



Neue Ansätze zur Überwindung oder Verhinderung der Cisplatinresistenz in verschiedenen Krebszelllinien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Laura Engelke
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Mai 2015

aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Professor Dr. Matthias U. Kassack

Korreferent: Professor Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	6
2	Zusammenfassung.....	8
3	Einleitung.....	10
3.1	Entwicklung	10
3.2	Krebserkrankungen	12
3.2.1	Ovarialkarzinom	12
3.2.2	Mammakarzinom	14
3.2.3	Ösophaguskarzinom	16
3.2.4	Orales Plattenepithelkarzinom.....	17
3.2.5	Kolonkarzinom.....	18
3.2.6	Leukämiezellen	18
3.2.7	Native Zelllinie	19
3.3	Cisplatinresistenz.....	19
3.3.1	Mechanismus und Resistenzentwicklung.....	19
3.3.2	Die Rolle der Glykolyse in der Cisplatinresistenz.....	24
3.3.3	EGF Rezeptorfamilie als Ursache für Resistenz	28
3.4	Naturstoffe	33
3.4.1	Naturstoffe als Therapieansatz	33
3.4.2	Ellagsäure	34
3.4.3	Resveratrol	38
3.4.4	Phomoxanthon A.....	40
3.4.5	Embellicin A und Embellicin B	41
4	Zielsetzung der Arbeit.....	43
4.1	Untersuchung der Cisplatinresistenz.....	43
4.1.1	Inhibition der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin in der Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780 durch den Einsatz der Naturstoffe Ellagsäure und Resveratrol.....	43
4.1.2	Überwindung der Cisplatinresistenz in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231CisR durch Verringerung der Expression des glykolytischen Enzyms PGK1	44
4.1.3	Apoptoseauslösung in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780CisR mit dem Tetrahydroxanthenon-Dimer Phomoxanthon A und den Alkaloiden Embellicin A und Embellicin B	
	44	
5	Material und Methoden	45

5.1	Materialien	45
5.1.1	Reagenzien, Chemikalien und Medien	45
5.1.2	Kits	48
5.1.3	Antikörper.....	49
5.1.4	Verbrauchsmaterialien	50
5.1.5	Primer	52
5.1.6	Plasmide	52
5.1.7	Geräte.....	54
5.1.8	Programme und Software	56
5.2	Puffer und Lösungen.....	57
5.2.1	Zellkultur.....	57
5.2.2	Bakterienkultur.....	58
5.2.3	Protein Präparation	59
5.2.4	BCA Protein Assay.....	60
5.2.5	Elektrophoresen	60
5.2.6	Western Blot.....	62
5.2.7	Lösungen zur Isolierung von RNA.....	63
5.2.8	PCR.....	63
5.2.9	MTT Assay.....	64
5.2.10	ROS Assay	65
5.2.11	Annexin V Assay.....	65
5.2.12	Apoptose Assay	66
5.2.13	Zellzyklusanalyse	66
5.2.14	ATP Bestimmung	67
5.2.15	Calcium Assay	68
5.2.16	Bestimmung der Caspaseaktivität.....	70
5.2.17	Zelllinien	70
5.3	Methoden.....	72
5.3.1	Transformation und Vermehrung von Vektoren in <i>E. Coli</i>	72
5.3.2	Aufreinigung der Vektoren.....	73
5.3.3	Zellkultivierung	74
5.3.4	Passagieren und Ernten.....	74
5.3.5	Zellzählung.....	75
5.3.6	Generierung neuer Zelllinien.....	75
5.3.7	Transfektion der Vektoren in die Krebszelle	76

5.3.8	MTT Assay.....	77
5.3.9	Isolierung von RNA	78
5.3.10	Reverse Transkription (RT)-PCR und quantitative PCR (qPCR).....	79
5.3.11	Isolierung von Proteinen	82
5.3.12	BCA Protein Assay.....	83
5.3.13	SDS-PAGE.....	84
5.3.14	Western Blot.....	85
5.3.15	Cisplatinbehandlung zur Generierung der resistenten Subzelllinien	87
5.3.16	Verdopplungszeit.....	88
5.3.17	Detektion apoptotischer Zellen.....	89
5.3.18	Zellzyklusanalyse	93
5.3.19	Reaktive Oxidative Spezies	96
5.3.20	Migration	98
5.3.21	Intrazellulärer ATP-Gehalt.....	99
5.3.22	Bestimmung von intrazellulären Calcium-Ionen	100
5.3.23	Bestimmung der Aktivität von Caspase 8 und Caspase 9.....	101
5.3.24	Statistik.....	103
6	Ergebnisse.....	104
6.1	Die Wirkung von Ellagsäure und Resveratrol auf die Cisplatinresistenz in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780CisR	104
6.2	Überwindung der Cisplatinresistenz durch molekular-biologische Inhibition von PGK1.....	130
6.3	Wirkung von Phomoxanthon A in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780CisR....	146
6.4	Der Wirkmechanismus von Embellicin A und Embellicin B	163
7	Diskussion	181
7.1	Inhibition der Resistenzentwicklung von Cisplatin durch Ellagsäure und Resveratrol.....	181
7.2	Überwindung der Cisplatinresistenz durch Inhibition der Glykolyse	185
7.3	Induktion von Apoptose an cisplatin sensitiven und –resistenten Zellpaaren durch Phomoxanthon A, Embellicin A und Embellicin B	188
	Literaturverzeichnis.....	195
	Abkürzungen	218
	Danksagung	222
	Erklärung	225

1 Abstract

Standard cytostatic drugs, like cisplatin, still play an important role for the treatment of cancer disease. Though, primary and secondary chemoresistance can cause a failure of therapy. This work investigated three strategies to overcome or prevent cisplatin resistance in several cancer cell lines.

In the first part of this work, the natural drugs ellagic acid and resveratrol were tested for their cytotoxic features on the cisplatin-sensitive A2780 and cisplatin-resistant A2780CisR ovarian cancer cell lines. Ellagic acid and resveratrol induced G₁ arrest and initiated apoptosis. Both natural drugs enhanced the sensitivity of A2780 cells for cisplatin, but not the sensitivity of A2780CisR cells. Permanent presence of ellagic acid or resveratrol in A2780 prevented the development of chemoresistance during intermittent cisplatin treatment over 26 weeks. So, the generated cell lines A2780Ellag and A2780Resv were as sensitive as the parental A2780 cells. Hence, a sensitive phenotype remains. A similar permanent treatment of A2780CisR with resveratrol or ellagic acid had no effect on the status of resistance. Immunoblot analysis yielded a reduced phosphorylation of ErbB3 through ellagic acid or resveratrol treatment. Furthermore, cell migration was reduced.

In the second part of this work, phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) was used as a target to overcome cisplatin resistance. Based on the mRNA and protein analysis, PGK1 was differently expressed in the triple-negative breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-231CisR. Especially in triple-negative breast cancer expressing low levels of estrogen, progesterone and ErbB2 receptor, alternative therapeutic targets are important. Reduction of PGK1 expression was reached by transient transfection of shRNA and caused an enhanced sensitivity of the cells for cisplatin. For comparison, the hexokinase inhibitor 3-bromopyruvate was used. 3-bromopyruvate increased the sensitivity for cisplatin as the shRNA knock-down of PGK1 did.

In the third part of this work, the toxic features of secondary metabolites from endophytic fungi were investigated, including the tetrahydroxanthone dimer phomoxanthone A as well as the alkaloids embellicine A and embellicine B. The cytotoxicity of these compounds was determined at ovarian, mamma, colon, esophagus and tongue cancer cell lines as well as a chronic myelogenous leukemia cell line. In A2780 and A2780CisR, the compounds induced G₁

arrest and initiated the extrinsic and intrinsic apoptosis pathway which was determined through the activation of caspase 8 and caspase 9. Furthermore, phomoxanthone A was shown to induce the activation of pro-apoptotic factors and the inhibition of anti-apoptotic factors.

In summary, this work presents three new strategies which may result in therapeutic approaches for overcoming cisplatin resistance: the inhibition of the development of cisplatin resistance through ellagic acid or resveratrol; the use of secondary metabolites from endophytes as new potent cytostatic drugs; PGK1 as a new therapeutic target in triple-negative breast cancer.

2 Zusammenfassung

Bei der Behandlung von Krebserkrankungen spielen klassische Zytostatika wie Cisplatin nach wie vor eine wichtige Rolle. Primäre und sekundäre Chemoresistenz kann dabei zum Therapieversagen führen. Diese Arbeit untersuchte drei Strategien zur Überwindung oder Verhinderung der Cisplatinresistenz in verschiedenen Krebszelllinien.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Naturstoffe Ellagsäure und Resveratrol auf ihre zytotoxischen Eigenschaften an cisplatinempfindlichen A2780 und cisplatinresistenten A2780CisR Ovarialkarzinom-Zellen untersucht. Ellagsäure und Resveratrol induzierten G₁-Arrest und leiteten Apoptose ein. Beide Naturstoffe erhöhten die Sensitivität von A2780 Zellen gegenüber Cisplatin, jedoch nicht die Sensitivität der A2780CisR Zellen. Permanente Behandlung von A2780 Zellen mit Ellagsäure oder Resveratrol verhinderte die Entwicklung der Chemoresistenz während einer intermittierenden Cisplatinbehandlung über 26 Wochen. Die so resultierenden Zelllinien A2780Ellag und A2780Resv besaßen die gleiche Sensitivität für Cisplatin wie die ursprünglichen A2780 Zellen. Somit bleibt ein sensibler Phänotyp erhalten. Eine ähnliche Dauerbehandlung von A2780CisR mit Resveratrol oder Ellagsäure führte zu keiner Veränderung des Resistenzstatus. Immunoblot Analysen ergaben eine reduzierte Phosphorylierung von ErbB3 durch Ellagsäure- oder Resveratrol-Behandlung. Ferner wurde die Zellmigration reduziert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde Phosphoglycerat Kinase 1 (PGK1) als Ansatzpunkt zur Überwindung der Cisplatinresistenz gewählt. Auf mRNA- und Protein-Ebene ergab sich eine differentielle Expression von PGK1 zwischen den triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR. Speziell in triple-negativen Mammakarzinomen, die nur eine geringe Expression von Estrogen-, Progesteron- und ErbB2-Rezeptor aufweisen, sind alternative therapeutische Targets wichtig. Die Reduktion der PGK1-Expression erfolgte durch transiente Transfektion von shRNA und bewirkte eine Sensitivierung der Zellen für Cisplatin. Zum Vergleich wurde der Hexokinase-Inhibitor 3-Brompyruvat verwendet. 3-Brompyruvat erhöhte ebenso wie der Knock-down von PGK1 die Sensitivität der Zellen für Cisplatin.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die zytotoxischen Eigenschaften von Sekundärmetaboliten endophytischer Fungi untersucht. Dazu gehörten das Tetrahydroxanthanon-Dimer

