten

Vertreter der Fall. Als Erklärung für das ausbleibende Ansprechen auf den ATMi der EFO21 könnte die genetische Überexpression der Kinase in diesen Zellen dienen [311]. Somit reicht die eingesetzte Konzentration von AZD1390 möglicherweise nicht aus, um das nachgeschaltete *signaling* komplett zu unterdrücken. Dass die A2780cis-Zellen nicht wie ihr Wildtyp signifikant gegen Niraparib sensitiviert werden, könnte neben der hohen Standardabweichung auch einer anderen zellulären Gegenreaktion geschuldet sein. Sie werden, von allen untersuchten Zelllinien, am stärksten durch die Vorbehandlung mit dem ATRi Elimusertib gegen diesen PARPi sensitiviert (Abb. 44). Dies könnte bedeuten, dass ATR für die zelluläre Antwort auf den durch Niraparib induzierten Stress in diesen Zellen wichtiger ist als ATM.

Zur weiteren Untersuchung der Funktion der ATM-Kinase wurde der Inhibitor AZD1390 auch in Kombination mit Cisplatin getestet, um mögliche Unterschiede zwischen den Resistenzen gegen diese beiden Substanzklassen aufzudecken.

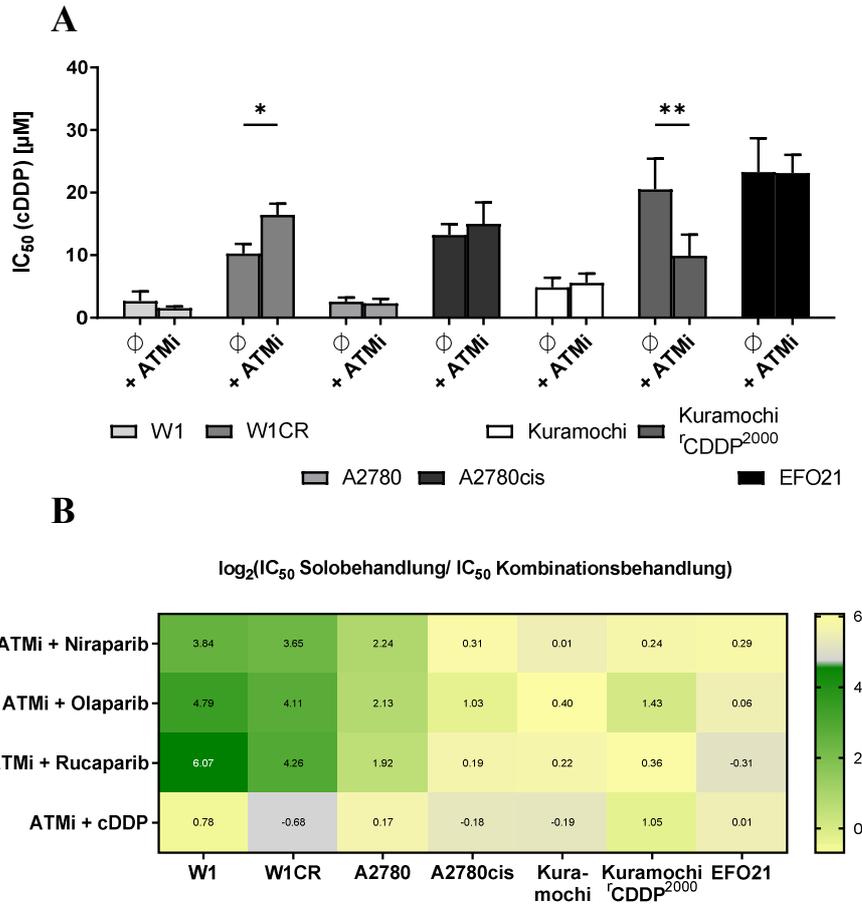


Abbildung 46: Gemittelte IC_{50} -Werte \pm SD der Viabilitätsassays der Behandlungen mit Cisplatin (A), alleine oder mit AZD1390 (ATMi) [1 μM] ($n = 3$). Als Test auf statistische Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. (B) zeigt eine Übersicht des errechneten \log_2 -Verhältnisses aus den IC_{50} -Werten von Solo- und Kombinationsbehandlungen der angezeigten PARPi und Cisplatin mit dem ATMi AZD1390 [1 μM] als Heatmap. Die Werte zur Berechnung entstammen den zuvor gezeigten Histogrammen.

Die erfassten Daten in Abb. 46 decken deutliche Unterschiede zwischen der Cisplatin- und der PARP-Inhibitorresistenz auf. Während die Zelllinien W1, W1CR und A2780 durch AZD1390 gegen alle PARPi z. T. sehr stark sensitiviert werden, zeigt der Wirkstoff keine Verbesserung des Ansprechens auf Cisplatin. Im Gegenteil wird die Resistenz der W1CR-Zellen sogar signifikant verstärkt. In den EFO21- und Kuramochi-Zellen ist, wie schon bei den Kombinationsbehandlungen mit den PARPi, kein Effekt zu erkennen. Im cisplatinresistenten Subtyp Kuramochi^{rCDDP²⁰⁰⁰} ist dagegen eine signifikante Halbierung der IC_{50} von Cisplatin aufgetreten, die im untersuchten Zelllinienspektrum einzigartig ist. Die Unterschiede im Kuramochi-Zellpaar liegen womöglich in den Veränderungen der zellulären Abläufe im Zuge der Resistenzzüchtung gegen das Zytostatikum. So

könnte es sein, dass die Kuramochi^rCDDP²⁰⁰⁰-Zellen andere ATM-vermittelte DNA-Reparatur-signalwege hochregulieren, die für die Abwehr von Cisplatin-induzierten Schäden von Bedeutung sind. Diese vermittelten Prozesse scheinen wiederum für die Abwehr von Olaparib wichtiger zu sein, als für die anderen beiden PARPi, da AZD1390 nur dessen Wirkung in diesen Zellen verstärken konnte. Diese Vermutungen müssen jedoch in weiterführenden Untersuchungen bestätigt werden, bspw. in einem ATM-kd Versuch mit einer entsprechenden Analyse der Aktivität beteiligter Signalwege unter diesen Bedingungen.

In Summe bietet die subtoxische Inhibition von ATM eine vielversprechende Möglichkeit zur Sensitivierung gegen PARPi. Gegen Olaparib werden dabei die meisten Zelllinien signifikant sensitiviert (Abb. 45, 46 B). Im Gegensatz zu den vorher getesteten ATRi, CHK1i und WEE1i sind mit dem ATMi auch Resistenzüberwindungen gegen Rucaparib aufgetreten. Die dabei erzielten log₂-Quotienten zeigen im W1-Zellpaar mit diesem Vertreter sogar die größte Synergie unter den untersuchten PARPi auf (Abb. 46 B). Die genauen Mechanismen hinter diesen Effekten sollen im Folgenden noch etwas genauer analysiert werden

5.3.7 Zelluläre Auswirkungen der ATM-Inhibition

Für erste Untersuchungen nach den Ursachen dieses starken Effekts von AZD1390 in Kombination mit den PARPi wurde der Einfluss auf den Zellzyklus untersucht, da ATM ein wichtiger Induktor des *G1-checkpoints* ist [121, 122]. Dies erfolgte in den Zellpaaren W1/W1CR und A2780/A2780cis, wo die größten Effekte erzielt wurden. Diesbezügliche Daten mit Niraparib sind in Abb. 47 erfasst.

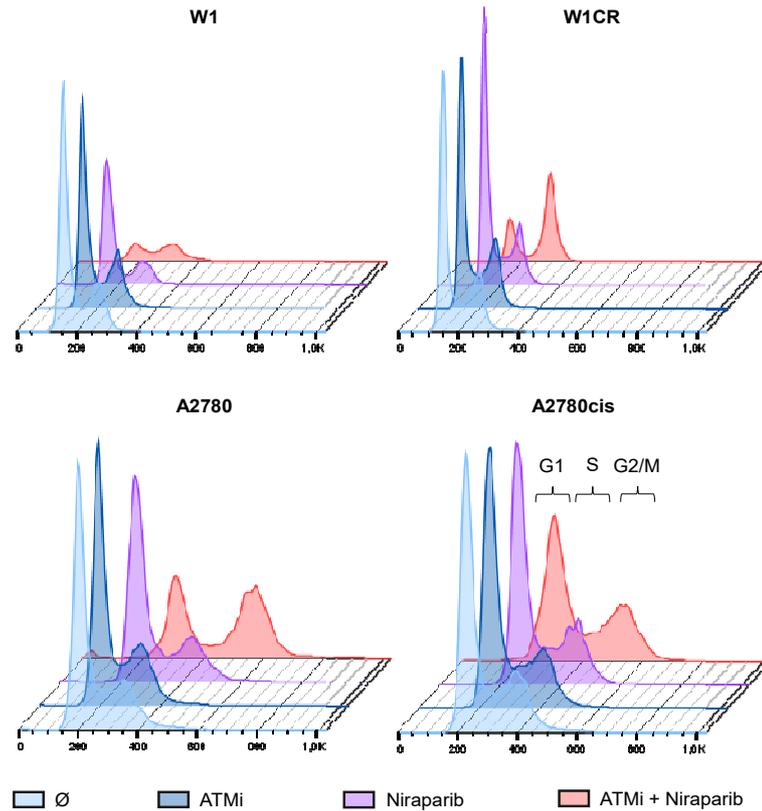


Abbildung 47: Exemplarische Diagramme der Zellzyklusmessungen von unbehandelten, mit Niraparib [1 µM], mit AZD1390 (ATMi) [1 µM] oder mit deren Kombination behandelten W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen eines biologischen Dublikats (n = 2).

Die Daten liefern erste Erkenntnisse, warum die Zellen so stark auf eine Kombination aus ATMi und PARPi ansprechen. In allen Zelllinien, außer W1, tritt ein breiterer und teilweise höherer Peak der G1-Phase unter Niraparibbehandlung auf. Dies spricht für ein Durchlaufen des *G1-checkpoints* mit anschließendem Zellzyklusarrest durch den vom PARPi induzierten Stress. Dass das Signal in den W1-Zellen so schwach ausfällt, ist ihrer höheren Sensitivität, verglichen mit den anderen Zelllinien, gegen Niraparib geschuldet. In den Proben der Kombinationsbehandlung aus ATMi, welcher alleine keinen Einfluss auf die Phasenverteilung des Zellzyklus zeigt, und Niraparib ist in allen Zelllinien eine deutliche Vergrößerung des G2-Peaks zu erkennen. Zudem ist eine Verkleinerung der Gesamtpopulation sowie Rechtsverschiebung der Farbintensität unter diesen Bedingungen ersichtlich, was mit einer bereits einsetzenden Apoptose zu erklären ist. Durch die damit assoziierte Auflockerung der Zellmembran gelangt mehr Propidiumiodid in den Nukleus und das Signal wird verstärkt. Diese sehr starken Effekte sind bei diesem Versuch bereits nach 24 h Inkubationszeit aufgetreten,

wohingegen die Zellviabilitätsmessungen (Abb. 45) erst nach 72 h detektiert wurden. Diese Daten belegen, dass Niraparib einen G1-Arrest induziert, was durch die gleichzeitige Gabe eines ATMi unterbunden und damit die stark synergistische Wirkung zu erklären ist. Die Versuche waren jedoch zum Ende dieser Arbeit noch nicht ganz abgeschlossen, weshalb die Daten aus Abb. 47 nur als biologisches Duplikat vorliegen und deshalb noch keine statistische Analyse durchgeführt wurde. Aufgrund der Deutlichkeit der Verschiebungen sind sie trotzdem aussagekräftig und für die Erklärung der Wirkweise dieser beiden Substanzen von Bedeutung. Die nachfolgenden, finalen Untersuchungen sehen zudem noch eine Beteiligung der ATM-Kinase in einem anderen, nicht DNA-Reparatur assoziierten Kontext, vor.

5.3.8 Beeinflussung der HSP27-Aktivität durch ATM-Inhibition

Für die letzten Tests dieser Arbeit wurde eine Verknüpfung des *signalings* der DNA-Reparaturkinasen zu den Hitzeschockproteinen herangezogen, welche für die Ausbildung von Resistenzen ebenso ursächlich sein können. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bereits bekannt, dass HSP27 ein wichtiger Regulator der Cisplatinresistenz der W1CR-Zellen ist. Für die Untersuchungen zur intrinsisch erhöhten Toleranz gegen die PARPi stellte sich nun die Frage, ob dieses Chaperon auch eine Rolle in der Vermittlung von DNA-Reparaturprozessen spielt. Zunächst wurde jedoch untersucht, ob diese Deregulierung der Expression ein generelles Phänomen cisplatinresistenter Zellen ist.

Zu beachten ist an dieser Stelle jedoch, dass es sich bei den gezeigten, bisher erfassten Daten nur um biologische Duplikate handelt und eine statistische Analyse sowie die exakte Aussagefähigkeit erst nach Erhöhung der Stichprobenzahl erfolgen kann.

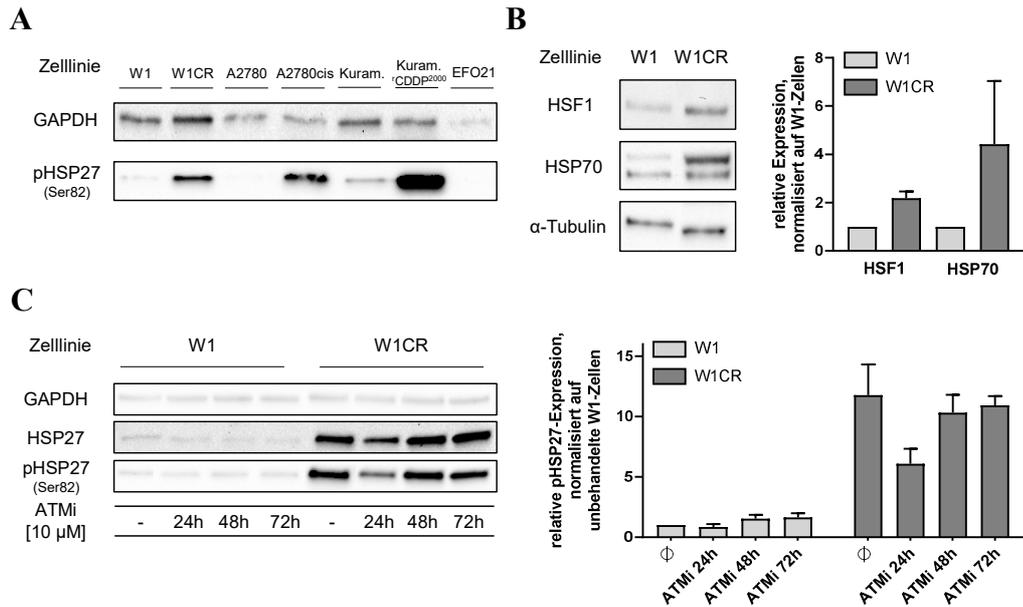


Abbildung 48: Exemplarische Western Blots von pHSP27 in allen untersuchten Zelllinien (A), von HSF1 und HSP70 in unbehandelten W1- und W1CR-Zellen sowie die resultierende, relative Expression (B). Exemplarische Western Blots von HSP27 und pHSP27 in unbehandelten W1- und W1CR-Zellen oder unter Vorbehandlung mit AZD1390 (ATMi) [10 μ M] sowie die resultierende, relative Expression (C) eines biologischen Duplikats (n = 2).