Phomoxanthon A sowie die Alkaloide Embellicin A und Embellicin B. Die Zytotoxizität der Substanzen wurde an Ovarial-, Mamma-, Kolon-, Ösophagus- und Zungenkarzinom-Zelllinien sowie einer chronisch myeloischen Leukämie-Zelllinie bestimmt. An A2780 und A2780CisR Zellen führten die Substanzen zum G₁-Arrest und induzierten den extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweg, wie durch die Aktivierung von Caspase 8 und Caspase 9 ermittelt wurde. Für Phomoxanthon A konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Substanz die Aktivierung pro-apoptotischer Faktoren und die Inhibition anti-apoptotischer Faktoren induziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Strategien verfolgt, welche neue Therapieansätze für die klinisch bedeutsame Cisplatinresistenz beinhalten können: die Inhibition der Entstehung von Cisplatinresistenz durch Ellagsäure oder Resveratrol; der Einsatz von Sekundärmetaboliten aus Endophyten als neue potentielle Zytostatika; PGK1 als neues therapeutisches Target bei Triple-negativen Mammakarzinomen.

3 Einleitung

3.1 Entwicklung

2013 wurden 1 660 290 neue Fälle von Krebserkrankungen allein in den USA erfasst. Im gleichen Jahr sind 580 350 Patienten aufgrund ihrer Krankheit verstorben [1]. Die Schätzungen für das Jahr 2014 erhöhten sich um 0,3% für neue Erkrankungen und um 0,9% für die Sterberate [2]. Neben dem Ziel, die Lebenserwartung des Patienten zu verlängern, steht auch der Aspekt für eine verbesserte Lebensqualität des Patienten ohne Nebenwirkungen im Fokus. Daher ist die Forschung für neue, bessere Medikamente essentiell, um die vielen verschiedenen Krebserkrankungen behandeln zu können, ohne dass der Patient an gravierenden Nebenwirkungen zu leiden hat [3].

Krebszellen werden hinsichtlich ihrer Sensitivität für Zytostatika in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe beschreibt Krebszellen, die sensitiv auf die Chemotherapie ansprechen. Der Patient erhält in mehreren Zyklen Zytostatika, wodurch die malignen Zellen absterben. Allerdings besteht das Risiko für einen Rückfall der Krankheit. Die zweite Gruppe entsteht im Verlauf der Chemotherapie. Während der Behandlung können die initial sensitiven Krebszellen eine Resistenz gegen die eingesetzten Zytostatika entwickeln, sodass ein Teil der Zellen die Chemotherapie überlebt. Zunächst wird die Zellproliferation gehemmt, jedoch nimmt die Zellpopulation durch die Ausbildung der Resistenz wieder zu. Eine alternative Behandlung ist nötig. Die letzte Gruppe charakterisiert Krebszellen, die eine natürliche Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aufweisen. Diese Resistenz entwickelt sich nicht während der Behandlungszyklen, sondern besteht von Anfang an. Dabei können Mischformen von sensitiven Zellen (beispielsweise epitheliale Zellen) und resistenten Krebsstammzellen vorliegen. Dies hat zur Folge, dass zunächst die sensitiven Zellen während der Therapie sterben, jedoch die resistenten Krebsstammzellen überleben. Nach einiger Zeit wächst der maligne Tumor, bestehend aus resistenten Zellen, wieder, welcher metastasieren kann. Der Patient erliegt letztendlich seiner Krankheit. In diesen Fällen wird sowohl nach Alternativen zu den Standard-Chemotherapeutika als auch nach Biomarkern gesucht, die eine solche Resistenz vorhersagen können. Prominente Targets, die die Resistenz in den Krebszellen verursachen, bieten zusätzliche Therapiemöglichkeiten, indem überexprimierte bzw. hyperaktivierte Proteine inhibiert werden [4] [5] [6].

Die Resistenz der Krebszellen kann durch mehrere Faktoren verursacht werden. Die Überexpression eines MDR-ABC-Transporters (multidrug resistance ATP-binding cassette), wie das humane P-Glykoprotein, fördert den aktiven Transport des Zytostatikums aus der Zelle [7]. Somit kann das Chemotherapeutikum seinen Bestimmungsort nicht erreichen und seine Wirkung nicht entfalten. Die Resistenz, beispielsweise in Ovarial- und Mammakarzinomen, kann ebenfalls durch Überexpression von wachstumsfördernden Rezeptoren, wie dem Progesteron Rezeptor (PR) und dem Human epidermal growth factor receptor-2 (ErbB2/HER-2), auftreten [8] [9]. Die Proliferationsrate ist in diesem Fall stark erhöht, was die Chemo- und Strahlentherapie erschwert. Daher wird meist die Kombination eines „klassischen“ Zytostatikums (beispielsweise platin- oder anthrazyklenbasiert) mit einem Inhibitor eingesetzt, der spezifisch endokrine Rezeptoren oder den ErbB2-Rezeptor blockiert. Platinbasierte Zytostatika werden ebenfalls mit Taxanen kombiniert, welche den Abbau der Mikrotubuli inhibieren und die Mitose der Zelle verhindert. Dieser Therapieansatz ist in der Behandlung von Lungenkrebs, insbesondere von NSCLC (non-small cell lung cancer) bei älteren Patienten erfolgreich [10]. Tumorsuppressor-Proteine, wie das p53, unterdrücken als Wildtyp das Wachstum von Zellen und induzieren nach Aktivierung Apoptose. In manchen Krebszellen sind diese Proteine mutiert. Diese Mutationen beeinträchtigen die Funktionalität oder führen zum Verlust der Funktion. Eine Umkehr der Funktionsweise ist ebenfalls möglich. Anstatt das Zellwachstum zu unterbinden, wird dieses gefördert. In der kommerziell erhältlichen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 liegt eine Missense-Mutation von p53 vor. Die Aktivierung von p53 fördert das Wachstum der Zellen anstatt Apoptose zu induzieren [11] [12].

Ein Hauptziel der Krebsforschung besteht darin, dass resistente Karzinome wieder ansprechbar auf die verfügbare Chemotherapie werden bzw. die Entwicklung der Resistenz zu verhindern. Durch Inhibition der Transkription oder der Funktionalität wichtiger Targets, welche für die Resistenzausbildung verantwortlich sind, können Therapien wieder ermöglicht werden. Patienten mit Mammakarzinomen, in denen der Estrogen-Rezeptor (ER) überexprimiert wird, werden neben den taxanhaltigen Zytostatika auch beispielsweise mit dem ER-Inhibitor Tamoxifen behandelt. Wenn Karzinome Mutationen in den EGFR- oder ErbB2-Rezeptoren besitzen, wodurch die Rezeptoren autophosphorylieren, können die Rezeptoren mit Lapatinib oder dem Antikörper Trastuzumab inhibiert werden [13].

3.2 Krebserkrankungen

3.2.1 Ovarialkarzinom

Zu den häufigsten letalen, gynäkologischen Erkrankungen zählen die Ovarialkarzinome. Die Überlebensrate beträgt 45% in den ersten fünf Jahren, trotz operativer Eingriffe und Chemotherapien [14]. Das Karzinom kann sich entweder aus der ovariellen Oberfläche des Epitheliums oder aus Zysten entwickeln, die sich nach follikulären Schäden verändert haben. Die Karzinogenese wird in zwei Typen klassifiziert [15]. Typ I beschreibt Krebszellen, die sich indolent verhalten und keine Mutationen in *TP53* besitzen, jedoch in verschiedenen anderen Genen. Wachstums-induzierende Cytokine, beispielsweise der Tumornekrosefaktor-alpha ($TNF\alpha$), und Rezeptoren, wie der Insulin-like growth Rezeptor (IGFR), sind nach der Transformation von gesunden zu malignen Zellen hochreguliert. $TNF\alpha$ spielt eine signifikante Rolle im frühen Stadium in der Entstehung von Krebszellen: Angiogenese und Invasion. Das proinflammatorische Cytokin hat allerdings eine Doppelrolle. Zum einen kann es den extrinsischen Apoptoseweg induzieren, zum anderen hemmt das Cytokin durch die Interaktion mit dem „zellulären Inhibitor des Apoptose Proteins-1“ (cIAP1) die Apoptose [16]. Zudem können Mutationen in dem Tumorsuppressor-Rezeptor PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) auftreten, wodurch die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-Trisphosphat (PIP_3) durch PTEN und die darauffolgende Proliferationshemmung beeinträchtigt werden kann. Maligne Zellen, die aus Zysten stammen, können eine hohe Menge an altem Blut enthalten, weswegen die Eisenkonzentration in der Zelle stark erhöht ist. Freies Eisen induziert andauernden, oxidativen Stress, was zur DNA Schädigung und einer Verminderung der DNA Reparatur führt. Die Folge ist die Entstehung maligner Zellen. Die unkontrollierte Zellproliferation kann durch erhöhte Aktivierung des MAPK (Mitogen-aktiviertes Protein-Kinase)-Signalwegs induziert werden, welcher durch die Regulatoren (zum Beispiel ErbB2) gesteigert wird [15].

Der Karzinom-Typ II ist im Vergleich zu Typ I wesentlich aggressiver und entwickelt sich relativ schnell. Dieser Typ wird häufig erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt. Die meisten Zellen besitzen Mutationen in *TP53*, was die Funktionsweise des Tumorsuppressors beeinflusst. Zudem überexprimieren und hyperaktivieren die Zellen den proliferationsfördernden Rezeptor ErbB2 sowie die Serin-Threonin Protein Kinase Akt. Eine

Mutation in den Breast Cancer Genen (BRCA) 1 und 2 erhöht das Risiko an Ovarialkarzinom zu erkranken bis zu 50% [15] [17].

Die Behandlung von Ovarialkarzinomen beruht zunächst auf einer operativen Entfernung des malignen Gewebes. Anschließend erfolgt je nach Grad der Krebserkrankung (Stadium IA Grad 2 bis 3, Stadium IB Grad 1 bis 3) eine platinhaltige Chemotherapie, meist Carboplatin. Im fortgeschrittenen Stadium (Stadium IIB bis IV) wird zu einer Kombinationstherapie aus Carboplatin und Paclitaxel geraten. Zusätzlich kann eine Therapie mit dem Antikörper Bevacizumab erfolgen [18]. Dieser Antikörper greift nicht die Krebszellen direkt an, sondern richtet sich gegen die umliegenden Zellen, die die Angiogenese fördern. Bevacizumab inhibiert den Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), was die Rückbildung der Blutgefäße zur Folge hat. Dadurch wird die Versorgung der Krebszellen mit Sauerstoff und Nährstoffen unterbunden [19].

In dieser Arbeit wurde das *in vitro* Modell A2780 verwendet, das bereits charakterisiert wurde [20] [21] [22] [23]. Die gewählte Zellkultur ist eine epitheliale Ovarialkarzinom-Zelllinie, welche ursprünglich von einer unbehandelten Patientin stammt [24]. Die Zellen wachsen erbsenrund und adhärent in dem Nährmedium RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) mit 10% fetalem Kalbserum (FKS). Die Subzelllinie A2780CisR wurde aus der Zelllinie A2780 durch wöchentliche Behandlungen mit Cisplatin, ähnlich wie in der Klinik behandelte Karzinome, generiert [22]. Der IC_{50} -Wert der neuen A2780CisR Zelllinie ist ungefähr 5-fach höher im Vergleich zu den cisplatinempfindlichen A2780 Zellen (Resistenzfaktor: 5).

Die cisplatinempfindliche Zelllinie exprimiert den funktionsfähigen Wild-Typ von p53. Die kommerziell erhältliche cisplatinresistente Zelllinie A2780/CP70 exprimiert ebenfalls den Wild-Typ, jedoch liegt in dieser Zelllinie ein Verlust der Funktion des Proteins durch eine veränderte Konformation vor [25]. Die Expression der Apoptosepromotoren Bak und Bax sind zudem in A2780/CP70 herunter reguliert [23] [26].

3.2.2 Mammakarzinom

In den USA und im westlichen Europa werden die meisten Brustkrebserkrankungen diagnostiziert, die jährlich zunehmen und von denen in den USA ungefähr 16% der Patientinnen der Krankheit erliegen. Um die Art des Krebses zu erkennen und die richtige Chemotherapie einzusetzen, sind prognostische und prädiktive Biomarker essentiell. Eine gesteigerte oder gesenkte Expression von Genen oder Proteinen in malignen Zellen im Vergleich zu nativen Zellen hilft, die Entwicklung der malignen Zellen einzuordnen und etwaige Resistenzen zu bestimmen [27]. Durch diese Expressionsprofile können verschiedene Subtypen von Brustkrebs charakterisiert werden. Dabei wird die gesteigerte oder fehlende Expression des ER, des Progesteron-Rezeptors (PR) und des „human epidermal growth factor“ Rezeptors (HER2/ErbB2) untersucht. Ein besonders aggressiver Typ des Mammakarzinoms ist das Triple-negative Mammakarzinom (TNBC), bei dem die Expression der genannten Rezeptoren vollständig fehlt bzw. sehr gering vorhanden ist [28]. Daher wird insbesondere für diesen Subtyp nach anderen Biomarkern geforscht. Eines der möglichen Zielproteine könnte das Enzym Poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP) sein, welches geschädigte DNA repariert und die Chromatinstruktur und die Transkription reguliert und somit Einfluss auf das Überleben der Zellen nimmt. Die Kombination eines DNA schädigenden Zytostatikums mit einem PARP-Inhibitor kann die Induktion von Apoptose erhöhen [29] [30] [31]. Ein weiteres Target ist der EGF-Rezeptor, der das Zellwachstum reguliert. Die Inhibition des EGF-Rezeptors verursacht den Arrest des Zellzyklus und leitet die Apoptose ein [32] [33] [34]. Zusätzlich ist die Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges eine weitere Möglichkeit, TNBC zu behandeln. Der PI3K/Akt Signalweg fördert die Zellproliferation und somit das Überleben der Zelle. Die eingesetzte Kombination von PI3K- und PARP-Inhibitoren reduziert signifikant die Wachstumsrate der malignen Zellen [35]. Der hohe Energiebedarf einer Krebszelle kann durch eine erhöhte Aktivität der Glykolyse bewerkstelligt werden. Daher sind die glykolytischen Enzyme, wie PGK1 (Phosphoglycerat-Kinase-1) und PKM2 (Pyruvatkinase M2), ebenfalls interessant für neue Therapieansätze. Die Inhibition der glykolytischen Enzyme führt zur Verminderung der ATP-Produktion, wodurch Apoptose induziert werden kann [36].

Die Leitlinien von 2012 zur Behandlung von Mammakarzinomen unterscheiden zwischen verschiedenen Karzinomtypen. Entweder werden die endokrinen Rezeptoren bzw. der

ErbB2-Rezeptor exprimiert oder keine dieser Rezeptoren sind in therapeutisch relevanten Mengen vorhanden oder nur einer bzw. zwei der Rezeptoren werden exprimiert. Nach operativer Entfernung kann entweder mit einer Strahlentherapie oder mit einer Chemotherapie mit taxan- bzw. anthrazyklinhaltigen Zytostatika begonnen werden, wenn die malignen Tumore ErbB2-positiv sowie ER- und PR-negativ sind. Wenn die Zellen ER- oder PR-positiv sind, soll die prämenopausale Patientin mit Tamoxifen behandelt werden. Dagegen sind Aromatasehemmer der 3. Generation, wie Anastrozol oder Exemestan, für postmenopausalen Patientinnen bestimmt [37]. In vitro Studien haben ergeben, dass TNBC-Zellen sensitiv auf Cisplatin reagieren, wenn diese p63 und p73 co-exprimieren. Die Expression der beiden Proteine hatte jedoch keinen Effekt auf die Sensitivität für die Standard Chemotherapeutika, wie Paclitaxel oder Doxorubicin [38].

Ein vergleichbares *in vitro* Modell ist die TNBC-Zelllinie MDA-MB-231 [39] [40] [41], welche aus dem Pleuraerguss einer Patientin stammt, die zunächst mit 5-Fluoruracil und Prednison behandelt wurde [42]. Da diese Therapie keinen Erfolg aufwies, wurde die Patientin mit einer Kombination aus Adriamycin und Amethopterin (Methotrexat) behandelt, was ebenfalls erfolglos war [42]. Da die TNBCs therapeutisch besonders problematisch sind, wurde die MDA-MB-231-Zelllinie und deren cisplatinresistente Subzelllinie MDA-MB-231CisR für die Studien in dieser Arbeit verwendet. Die cisplatinresistente Zelllinie MDA-MB-231CisR hat im Vergleich zur ihrer Ausgangszelllinie einen Resistenzfaktor von 2. Die Zelllinien wachsen adhärent in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 15% FKS und können rundliche mit kronenartigem Kranz bis hin zu langen spindelartigen Formen bilden. Die Zelllinie exprimiert den EGF-Rezeptor, welcher den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert und somit die Zellmigration und Proliferation stimuliert. Die Behandlung mit dem Liganden EGF verstärkt das Migrationsverhalten der Zelle [43]. Außerdem besitzt die Zelllinie eine Missense-Mutation in *TP53*, bei der die Aminosäure Arginin mit Lysin an Position 280 ausgetauscht ist. Diese Mutation führt zum Überleben der Zellen durch ein erhöhtes Migrationspotential [11] [12].

Neben dieser TNBC Zelllinie wurde die epitheliale Luminal A Mammakarzinom-Zelllinie T-47D als ER+ Kontrolle (ER exprimierende Kontrolle) in Experimenten verwendet [40] [41]. Die Zelllinie stammt aus einem unbehandelten Pleuraerguss [44]. Die cisplatinresistente Zelllinie T-47DCisR besitzt einen Resistenzfaktor von 1,5 im Vergleich zur Ausgangszelllinie. Die Zelllinie T-47D wurde positiv auf PTEN getestet [45]. Wenn neben dem ER auch der

Tumorsuppressor PTEN exprimiert wird, ist das Risiko geringer, ein Rezidiv zu entwickeln, als wenn PTEN nicht exprimiert wird [27]. PTEN dephosphoryliert das Phosphatidylinositol-Trisphosphat, wodurch die Proliferation über den PI3K/Akt-Signalweg unterbunden wird.

3.2.3 Ösophaguskarzinom

Das Ösophaguskarzinom gehört zu den Diagnosen, denen eine hohe Sterberate von 80 bis 90% folgt. Der häufigste Subtyp ist das Plattenepithelkarzinom, das überwiegend durch den Konsum von Alkohol und Tabak verursacht wird. Diese Konsumgüter lösen Entzündungen aus, die oxidativen Stress und DNA-Schädigung zur Folge haben. Gesunde Zellen verändern sich dadurch zu malignen Zellen. Ein weiterer Subtyp vom Speiseröhrenkrebs ist das Adenokarzinom. Dies wird meist durch Refluxösophagitis (gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD)) in Zusammenhang gebracht. Unbehandelte Entzündungen durch den chronischen Rückfluss von Magensäure führen zu einer metaplastischen Umwandlung des Gewebes in maligne Zellen. Das Ösophaguskarzinom hat ein hohes Potenzial zur Streuung in Organe, wie Leber, Lunge und Nieren sowie in Knochen und Gehirn [46]. Als Standard-Chemotherapie wird die Kombination von Cisplatin mit 5-Fluoruracil eingesetzt. In einigen Fällen wird Strahlentherapie hinzugezogen, wenn keine Strahlenresistenz vorliegt und umliegendes gesundes Gewebe nicht beeinträchtigt wird [47].