In Abbildung 48 A ist zu erkennen, dass alle drei Zelllinien mit erworbener Toleranz eine deutlich verstärkte Expression der aktivierten Form pHSP27 vorweisen. Die trifft allerdings für die intrinsisch resistenten EFO21-Zellen nicht zu. An dieser Stelle fehlen jedoch noch zusätzliche Expressionsdaten des gesamten HSP27, aber die vorliegenden Befunde sprechen für eine Hochregulierung der Aktivität dieses Chaperons während des Erwerbs der Resistenz. Eine detaillierte Analyse der Expression weiterer Hitzeschockproteine ist zunächst nur im W1-Zellpaar durchgeführt worden, da in diesen bereits der Zusammenhang mit der Cisplatinresistenz belegt ist [192]. Die Daten in Abb. 48 B zeigen, dass nicht nur das HSP27, sondern mit HSP70 auch ein weiteres, mit Resistenzphänomenen assoziiertes Chaperon, sowie der zugehörige Transkriptionsfaktor HSF1 in den W1CR-Zellen deutlich hochreguliert sind. Da es Berichte über die Wechselwirkung zwischen der ATM-Kinase und HSP27 gibt, sollte die Beeinflussung der Aktivität durch den Einsatz von AZD1390 untersucht werden [197, 199]. Die Daten aus Abb. 48 C zeigen, dass der ATMi in der Lage ist die Expression von HSP27 innerhalb einer 24-stündigen Inkubationszeit deutlich zu reduzieren. Dieser Effekt lässt allerdings bei einer längeren Exposition nach und hat bereits nach 48 h wieder

den Ausgangswert der unbehandelten Proben. Trotzdem könnte diese Interaktion des Inhibitors mit der HSP27-Aktivierung eine Erklärung für dessen starke Wirksamkeit in Kombination mit den PARPi in diesen Zellen sein. Warum dies jedoch nicht für Cisplatin gilt (Abb. 46), muss noch weiter untersucht werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass für diese Resistenz andere Effekte des Chaperons, bspw. die Bereitstellung reduzierender Verbindungen wie Glutathion, wichtiger sind als die Wechselwirkung mit ATM. Zudem müssen weiterführende Experimente zeigen, ob die unterdrückte Phosphorylierung durch AZD1390 auch in den anderen resistenten Zelllinien auftritt. Dennoch stellt der Zusammenhang zwischen HSP27 und einer PARPi-Resistenz ein völlig unbekanntes Phänomen dar, welches nun in einem zukünftigen Projekt mittels eines *knockdowns* des Chaperons näher untersucht werden soll.

5.3.9 Zusammenfassung der Resistenzen gegen PARPi und Strategien zu deren Überwindung

Aus diesem Kapitel geht hervor, dass die untersuchten Zelllinien sehr heterogen auf Niraparib und Olaparib ansprechen, während Rucaparib in nahezu allen gleich effektiv ist. Dies bedeutet auch, dass eine Kreuzresistenz cisplatinresistenter Zellen ebenfalls eher gegen Niraparib und Olaparib besteht. Zudem ist die BRCA2-Mutation der Kuramochi-Zellen kein Indikator eines besseren Ansprechens gegen diese Verbindungsklasse. Die Expression der Helikase Slfn11 steht ebenso mehr im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Niraparib und Olaparib, als auf Rucaparib. Die Kombinationsbehandlungen mit den eingesetzten DDR-Inhibitoren zeichnen ebenso ein heterogenes Bild der Wirkweise der untersuchten PARPi in den einzelnen Zelllinien. Sie stellen, wie schon bei den Experimenten mit Cisplatin, den ATRi Elimusertib als vielversprechenderen Ansatz als die Inhibition von CHK1 oder WEE1 heraus. Noch stärkere sensitivierende Eigenschaften zeigt dagegen der ATMi AZD1390, welcher eine massive Deregulierung des Zellzyklus in Kombination mit Niraparib auslöst. Zudem legt seine Wechselwirkung mit dem resistenzerzeugenden Chaperon HSP27 eine völlig neue Verknüpfung in der Betrachtung der PARPi-Resistenz von Ovarialkarzinomen offen.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass PARPi durchaus in platinresistenten Tumoren wirksam sein können, die genaue Auswahl des Vertreters jedoch Unterschiede im Therapieerfolg ausmachen kann. An welchen molekularbiologischen Faktoren dies abzulesen ist, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen.

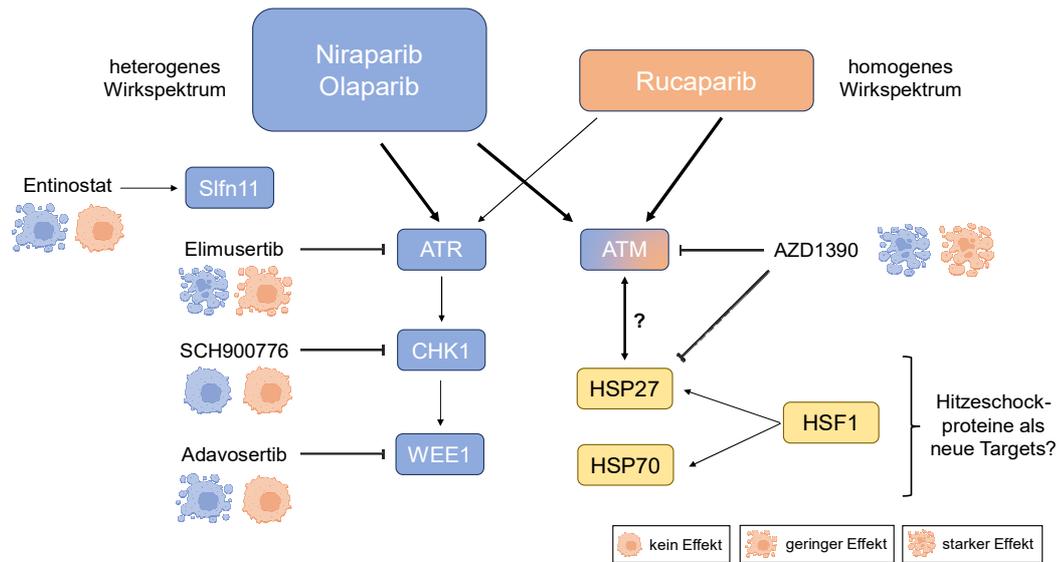


Abbildung 49: Übersicht der Wirkmechanismen der drei verwendeten PARPi sowie der untersuchten Ansätze zur Resistenzüberwindung.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum näheren Verständnis der Mechanismen einer Chemoresistenz gegen Cisplatin sowie PARP-Inhibitoren in Ovarialkarzinomen leisten. Besonderer Fokus liegt dabei auf der Kontrolle der Redox-Balance sowie DNA-Reparatursignalwegen in cisplatinresistenten Zellen, verglichen mit ihren jeweiligen Wildtypen. Dies erfolgt mittels Testungen neuartiger Wirkstoffe wie organischen Goldverbindungen als Hemmer der Thioredoxinreduktase, selektiven Inhibitoren gegen regulatorische Kinasen der DNA-Schadensreparatur sowie epigenetisch wirksamen Substanzen und den durch sie induzierten Veränderungen zellulärer Abläufe.

Im ersten Abschnitt wird demonstriert, dass die goldhaltigen Wirkstoffe Auranofin, UB-1 und MC3 starke antitumorale Effekte im W1- und A2780-Zellpaar vermitteln. Zudem sind Unterschiede in ihrer Potenz ersichtlich, die zeigen, dass der Biscarben-Komplex deutlich niedrigere IC_{50} -Werte erzielt als die Gold(I)-Phosphine, gegen die zudem eine leichte Kreuzresistenz in den A2780cis-Zellen auftritt. Als deren Ursache ist Nrf2 anzusehen, welches in diesen Zellen überexprimiert vorliegt. Dessen *upstream* Substrat ERK 1/2 geht als wichtiger Regulator der Apoptose in den Ovarialkarzinomzellen hervor, der zudem unterschiedliche zelluläre Auswirkungen zwischen Gold- und Platinverbindungen offenlegt. Während die Kinase für die Abwehr des oxidativen Stresses, induziert durch die TrxR-Hemmung, von Bedeutung ist, fördert sie die Apoptose unter dem Einfluss des Cisplatin. Die Goldverbindungen erweisen sich in diesen Untersuchungen als vielversprechender Therapieansatz, welcher nun durch in vivo Versuche auf Effektivität und Verträglichkeit getestet werden sollte.

Als weiteres Ziel zur Resistenzüberwindung in den Ovarialkarzinomzelllinien wurden DNA-Reparaturprozesse untersucht, welche die zelluläre Reaktion auf die durch Cisplatin induzierten Schäden einleiten. Aus den Untersuchungen geht die ATR-Kinase als attraktives *target* für Kombinationsbehandlungen zur Überwindung einer Cisplatinresistenz hervor. Ihr selektiver Inhibitor Elimusertib führt in subtoxischen Dosen universell zu einer signifikanten Sensitivierung gegen das Zytostatikum. Die Bedeutung der *downstream* Proteine ist im untersuchten

Zelllinienspektrum dagegen sehr heterogen. Während die Inhibition von CHK1 oder WEE1 in einigen ähnlich starke Effekte erzielte, erwirken diese Ansätze in anderen Zelllinien keinen Erfolg. Für die Reaktion auf DNA-Schäden ist zudem die Aktivierung der homologen Rekombination via BRCA1 durch ATR bedeutsam. Zusätzlich ist erwiesen, dass eine fehlende Slfn11-Expression nicht als genereller Resistenzmarker für Cisplatin fungieren kann. Eine durch den HDAC-Inhibitor Entinostat induzierte Expression der Helikase eignet sich hingegen zur Resistenzüberwindung. Dieses Vorgehen bietet ebenso eine Möglichkeit zur Sensitivierung gegen die beiden PARPi Niraparib und Olaparib, welche stark schwankende IC₅₀-Werte in den sieben Zelllinien aufweisen. Dagegen zeigt Rucaparib eine vergleichbare Wirksamkeit, unabhängig einer Cisplatinresistenz. Die Kombination mit dem ATRi Elimusertib erzielt auch bei dieser Substanzklasse einen synergistischen Effekt, besonders mit Niraparib und Olaparib, die sich insgesamt in ihrer Wirkweise näherzustehen scheinen, als Rucaparib. Die *downstream* Substrate von ATR bieten weniger sensitivierendes Potential - die Inhibition von WEE1 ist dabei effektiver als jene von CHK1. Mit ATM sticht eine weitere Kinase der DNA-Reparatur als vielversprechendes Ziel für Kombinationsbehandlungen mit PARPi, nicht jedoch mit Cisplatin, heraus. Der ATMi AZD1390 induziert mit Niraparib eine massive Akkumulation von G2/M-Zellen. Neben dieser Beeinträchtigung des Zellzyklus, könnte auch die verminderte Aktivität von HSP27, welches in allen Zellen mit erworbener Cisplatinresistenz überexprimiert vorliegt, für den starken Synergismus ursächlich sein.

Insgesamt werden in dieser Arbeit neue Strategien gezeigt die Cisplatin- und PARP-Inhibitorresistenz von Ovarialkarzinomen zu überwinden, welche nun durch in vivo Versuche weiterverfolgt werden sollten. Gleichzeitig wird die Heterogenität deutlich, mit der bereits ein paar Vertreter derselben Tumorentität auf verschiedene Wirkstoffe reagieren. Für die Übertragung in die klinische Praxis bedeutet dies die Notwendigkeit eines gründlichen Screenings der molekularen Eigenschaften eines Tumors für die korrekte Auswahl einer patientenindividuellen Behandlung. Feststeht, dass es Wege gibt, behandlungsresistente Tumore zu bekämpfen, die in Zukunft dazu beitragen können das Leid Erkrankter zu mildern oder sie gar zu heilen.

Literaturverzeichnis

1. Terrasse V. Press Release No. 345 IARC [Stand: 05.02.2024]; verfügbar unter: https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2024/02/pr345_E.pdf.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2021; 71(3):209–49. doi: 10.3322/caac.21660.
3. Sundar S, Neal RD, Kehoe S. Diagnosis of ovarian cancer. *BMJ* 2015; 351:h4443. doi: 10.1136/bmj.h4443.
4. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018; 68(4):284–96. doi: 10.3322/caac.21456.
5. SEER. Cancer of the Ovary - Cancer Stat Facts; 2024 [Stand: 06.02.2024]. Verfügbar unter: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>.
6. Reid F, Bhatla N, Oza AM, Blank SV, Cohen R, Adams T et al. The World Ovarian Cancer Coalition Every Woman Study: identifying challenges and opportunities to improve survival and quality of life. *International Journal of Gynecologic Cancer* 2021; 31(2):238–44. doi: 10.1136/ijgc-2019-000983.
7. Kurnit KC, Fleming GF, Lengyel E. Updates and New Options in Advanced Epithelial Ovarian Cancer Treatment. *Obstet Gynecol* 2021; 137(1):108–21. doi: 10.1097/AOG.0000000000004173.
8. Rottenberg S, Disler C, Perego P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2021; 21(1):37–50. doi: 10.1038/s41568-020-00308-y.
9. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2023; 73(1):17–48. doi: 10.3322/caac.21763.
10. Buttman-Schweiger N, Kraywinkel K. Epidemiologie von Eierstockkrebs in Deutschland. *Onkologie* 2019; 25(2):92–8. doi: 10.1007/s00761-018-0507-8.

11. Ebell MH, Culp MB, Radke TJ. A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *American Journal of Preventive Medicine* 2016; 50(3):384–94. doi: 10.1016/j.amepre.2015.09.023.
12. Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2011; 305(22):2295–303. doi: 10.1001/jama.2011.766.
13. Peres LC, Cushing-Haugen KL, Köbel M, Harris HR, Berchuck A, Rossing MA et al. Invasive Epithelial Ovarian Cancer Survival by Histotype and Disease Stage. *J Natl Cancer Inst* 2019; 111(1):60–8. doi: 10.1093/jnci/djy071.
14. Irodi A, Rye T, Herbert K, Churchman M, Bartos C, Mackean M et al. Patterns of clinicopathological features and outcome in epithelial ovarian cancer patients: 35 years of prospectively collected data. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2020; 127(11):1409–20. doi: 10.1111/1471-0528.16264.
15. McCluggage WG, Singh N, Gilks CB. Key changes to the World Health Organization (WHO) classification of female genital tumours introduced in the 5th edition (2020). *Histopathology* 2022; 80(5):762–78. doi: 10.1111/his.14609.
16. Gurung A, Hung T, Morin J, Gilks CB. Molecular abnormalities in ovarian carcinoma: clinical, morphological and therapeutic correlates. *Histopathology* 2013; 62(1):59–70. doi: 10.1111/his.12033.
17. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch* 2012; 460(3):237–49. doi: 10.1007/s00428-012-1203-5.
18. Morgan RD, McNeish IA, Cook AD, James EC, Lord R, Dark G et al. Objective responses to first-line neoadjuvant carboplatin-paclitaxel regimens for ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma (ICON8): post-hoc exploratory analysis of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2021; 22(2):277–88. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30591-X.

19. Bowtell DD, Böhm S, Ahmed AA, Aspuria P-J, Bast RC, Beral V et al. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(11):668–79. doi: 10.1038/nrc4019.
20. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474(7353):609–15. doi: 10.1038/nature10166.
21. Tomasini R, Mak TW, Melino G. The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer. *Trends in Cell Biology* 2008; 18(5):244–52. doi: 10.1016/j.tcb.2008.03.003.
22. Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim B-G, Oaknin A, Friedlander M et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2018; 379(26):2495–505. doi: 10.1056/NEJMoa1810858.
23. Soovares P, Pasanen A, Similä-Maarala J, Bützow R, Lassus H. Clinical factors and biomarker profiles associated with patient outcome in endometrioid ovarian carcinoma - Emphasis on tumor grade. *Gynecologic Oncology* 2022; 164(1):187–94. doi: 10.1016/j.ygyno.2021.10.078.
24. Storey DJ, Rush R, Stewart M, Rye T, Al-Nafussi A, Williams AR et al. Endometrioid epithelial ovarian cancer : 20 years of prospectively collected data from a single center. *Cancer* 2008; 112(10):2211–20. doi: 10.1002/cncr.23438.
25. Leskela S, Romero I, Rosa-Rosa JM, Caniego-Casas T, Cristobal E, Pérez-Mies B et al. Molecular Heterogeneity of Endometrioid Ovarian Carcinoma: An Analysis of 166 Cases Using the Endometrial Cancer Subrogate Molecular Classification. *The American Journal of Surgical Pathology* 2020; 44(7):982–90. doi: 10.1097/PAS.0000000000001478.
26. Hollis RL, Thomson JP, Stanley B, Churchman M, Meynert AM, Rye T et al. Molecular stratification of endometrioid ovarian carcinoma predicts clinical outcome. *Nat Commun* 2020; 11(1):4995. doi: 10.1038/s41467-020-18819-5.
27. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Sig Transduct Target Ther* 2021; 6(1):386. doi: 10.1038/s41392-021-00780-4.

28. Chan JK, Teoh D, Hu JM, Shin JY, Osann K, Kapp DS. Do clear cell ovarian carcinomas have poorer prognosis compared to other epithelial cell types? A study of 1411 clear cell ovarian cancers. *Gynecologic Oncology* 2008; 109(3):370–6. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.02.006.
29. Takahashi K, Takenaka M, Kawabata A, Yanaihara N, Okamoto A. Rethinking of treatment strategies and clinical management in ovarian clear cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2020; 25(3):425–31. doi: 10.1007/s10147-020-01625-w.
30. Sugiyama T, Okamoto A, Enomoto T, Hamano T, Aotani E, Terao Y et al. Randomized Phase III Trial of Irinotecan Plus Cisplatin Compared With Paclitaxel Plus Carboplatin As First-Line Chemotherapy for Ovarian Clear Cell Carcinoma: JGOG3017/GCIG Trial. *J Clin Oncol* 2016; 34(24):2881–7. doi: 10.1200/JCO.2016.66.9010.
31. Mabuchi S, Sugiyama T, Kimura T. Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives. *Journal of Gynecologic Oncology* 2016; 27(3):e31. doi: 10.3802/jgo.2016.27.e31.
32. Yamamoto S, Tsuda H, Takano M, Tamai S, Matsubara O. Loss of ARID1A protein expression occurs as an early event in ovarian clear-cell carcinoma development and frequently coexists with PIK3CA mutations. *Mod Pathol* 2012; 25(4):615–24. doi: 10.1038/modpathol.2011.189.
33. Berns K, Caumanns JJ, Hijmans EM, Gennissen AMC, Severson TM, Evers B et al. ARID1A mutation sensitizes most ovarian clear cell carcinomas to BET inhibitors. *Oncogene* 2018; 37(33):4611–25. doi: 10.1038/s41388-018-0300-6.
34. Caumanns JJ, Berns K, Wisman GBA, Fehrmann RSN, Tomar T, Klip H et al. Integrative Kinome Profiling Identifies mTORC1/2 Inhibition as Treatment Strategy in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2018; 24(16):3928–40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3060.
35. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P et al. Statement by the Kommission Ovar of the AGO: The New FIGO and WHO Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary

- Peritoneal Cancer. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 2015; 75(10):1021–7. doi: 10.1055/s-0035-1558079.
36. Leitlinienprogramm Onkologie: Ovarialkarzinom; 2023 [Stand: 17.11.2023]. Verfügbar unter: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom>.
37. Wagner U, Reuß A. S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren“. *Forum* 2019; 34(5):413–5. doi: 10.1007/s12312-019-00671-4.
38. Vergote I, Coens C, Nankivell M, Kristensen GB, Parmar MKB, Ehlen T et al. Neoadjuvant chemotherapy versus debulking surgery in advanced tubo-ovarian cancers: pooled analysis of individual patient data from the EORTC 55971 and CHORUS trials. *Lancet Oncol* 2018; 19(12):1680–7. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30566-7.
39. Schubert M, Rogmans C, Bauerschlag D. Diagnostik und Therapie des Ovarialkarzinoms. *Gynäkologie* 2022; 55(11):851–66. doi: 10.1007/s00129-022-05013-5.
40. Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, Lisowska KM. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018; 81(1):17–38. doi: 10.1007/s00280-017-3501-8.
41. Baert T, Ferrero A, Sehouli J, O'Donnell DM, González-Martín A, Joly F et al. The systemic treatment of recurrent ovarian cancer revisited. *Ann Oncol* 2021; 32(6):710–25. doi: 10.1016/j.annonc.2021.02.015.
42. Kuroki L, Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ* 2020:m3773. doi: 10.1136/bmj.m3773.
43. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie, klinische Pharmakologie, Toxikologie. 11., völlig neu bearbeitete Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2020; ISBN: 9783804740549.

44. Canetta R, Rozenzweig M, Carter SK. Carboplatin: the clinical spectrum to date. *Cancer Treatment Reviews* 1985; 12 Suppl A:125–36. doi: 10.1016/0305-7372(85)90027-1.
45. Müller K, Prinz H, Lehr M. Pharmazeutische/Medizinische Chemie: Arzneistoffe - von der Struktur zur Wirkung : mit 1898 Abbildungen und 54 Tabellen. 1. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2022; ISBN: 9783804742871.
46. Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol* 1999; 17(1):409–22. doi: 10.1200/JCO.1999.17.1.409.
47. Burger H, Loos WJ, Eechoute K, Verweij J, Mathijssen RHJ, Wiemer EAC. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist Updat* 2011; 14(1):22–34. doi: 10.1016/j.drug.2010.12.002.
48. Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2007; 63(1):12–31. doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.02.001.
49. Gore ME, Fryatt I, Wiltshaw E, Dawson T, Robinson BA, Calvert AH. Cisplatin/carboplatin cross-resistance in ovarian cancer. *Br J Cancer* 1989; 60(5):767–9. doi: 10.1038/bjc.1989.356.
50. Peyrone M. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1844; 51(1):1–29. doi: 10.1002/jlac.18440510102.
51. ROSENBERG B, VANCAMP L, KRIGAS T. INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. *Nature* 1965; 205(4972):698–9. doi: 10.1038/205698a0.
52. ROSENBERG B, VANCAMP L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969; 222(5191):385–6. doi: 10.1038/222385a0.

53. Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer* 1998; 34(10):1522–34. doi: 10.1016/S0959-8049(98)00224-X.
54. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(8):573–84. doi: 10.1038/nrc2167.
55. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 2010; 39(35):8113. doi: 10.1039/C0DT00292E.
56. Ott I, Gust R. Besonderheiten anorganischer Zytostatika. *Medizinische Chemie der Platinkomplexe. Pharmazie in unserer Zeit* 2006; 35(2):124–33. doi: 10.1002/pauz.200500161.
57. Espósito BP, Najjar R. Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin. *Coordination Chemistry Reviews* 2002; 232(1-2):137–49. doi: 10.1016/S0010-8545(02)00049-8.
58. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 1993; 67(6):1171–6. doi: 10.1038/bjc.1993.221.
59. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(22):14298–302. doi: 10.1073/pnas.162491399.
60. Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Roth H. *Medizinische Chemie: Targets, Arzneistoffe, Chemische Biologie. 2. völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage.* Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2010; ISBN: 9783769269741.
61. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22(47):7265–79. doi: 10.1038/sj.onc.1206933.
62. Juan CA, La Pérez de Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. *The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies.*

- International Journal of Molecular Sciences 2021; 22(9):4642. doi: 10.3390/ijms22094642.
63. Brozovic A, Ambriović-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology* 2010; 40(4):347–59. doi: 10.3109/10408441003601836.
64. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 2014; 740:364–78. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
65. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Toxicology* 2012; 2012:645460. doi: 10.1155/2012/645460.
66. Kruidering M, van de Water B, Heer E de, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280(2):638–49.
67. Saad SY, Najjar TAO, Alashari M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31(12):862–7. doi: 10.1111/j.1440-1681.2004.04127.x.
68. Marullo R, Werner E, Degtyareva N, Moore B, Altavilla G, Ramalingam SS et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLOS ONE* 2013; 8(11):e81162. doi: 10.1371/journal.pone.0081162.
69. 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(1):19–38. doi: 10.1039/b911438f.
70. Hildebrandt J, Häfner N, Görls H, Kritsch D, Ferraro G, Dürst M et al. Platinum(ii) O,S complexes as potential metallodrugs against Cisplatin

- resistance. *Dalton Trans.* 2016; 45(47):18876–91. doi: 10.1039/C6DT01388K.
71. Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, Hartog JH den, Lohman PH, Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 1985; 24(3):707–13. doi: 10.1021/bi00324a025.
72. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001; 59(4):657–63. doi: 10.1124/mol.59.4.657.
73. Luvero D, Milani A, Ledermann JA. Treatment options in recurrent ovarian cancer: latest evidence and clinical potential. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 2014; 6(5):229–39. doi: 10.1177/1758834014544121.
74. David W Chan MXL, YS Ngan H. Mechanisms of Chemoresistance in Human Ovarian Cancer at a Glance. *Gynecol Obstet (Sunnyvale)* 2012; 02(03). doi: 10.4172/2161-0932.1000e104.
75. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012; 31(15):1869–83. doi: 10.1038/onc.2011.384.
76. Kalayda GV, Wagner CH, Jaehde U. Relevance of copper transporter 1 for cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2012; 116:1–10. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.07.010.
77. 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(23):7149–58. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0564.
78. Janson V, Johansson A, Grankvist K. Resistance to caspase-8 and -9 fragments in a malignant pleural mesothelioma cell line with acquired cisplatin-resistance. *Cell Death Dis* 2010; 1(9):e78. doi: 10.1038/cddis.2010.54.

79. Deng J, Bai X, Feng X, Ni J, Beretov J, Graham P et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through reversing epithelial-mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression. *BMC Cancer* 2019; 19(1):618. doi: 10.1186/s12885-019-5824-9.
80. Giacomo Cossa, Laura Gatti, Giuliana Cassinelli, Cinzia Lanzi, Nadia Zaffaroni, Paola Perego. Modulation of Sensitivity to Antitumor Agents by Targeting the MAPK Survival Pathway. *Current Pharmaceutical Design*; 19(5):883–94.
81. Kielbik M, Krzyzanowski D, Pawlik B, Klink M. Cisplatin-induced ERK1/2 activity promotes G1 to S phase progression which leads to chemoresistance of ovarian cancer cells. *Oncotarget* 2018; 9(28):19847–60. doi: 10.18632/oncotarget.24884.
82. Song H, Wei M, Liu W, Shen S, Li J, Wang L. Cisplatin induced apoptosis of ovarian cancer A2780s cells by activation of ERK/p53/PUMA signals. *Histol Histopathol* 2018; 33(1):73–9. doi: 10.14670/HH-11-889.
83. van der Ploeg P, Uittenboogaard A, Thijs AMJ, Westgeest HM, Boere IA, Lambrechts S et al. The effectiveness of monotherapy with PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecologic Oncology* 2021; 163(2):433–44. doi: 10.1016/j.ygyno.2021.07.008.
84. Musacchio L, Valsecchi AA, Salutari V, Valabrega G, Camarda F, Tuninetti V et al. MEK inhibitor as single agent in low grade serous ovarian and peritoneal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews* 2022; 110:102458. doi: 10.1016/j.ctrv.2022.102458.
85. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51(3):794–8.
86. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* 2011; 16(2):123–40. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x.
87. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical

- for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(4):443–53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040.
88. 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. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268(27):20116–25. doi: 10.1016/S0021-9258(20)80702-9.
89. 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(12):788. doi: 10.3390/biom9120788.
90. Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(7):3070–4. doi: 10.1073/pnas.89.7.3070.
91. Turanov AA, Kehr S, Marino SM, Yoo M-H, Carlson BA, Hatfield DL et al. Mammalian thioredoxin reductase 1: roles in redox homeostasis and characterization of cellular targets. *The Biochemical journal* 2010; 430(2):285–93. doi: 10.1042/BJ20091378.
92. Harris IS, Treloar AE, Inoue S, Sasaki M, Gorrini C, Lee KC et al. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell* 2015; 27(2):211–22. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.019.
93. Collet J-F, Messens J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13(8):1205–16. doi: 10.1089/ars.2010.3114.
94. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The EMBO Journal* 1998; 17(9):2596–606. doi: 10.1093/emboj/17.9.2596.