Zur Untersuchung der Wirkmechanismen verschiedener Substanzen wurde die epitheloide Ösophaguskarzinom-Zelllinie Kyse510 verwendet. Die Zellen wurden nach Cisplatin- und Strahlentherapie aus der mukosalen Oberfläche des differenzierten Karzinoms entnommen [48]. Die Zellen wachsen adhärent in RPMI-1640 mit 10% FKS und haben eine kleine und erbsenförmige Struktur. Die cisplatinresistente Zelllinie wurde als Kyse510CisR bezeichnet, deren Resistenzfaktor bei 3 liegt, und wurde klinisch ähnlich aus der Kyse510 erhalten [49].

3.2.4 Orales Plattenepithelkarzinom

Das orale Plattenepithelkarzinom ist mit 95% die häufigste Krebserkrankung im Kopf- und Nacken-Bereich, welches die Lippen, laterale Bereiche der Zunge und die Decke der Mundhöhle umschließt. Ursachen für die Entstehung der malignen Zellen können der Konsum von Alkohol und Tabak sein. Die Therapiemöglichkeiten bestehen aus einer Kombination von Strahlen- und Chemotherapie. Jedoch ist die Rezidivrate hoch und die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten liegt bei 53%. Das Tumorsuppressor-Protein p53, welches durch DNA-Schädigung oder Hypoxie aktiviert wird, wurde als Biomarker bestimmt. In dieser Krebsart liegt das Protein meist mutiert vor, wodurch die natürliche Funktionalität entweder beeinträchtigt oder vollständig gehemmt ist. In der Mikroumgebung der Krebszellen befinden sich Fibroblasten, die die Zellmigration und die Metastasierung der Krebszellen unterstützen [50]. Laut den Leitlinien soll nach der operativen Entfernung des Karzinoms entweder eine Strahlentherapie oder eine Radiochemotherapie mit Cisplatin durchgeführt werden. Alternativ zur Radiochemotherapie kann die Kombination aus Strahlentherapie mit Cetuximab angewandt werden [51].

Als *in vitro* System wurde die epitheliale Zungenkarzinom-Zelllinie Cal27 für die Untersuchungen von Wirkmechanismen verschiedener Substanzen verwendet. Die Zellen wurden dem Patienten vor der ersten Behandlung entnommen [52]. Als Kulturmedium wird DMEM mit 10% FKS verwendet und die Zellen wachsen eng aneinander, ohne jeglichen Zwischenraum. Die cisplatinresistente Zelllinie Cal27CisR (Resistenzfaktor: 4) wurde aus Cal27, ähnlich wie in der Klinik, generiert [53]. In der Cal27-Zelllinie wird CD44 exprimiert, welches als Biomarker für Stammzellen genutzt wird. Außerdem interagiert CD44 mit Signalmolekülen, die die Zellproliferation und Migration regulieren. Dazu gehört die Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR. Die Inhibition von CD44 resultiert in der Verminderung der EGFR Expression und Phosphorylierung. Somit wird das Zellwachstum gehemmt [54]. Zudem liegt in Cal27 das Gen *TP53* mutiert vor. Allerdings wird vermutet, dass diese Mutation keinen onkogenen Effekt hat [55].

3.2.5 Kolonkarzinom

In Deutschland betrifft beinahe jede 7. Krebserkrankung den Darm, von denen fast zwei Drittel im Dickdarm vorkommen. Abgesehen von den Plattenepithelkarzinomen finden sich histologisch überwiegend Adenokarzinome. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt sowohl bei Männern als auch bei Frauen bei ungefähr 65% [56]. Nach einer chirurgischen Resektion kann die Rezidivrate durch eine anschließende Chemotherapie reduziert werden. Diese basiert häufig auf eine 5-Fluoruracil-haltige Therapie [57]. Die in dieser Arbeit verwendete Adenokarzinom-Zelllinie HCT116 stammt von einem primären Kolonkarzinom [58] [59]. In HCT116 Zellen wurden keine Mutationen im p53 und adenomatösen Polyposis Kolonkarzinom-Gen detektiert [60]. Eine RNA- und Protein-Überexpression von PIK3CB, eine Untereinheit von PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), ist die Folge einer Strahlentherapie [61].

3.2.6 Leukämiezellen

Eine Störung in den klonalen, myeloproliferativen Stammzellen kann zu bösartigen Veränderungen, wie der chronisch myeloischen Leukämie führen. Unbehandelt entwickelt sie sich weiter zur aggressiven, lebensbedrohlichen akuten Leukämie [62]. Die Krankheit konnte erstmals erfolgreich behandelt werden, als der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib eingesetzt wurde. Nach der Beobachtung von Resistenzen gegen Imatinib wurden weitere Tyrosinkinase-Inhibitoren entwickelt, die in den imatinibresistenten Zellen aktiv waren [63]. Das in dieser Arbeit verwendete *in vitro* Modell K562 stammt von einem Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie. Die Zellen wurden von einem Pleuraerguss isoliert und sind Blasten mit einem undifferenzierten Immunphänotyp [64]. Die kleinen, erbsenförmigen Zellen wachsen in Suspension im Nähmedium RPMI-1640 mit 10% FKS. Die Toxizität verschiedener Substanzen wurde an dieser Zelllinie untersucht.

3.2.7 Native Zelllinie

Zusätzlich zu den verschiedenen Krebszelllinien wurde die native, nicht bösartige, epitheliale Zelllinie HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) verwendet. In die humanen embryonalen Nierenzellen wurde die DNA vom Adenovirus Typ 5 transfiziert [65]. Die HEK293 Zellen wurden nach der Adenovirus-Transfektion immortalisiert. Dies bedeutet, dass die Zellen stetig proliferieren und somit über längere Zeit kultivierbar sind. Diese Zelllinie dient als Kontrolle, um Effekte an malignen Zellen mit nativen, gutartigen Zellen vergleichen zu können.

3.3 Cisplatinresistenz

3.3.1 Mechanismus und Resistenzentwicklung

Das Prodrug cis-Diammindichloridoplatin(II) (Cisplatin) wird zur Behandlung von Krebszellen eingesetzt. Cisplatin gelangt durch passive Diffusion oder aktiv durch den Kupfer-Transporter CTR1 in die Zellen. In der Zelle wird Cisplatin wegen des niedrigen Chlorid-Gehalts durch die Substitution der beiden Chloridoliganden mit zwei Wasser-Molekülen aktiviert. Dieser reaktive Aquokomplex greift an nucleophilen Strukturen innerhalb der Zelle an. Die zytotoxische Wirkung entsteht dabei hauptsächlich durch die Bildung von Platin-DNA-Addukten. Dabei werden die Stickstoffe in N7-Position der Purinbasen Guanin und Adenin angegriffen, wenn diese in 1,2-Position innerhalb eines DNA-Stranges bzw. in 1,3-Position zwischen zwei Strängen zueinander stehen. In der G₁-Phase des Zellzyklus besitzen die Zellen einen einfachen Chromosomensatz. Die Zellen produzieren Zellbestandteile wie Zytoplasma und Organellen. In dieser Phase komplexieren die Cycline D1, D2 und D3 mit CDK4 und 6, um verschiedene Wachstumsfaktoren zu stimulieren. Der Cyclin E-CDK2-Komplex reguliert den Übergang von der G₁- in die S-Phase. In der S-Phase wird die DNA für die bevorstehende Zellteilung synthetisiert. In der G₂-Phase verfügt die Zelle über den doppelten Chromosomensatz. Die Komplexierung von Cyclin A mit CDK1 fördert den Übergang in die M-Phase. Die Mitose wird anschließend von dem Cyclin B-CDK1-Komplex reguliert [66]. Cisplatin kann entweder den intrinsischen oder den extrinsischen Apoptoseweg induzieren

(Abbildung 1) [67]. Beim intrinsischen Apoptoseweg wird nach der DNA-Schädigung durch Cisplatin die DNA-Synthese gestoppt und der Tumorsuppressor p53 aktiviert. Einige Zellen arretieren in der S-Phase, wogegen andere Zellen in der G₂/M-Phase arretieren [68] [69] [70] [71]. Anschließend wird aus den Mitochondrien Cytochrom c ins Zytoplasma ausgeschüttet und an Apaf1 (Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) gebunden. Dies bewirkt eine Konformationsänderung von Apaf1, welches anschließend mit der proCaspase 9 das Apoptosom bildet [72]. Im Apoptosom wird die Caspase 9 aktiviert, die wiederum Caspase 3 aktiviert [73] [74] [75] [76]. Die DNA wird fragmentiert und das membranständige Phosphatidylserin wird von der Membran-Innenseite zur Außenseite externalisiert [77] [78] [67]. Bei dem extrinsischen Apoptoseweg werden Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie (Tumornekrosefaktor) durch Bindung von Liganden (TNF, FasL oder verschiedene Zytokine) aktiviert (Abbildung 1). Die Rezeptoren bilden Trimere, an denen zunächst das TRADD (TNF-Rezeptor-assoziiertes Protein) und anschließend das FADD (Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne) binden. Daraufhin komplexiert die proCaspase 8 mit dem FADD und wird autokatalytisch zu Caspase 8 aktiviert. Die Caspase 8 aktiviert wiederum die Caspase-Kaskade, bestehend aus Caspase 3, Caspase 6 und Caspase 7 [73] [74] [75]. So sind z.B. in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 beide Apoptosewege beschrieben. Singh et al. beschreiben die Induktion von Apoptose durch Cisplatin über die Aktivierung der Caspase 9 und somit über den intrinsischen Apoptoseweg. Folgend wird Caspase 3 aktiviert, welche wiederum Caspase 7 aktiviert. Caspase 7 inhibiert die Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) und somit die Reparatur der geschädigten DNA [79]. Weiterhin beschreiben Duiker et al., dass Cisplatin in A2780 Zellen neben dem intrinsischen Apoptoseweg zusätzlich Caspase 8 aktiviert [80]. Die Sensitivität gegenüber Cisplatin wird unter anderem mit dem cAMP-Spiegel in den Ovarialkarzinom-Zellsystemen A2780 und 2008 in Verbindung gebracht [81]. In der Ausgangszelllinie und in der cisplatinresistenten Subzelllinie wurde eine ähnliche Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) beobachtet. Allerdings war der cAMP-Level in der resistenten Zelllinie geringer als in der sensitiven Zelllinien. Demnach unterstützt ein hoher cAMP-Spiegel neben der Akkumulierung auch die Toxizität des Zytostatikums [81]. Die Induktion von Apoptose durch Cisplatin ist nicht nur konzentrationsabhängig, sondern auch zeitabhängig. Je nach eingesetzter Konzentration dauert die Induktion von Apoptose mehrere Stunden bis hin zu Tagen [82].