95. Tonissen KF, Di Trapani G. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53(1):87–103. doi: 10.1002/mnfr.200700492.
96. Ichijo H, Nishida E, Irie K, Dijke P ten, Saitoh M, Moriguchi T et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)* 1997; 275(5296):90–4. doi: 10.1126/science.275.5296.90.
97. Sasada T, Nakamura H, Ueda S, Sato N, Kitaoka Y, Gon Y et al. Possible involvement of thioredoxin reductase as well as thioredoxin in cellular sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 27(5-6):504–14. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00101-X.
98. Woolston CM, Deen S, Al-Attar A, Shehata M, Chan SY, Martin SG. Redox protein expression predicts progression-free and overall survival in ovarian cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Free Radic Biol Med* 2010; 49(8):1263–72. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.008.
99. Sasada T, Iwata S, Sato N, Kitaoka Y, Hirota K, Nakamura K et al. Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* 1996; 97(10):2268–76. doi: 10.1172/JCI118668.
100. Yokomizo A, Ono M, Nanri H, Makino Y, Ohga T, Wada M et al. Cellular Levels of Thioredoxin Associated with Drug Sensitivity to Cisplatin, Mitomycin C, Doxorubicin, and Etoposide. *Cancer Res* 1995; 55(19):4293–6.
101. Shokolenko I, Venediktova N, Bochkareva A, Wilson GL, Alexeyev MF. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(8):2539–48. doi: 10.1093/nar/gkp100.
102. Salehi F, Behboudi H, Kavooosi G, Ardestani SK. Oxidative DNA damage induced by ROS-modulating agents with the ability to target DNA: A comparison of the biological characteristics of citrus pectin and apple pectin. *Sci Rep* 2018; 8(1):13902. doi: 10.1038/s41598-018-32308-2.

103. Wong-Brown MW, van der Westhuizen A, Bowden NA. Targeting DNA Repair in Ovarian Cancer Treatment Resistance. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2020; 32(8):518–26. doi: 10.1016/j.clon.2020.03.005.
104. Huang D, Savage SR, Calinawan AP, Lin C, Zhang B, Wang P et al. A highly annotated database of genes associated with platinum resistance in cancer. *Oncogene* 2021; 40(46):6395–405. doi: 10.1038/s41388-021-02055-2.
105. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; 461(7267):1071–8. doi: 10.1038/nature08467.
106. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell* 2017; 66(6):801–17. doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.015.
107. Klein A de, Muijtjens M, van Os R, Verhoeven Y, Smit B, Carr AM et al. Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Current Biology* 2000; 10(8):479–82. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00447-4.
108. Murga M, Bunting S, Montaña MF, Soria R, Mulero F, Cañamero M et al. A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat Genet* 2009; 41(8):891–8. doi: 10.1038/ng.420.
109. Nghiem P, Park PK, Kim Y, Vaziri C, Schreiber SL. ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16):9092–7. doi: 10.1073/pnas.161281798.
110. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (New York, N.Y.)* 2003; 300(5625):1542–8. doi: 10.1126/science.1083430.
111. Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science (New York, N.Y.)* 2001; 294(5547):1713–6. doi: 10.1126/science.1065521.
112. Guo Z, Kumagai A, Wang SX, Dunphy WG. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA

- replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.* 2000; 14(21):2745–56. doi: 10.1101/gad.842500.
113. Liu Q, Guntuku S, Cui X-S, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K et al. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G₂/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 2000; 14(12):1448–59. doi: 10.1101/gad.14.12.1448.
114. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *Journal of Nucleic Acids* 2010; 2010. doi: 10.4061/2010/201367.
115. Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 2004; 23(16):2825–37. doi: 10.1038/sj.onc.1207528.
116. Lee J, Kumagai A, Dunphy WG. Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Mol Biol Cell* 2001; 12(3):551–63. doi: 10.1091/mbc.12.3.551.
117. Parker LL, Piwnica-Worms H. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science (New York, N.Y.)* 1992; 257(5078):1955–7. doi: 10.1126/science.1384126.
118. Buisson R, Niraj J, Rodrigue A, Ho CK, Kreuzer J, Foo TK et al. Coupling of Homologous Recombination and the Checkpoint by ATR. *Molecular Cell* 2017; 65(2):336–46. doi: 10.1016/j.molcel.2016.12.007.
119. Wang Q-E, Milum K, Han C, Huang Y-W, Wani G, Thomale J et al. Differential contributory roles of nucleotide excision and homologous recombination repair for enhancing cisplatin sensitivity in human ovarian cancer cells. *Mol Cancer* 2011; 10(1):24. doi: 10.1186/1476-4598-10-24.
120. Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Shiloh Y, Rotman G. Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(41):38224–30. doi: 10.1074/jbc.M102986200.
121. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science (New York, N.Y.)* 1998; 281(5383):1674–7. doi: 10.1126/science.281.5383.1674.

122. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science (New York, N.Y.)* 1998; 282(5395):1893–7. doi: 10.1126/science.282.5395.1893.
123. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004; 432(7015):316–23. doi: 10.1038/nature03097.
124. Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & Development* 1999; 13(2):152–7. doi: 10.1101/gad.13.2.152.
125. Shieh S-Y, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* 2000; 14(3):289–300. doi: 10.1101/gad.14.3.289.
126. Abuetabh Y, Wu HH, Chai C, Al Yousef H, Persad S, Sergi CM et al. DNA damage response revisited: the p53 family and its regulators provide endless cancer therapy opportunities. *Exp Mol Med* 2022; 54(10):1658–69. doi: 10.1038/s12276-022-00863-4.
127. Gadducci A, Cosio S, Muraca S, Genazzani AR. Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *European journal of gynaecological oncology* 2002; 23(5):390–6.
128. Alam SK, Yadav VK, Bajaj S, Datta A, Dutta SK, Bhattacharyya M et al. DNA damage-induced ephrin-B2 reverse signaling promotes chemoresistance and drives EMT in colorectal carcinoma harboring mutant p53. *Cell Death Differ* 2016; 23(4):707–22. doi: 10.1038/cdd.2015.133.
129. Huang Y, Liu N, Liu J, Liu Y, Zhang C, Long S et al. Mutant p53 drives cancer chemotherapy resistance due to loss of function on activating transcription of PUMA. *Cell Cycle* 2019; 18(24):3442–55. doi: 10.1080/15384101.2019.1688951.
130. Lin X, Howell SB. DNA mismatch repair and p53 function are major determinants of the rate of development of cisplatin resistance. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(5):1239–47. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0491.

131. Kotnik EN, Mullen MM, Spies NC, Li T, Inkman M, Zhang J et al. Genetic characterization of primary and metastatic high-grade serous ovarian cancer tumors reveals distinct features associated with survival. *Commun Biol* 2023; 6(1):688. doi: 10.1038/s42003-023-05026-3.
132. Chou W-C, Wang H-C, Wong F-H, Ding S, Wu P-E, Shieh S-Y et al. Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair. *The EMBO Journal* 2008; 27(23):3140–50. doi: 10.1038/emboj.2008.229.
133. Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular Cell* 2012; 47(4):497–510. doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.029.
134. Da Costa AABA, Chowdhury D, Shapiro GI, D'Andrea AD, Konstantinopoulos PA. Targeting replication stress in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2023; 22(1):38–58. doi: 10.1038/s41573-022-00558-5.
135. Singleton BK, Torres-Arzayus MI, Rottinghaus ST, Taccioli GE, Jeggo PA. The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Molecular and Cellular Biology* 1999; 19(5):3267–77. doi: 10.1128/MCB.19.5.3267.
136. Jette N, Lees-Miller SP. The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2015; 117(2-3):194–205. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.003.
137. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology* 2016; 26(1):52–64. doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.009.
138. Chen BPC, Uematsu N, Kobayashi J, Lerenthal Y, Krempler A, Yajima H et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(9):6582–7. doi: 10.1074/jbc.M611605200.

139. Zoppoli G, Regairaz M, Leo E, Reinhold WC, Varma S, Ballestrero A et al. Putative DNA/RNA helicase Schlafen-11 (SLFN11) sensitizes cancer cells to DNA-damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(37):15030–5. doi: 10.1073/pnas.1205943109.
140. Winkler C, Armenia J, Jones GN, Tobalina L, Sale MJ, Petreus T et al. SLFN11 informs on standard of care and novel treatments in a wide range of cancer models. *Br J Cancer* 2021; 124(5):951–62. doi: 10.1038/s41416-020-01199-4.
141. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012; 483(7391):603–7. doi: 10.1038/nature11003.
142. Mu Y, Lou J, Srivastava M, Zhao B, Feng X, Liu T et al. SLFN11 inhibits checkpoint maintenance and homologous recombination repair. *EMBO Rep* 2016; 17(1):94–109. doi: 10.15252/embr.201540964.
143. Murai J, Thomas A, Miettinen M, Pommier Y. Schlafen 11 (SLFN11), a restriction factor for replicative stress induced by DNA-targeting anti-cancer therapies. *Pharmacology & Therapeutics* 2019; 201:94–102. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.009.
144. Murai J, Tang S-W, Leo E, Baechler SA, Redon CE, Zhang H et al. SLFN11 Blocks Stressed Replication Forks Independently of ATR. *Molecular Cell* 2018; 69(3):371–384.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2018.01.012.
145. Nogales V, Reinhold WC, Varma S, Martinez-Cardus A, Moutinho C, Moran S et al. Epigenetic inactivation of the putative DNA/RNA helicase SLFN11 in human cancer confers resistance to platinum drugs. *Oncotarget* 2016; 7(3):3084–97. doi: 10.18632/oncotarget.6413.
146. Tang S-W, Thomas A, Murai J, Trepel JB, Bates SE, Rajapakse VN et al. Overcoming Resistance to DNA-Targeted Agents by Epigenetic Activation of Schlafen 11 (SLFN11) Expression with Class I Histone Deacetylase Inhibitors. *Clin Cancer Res* 2018; 24(8):1944–53. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0443.

147. Gardner EE, Lok BH, Schneeberger VE, Desmeules P, Miles LA, Arnold PK et al. Chemosensitive Relapse in Small Cell Lung Cancer Proceeds through an EZH2-SLFN11 Axis. *Cancer Cell* 2017; 31(2):286–99. doi: 10.1016/j.ccell.2017.01.006.
148. Murai J, Feng Y, Yu GK, Ru Y, Tang S-W, Shen Y et al. Resistance to PARP inhibitors by SLFN11 inactivation can be overcome by ATR inhibition. *Oncotarget* 2016; 7(47):76534–50. doi: 10.18632/oncotarget.12266.
149. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal* 1998; 17(18):5497–508. doi: 10.1093/emboj/17.18.5497.
150. Karanam K, Kafri R, Loewer A, Lahav G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Molecular Cell* 2012; 47(2):320–9. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.052.
151. Gatei M, Zhou BB, Hobson K, Scott S, Young D, Khanna KK. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(20):17276–80. doi: 10.1074/jbc.M011681200.
152. Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J et al. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science (New York, N.Y.)* 1999; 285(5428):747–50. doi: 10.1126/science.285.5428.747.
153. Tarsounas M, Sung P. The antitumorigenic roles of BRCA1-BARD1 in DNA repair and replication. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(5):284–99. doi: 10.1038/s41580-020-0218-z.
154. Cejka P. DNA End Resection: Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous Recombination. *J Biol Chem* 2015; 290(38):22931–8. doi: 10.1074/jbc.R115.675942.

155. Thorslund T, McIlwraith MJ, Compton SA, Lekomtsev S, Petronczki M, Griffith JD et al. The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(10):1263–5. doi: 10.1038/nsmb.1905.
156. Bhattacharyya A, Ear US, Koller BH, Weichselbaum RR, Bishop DK. The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(31):23899–903. doi: 10.1074/jbc.C000276200.
157. Baumann P, Benson FE, West SC. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 1996; 87(4):757–66. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81394-X.
158. Sneeden JL, Grossi SM, Tappin I, Hurwitz J, Heyer W-D. Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(9):4913–25. doi: 10.1093/nar/gkt192.
159. King M-C, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science (New York, N.Y.)* 2003; 302(5645):643–6. doi: 10.1126/science.1088759.
160. Tan DSP, Rothermundt C, Thomas K, Bancroft E, Eeles R, Shanley S et al. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol* 2008; 26(34):5530–6. doi: 10.1200/JCO.2008.16.1703.
161. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009; 361(2):123–34. doi: 10.1056/NEJMoa0900212.
162. Quinn JE, James CR, Stewart GE, Mulligan JM, White P, Chang GKF et al. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13(24):7413–20. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1083.

163. Vyas S, Matic I, Uchima L, Rood J, Zaja R, Hay RT et al. Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Nat Commun* 2014; 5(1):4426. doi: 10.1038/ncomms5426.
164. Ménissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F et al. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *The EMBO Journal* 2003; 22(9):2255–63. doi: 10.1093/emboj/cdg206.
165. Langelier M-F, Planck JL, Roy S, Pascal JM. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. *Science (New York, N.Y.)* 2012; 336(6082):728–32. doi: 10.1126/science.1216338.
166. Schreiber V, Dantzer F, Ame J-C, Murcia G de. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(7):517–28. doi: 10.1038/nrm1963.
167. Lonskaya I, Potaman VN, Shlyakhtenko LS, Oussatcheva EA, Lyubchenko YL, Soldatenkov VA. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(17):17076–83. doi: 10.1074/jbc.M413483200.
168. Gagné J-P, Isabelle M, Lo KS, Bourassa S, Hendzel MJ, Dawson VL et al. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(22):6959–76. doi: 10.1093/nar/gkn771.
169. Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(52):40974–80. doi: 10.1074/jbc.M006520200.
170. Pines A, Vrouwe MG, Marteiijn JA, Typas D, Luijsterburg MS, Cansoy M et al. PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J Cell Biol* 2012; 199(2):235–49. doi: 10.1083/jcb.201112132.

171. Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(7):465–81. doi: 10.1038/nrm3822.
172. Reynolds P, Cooper S, Lomax M, O'Neill P. Disruption of PARP1 function inhibits base excision repair of a sub-set of DNA lesions. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(8):4028–38. doi: 10.1093/nar/gkv250.
173. Ali AAE, Timinszky G, Arribas-Bosacoma R, Kozlowski M, Hassa PO, Hassler M et al. The zinc-finger domains of PARP1 cooperate to recognize DNA strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19(7):685–92. doi: 10.1038/nsmb.2335.
174. Haince J-F, McDonald D, Rodrigue A, Déry U, Masson J-Y, Hendzel MJ et al. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283(2):1197–208. doi: 10.1074/jbc.M706734200.
175. Li M, Yu X. Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation. *Cancer Cell* 2013; 23(5):693–704. doi: 10.1016/j.ccr.2013.03.025.
176. Hu Y, Petit SA, Ficarro SB, Toomire KJ, Xie A, Lim E et al. PARP1-driven poly-ADP-ribosylation regulates BRCA1 function in homologous recombination-mediated DNA repair. *Cancer Discov* 2014; 4(12):1430–47. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0891.
177. Ruscetti T, Lehnert BE, Halbrook J, Le Trong H, Hoekstra MF, Chen DJ et al. Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(23):14461–7. doi: 10.1074/jbc.273.23.14461.
178. Ray Chaudhuri A, Hashimoto Y, Herrador R, Neelsen KJ, Fachinetti D, Bermejo R et al. Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19(4):417–23. doi: 10.1038/nsmb.2258.

179. Annunziata CM, O'Shaughnessy J. Poly (ADP-ribose) polymerase as a novel therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16(18):4517–26. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0526.
180. Wang Q, Xiong J, Qiu D, Zhao X, Yan D, Xu W et al. Inhibition of PARP1 activity enhances chemotherapeutic efficiency in cisplatin-resistant gastric cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2017; 92:164–72. doi: 10.1016/j.biocel.2017.08.001.
181. Michels J, Vitale I, Galluzzi L, Adam J, Olaussen KA, Kepp O et al. Cisplatin resistance associated with PARP hyperactivation. *Cancer Res* 2013; 73(7):2271–80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3000.
182. Prasad CB, Prasad SB, Yadav SS, Pandey LK, Singh S, Pradhan S et al. Olaparib modulates DNA repair efficiency, sensitizes cervical cancer cells to cisplatin and exhibits anti-metastatic property. *Sci Rep* 2017; 7(1):12876. doi: 10.1038/s41598-017-13232-3.
183. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(10):630–42. doi: 10.1038/nrm3658.
184. 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(22):2592–601. doi: 10.4161/cc.5.22.3448.
185. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends in Biochemical Sciences* 2006; 31(3):164–72. doi: 10.1016/j.tibs.2006.01.006.
186. Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11:441–69. doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.002301.
187. Arrigo A-P, Virost S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(3-4):414–22. doi: 10.1089/ars.2005.7.414.

188. Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viroit S, Arrigo A-P. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Molecular and Cellular Biology* 2002; 22(3):816–34. doi: 10.1128/MCB.22.3.816-834.2002.
189. Rocchi P, Jugpal P, So A, Sinneman S, Ettinger S, Fazli L et al. Small interference RNA targeting heat-shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase-3 activation in vitro. *BJU International* 2006; 98(5):1082–9. doi: 10.1111/j.1464-410X.2006.06425.x.
190. Havasi A, Li Z, Wang Z, Martin JL, Botla V, Ruchalski K et al. Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283(18):12305–13. doi: 10.1074/jbc.M801291200.
191. Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J* 1999; 13(14):2061–70. doi: 10.1096/fasebj.13.14.2061.
192. Wantoch von Rekowski K, König P, Henze S, Schlesinger M, Zawierucha P, Januchowski R et al. Insight into Cisplatin-Resistance Signaling of W1 Ovarian Cancer Cells Emerges mTOR and HSP27 as Targets for Sensitization Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(23). doi: 10.3390/ijms21239240.
193. Stope MB, Weiss M, Preuss M, Streitböcker A, Ritter CA, Zimmermann U et al. Immediate and transient phosphorylation of the heat shock protein 27 initiates chemoresistance in prostate cancer cells. *Oncology Reports* 2014; 32(6):2380–6. doi: 10.3892/or.2014.3492.
194. Gao Y, Han C, Huang H, Xin Y, Xu Y, Luo L et al. Heat shock protein 70 together with its co-chaperone CHIP inhibits TNF-alpha induced apoptosis by promoting proteasomal degradation of apoptosis signal-regulating kinase1. *Apoptosis* 2010; 15(7):822–33. doi: 10.1007/s10495-010-0495-7.
195. Yang X, Wang J, Zhou Y, Wang Y, Wang S, Zhang W. Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Letters* 2012; 321(2):137–43. doi: 10.1016/j.canlet.2012.01.030.

196. Zhang R, Luo D, Miao R, Bai L, Ge Q, Sessa WC et al. Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene* 2005; 24(24):3954–63. doi: 10.1038/sj.onc.1208548.
197. Guttman DM, Hart L, Du K, Seletsky A, Koumenis C. Inhibition of Hsp27 radiosensitizes head-and-neck cancer by modulating deoxyribonucleic acid repair. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013; 87(1):168–75. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.05.028.
198. Cosentino C, Grieco D, Costanzo V. ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *The EMBO Journal* 2011; 30(3):546–55. doi: 10.1038/emboj.2010.330.
199. Yamamoto Y, Hosoda K, Imahori T, Tanaka J, Matsuo K, Nakai T et al. Pentose phosphate pathway activation via HSP27 phosphorylation by ATM kinase: A putative endogenous antioxidant defense mechanism during cerebral ischemia-reperfusion. *Brain Research* 2018; 1687:82–94. doi: 10.1016/j.brainres.2018.03.001.
200. Ha K, Fiskus W, Rao R, Balusu R, Venkannagari S, Nalabothula NR et al. Hsp90 inhibitor-mediated disruption of chaperone association of ATR with hsp90 sensitizes cancer cells to DNA damage. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(7):1194–206. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0094.
201. Arlander SJH, Eapen AK, Vroman BT, McDonald RJ, Toft DO, Karnitz LM. Hsp90 inhibition depletes Chk1 and sensitizes tumor cells to replication stress. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(52):52572–7. doi: 10.1074/jbc.M309054200.
202. Stecklein SR, Kumaraswamy E, Behbod F, Wang W, Chaguturu V, Harlan-Williams LM et al. BRCA1 and HSP90 cooperate in homologous and non-homologous DNA double-strand-break repair and G2/M checkpoint activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(34):13650–5. doi: 10.1073/pnas.1203326109.
203. Noguchi M, Yu D, Hirayama R, Ninomiya Y, Sekine E, Kubota N et al. Inhibition of homologous recombination repair in irradiated tumor cells pretreated with Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin.

- Biochemical and Biophysical Research Communications 2006; 351(3):658–63. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.094.
204. Kotoglou P, Kalaitzakis A, Vezyraki P, Tzavaras T, Michalis LK, Dantzer F et al. Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14(4):391–406. doi: 10.1007/s12192-008-0093-6.
205. Yang J, Liu X, Niu P, Zou Y, Duan Y. Correlations and co-localizations of Hsp70 with XPA, XPG in human bronchial epithelia cells exposed to benzoapyrene. *Toxicology* 2009; 265(1-2):10–4. doi: 10.1016/j.tox.2009.09.001.
206. Ott I, Gust R. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. *Archiv der Pharmazie* 2007; 340(3):117–26. doi: 10.1002/ardp.200600151.
207. Marzo T, Cirri D, Gabbiani C, Gamberi T, Magherini F, Pratesi A et al. Auranofin, Et3PAuCl, and Et3PAuI Are Highly Cytotoxic on Colorectal Cancer Cells: A Chemical and Biological Study. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2017; 8(10):997–1001. doi: 10.1021/acsmchemlett.7b00162.
208. Marzano C, Gandin V, Folda A, Scutari G, Bindoli A, Rigobello MP. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2007; 42(6):872–81. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.021.
209. Altaf M, Monim-ul-Mehboob M, Kawde A-N, Corona G, Larcher R, Ogasawara M et al. New bipyridine gold(III) dithiocarbamate-containing complexes exerted a potent anticancer activity against cisplatin-resistant cancer cells independent of p53 status. *Oncotarget* 2017; 8(1):490–505. doi: 10.18632/oncotarget.13448.
210. Gromer S, Arscott LD, Williams CH, Schirmer RH, Becker K. Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(32):20096–101. doi: 10.1074/jbc.273.32.20096.
211. Rigobello MP, Scutari G, Folda A, Bindoli A. Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition by gold(I) compounds and concurrent stimulation of

- permeability transition and release of cytochrome c. *Biochemical Pharmacology* 2004; 67(4):689–96. doi: 10.1016/j.bcp.2003.09.038.
212. Andermark V, Göke K, Kokoschka M, Abu el Maaty, Mohamed A., Lum CT, Zou T et al. Alkynyl gold(I) phosphane complexes: Evaluation of structure-activity-relationships for the phosphane ligands, effects on key signaling proteins and preliminary in-vivo studies with a nanoformulated complex. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2016; 160:140–8. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.12.020.
213. Cheng X, Holenya P, Can S, Alborzinia H, Rubbiani R, Ott I et al. A TrxR inhibiting gold(I) NHC complex induces apoptosis through ASK1-p38-MAPK signaling in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* 2014; 13(1):221. doi: 10.1186/1476-4598-13-221.
214. Shaw III CF. Gold-based therapeutic agents. *Chemical Reviews* 1999; 99(9):2589–600. doi: 10.1021/cr980431o.
215. Fiehn C, Holle J, Iking-Konert C, Leipe J, Weseloh C, Frerix M et al. S2e-Leitlinie: Therapie der rheumatoiden Arthritis mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten. *Z Rheumatol* 2018; 77(Suppl 2):35–53. doi: 10.1007/s00393-018-0481-y.
216. Berglöff FE, Berglöff K, Walz DT. Auranofin: an oral chrysotherapeutic agent for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1978; 5(1):68–74.
217. Simon TM, Kunishima DH, Vibert GJ, Lorber A. Screening Trial with the Coordinated Gold Compound Auranofin Using Mouse Lymphocytic Leukemia P388. *Cancer Res* 1981; 41(1):94–7.
218. Zoppi C, Messori L, Pratesi A. ESI MS studies highlight the selective interaction of Auranofin with protein free thiols. *Dalton Trans.* 2020; 49(18):5906–13. doi: 10.1039/D0DT00283F.
219. Zhong L, Arnér ES, Holmgren A. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(11):5854–9. doi: 10.1073/pnas.100114897.

220. Zhang J, Li X, Han X, Liu R, Fang J. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* 2017; 38(9):794–808. doi: 10.1016/j.tips.2017.06.001.
221. Rigobello MP, Scutari G, Boscolo R, Bindoli A. Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a gold(I)-phosphine derivative. *British Journal of Pharmacology* 2002; 136(8):1162–8. doi: 10.1038/sj.bjp.0704823.
222. Snyder RM, Mirabelli CK, Crooke ST. Cellular association, intracellular distribution, and efflux of auranofin via sequential ligand exchange reactions. *Biochemical Pharmacology* 1986; 35(6):923–32. doi: 10.1016/0006-2952(86)90078-X.
223. Mirabelli CK, Johnson RK, Hill DT, Faucette LF, Girard GR, Kuo GY et al. Correlation of the in vitro cytotoxic and in vivo antitumor activities of gold(I) coordination complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 1986; 29(2):218–23. doi: 10.1021/jm00152a009.
224. Kinsch EM, Stephan DW. A ^{31}P nuclear magnetic resonance and fluorescence study of the interaction of an anti-arthritic gold phosphine drug with albumin. A bioinorganic approach. *Inorganica Chimica Acta* 1984; 91(4):263–7. doi: 10.1016/S0020-1693(00)81848-4.
225. Mirabelli CK, Johnson RK, Sung CM, Faucette L, Muirhead K, Crooke ST. Evaluation of the in Vivo Antitumor Activity and in Vitro Cytotoxic Properties of Auranofin, a Coordinated Gold Compound, in Murine Tumor Models. *Cancer Res* 1985; 45(1):32–9.
226. Baker MV, Barnard PJ, Berners-Price SJ, Brayshaw SK, Hickey JL, Skelton BW et al. Cationic, linear Au(I) N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, structure and anti-mitochondrial activity. *Dalton Trans* 2006; (30):3708–15. doi: 10.1039/B602560A.
227. Rubbiani R, Kitanovic I, Alborzinia H, Can S, Kitanovic A, Onambele LA et al. Benzimidazol-2-ylidene gold(I) complexes are thioredoxin reductase inhibitors with multiple antitumor properties. *Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 53(24):8608–18. doi: 10.1021/jm100801e.

228. Rubbiani R, Can S, Kitanovic I, Alborzinia H, Stefanopoulou M, Kokoschka M et al. Comparative in vitro evaluation of N-heterocyclic carbene gold(I) complexes of the benzimidazolylidene type. *Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 54(24):8646–57. doi: 10.1021/jm201220n.
229. Purnell MR, Whish WJ. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *The Biochemical journal* 1980; 185(3):775–7. doi: 10.1042/bj1850775.
230. Brown JS, Kaye SB, Yap TA. PARP inhibitors: the race is on. *Br J Cancer* 2016; 114(7):713–5. doi: 10.1038/bjc.2016.67.
231. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A et al. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2016; 375(22):2154–64. doi: 10.1056/NEJMoa1611310.
232. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15(8):852–61. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70228-1.
233. Xie H, Wang W, Xia B, Jin W, Lou G. Therapeutic applications of PARP inhibitors in ovarian cancer. *Biomed Pharmacother* 2020; 127:110204. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110204.
234. Coleman RL, Oza AM, Lorusso D, Aghajanian C, Oaknin A, Dean A et al. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390(10106):1949–61. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32440-6.
235. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Gonçalves A, Lee K-H et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med* 2018; 379(8):753–63. doi: 10.1056/NEJMoa1802905.

236. LaFargue CJ, Dal Molin GZ, Sood AK, Coleman RL. Exploring and comparing adverse events between PARP inhibitors. *Lancet Oncol* 2019; 20(1):e15-e28. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30786-1.
237. Papeo G, Posterl H, Borghi D, Busel AA, Caprera F, Casale E et al. Discovery of 2-1-(4,4-Difluorocyclohexyl)piperidin-4-yl-6-fluoro-3-oxo-2,3-dihydro-1H-isoindole-4-carboxamide (NMS-P118): A Potent, Orally Available, and Highly Selective PARP-1 Inhibitor for Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58(17):6875–98. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00680.
238. Bono J de, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2020; 382(22):2091–102. doi: 10.1056/NEJMoa1911440.
239. Golan T, Hammel P, Reni M, van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2019; 381(4):317–27. doi: 10.1056/NEJMoa1903387.
240. Abida W, Patnaik A, Campbell D, Shapiro J, Bryce AH, McDermott R et al. Rucaparib in Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Harboring a BRCA1 or BRCA2 Gene Alteration. *J Clin Oncol* 2020; 38(32):3763–72. doi: 10.1200/JCO.20.01035.
241. Curtin NJ, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2020; 19(10):711–36. doi: 10.1038/s41573-020-0076-6.
242. Pommier Y, O'Connor MJ, Bono J de. Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. *Sci Transl Med* 2016; 8(362):362ps17. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf9246.
243. Lord CJ, Tutt ANJ, Ashworth A. Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors. *Annu Rev Med* 2015; 66:455–70. doi: 10.1146/annurev-med-050913-022545.
244. Ashworth A, Lord CJ, Reis-Filho JS. Genetic interactions in cancer progression and treatment. *Cell* 2011; 145(1):30–8. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.020.

245. Murai J, Huang S-YN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res* 2012; 72(21):5588–99. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2753.
246. Murai J, Huang S-YN, Renaud A, Zhang Y, Ji J, Takeda S et al. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(2):433–43. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0803.
247. Vaidyanathan A, Sawers L, Gannon A-L, Chakravarty P, Scott AL, Bray SE et al. ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 2016; 115(4):431–41. doi: 10.1038/bjc.2016.203.
248. Henneman L, van Miltenburg MH, Michalak EM, Braumuller TM, Jaspers JE, Drenth AP et al. Selective resistance to the PARP inhibitor olaparib in a mouse model for BRCA1-deficient metaplastic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(27):8409–14. doi: 10.1073/pnas.1500223112.
249. Zhao D, Long X, Wang J. Transporter-mediated drug-drug interactions involving poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors (Review). *Oncology Letters* 2023; 25(4):161. doi: 10.3892/ol.2023.13747.
250. Pettitt SJ, Krastev DB, Brandsma I, Dréan A, Song F, Aleksandrov R et al. Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. *Nat Commun* 2018; 9(1):1849. doi: 10.1038/s41467-018-03917-2.
251. Pettitt SJ, Rehman FL, Bajrami I, Brough R, Wallberg F, Kozarewa I et al. A genetic screen using the PiggyBac transposon in haploid cells identifies Parp1 as a mediator of olaparib toxicity. *PLOS ONE* 2013; 8(4):e61520. doi: 10.1371/journal.pone.0061520.
252. Barber LJ, Sandhu S, Chen L, Campbell J, Kozarewa I, Fenwick K et al. Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor. *The Journal of Pathology* 2013; 229(3):422–9. doi: 10.1002/path.4140.