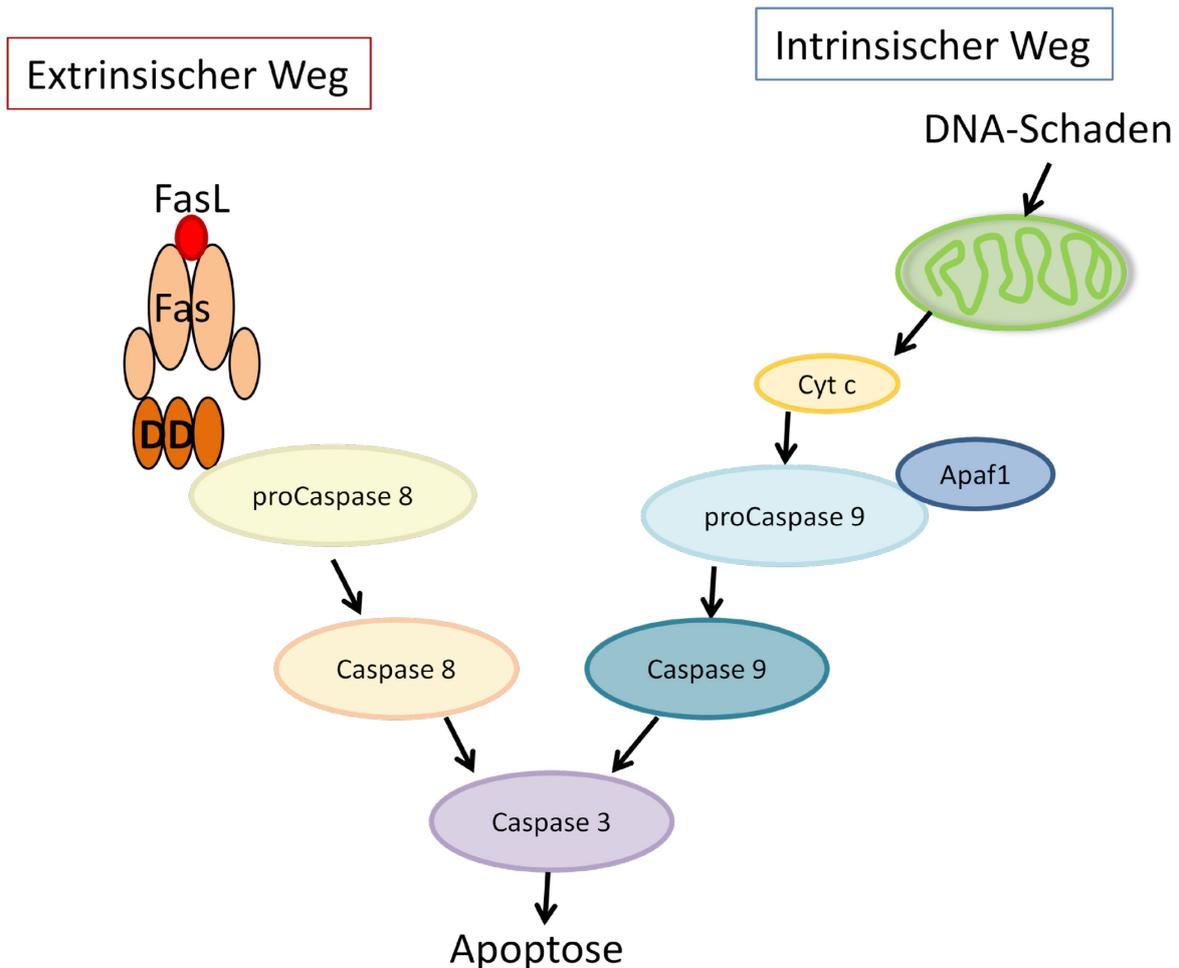


Abbildung 1: Signalkaskade bei dem extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweg modifiziert nach [83]. Wenn die DNA geschädigt wird, wird Cytochrom c (Cyt c) aus den Mitochondrien ins Zytoplasma freigesetzt, welches das Apaf1 (Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) aktiviert. Anschließend bindet Apaf1 an die proCaspase 9, wodurch die aktive Caspase 9 gebildet wird. Diese aktiviert folgend die Caspase 3, welche Apoptose induziert. Wenn extrazelluläre Liganden wie FasL an den Todesrezeptoren (Fas) binden, bilden sich Trimere, an denen die Todesdomänen (DD) binden. An dieser Domäne komplexiert proCaspase 8 und wird zur aktiven Caspase 8 umgewandelt. Diese aktiviert weiter Caspase 3 und induziert Apoptose.

Krebszellen können eine natürliche Resistenz gegenüber Cisplatin besitzen, die sich bei der Differenzierung von gesunden zu malignen Zellen gebildet hat. Andererseits können Zellen, die zunächst sensitiv auf das Chemotherapeutikum reagieren, nach mehreren Behandlungen mit Cisplatin Resistenzen gegen das Zytostatikum entwickeln. Mutationen von Genen sowie veränderte Signalwege erschweren die Chemotherapie. Die Bildung der Resistenz kann verschiedene Ursachen haben, die meist in Kombination auftreten. Die passive Diffusion von Cisplatin wird beeinträchtigt, wenn sich die Festigkeit der Zellmembran erhöht [84]. Eine

erhöhte Expression des Kupfertransporters CTR1 führt zur Akkumulierung von Cisplatin in der Zelle. Durch Mutationen in CTR1 oder einer Veränderung der Regulationsmechanismen kann die Aktivität des Transporters verringert werden, sodass weniger Cisplatin in die Zelle transportiert wird. Der Transporter CTR2 fördert die Ausscheidung von Cisplatin aus der Zelle. Die Überexpression und Hyperaktivierung des zweiten Kupfertransporters erhöht somit die Resistenz der Zelle [84] [85]. Ein erhöhter Efflux von Cisplatin kann ebenfalls durch die gesteigerte Aktivität der Kupfer-Transporter ATP7A und ATP7B erfolgen [86] [87]. Diese Veränderung entsteht meist nach mehrfacher Behandlung mit Cisplatin. Innerhalb der Zelle induziert Cisplatin ROS, die zu DNA-Läsionen beitragen können. Durch nukleophile Angriffe von Glutathion, Methionin und Metallothionein wird Cisplatin deaktiviert. Somit wird die Zelle verstärkt entgiftet und Cisplatin löst keinen weiteren oxidativen Stress aus [84].

Befinden sich die Zellen während des Zellzyklus in der G₁-Phase, werden Zytoplasma und Zellorganellen ergänzt sowie mRNAs und Histone produziert. Die DNA wickelt sich dann um ein Histon-Oktamer. Werden die Histone mehrfach deacetyliert, wird die Chromatinstruktur kondensiert und der Zugang zur DNA für Cisplatin wird behindert. Somit ist eine erhöhte Aktivität der Enzymfamilie der Histon-Deacetylasen (HDAC) problematisch für die Therapie. Die Inhibition der Histon-Deacetylasen verhindert die Deacetylierung der Histone und erleichtert den Zugang zur DNA für Cisplatin [88]. Daher kann der Einsatz von HDAC-Inhibitoren in Zusammenhang mit platinhaltigen Therapien vorteilhaft sein.

Gelangt Cisplatin schließlich zur DNA, kann sich die Zelle anderweitig vor der Auslösung von Apoptose schützen. Verschiedene Reparatur-Systeme (Basen- oder Nukleotidexzisionsreparatur-Systeme) reparieren die beschädigten DNA-Stellen, indem Basen oder Nukleotid-Stränge ausgetauscht werden. Somit kann die DNA wieder fehlerfrei abgelesen werden. Die Hyperaktivierung von PARP fördert ebenfalls die Reparatur der DNA und verringert somit die Induktion von Apoptose. Eine weitere Möglichkeit der Resistenz ist die Toleranz für fehlerhafte DNA, wenn der Schaden keine erhebliche Auswirkung auf den Metabolismus hat oder durch andere Komponenten kompensiert wird [84] [87].