253. Tobalina L, Armenia J, Irving E, O'Connor MJ, Forment JV. A meta-analysis of reversion mutations in BRCA genes identifies signatures of DNA end-joining repair mechanisms driving therapy resistance. *Ann Oncol* 2021; 32(1):103–12. doi: 10.1016/j.annonc.2020.10.470.
254. Bunting SF, Callén E, Wong N, Chen H-T, Polato F, Gunn A et al. 53BP1 inhibits homologous recombination in *Brcal*-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 2010; 141(2):243–54. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.012.
255. Yang Z, Liao X, Chen Y, Shen Y, Yang X, Su Y et al. Combining 53BP1 with BRCA1 as a biomarker to predict the sensitivity of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Acta Pharmacol Sin* 2017; 38(7):1038–47. doi: 10.1038/aps.2017.8.
256. Ray Chaudhuri A, Callen E, Ding X, Gogola E, Duarte AA, Lee J-E et al. Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* 2016; 535(7612):382–7. doi: 10.1038/nature18325.
257. Allison Stewart C, Tong P, Cardnell RJ, Sen T, Li L, Gay CM et al. Dynamic variations in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), ATM, and SLFN11 govern response to PARP inhibitors and cisplatin in small cell lung cancer. *Oncotarget* 2017; 8(17):28575–87. doi: 10.18632/oncotarget.15338.
258. Yazinski SA, Comaills V, Buisson R, Genois M-M, Nguyen HD, Ho CK et al. ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant BRCA-deficient cancer cells. *Genes Dev.* 2017; 31(3):318–32. doi: 10.1101/gad.290957.116.
259. Willis SE, Winkler C, Roudier MP, Baird T, Marco-Casanova P, Jones EV et al. Retrospective analysis of Schlafen11 (SLFN11) to predict the outcomes to therapies affecting the DNA damage response. *Br J Cancer* 2021; 125(12):1666–76. doi: 10.1038/s41416-021-01560-1.
260. Li Q, Qian W, Zhang Y, Hu L, Chen S, Xia Y. A new wave of innovations within the DNA damage response. *Sig Transduct Target Ther* 2023; 8(1):338. doi: 10.1038/s41392-023-01548-8.

261. Durant ST, Zheng L, Wang Y, Chen K, Zhang L, Zhang T et al. The brain-penetrant clinical ATM inhibitor AZD1390 radiosensitizes and improves survival of preclinical brain tumor models. *Sci Adv* 2018; 4(6):eaat1719. doi: 10.1126/sciadv.aat1719.
262. Li H, Liu Y, Xiao Y, Wilson CN, Bai HJ, Jones MD et al. CRISPR metabolic screen identifies ATM and KEAP1 as targetable genetic vulnerabilities in solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2023; 120(6):e2212072120. doi: 10.1073/pnas.2212072120.
263. Jin MH, Oh D-Y. ATM in DNA repair in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 2019; 203:107391. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.07.002.
264. Gilardini Montani MS, Prodosmo A, Stagni V, Merli D, Monteonofrio L, Gatti V et al. ATM-depletion in breast cancer cells confers sensitivity to PARP inhibition. *J Exp Clin Cancer Res* 2013; 32(1):95. doi: 10.1186/1756-9966-32-95.
265. Schmitt A, Knittel G, Welcker D, Yang T-P, George J, Nowak M et al. ATM Deficiency Is Associated with Sensitivity to PARP1- and ATR Inhibitors in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res* 2017; 77(11):3040–56. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3398.
266. Search for: AZD1390 | Card Results | ClinicalTrials.gov; 2024 [Stand: 22.01.2024]. Verfügbar unter: <https://www.clinicaltrials.gov/search?intr=AZD1390>.
267. Buisson R, Boisvert JL, Benes CH, Zou L. Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase. *Molecular Cell* 2015; 59(6):1011–24. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.029.
268. Schoonen PM, Kok YP, Wierenga E, Bakker B, Foijer F, Spierings DCJ et al. Premature mitotic entry induced by ATR inhibition potentiates olaparib inhibition-mediated genomic instability, inflammatory signaling, and cytotoxicity in BRCA2-deficient cancer cells. *Molecular Oncology* 2019; 13(11):2422–40. doi: 10.1002/1878-0261.12573.
269. Shapiro GI, Wesolowski R, Devoe C, Lord S, Pollard J, Hendriks BS et al. Phase 1 study of the ATR inhibitor berzosertib in combination with cisplatin

- in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2021; 125(4):520–7. doi: 10.1038/s41416-021-01406-w.
270. Jo U, Senatorov IS, Zimmermann A, Saha LK, Murai Y, Kim SH et al. Novel and Highly Potent ATR Inhibitor M4344 Kills Cancer Cells With Replication Stress, and Enhances the Chemotherapeutic Activity of Widely Used DNA Damaging Agents. *Mol Cancer Ther* 2021; 20(8):1431–41. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-1026.
271. Lücking U, Wortmann L, Wengner AM, Lefranc J, Lienau P, Briem H et al. Damage Incorporated: Discovery of the Potent, Highly Selective, Orally Available ATR Inhibitor BAY 1895344 with Favorable Pharmacokinetic Properties and Promising Efficacy in Monotherapy and in Combination Treatments in Preclinical Tumor Models. *Journal of Medicinal Chemistry* 2020; 63(13):7293–325. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00369.
272. Wengner AM, Siemeister G, Lücking U, Lefranc J, Wortmann L, Lienau P et al. The Novel ATR Inhibitor BAY 1895344 Is Efficacious as Monotherapy and Combined with DNA Damage-Inducing or Repair-Compromising Therapies in Preclinical Cancer Models. *Mol Cancer Ther* 2020; 19(1):26–38. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0019.
273. Yap TA, Tan DSP, Terbuch A, Caldwell R, Guo C, Goh BC et al. First-in-Human Trial of the Oral Ataxia Telangiectasia and RAD3-Related (ATR) Inhibitor BAY 1895344 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Discov* 2021; 11(1):80–91. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-0868.
274. Search for: elimusertib | Card Results | ClinicalTrials.gov; 2024 [Stand: 23.01.2024]. Verfügbar unter: <https://www.clinicaltrials.gov/search?intr=elimusertib>.
275. Syljuåsen RG, Sørensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F et al. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25(9):3553–62. doi: 10.1128/MCB.25.9.3553-3562.2005.
276. Ditano JP, Eastman A. Comparative Activity and Off-Target Effects in Cells of the CHK1 Inhibitors MK-8776, SRA737, and LY2606368. *ACS*

- Pharmacology & Translational Science 2021; 4(2):730–43. doi: 10.1021/acsptsci.0c00201.
277. Daud AI, Ashworth MT, Strosberg J, Goldman JW, Mendelson D, Springett G et al. Phase I dose-escalation trial of checkpoint kinase 1 inhibitor MK-8776 as monotherapy and in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2015; 33(9):1060–6. doi: 10.1200/JCO.2014.57.5027.
278. Karp JE, Thomas BM, Greer JM, Sorge C, Gore SD, Pratz KW et al. Phase I and pharmacologic trial of cytosine arabinoside with the selective checkpoint 1 inhibitor Sch 900776 in refractory acute leukemias. *Clin Cancer Res* 2012; 18(24):6723–31. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2442.
279. Do K, Doroshow JH, Kummar S. Wee1 kinase as a target for cancer therapy. *Cell Cycle* 2013; 12(19):3159–64. doi: 10.4161/cc.26062.
280. Chen T, Stephens PA, Middleton FK, Curtin NJ. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discovery Today* 2012; 17(5-6):194–202. doi: 10.1016/j.drudis.2011.12.009.
281. Hirai H, Iwasawa Y, Okada M, Arai T, Nishibata T, Kobayashi M et al. Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(11):2992–3000. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0463.
282. Witt Hamer PC de, Mir SE, Noske D, van Noorden CJF, Würdinger T. WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe. *Clin Cancer Res* 2011; 17(13):4200–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2537.
283. Slipicevic A, Holth A, Hellesylt E, Tropé CG, Davidson B, Flørenes VA. Wee1 is a novel independent prognostic marker of poor survival in post-chemotherapy ovarian carcinoma effusions. *Gynecologic Oncology* 2014; 135(1):118–24. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.07.102.
284. Leijen S, van Geel RMJM, Sonke GS, Jong D de, Rosenberg EH, Marchetti S et al. Phase II Study of WEE1 Inhibitor AZD1775 Plus Carboplatin in Patients With TP53-Mutated Ovarian Cancer Refractory or Resistant to First-Line

- Therapy Within 3 Months. *J Clin Oncol* 2016; 34(36):4354–61. doi: 10.1200/JCO.2016.67.5942.
285. Oza AM, Estevez-Diz M, Grischke E-M, Hall M, Marmé F, Provencher D et al. A Biomarker-enriched, Randomized Phase II Trial of Adavosertib (AZD1775) Plus Paclitaxel and Carboplatin for Women with Platinum-sensitive TP53-mutant Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2020; 26(18):4767–76. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0219.
286. Moore KN, Chambers SK, Hamilton EP, Chen L-M, Oza AM, Ghamande SA et al. Adavosertib with Chemotherapy in Patients with Primary Platinum-Resistant Ovarian, Fallopian Tube, or Peritoneal Cancer: An Open-Label, Four-Arm, Phase II Study. *Clin Cancer Res* 2022; 28(1):36–44. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0158.
287. Jung M, Sippl W, Hrsg. Epigenetic targets in drug discovery. Weinheim: Wiley-VCH; 2009. (Methods and principles in medicinal chemistry; Bd. 42); ISBN: 3527627073. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527627073>.
288. Matei D, Fang F, Shen C, Schilder J, Arnold A, Zeng Y et al. Epigenetic resensitization to platinum in ovarian cancer. *Cancer Res* 2012; 72(9):2197–205. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3909.
289. Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R. Reversal of Drug Resistance in Human Tumor Xenografts by 2'-Deoxy-5-azacytidine-induced Demethylation of the hMLH1 Gene Promoter. *Cancer Res* 2000; 60(21):6039–44.
290. Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholic NM, Huang K-C, Xiao Y et al. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(4):842–54. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0773.
291. Klee CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(20):11606–11. doi: 10.1073/pnas.1933744100.

292. Krill L, Deng W, Eskander R, Mutch D, Zweizig S, Hoang B et al. Overexpression of enhance of Zeste homolog 2 (EZH2) in endometrial carcinoma: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecologic Oncology* 2020; 156(2):423–9. doi: 10.1016/j.ygyno.2019.12.003.
293. Gan L, Xu M, Hua R, Tan C, Zhang J, Gong Y et al. The polycomb group protein EZH2 induces epithelial-mesenchymal transition and pluripotent phenotype of gastric cancer cells by binding to PTEN promoter. *Journal of Hematology & Oncology* 2018; 11(1):9. doi: 10.1186/s13045-017-0547-3.
294. Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2008; 647(1-2):21–9. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.010.
295. Li H, Cai Q, Godwin AK, Zhang R. Enhancer of zeste homolog 2 promotes the proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* 2010; 8(12):1610–8. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0398.
296. Keudell G von, Salles G. The role of tazemetostat in relapsed/refractory follicular lymphoma. *Ther Adv Hematol* 2021; 12:20406207211015882. doi: 10.1177/20406207211015882.
297. Search for: Cancer, Tazemetostat | Card Results | ClinicalTrials.gov; 2024 [Stand: 26.01.2024]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/search?cond=Cancer&intr=Tazemetostat>.
298. Yang X-J, Seto E. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development* 2003; 13(2):143–53. doi: 10.1016/S0959-437X(03)00015-7.
299. Kim H-J, Bae S-C. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American Journal of Translational Research* 2011; 3(2):166–79.
300. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(18):10014–9. doi: 10.1073/pnas.180316197.

301. Ho TCS, Chan AHY, Ganesan A. Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight. *Journal of Medicinal Chemistry* 2020; 63(21):12460–84. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00830.
302. Cappellacci L, Perinelli DR, Maggi F, Grifantini M, Petrelli R. Recent Progress in Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Agents. *Curr Med Chem* 2020; 27(15):2449–93. doi: 10.2174/0929867325666181016163110.
303. Hess-Stumpp H, Bracker TU, Henderson D, Politz O. MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases--the development of an anticancer agent. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39(7-8):1388–405. doi: 10.1016/j.biocel.2007.02.009.
304. Haberland M, Johnson A, Mokalled MH, Montgomery RL, Olson EN. Genetic dissection of histone deacetylase requirement in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(19):7751–5. doi: 10.1073/pnas.0903139106.
305. Bandolik JJ, Hamacher A, Schrenk C, Weishaupt R, Kassack MU. Class I-Histone Deacetylase (HDAC) Inhibition is Superior to pan-HDAC Inhibition in Modulating Cisplatin Potency in High Grade Serous Ovarian Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20(12):3052. doi: 10.3390/ijms20123052.
306. Inoue S, Mai A, Dyer MJS, Cohen GM. Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* 2006; 66(13):6785–92. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4563.
307. Yardley DA, Ismail-Khan RR, Melichar B, Lichinitser M, Munster PN, Klein PM et al. Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor. *J Clin Oncol* 2013; 31(17):2128–35. doi: 10.1200/JCO.2012.43.7251.
308. Mullard A. 2023 FDA approvals. *Nat Rev Drug Discov* 2024; 23(2):88–95. doi: 10.1038/d41573-024-00001-x.