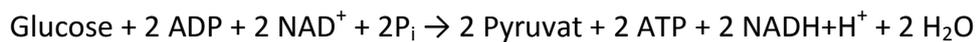
Bei der Entstehung einer Cisplatinresistenz können zudem pro-apoptotische Proteine herunter reguliert werden oder durch Mutationen ihre Funktion verlieren. Dazu zählen die verschiedenen Caspasen, die nach ihrer Aktivierung verschiedene Signalwege induzieren, die zur Apoptose führen würden. Außerdem kann die Expression bzw. Aktivierung von Apoptoseinhibitoren, wie Bcl-2 und cIAP, hoch reguliert werden [87]. Bei der Entwicklung

einer Cisplatinresistenz werden verschiedene Signalwege beeinflusst. Wachstums- und migrationsfördernde Rezeptoren und Liganden werden verstärkt aktiviert. Die Hyperaktivierung von ERK1/2 (Extrazelluläre-Signalregulierende Kinase) und dem MAP Kinase-Signalweg erhöht die Zellmigration und die Invasion [87]. Die Inhibition von ERK1/2 oder dem Signalweg führt zu einer vollständigen Inhibition der Zellmigration [89] [90]. Neben dem PI3K/Akt-Signalweg, der die Proliferation der Zellen fördert, können Rezeptoren der EGFR-Familie, welche sowohl die Zelldifferenzierung als auch die Proliferation regulieren, zur Entwicklung der Resistenz beitragen. Außerdem fördert der EGFR-Signalweg die Zellmigration durch die Aktivierung von ERK1/2 und Akt. Aus dieser Rezeptorfamilie sind insbesondere EGFR1 und ErbB2 als Biomarker für eine Cisplatinresistenz bekannt [87] [91] [92]. Die Aktivierung durch Dimerisierung der Rezeptoren erfolgt durch die Bindung eines Liganden. Wenn diese Rezeptoren überexprimiert werden und somit vermehrt an der Zellmembran vorliegen, kann eine Autodimerisierung stattfinden und zur Aktivierung der Rezeptoren ohne die Anwesenheit eines Liganden führen. In manchen Patienten mit NSCLC wurde eine Mutation des EGF-Rezeptors festgestellt, bei der die Aminosäure Threonin durch Methionin ausgetauscht wurde [93]. Dies erhöht die Affinität der Kinase-Domäne zu ATP und senkt gleichzeitig die Affinität der Ligandenbindungsstelle für die Inhibitoren Erlotinib oder Gefitinib. In präklinischen Modellen wurde der irreversible Inhibitor Afatinib erfolgreich für diese Mutante getestet. Jedoch war der Erfolg bei Patienten moderat, die zuvor mit Erlotinib bzw. Gefitinib therapiert wurden [93].

In verschiedenen Krebszellen wurde ebenfalls eine Überexpression des Enzyms PGK1, das in der Glykolyse zur ATP-Gewinnung beiträgt, im Zusammenhang mit der Entstehung einer Resistenz beobachtet. Durch eine erhöhte Glykolyseaktivität kann die maligne Zelle ihren erhöhten Energiebedarf decken [84] [5] [94]. Die verschiedenen vorgestellten Mechanismen zur Ausbildung einer Cisplatinresistenz können in manchen Karzinomen zusammen auftreten und die Behandlung erschweren [95].

3.3.2 Die Rolle der Glykolyse in der Cisplatinresistenz

In der Zelle dient die Glykolyse zur Lieferung benötigter Energie [96]. Die Glucose wird extrazellulär aufgenommen und wird unter Bildung der Energieträger ATP und $\text{NADH}+\text{H}^+$ zu Pyruvat umgewandelt. Die folgende Gleichung beschreibt die allgemeine Reaktion:



Zunächst wird unter ATP-Verbrauch die Glucose durch die Hexokinase (HK) zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert. Das Produkt wird unter weiterem Verbrauch von einem ATP über mehrere Schritte zu Fructose-1,6-bisphosphat metabolisiert. Die Aldolase spaltet Fructose-1,6-bisphosphat in Glyceraldehyd-3-phosphat und in Dihydroxyacetonphosphat. Letzteres wird wiederum in Glyceraldehyd-3-phosphat umgewandelt. Die beiden Moleküle werden durch die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase zu 1,3-Bisphosphoglycerat umgebildet, wobei 2 NAD^+ zu 2 $\text{NADH}+\text{H}^+$ umgesetzt werden. Anschließend transferiert die Phosphoglycerat-Kinase-1 (PGK1) jeweils einen Phosphat-Substituenten von beiden Produkten auf zwei ADP Moleküle, womit zwei ATP Moleküle gewonnen werden. Die beiden entstandenen Phosphoglycerat-Moleküle werden über mehrere Schritte unter Gewinnung von zwei weiteren ATP Molekülen zu Pyruvat umgebaut (Abbildung 2). Das Pyruvat kann nun für zwei verschiedene Reaktionen genutzt werden. Eine Möglichkeit ist, dass das Pyruvat zu Acetyl-CoA oxidativ decarboxyliert wird. Das Acetyl-CoA wird in der Atmungskette in den Mitochondrien durch den Einsatz von Sauerstoff unter Bildung von ATP abgebaut. Die zweite Möglichkeit ist die Umwandlung von Pyruvat in Lactat [97] [98] [96].

Maligne Zellen haben meist einen erhöhten Bedarf an Energie, den sie durch Erhöhung der Glykolyseaktivität decken können. Dadurch kann die Atmungskette verstärkt die höheren Mengen an verfügbarem Acetyl-CoA verarbeiten und weiteres ATP produzieren. Steht der Zelle zu wenig molekularer Sauerstoff zur Verfügung (Hypoxie), ist die Funktion der Atmungskette gehemmt. Das Pyruvat wird vermehrt zu Lactat umgewandelt. Dieser Fall wird als Warburg Effekt bezeichnet [99] [100] [101]. Die Zelle kann so unter hypoxischen Bedingungen weiterhin Energie zur Verfügung stellen. Um die erhöhte Aktivität gewährleisten zu können, werden bestimmte Enzyme aus der Glykolyse, wie PGK1, überexprimiert. Somit wird mehr ATP produziert und vermehrt Pyruvat zur Verfügung

gestellt. Dies kann ein Charakteristikum für Resistenzen gegenüber Zytostatika und Strahlungstherapie sein [98] [102] [103]. Neben der Energiegewinnung begünstigt eine erhöhte Expression von PGK1 die Angiogenese und Migration in verschiedenen Krebszelllinien [104] [105] [106] [107]. Außerdem wird die Überexpression von PGK1 mit einer starken Proliferation in Verbindung gebracht [108]. Die erhöhte Proliferation führt zu einer erhöhten Masse an malignen Zellen, die einen Cluster bilden. Das Zytostatikum gelangt in die Zellen im äußeren Rand des Clusters, allerdings nicht in die Zellen im Inneren des Clusters.

Um die Energieproduktion von Krebszelllinien zu unterbinden, werden verschiedene Inhibitoren eingesetzt. Ein prominentes Beispiel ist 3-Brompyruvat (3-BrPy). Dieser Inhibitor hemmt die Hexokinase, die am Anfang der Glykolyse steht [97]. Die Produktion von intrazellulärem ATP wird in Abhängigkeit von der 3-BrPy-Konzentration vollständig eingestellt, wodurch das Zellwachstum unterbunden wird und der Zelltod eintritt [109] [110] [111]. Neben der Hexokinase inhibiert 3-BrPy auch die Pyruvat-Dehydrogenase, da 3-BrPy strukturanalog zu Pyruvat ist. Bei einer Blockade der Pyruvat-Dehydrogenase durch 3-BrPy kann Pyruvat nicht mehr in Acetyl-CoA umgewandelt werden, was wiederum die Aktivität der Atmungskette vermindert. Kombinationen von 3-BrPy mit Chemotherapeutika erhöhen die Sterberate der Krebszellen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem Zytostatikum [112] [113]. Eine cisplatinresistente Ovarialkarzinom-Zelllinie, die SKOV-3, in der ein Verlust der p53-Funktion vorliegt, wurde mit Cisplatin und 3-BrPy in nicht toxischen Konzentrationen behandelt. Die Kombination der beiden Substanzen führte zu einer signifikanten Inhibition der Zellproliferation [114].

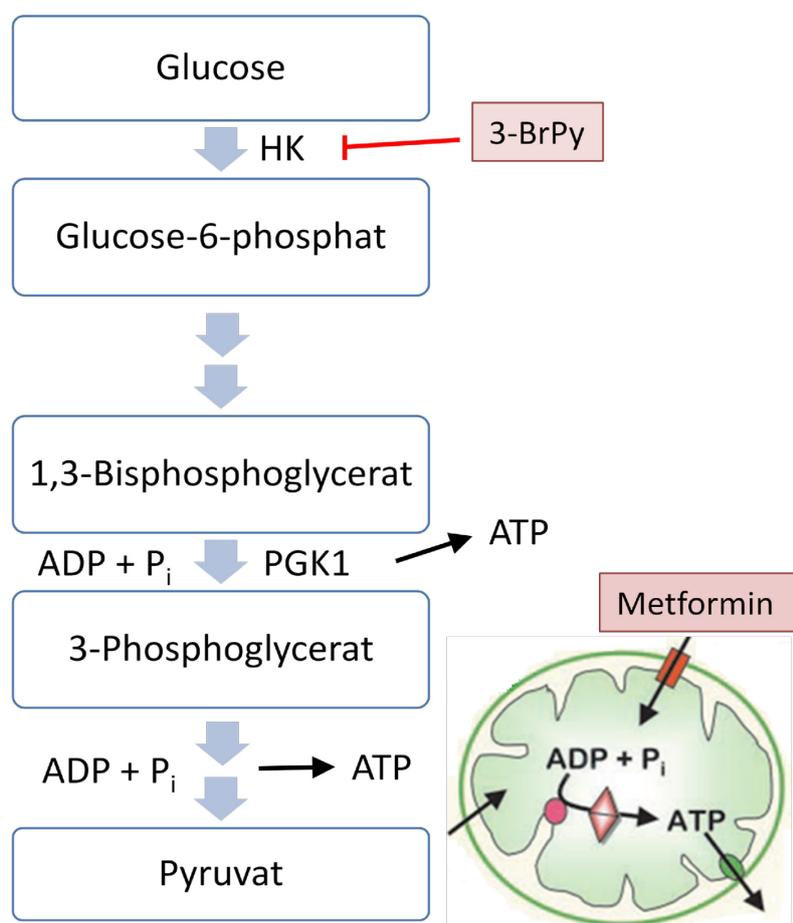


Abbildung 2: Die ATP-Produktion durch die Glykolyse und der Atmungskette in eukaryotischen Zellen [97] [110] [115]. Glucose wird unter Verbrauch von ATP nach mehreren Schritten zu 1,3-Bisphosphoglycerat umgewandelt. Die Phosphoglycerat-Kinase-1 (PGK1) dephosphoryliert 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat unter Bildung von ATP. Das Produkt wird nach weiteren Schritten und Bildung von weiterem ATP zu Pyruvat umgewandelt. Der Inhibitor 3-BrPy hemmt die Aktivität der Hexokinase (HK) und stoppt so die Glykolyse und ATP-Produktion. Der Inhibitor Metformin gelangt über OCT1/2 in die Mitochondrien und blockiert den Atmungskettenkomplex I. Dadurch wird die Phosphorylierung von ADP zu ATP am Komplex V inhibiert.