309. Stordal B, Timms K, Farrelly A, Gallagher D, Busschots S, Renaud M et al. BRCA1/2 mutation analysis in 41 ovarian cell lines reveals only one functionally deleterious BRCA1 mutation. *Molecular Oncology* 2013; 7(3):567–79. doi: 10.1016/j.molonc.2012.12.007.
310. Barnes BM, Nelson L, Tighe A, Burghel GJ, Lin I-H, Desai S et al. Distinct transcriptional programs stratify ovarian cancer cell lines into the five major histological subtypes. *Genome Med* 2021; 13(1):140. doi: 10.1186/s13073-021-00952-5.
311. Papp E, Hallberg D, Konecny GE, Bruhm DC, Adleff V, Noë M et al. Integrated Genomic, Epigenomic, and Expression Analyses of Ovarian Cancer Cell Lines. *Cell Reports* 2018; 25(9):2617–33. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.096.
312. Sterzyńska K, Kaźmierczak D, Klejewski A, Świerczewska M, Wojtowicz K, Nowacka M et al. Expression of Osteoblast-Specific Factor 2 (OSF-2, Periostin) Is Associated with Drug Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20(16):3927. doi: 10.3390/ijms20163927.
313. Januchowski R, Wojtowicz K, Sujka-Kordowska P, Andrzejewska M, Zabel M. MDR gene expression analysis of six drug-resistant ovarian cancer cell lines. *BioMed Research International* 2013; 2013:241763. doi: 10.1155/2013/241763.
314. Motoyama T. Biological characterization including sensitivity to mitomycin C of cultured human ovarian cancers (author's transl). *Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi* 1981; 33(8):1197–204.
315. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun* 2013; 4(1):2126. doi: 10.1038/ncomms3126.
316. Industrial Biotechnology Centre. The Resistant Cancer Cell Line (RCCL) collection - Industrial Biotechnology Centre - Research at Kent; 2023 [Stand: 14.02.2024]. Verfügbar unter: <https://research.kent.ac.uk/industrial-biotechnology-centre/the-resistant-cancer-cell-line-rccl-collection/>.

317. Michaelis M, Wass MN, Cinatl J. Drug-adapted cancer cell lines as preclinical models of acquired resistance. *Cancer Drug Resist* 2019; 2(3):447–56. doi: 10.20517/cdr.2019.005.
318. Hölzel F, Simon WE, Albrecht M, Hänsel M, Dietel M. Cell Lines Derived from Human Ovarian Carcinomas: Growth Stimulation by Gonadotropic and Steroid Hormones²³. *J Natl Cancer Inst* 1983; 70(5):839–45. doi: 10.1093/jnci/70.5.839.
319. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65(1-2):55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
320. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: *Biotechnology Annual Review: Elsevier*; 2005. S. 127–52 Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387265605110047>.
321. Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 2010; 70(2):440–6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
322. Zheng S, Wang W, Aldahdooh J, Malyutina A, Shadbahr T, Tanoli Z et al. SynergyFinder Plus: Toward Better Interpretation and Annotation of Drug Combination Screening Datasets. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 2022; 20(3):587–96. doi: 10.1016/j.gpb.2022.01.004.
323. Schmidt C, Karge B, Misgeld R, Prokop A, Franke R, Brönstrup M et al. Gold(I) NHC Complexes: Antiproliferative Activity, Cellular Uptake, Inhibition of Mammalian and Bacterial Thioredoxin Reductases, and Gram-Positive Directed Antibacterial Effects. *Chemistry – A European Journal* 2017; 23(8):1869–80. doi: 10.1002/chem.201604512.
324. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 1994; 32:5–8. doi: 10.1385/0-89603-268-X:5.
325. Lottspeich F, Hrsg. *Bioanalytik*. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2012; ISBN: 9783827429421.

326. Posch A, Kohn J, Oh K, Hammond M, Liu N. V3 stain-free workflow for a practical, convenient, and reliable total protein loading control in western blotting. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* 2013; (82):50948. doi: 10.3791/50948.
327. Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K et al. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Analytical Biochemistry* 2013; 433(2):105–11. doi: 10.1016/j.ab.2012.10.010.
328. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Seminars in Hematology* 2001; 38(2):179–93. doi: 10.1016/S0037-1963(01)90051-4.
329. Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 1975; 66(1):188–93. doi: 10.1083/jcb.66.1.188.
330. Watson JV, Chambers SH, Smith PJ. A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* 1987; 8(1):1–8. doi: 10.1002/cyto.990080101.
331. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1992; 148(7):2207–16.
332. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 1995; 184(1):39–51. doi: 10.1016/0022-1759(95)00072-I.
333. Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL. *Stryer Biochemie*. 7. Aufl. 2013. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013; ISBN: 9783827429896.
334. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 2015; 439:231–50. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017.

335. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit* 2007; 37(2):120–6. doi: 10.1002/biuz.200610332.
336. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005; 39(1):75–85. doi: 10.2144/05391RV01.
337. Friedrich M, Aigner A. Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives. *BioDrugs* 2022; 36(5):549–71. doi: 10.1007/s40259-022-00549-3.
338. Han H. RNA Interference to Knock Down Gene Expression. *Basic Protein and Peptide Protocols* 2018; 1706:293–302. doi: 10.1007/978-1-4939-7471-9_16.
339. König P, Zhulenko R, Suparman E, Hoffmeister H, Bückreiß N, Ott I et al. A biscarbene gold(I)-NHC-complex overcomes cisplatin-resistance in A2780 and W1 ovarian cancer cells highlighting pERK as regulator of apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2023; 92(1):57–69. doi: 10.1007/s00280-023-04548-1.
340. Okuno S, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Tamba M, Wang H, Sohda S et al. Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer* 2003; 88(6):951–6. doi: 10.1038/sj.bjc.6600786.
341. Wragg D, Almeida A de, Bonsignore R, Kühn FE, Leoni S, Casini A. On the Mechanism of Gold/NHC Compounds Binding to DNA G-Quadruplexes: Combined Metadynamics and Biophysical Methods. *Angewandte Chemie International Edition* 2018; 57(44):14524–8. doi: 10.1002/anie.201805727.
342. Bazzicalupi C, Ferraroni M, Papi F, Massai L, Bertrand B, Messori L et al. Determinants for Tight and Selective Binding of a Medicinal Dicarbene Gold(I) Complex to a Telomeric DNA G-Quadruplex: a Joint ESI MS and XRD Investigation. *Angewandte Chemie* 2016; 128(13):4328–31. doi: 10.1002/ange.201511999.
343. Kim KC, Kang KA, Zhang R, Piao MJ, Kim GY, Kang MY et al. Up-regulation of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression by eckol, a

- phlorotannin compound, through activation of Erk and PI3K/Akt. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2010; 42(2):297–305. doi: 10.1016/j.biocel.2009.11.009.
344. Sugiura R, Satoh R, Takasaki T. ERK: A Double-Edged Sword in Cancer. ERK-Dependent Apoptosis as a Potential Therapeutic Strategy for Cancer. *Cells* 2021; 10(10). doi: 10.3390/cells10102509.
345. Lee M, Young Kim S, Kim J, Kim H-S, Kim S-M, Kim EJ. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibition and sustained extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in camptothecin-induced human colon cancer cell death. *Cancer Biology & Therapy* 2013; 14(11):1007–15. doi: 10.4161/cbt.26044.
346. Balmanno K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 2009; 16(3):368–77. doi: 10.1038/cdd.2008.148.
347. Januchowski R, Sterzyńska K, Zaorska K, Sosińska P, Klejewski A, Brązert M et al. Analysis of MDR genes expression and cross-resistance in eight drug resistant ovarian cancer cell lines. *J Ovarian Res* 2016; 9(1):65. doi: 10.1186/s13048-016-0278-z.
348. Wagner JM, Karnitz LM. Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival. *Mol Pharmacol* 2009; 76(1):208–14. doi: 10.1124/mol.109.055178.
349. Jo U, Murai Y, Chakka S, Chen L, Cheng K, Murai J et al. SLFN11 promotes CDT1 degradation by CUL4 in response to replicative DNA damage, while its absence leads to synthetic lethality with ATR/CHK1 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; 118(6):e2015654118. doi: 10.1073/pnas.2015654118.
350. Li M, Kao E, Malone D, Gao X, Wang JYJ, David M. DNA damage-induced cell death relies on SLFN11-dependent cleavage of distinct type II tRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2018; 25(11):1047–58. doi: 10.1038/s41594-018-0142-5.
351. Gupta VG, Hirst J, Petersen S, Roby KF, Kusch M, Zhou H et al. Entinostat, a selective HDAC1/2 inhibitor, potentiates the effects of olaparib in

- homologous recombination proficient ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2021; 162(1):163–72. doi: 10.1016/j.ygyno.2021.04.015.
352. Barnieh FM, Loadman PM, Falconer RA. Progress towards a clinically-successful ATR inhibitor for cancer therapy. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery* 2021; 2:100017. doi: 10.1016/j.crphar.2021.100017.
353. Sloombeek PHJ, Kloots ISH, van Oort IM, Kroeze LI, Schalken JA, Bloemendal HJ et al. Cross-Resistance between Platinum-Based Chemotherapy and PARP Inhibitors in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers* 2023; 15(10). doi: 10.3390/cancers15102814.
354. Jiang X, Li X, Li W, Bai H, Zhang Z. PARP inhibitors in ovarian cancer: Sensitivity prediction and resistance mechanisms. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2019; 23(4):2303–13. doi: 10.1111/jcmm.14133.
355. Antolin AA, Ameratunga M, Banerji U, Clarke PA, Workman P, Al-Lazikani B. The kinase polypharmacology landscape of clinical PARP inhibitors. *Sci Rep* 2020; 10(1):2585. doi: 10.1038/s41598-020-59074-4.
356. Thomas A, Murai J, Pommier Y. The evolving landscape of predictive biomarkers of response to PARP inhibitors. *J Clin Invest* 2018; 128(5):1727–30. doi: 10.1172/JCI120388.
357. Wahlberg E, Karlberg T, Kouznetsova E, Markova N, Macchiarulo A, Thorsell A-G et al. Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors. *Nat Biotechnol* 2012; 30(3):283–8. doi: 10.1038/nbt.2121.
358. Choi M, Kipps T, Kurzrock R. ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* 2016; 15(8):1781–91. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0945.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Häufigkeit der einzelnen Stadien des epithelialen Ovarialkarzinoms bei Diagnosestellung zwischen 2007 und 2013 (A), Definition der einzelnen Stadien [35] sowie das 5-Jahresüberleben (B). Zahlenwerte aus: [4]. Erstellt mit BioRender.com.....	5
Abbildung 2: Aktivierung von Cisplatin nach Eintritt in die Zelle und Adduktbildung an der DNA, modifiziert nach [69, 70]. Erstellt mit BioRender.com.....	9
Abbildung 3: Übersicht der Zellzykluskontrolle durch die Sensorinasen ATM und ATR sowie Slfn11 in Folge von DNA-Schäden und replikativem Stress. Modifiziert nach [134]. Erstellt mit BioRender.com.....	14
Abbildung 4: Strukturformeln der verwendeten Goldverbindungen und ihr postulierter Wirkmechanismus.....	21
Abbildung 5: Übersicht der Strukturformeln der zugelassen sowie des PARP1-selektiven Inhibitors. In Rot eingezeichnet ist der Benzamid-Teil jedes Moleküls, der sich vom natürlichen Substrat der PARP-Enzyme, dem Nikotinamid des NAD ⁺ , ableitet. Modifiziert nach [241].....	23
Abbildung 6: Vereinfachte Übersicht der zellulären Reaktion auf die Cisplatin- und PARPi-induzierten DNA-Schäden sowie die Angriffspunkte der verwendeten, selektiven DDR-Inhibitoren. Erstellt mit BioRender.com.....	27
Abbildung 7: Überblick der Konsequenz einer epigenetisch unterdrückten Slfn11-Expression als Resistenzmechanismus gegen Cisplatin sowie der Einsatz von Inhibitoren gegen DNMTs (Decitabin), EZH2 (Tazemetostat) und HDACs (Entinostat) zur Reversion des Slfn11-negativen Phänotyps. Erstellt mit BioRender.com.	29
Abbildung 8: Belegung einer Platte des MTT-Assays am Beispiel von W1- und W1CR-Zellen unter Cisplatinbehandlung. Erstellt mit BioRender.com.....	53
Abbildung 9: Detektionsprinzip des Western Blots	61
Abbildung 10: Gating-Strategie sowie resultierende Dotplots des Zellzyklus-Assays. Zunächst wurde die Hauptpopulation (A) und anschließend die einzelnen Zellen (B) durch entsprechende Gates herausortiert. Die Auftragung gegen den gelben Kanal erbrachte dann die Einteilung in die Phasen des Zellzyklus (C), die mittels Watson Pragmatic-Modell quantifiziert wurden (D).....	64
Abbildung 11: Gating-Strategie des Annexin V-PI-Assays. Zunächst wurde ein Gate für die Hauptpopulation gesetzt und der Zellschrott (unten links) exkludiert (A). Anschließend erfolgte die Erfassung einzelner Zellen (B). Schließlich wurden beide Farbstoffe gegeneinander aufgetragen und die Zellen durch das Anlegen der Quadranten in die entsprechenden Populationen geteilt (C).....	66

- Abbildung 12: Temperaturprogramm und Detektionsprinzip der qPCR. Erstellt mit BioRender.com 68
- Abbildung 13: Zellviabilität unter dem Einfluss der Goldverbindungen und Cisplatin. Gezeigt sind exemplarische Dosis-Wirkungskurven einer Messung unter Behandlung mit Auranofin (A und B), UB-1 (C und D) sowie MC3 (E und F) jeweils im Vergleich zu Cisplatin in den Zellpaaren A2780/A2780cis und W1/W1CR. In den Tabellen unter den Kurven sind die gemittelten IC₅₀-Werte ± SD (n = 4) aufgelistet [339]. 72
- Abbildung 14: Gemittelte IC₅₀-Werte ± SD von Cisplatin als alleinige Behandlung oder in Kombination mit den Goldverbindungen in subtoxischen Mengen in A2780/A2780cis-Zellen (A) und W1/W1CR-Zellen (B). Als Vorbehandlung wurden Auranofin mit [0,1 µM], UB-1 mit [1 µM] und MC3 mit [0,01 µM] eingesetzt (n = 4). Als Test auf statistische Signifikanz wurde für jede Zelllinie eine One-Way ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's Test durchgeführt, die Kontrolle ist dabei die Solobehandlung mit Cisplatin; ***: p < 0,001. In der Tabelle unter den Histogrammen sind die ermittelten CI-Werte aufgelistet. Es gilt, dass CI < 1 = Synergismus, CI = 1 = additiver Effekt und CI > 1 = Antagonismus [321, 339]. 73
- Abbildung 15: Intrazellulärer Goldgehalt nach einer Behandlung über 72 h mit 0,1 µM Auranofin (A) oder 0,01 µM MC3 (B) in A2780/A2780cis- und W1/W1CR-Zellen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte ± SD eines n = 3. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte mittels t-Test und wegen der stark abweichenden SD mit nachfolgender Korrektur nach Welch. *: p < 0,05; **: p < 0,01 [339]. 74
- Abbildung 16: Intrazellulärer ROS-Gehalt als Verhältnis nach 24 h und nach 4 h Behandlung. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test für jede Zelllinie mit der unbehandelten Probe als Kontrolle. *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001 [339]. 76
- Abbildung 17: Relative Expression von Nrf2 in unbehandelten W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen (A) sowie unter Behandlung mit MC3 [0,01 µM], Auranofin [0,1 µM] und cDDP [1 µM] in W1/W1CR-Zellen (B) und A2780/A2780cis-Zellen (C). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats (n = 3), dessen relative Expressionen in den Histogrammen unter den Bildern dargestellt sind. Die Werte der Proteinexpression wurden auf die unbehandelte Wildtypzelle (A) oder auf die jeweilige unbehandelte Zelle (B und C) normalisiert. Als Test auf statistische Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test (A) oder eine One-Way ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's Test (B und C) durchgeführt. **: p < 0,01 [339]. 77