In vivo Studien waren erfolgreich beim Einsatz von RNAi (RNA interference), um Komponenten zu inhibieren, die für das Wachstum und der Chemoresistenz von Krebszellen verantwortlich sind [116]. Die Anwendung von RNAi kann durch siRNA (small interfering RNA) oder shRNA (short hairspin RNA) erfolgen. Diese blockieren spezifisch die mRNA des Targets, wodurch die Translation zum Protein unterdrückt bzw. verringert wird [116]. In Ovarialkarzinomzellen führt die Behandlung mit siPGK1 (siRNA spezifisch gegen PGK1 mRNA) zu einer Sensitivierung gegenüber Cisplatin durch eine vollständige Inhibition der PGK1

Expression [117]. Der Atmungskette und der Lactat-Fermentation steht somit kein Pyruvat mehr zur Verfügung und die Aktivität der Metabolisierungswege ist eingeschränkt. Zudem verringert eine Inhibition der PGK1 Expression das invasive Verhalten von Krebszellen [104] [106].

Die Atmungskette in den Mitochondrien besteht aus fünf Proteinkomplexen. Vom Komplex I werden zwei Elektronen über $\text{NADH}+\text{H}^+$ zum Komplex III übertragen. Vom Komplex II werden ebenfalls zwei Elektronen zum Komplex III übertragen, jedoch über FADH_2 (reduzierte Form des Flavin-Adenin-Dinukleotids). Beide Transportwege werden über die Reduktion von Ubichinon zum Ubichinol gesteuert. Vom Komplex III transportiert Ubichinol ein Elektron weiter zum Cytochrom c. Das Cytochrom c wird reduziert, woraufhin Protonen in den intermembranen Raum freigegeben werden. Das zweite Elektron bindet an ein Ubichinon, das zum Radikal wird und durch Aufnahme von Protonen reduziert wird. Am Komplex IV wird das Cytochrom c wieder oxidiert und Sauerstoff zu Wasser reduziert [118]. Am Komplex V wird anschließend ADP zum ATP phosphoryliert [115]. Ein prominenter Inhibitor der Atmungskette ist Metformin, welches anfangs ausschließlich zur Behandlung von Typ 2 Diabetes mellitus eingesetzt wurde [115]. Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus haben ein erhöhtes Risiko an verschiedenen Krebsarten, wie beispielsweise Leber-, Mamma-, Pankreas- oder Kolorektalkarzinom, zu erkranken [119]. Metformin wird überwiegend in der Leber akkumuliert. Dort gelangt Metformin über den organic cation transporter 1/2 (OCT1/2) in die Zellen und inhibiert den Komplex I der Atmungskette. Dies vermindert die Oxidation von $\text{NADH}+\text{H}^+$ und weiterhin die Phosphorylierung von ADP zu ATP. Das intrazelluläre AMP/ATP-Verhältnis verändert sich zu Gunsten von AMP [115]. Der Überschuss an AMP hemmt die Gluconeogenese und aktiviert die Serin/Threonin-Proteinkinase AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase). Diese spielt bei Energiemangel eine wichtige Rolle für das Zellüberleben. AMPK inhibiert durch Phosphorylierung die HMG-CoA-Reduktase und Acetyl-CoA-Carboxylase, die bei der Cholesterin- bzw. Fettsäurebiosynthese ATP verbrauchen [120] [115]. Zudem wird AMPK durch den Tumorsuppressor LKB1 (liver kinase B1) aktiviert. Die Fütterung von Mäusen mit Metformin, in denen sich die Krebszellen in den Pankreas verbreitet hat, führte zu einer erhöhten Aktivierung von AMPK. AMPK aktiviert TSC2 (tuberous sclerosis complex protein 2), welches weiterhin mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) inhibiert. Dies führt zur Reduzierung der Proteinsynthese und des Zellwachstums [119] [115]. Die Inhibition von mTOR kann auch

AMPK-unabhängig über Metformin erfolgen. In Lungenkarzinomen von Mäusen inhibierte Metformin den mTOR-Signalweg über die Inaktivierung von IGFR-1 (Insulin-like growth factor receptor-1), Akt und ERK [119]. In Mammakarzinomen wurde eine verringerte Expression von ErbB2 nach der Behandlung mit Metformin beobachtet. Dieser Effekt wurde über die Inhibition des mTOR-Effektors p70S6K1 (p70 S6 Kinase1) vermittelt. Dieser ist für die Proteinsynthese am Ribosom verantwortlich [119]. In verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien (LNCaP, PC3 und DU145) wurde die Aufnahme von extrazellulärer Glucose und die Lactat-Sekretion erhöht [121]. In anderen Krebszellen, wie Kolon-, Mamma- und Pankreaskarzinom, inhibierte Metformin das Zellwachstum durch Aufhebung der Insulinresistenz, der Hyperglykämie und der Hyperinsulinämie. Dabei wurde Der Spiegel von Glucose, Insulin und IGF reduziert [115]. Studien ergaben, dass Metformin das Fortschreiten von Mamma- oder Pankreaskarzinomen in Patienten reduzierte, insbesondere in Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus [122] [123].

3.3.3 EGF Rezeptorfamilie als Ursache für Resistenz

Die Familie der Epidermal growth factor Rezeptoren besteht aus vier transmembranären Rezeptor-Tyrosinkinase: EGFR (ErbB1/HER-1), ErbB2 (HER-2), ErbB3 (HER-3) und ErbB4 (HER-4). Liganden induzieren die Dimerisierung der Rezeptoren, wodurch verschiedene Tyrosin-Reste im Bereich des C-Terminus phosphoryliert und die Rezeptoren aktiviert werden. Die Rezeptoren regulieren neben der Zelldifferenzierung auch die Proliferation und Migration der Zelle. In Krebszellen wird oft eine Überexpression der Rezeptoren beobachtet. Sie dienen daher als Biomarker für die Bestimmung der Resistenz und der geeigneten Therapie [124] [125].

Die Überexpression von ErbB2 verursacht die Homodimerisierung des Rezeptors und führt zur Autophosphorylierung der Tyrosinreste in der intrazellulären Domäne. In dieser Konformation lagern sich die katalytische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) mit dem p85 Adapter und der Tyrosin-Kinase Src an, wodurch diese aktiviert werden. Anschließend generiert PI3K Phosphatidylinositol-Trisphosphat (PIP₃), welches die Serin-Threonin Proteinkinase Akt direkt oder indirekt über die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase (PDK) aktiviert. Die aktive Kinase Akt stimuliert die Zellproliferation und die

Proteinsynthese. Das aktivierte Src phosphoryliert den Tumorsuppressor PTEN, womit die Translokation von PTEN zur Plasmamembran und die darauffolgende Dephosphorylierung von PIP₃ verhindert werden (Abbildung 3). Somit bleibt PTEN inaktiv [126] [127]. ErbB2 kann in Krebszellen mutiert vorliegen. In den meisten Fällen bewirkt die Mutation eine erhöhte Kinaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp. In verschiedenen Krebszelllinien induziert die Transfektion mit mutiertem ErbB2 eine verstärkte Phosphorylierung von mehreren proliferationsfördernden Proteinen, wie MAPK und ErbB3. Lapatinib ist ein dualer Inhibitor für EGFR und ErbB2. Die Inhibition der Rezeptoren reduziert das Zellwachstum bis hin zum Zelltod. Zellen mit Mutationen in ErbB2 besitzen eine ähnliche Ansprechbarkeit gegenüber Lapatinib als der Wildtyp [128]. Bei der Mutante L755S wurde sogar eine Resistenz bezüglich Lapatinib beobachtet [128]. Kombinationen von Lapatinib mit anderen Inhibitoren und Zytostatika erhöhen das Zellsterben von Krebszellen, die ErbB2 Wildtyp überexprimieren [129].

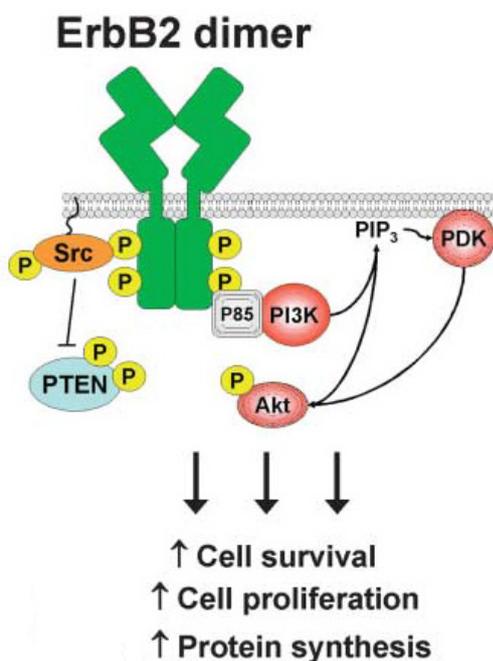


Abbildung 3: Signalweg nach Homodimerisierung von ErbB2 modifiziert nach [126]. Die Dimerisierung von ErbB2 aktiviert die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) über den p85 Adapter. PI3K generiert Phosphatidylinositol-Trisphosphat (PIP₃), welches weiter die Serin-Threonin Proteinkinase Akt direkt oder indirekt über die Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase (PDK) aktiviert. Gleichzeitig aktiviert das ErbB2-Dimer die Tyrosinkinase Src, welche die Translokation von PTEN zur Plasmamembran und somit die Aktivierung von PTEN inhibiert.