Abbildung 18: Relative Expression von Trx in unbehandelten W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen (A) sowie unter Behandlung mit MC3 [0,01 μ M], Auranofin [0,1 μ M] und cDDP [1 μ M] in W1/W1CR-Zellen (B) und A2780/A2780cis-Zellen (C). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats (n = 3), dessen relative Expressionen in den Histogrammen unter den Bildern dargestellt sind. Die Werte der Proteinexpression wurden auf die unbehandelte Wildtypzelle (A) oder auf die jeweilige unbehandelte Zelle (B und C) normalisiert. Als Test auf statistische Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test (A) oder eine One-Way ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's Test (B und C) durchgeführt. *: p < 0,05; **: p < 0,01 [339].	78
Abbildung 19: Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus unter den angegebenen Behandlungen. Statistische Signifikanz wurde mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test ermittelt. *: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001 [339].	80
Abbildung 20: IC ₅₀ -Werte der Behandlung von A2780/A2780cis-Zellen mit Auranofin (A) oder MC3 (B) als Monobehandlung oder in Kombination mit den angezeigten Inhibitoren. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD eines n = 4 dargestellt. Als Test auf statistische Signifikanz wurde eine One-Way ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's Test durchgeführt [339].	81
Abbildung 21: Expressionen von ERK 1/2 und pERK 1/2 in A2780/A2780cis-Zellen sowie unter Behandlung mit MC3 [0,01 μ M], Auranofin [0,1 μ M] und cDDP [1 μ M] (A). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats (n = 3) und das Verhältnis der relativen Expressionen von pERK 1/2 und ERK 1/2. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test. Außerdem ist die Kombinationsbehandlung von SCH772984 mit den Goldverbindungen (B) und Cisplatin (C) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 [339].	82
Abbildung 22: Übersicht der Signalwege, welche für die Erforschung der Wirkweise von Goldverbindungen untersucht wurden [339].	84
Abbildung 23: Exemplarische Dosis-Wirkungskurve der Behandlung von W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen mit Elimusertib sowie die ausgewählte Konzentration für eine Kombinationsbehandlung (schwarzes Rechteck). In der Tabelle daneben sind die gemittelten IC ₅₀ -Werte \pm SD des biologischen Triplikats gelistet (A). Gemittelte IC ₅₀ -Werte \pm SD der Kombinationsbehandlung von Cisplatin mit Elimusertib (eli) eines n = 5 (B). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.	86

- Abbildung 24: Darstellung des Apoptose-Assays in Form von repräsentativen Dotplots unter den angegebenen Behandlungen. Die in Rot eingezeichneten Zellen sind entweder früh- (Q3) oder spät-apoptotisch (Q2) (A). Gemittelte Werte \pm SD des Anteils apoptotischer Zellen des biologischen Triplikats ($n = 3$) (B). Als Test auf statistische Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 87
- Abbildung 25: Expressionen von ATR und pATR in W1/W1CR- (A) und A2780/A2780cis-Zellen (B) unter den angegebenen Behandlungen: cDDP [1 μ M] und eli [10 nM]. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats ($n = 3$) und das Verhältnis der relativen Expressionen von pATR und ATR. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey Test..... 88
- Abbildung 26: Exemplarische Western Blots von ATR in W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen unter Behandlung mit Kontroll-siRNA (ctr) oder ATR *knockdown*-siRNA (siATR). Über den Bildern ist die relative Expression von ATR unter den jeweiligen Bedingungen angegeben. Die Histogramme repräsentieren die Mittelwerte \pm SD der IC_{50} -Werte von Cisplatin unter der Behandlung mit Kontroll-siRNA (scr) oder ATR *knockdown*-siRNA (kd). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test. *: $p < 0,05$ 89
- Abbildung 27: Exemplarischer Western Blot der Expression von ATR in den gekennzeichneten Zelllinien. Zudem ist der Mittelwert \pm SD der relativen Expression eines biologischen Triplikats ($n = 3$) auf W1-Zellen normalisiert dargestellt. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels ungepaartem t-Test zwischen den jeweiligen Zellpaaren. *: $p < 0,05$ 90
- Abbildung 28: Exemplarische Dosis-Wirkungskurve der Behandlung des Kuramochi-Zellpaares und der EFO21-Zellen mit Elimusertib sowie die 10 nM der Kombinationsbehandlung als schwarzes Rechteck eingezeichnet. In der Tabelle daneben sind die gemittelten IC_{50} -Werte \pm SD des biologischen Triplikats gelistet (A). Gemittelte IC_{50} -Werte \pm SD der Kombinationsbehandlung von Cisplatin mit Elimusertib (eli) eines $n = 4$ (B). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$ 91
- Abbildung 29: Heatmap der mittels SynergyFinder Plus kalkulierten CI-Werte für die Behandlungen mit Elimusertib und Cisplatin in den angegebenen Konzentrationen in den sieben untersuchten Zelllinien. 91
- Abbildung 30: Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus unter den angegebenen Behandlungen (A). Cisplatin wurde mit [1 μ M] und Elimusertib mit [10 nM] eingesetzt. Statistische Signifikanz wurde mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test ermittelt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Übersicht des untersuchten

	Signalwegs, der durch die platinbasierten DNA-Schäden eingeleitet wird, mit den Angriffspunkten der nachfolgend eingesetzten Inhibitoren. Erstellt mit BioRender.com (B).	93
Abbildung 31:	Expressionen von CHK1 und pCHK1 in W1/W1CR- (A) und A2780/A2780cis-Zellen (B) unter den angegebenen Behandlungen: cDDP [1 μ M] und eli [10 nM]. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats (n = 3) und das Verhältnis der relativen Expressionen von pCHK1 und CHK1. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01.	94
Abbildung 32:	Mittelwerte \pm SD der relativen Viabilität der angegebenen Zelllinien unter der Behandlung mit SCH900776 [0,1 μ M] und [1 μ M] sowie Adavosertib [10 nM] und [100 nM] in Prozent, jeweils bezogen auf eine PBS-behandelte Negativkontrolle.....	95
Abbildung 33:	Gemittelte IC ₅₀ -Werte \pm SD der Kombinationsbehandlung von Cisplatin mit SCH900776 (CHK1i) (A) und Adavosertib (WEE1i) (B) in W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen (n = 3) sowie in Kuramochi/Kuramochi ^r cDDP ²⁰⁰⁰ - und EFO21-Zellen (n = 4) (C). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Dunnett's Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001.....	96
Abbildung 34:	Expressionen von BRCA1 und pBRCA1 in W1/W1CR- (A) und A2780/A2780cis-Zellen (B) unter den angegebenen Behandlungen: cDDP [1 μ M] und eli [10 nM]. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot des biologischen Triplikats (n = 3) und das Verhältnis der relativen Expressionen von pBRCA1 und BRCA1. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01.	98
Abbildung 35:	Expression von Rad51 in W1/W1CR- (A) und A2780/A2780cis-Zellen (B) unter den angegebenen Behandlungen: cDDP [1 μ M] und eli [10 nM]. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot eines biologischen Quartetts (n = 4) und die auf die jeweilige unbehandelte Wildtypzelle normalisierten Rad51-Expressionen. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01.	99
Abbildung 36:	Gemittelte IC ₅₀ -Werte \pm SD der Behandlung mit Cisplatin in den angezeigten Zelllinien (n = 6) (A). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. ****: p < 0,0001. In (B) ist ein exemplarischer Western Blot des biologischen Triplikats der Slfn11-Expression in den angezeigten Zelllinien dargestellt.....	100
Abbildung 37:	Mittelwerte \pm SD der relativen mRNA-Expression von Slfn11 im W1-Zellpaar unter Behandlung mit Decitabin (Dec), Tazemetostat (Taz) oder Entinostat (Ent), normalisiert auf unbehandelte W1-Zellen (A). Repräsentative Western Blots	

	eines biologischen Triplikats der zuvor genannten Behandlungen im W1-Zellpaar (B). Mittelwerte \pm SD der IC ₅₀ -Werte von cDDP unter Vorbehandlung mit den genannten Substanzen (C). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01.....	101
Abbildung 38:	Mittelwerte \pm SD der relativen mRNA-Expression von Slfn11 im A2780-Zellpaar unter Behandlung mit Entinostat (Ent), normalisiert auf mit [0,1 μ M] behandelte A2780-Zellen (A). Repräsentativer Western Blot eines biologischen Triplikats der zuvor angezeigten Behandlungen, verglichen mit unbehandelten W1-Zellen (B). Mittelwerte \pm SD der IC ₅₀ -Werte von cDDP unter Vorbehandlung mit den angezeigten Substanzen (C). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: p < 0,05.....	102
Abbildung 39:	Mittelwerte \pm SD der IC ₅₀ -Werte (n = 4) von Niraparib (A) und Cisplatin nach einer Vorbehandlung mit Niraparib (B) in W1- und W1CR-Zellen. Zudem sind exemplarische Dosis-Wirkungskurven des Ansprechens auf Cisplatin, Niraparib oder beiden zusammen in W1- und W1CR-Zellen dargestellt (C). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001....	104
Abbildung 40:	Mittelwerte \pm SD der IC ₅₀ -Werte (n = 4) von Niraparib, Olaparib und Rucaparib in den angezeigten Zelllinien (A). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001.	105
Abbildung 41:	Exemplarischer Western Blot der Expression von PARP1 in den gekennzeichneten Zelllinien. Zudem ist der Mittelwert \pm SD der relativen Expression eines biologischen Triplikats (n = 3) auf W1-Zellen normalisiert dargestellt (A). Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: p < 0,05. Exemplarische Dosis-Wirkungskurve eines n = 3 der Behandlung von W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen mit NMS-P118 (B).....	107
Abbildung 42:	Mittelwerte \pm SD der IC ₅₀ -Werte der drei PARPi als Solobehandlung oder unter Vorbehandlung mit Entinostat [0,1 μ M] (n = 3) in W1-, W1CR-, A2780- und A2780cis-Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem t-Test. *: p < 0,05; **: p < 0,01.	109
Abbildung 43:	Gemittelte IC ₅₀ -Werte \pm SD der Viabilitätsassays von Niraparib und der Kombination mit Elimusertib (eli) eines n = 3 (A). Gemittelte Werte \pm SD des Anteils apoptotischer Zellen des Annexin V/PI-Assays eines biologischen Triplikats (n = 3) (B). Darstellung des Apoptose-Assays in Form von repräsentativen Dotplots. Die in Rot eingezeichneten Zellen sind entweder früh- (Q3) oder spät-apoptotisch (Q2) (C). Als Test auf statistische Signifikanz in (A) und (B) wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. *: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.....	111

Abbildung 44: Übersicht des errechneten \log_2 -Verhältnisses aus den IC_{50} -Werten von Solo- und Kombinationsbehandlungen der angezeigten PARPi mit dem ATRi Elimusertib [10 nM], dem CHK1i SCH900776 [100 nM] oder dem WEE1i Adavosertib [10 nM] als Heatmap. Die Werte wurden mindestens aus biologischen Triplikaten ($n = 3$) erfasst.....	112
Abbildung 45: Gemittelte IC_{50} -Werte \pm SD der Viabilitätsassays der Behandlungen mit Niraparib (A), Olaparib (B) oder Rucaparib (C) alleine oder mit AZD1390 (ATMi) [1 μ M] ($n = 3$). Als Test auf statistische Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$	115
Abbildung 46: Gemittelte IC_{50} -Werte \pm SD der Viabilitätsassays der Behandlungen mit Cisplatin (A), alleine oder mit AZD1390 (ATMi) [1 μ M] ($n = 3$). Als Test auf statistische Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. (B) zeigt eine Übersicht des errechneten \log_2 -Verhältnisses aus den IC_{50} -Werten von Solo- und Kombinationsbehandlungen der angezeigten PARPi und Cisplatin mit dem ATMi AZD1390 [1 μ M] als Heatmap. Die Werte zur Berechnung entstammen den zuvor gezeigten Histogrammen.	117
Abbildung 47: Exemplarische Diagramme der Zellzyklusmessungen von unbehandelten, mit Niraparib [1 μ M], mit AZD1390 (ATMi) [1 μ M] oder mit deren Kombination behandelten W1/W1CR- und A2780/A2780cis-Zellen eines biologischen Dublikats ($n = 2$).	119
Abbildung 48: Exemplarische Western Blots von pHSP27 in allen untersuchten Zelllinien (A), von HSF1 und HSP70 in unbehandelten W1- und W1CR-Zellen sowie die resultierende, relative Expression (B). Exemplarische Western Blots von HSP27 und pHSP27 in unbehandelten W1- und W1CR-Zellen oder unter Vorbehandlung mit AZD1390 (ATMi) [10 μ M] sowie die resultierende, relative Expression (C) eines biologischen Duplikats ($n = 2$).....	121
Abbildung 49: Übersicht der Wirkmechanismen der drei verwendeten PARPi sowie der untersuchten Ansätze zur Resistenzüberwindung.....	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Kits	32
Tabelle 2:	Verwendete Inhibitoren und Zytostatika	34
Tabelle 3:	Hergestellte Lösungen der Inhibitoren und Zytostatika.....	35
Tabelle 4:	Sonstige hergestellte Lösungen, Puffer und Medien	37
Tabelle 5:	Verwendete primäre Antikörper	39
Tabelle 6:	Hergestellte Lösungen der primären Antikörper nach Hersteller sortiert	40
Tabelle 7:	Verwendete sekundäre Antikörper	40
Tabelle 8:	Hergestellte Lösungen der sekundären Antikörper nach Hersteller.....	41
Tabelle 9:	Verwendete Primer; angegebene Sequenzen beziehen sich auf den Forward- (F) und Reversed-Primer (R).....	41
Tabelle 10:	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	41
Tabelle 11:	Verwendete Geräte.....	44
Tabelle 12:	Verwendete Software.....	47
Tabelle 13:	Verwendete Verbindungen, ihr zelluläres Ziel und ihre eingesetzte Konzentration für die subtoxische Vorbehandlung.....	54
Tabelle 14:	Verwendete epigenetisch wirksame Verbindungen, ihr zelluläres Ziel und ihre eingesetzte Konzentration für die Vorbehandlung in der Kulturflasche und Platte.....	55
Tabelle 15:	Eingesetzte Verbindungen, deren zelluläres Target und die verwendete Konzentration für die Generierung von Zelllysaten	57
Tabelle 16:	Verwendete Substanzen für die Zellzyklusanalyse, deren zelluläres Target und die eingesetzten Konzentrationen	63