Der Rezeptor ErbB3 besitzt eine katalytisch inaktive Tyrosinkinasedomäne, die nur durch die Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren aus der EGFR-Familie aktiviert werden kann [124]. Eine Homodimerisierung führt zu keiner Autophosphorylierung. Die Kombination von ErbB3 mit ErbB1 besitzt eine schwache Aktivität im Vergleich zu den anderen Heterodimeren [130]. Das Heterodimer ErbB2/ErbB3 ist die potenteste onkogene Kombination für die Aktivierung der PI3K/Akt- und Ras/ERK-Signalwege, die die Proliferation und das Überleben der Zellen regulieren (Abbildung 4) [131]. Durch die Dimerisierung von ErbB2 mit ErbB3 wird nach mehreren Schritten ERK unter Bildung von GTP aktiviert. Das aktivierte ERK phosphoryliert wiederum zytoplasmatische und membranständige Substrate. Außerdem wird im Nukleus eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren aktiviert. Dies begünstigt die Proteinsynthese [132]. Die Überexpression sowohl von ErbB2 als auch von ErbB3 erhöht die Wahrscheinlichkeit zur Dimerisierung der beiden Rezeptoren. Durch zusätzliche Mutationen ist ebenfalls eine Hyperaktivierung des Dimers möglich. In diesen Fällen ist eine gesteigerte Zellproliferation vorhanden, was das Risiko der Resistenzbildung erhöht. Die Inaktivierung von ErbB3 in verschiedenen Zelltypen kann Apoptose induzieren. Dies wurde unter anderem in der A2780S Zelllinie beobachtet [133] [134].

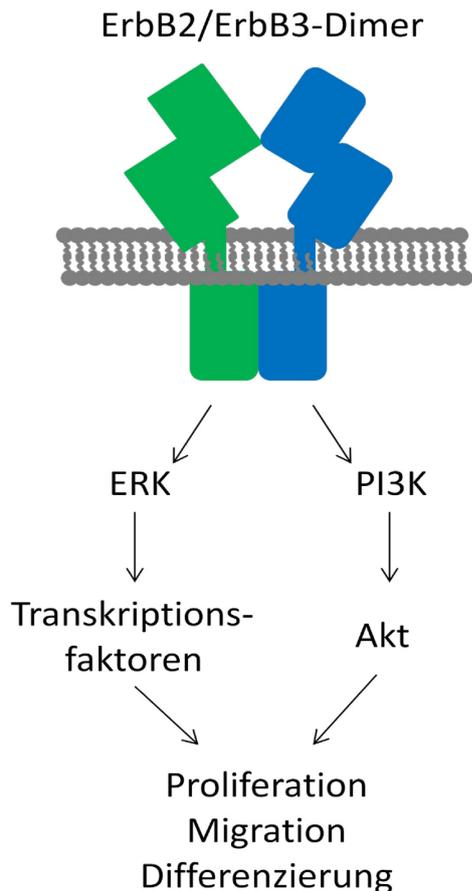


Abbildung 4: Aktivierung verschiedener Signalwege durch das aktive ErbB2/ErbB3-Dimer modifiziert nach [132]. Die Dimerisierung der EGF-Rezeptoren aktiviert ERK1/2, wodurch Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Die Transkriptionsfaktoren regulieren die Zellmigration. Das ErbB2/ErbB3-Dimer induziert weiterhin die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges. Der Signalweg fördert die Zellproliferation und Differenzierung der Zelle.

Die Inhibition der Rezeptor-Tyrosinkinasen deaktiviert die PI3K/Akt-, MAPK- und Src-Signalwege. Um die Aktivität der EGF-Rezeptoren zu inhibieren, können verschiedene Methoden angewendet werden. Eine Möglichkeit ist der Einsatz spezifischer Antikörper, die alleine oder in Kombination mit anderen Zytostatika eingesetzt werden. Die Antikörper, wie Trastuzumab oder Cetuximab, induzieren entweder Inhibitoren, wie den Cyclin-dependent kinase (CDK) Inhibitor, oder fungieren als inhibierende Liganden für die EGF-Rezeptoren [125]. In beiden Fällen wird der Zellzyklusarrest eingeleitet. Erlotinib und Lapatinib sind Inhibitoren der Tyrosinkinasedomäne von Rezeptoren der EGFR-Familie. In Lungenkarzinom ist Erlotinib aktiv für EGFR mit Mutationen, die überwiegend auf das Fehlen von Gensequenz beruhen [135]. Dagegen ist Lapatinib sowohl für den Wildtyp als auch für verschiedene

Mutanten von EGFR aktiv. Zusätzlich ist ErbB2 ein Target für Lapatinib. [125] [128]. Nach der Behandlung mit Erlotinib oder Lapatinib werden durch die Inhibition der EGF-Rezeptoren die Phosphorylierungen von ERK1/2 und Akt reduziert [136] [137]. Das Zellwachstum wird insbesondere in den Zelllinien gehemmt, in denen die Rezeptor-Tyrosinkinasen überexprimiert werden [138].

Die Aggressivität von Krebszellen kann mit deren Migrationspotential charakterisiert werden. Einige Zellen sind stark invasiv, andere migrieren gar nicht. Warum es Zellen möglich ist, in anderes Gewebe zu wandern, hängt unter anderem vom Zytoskelett der Zellen ab [139]. Das Zytoskelett, bestehend aus Mikrotubuli, Actin-Filamenten und Intermediärfilamenten, steht in Verbindung mit dem Nukleusmantel. Die Bestandteile des Zytoskeletts unterstützen die strukturelle Stabilität des Nukleus durch den „Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton“, welcher durch die Nukleus-Membran ins Innere des Zellkerns reicht. Durch die Mikrotubuli-assoziierte Bewegung des Motorproteins Dynein reorientiert sich der Nukleus, was der Zelle ermöglicht, leichter durch die schmalen Poren des Gitters aus Kollagen zu wandern [139]. Die Aktivierung der GTPase Rho durch das Lipoprotein A (LPA) induziert ebenfalls eine Reorientierung des Nukleus [140]. Eine weitere Ursache für Zellmigration ist die Aktivierung von Mitgliedern der EGFR-Familie durch Bindung eines Liganden oder von microRNA [93]. Aktivierte EGF-Rezeptoren initialisieren verschiedene Signalwege mit PI3K, MAPK oder STAT3 (Signal transducer and activator of transcription-3), die verschiedene zelluläre Aktivitäten, wie zum Beispiel die Migration, regulieren [90] [141]. Die Aktivierung von ERK1/2 durch die EGF-Rezeptoren begünstigt die Komplexbildung von ERK und Paxillin [89]. Für die Zellbeweglichkeit sind ebenso PLC γ -1 [142] und Pyk2 [143] relevant, welche ebenfalls mit Paxillin interagieren. Die Inhibition der verschiedenen Wachstumsfaktorrezeptoren unterstützt die Chemotherapie, insbesondere wenn die Krebszellen eine Überexpression an Wachstumsfaktorrezeptoren aufweisen [144].

3.4 Naturstoffe

3.4.1 Naturstoffe als Therapieansatz

Die Natur inspiriert die Forschung für neue Therapiemöglichkeiten gegen verschiedene Krankheiten. Zur Behandlung von Karzinomen werden Naturstoffe entweder allein oder in Kombination mit anderen Zytostatika eingesetzt. Die Naturstoffe können entweder aus verschiedenen Bereichen der Natur gewonnen werden oder nach dem Bauplan, den die Natur vorgibt, synthetisiert werden. Aus Früchten und Pflanzen werden Stoffe, wie Stilben und Flavonoide, extrahiert und ihr Effekt auf die Erhöhung der Sensitivität der Krebszellen gegenüber herkömmlichen Zytostatika getestet. Diese Naturstoffe fungieren entweder als Antioxidantien oder erhöhen signifikant den Spiegel von ROS [145]. Die Antioxidantien inaktivieren ROS, die Schäden in der DNA, in Proteinen und Lipiden verursachen. Durch die Schäden der DNA können Mutationen entstehen, die die Ursache für die Entstehung von malignen Zellen sein können. Die Aufnahme einiger Naturstoffe mit der Nahrung kann das Risiko für die Entstehung von Krebszellen vermindern [146] [147] [148]. Je nach Zelltyp kann eine Erhöhung des ROS-Spiegels von Vorteil sein. Große Mengen an ROS können die DNA so stark beschädigen, dass die Zelle Apoptose einleitet. Einige Naturstoffe, wie Genistein oder Quercetin, beeinflussen die Aufnahme von Glucose durch Inhibition der Glucose Transporter (beispielsweise GLUT1) [149]. Genistein bindet an die extrazelluläre Seite des Transporters GLUT1, wogegen Quercetin an die intrazelluläre Seite bindet [149].

Nicht nur die Pflanzen bieten Wirkstoffe, die für die Forschung gegen Krankheiten geeignet sind, sondern auch Mikroorganismen, die innerhalb der Pflanzen in Symbiose mit ihren Wirten leben. Diese endophytischen Mikroorganismen sind entweder Bakterien oder Pilze, die ebenfalls potenzielle Metaboliten für die Forschung beinhalten [150] [151] [152] [153].

3.4.2 Ellagsäure

Der Naturstoff Ellagsäure (Abbildung 5) ist ein Polyphenol, das in verschiedenen Früchten, wie in Granatapfel oder in Beeren, vorkommt [146]. Biosynthetisch kann es aus Ellagtanninen gebildet werden. Die Tannine werden enzymatisch zu Ellagsäure oder Gallussäure und Glucose umgesetzt [154] [155] [156]. Ein weiterer Weg ist die enzymatische Synthese von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat zur Shikimisäure, die über mehrere Schritte erfolgt. Die Shikimisäure wird anschließend in Gallussäure umgewandelt. Zwei Moleküle der Gallussäure können weiter zur Ellagsäure kondensieren [157].

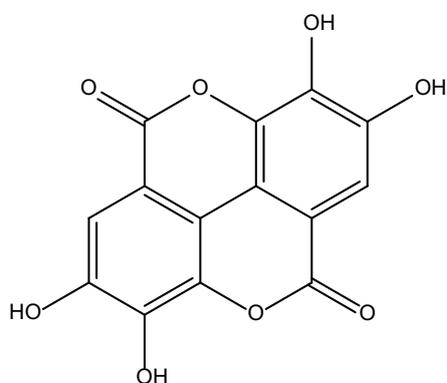
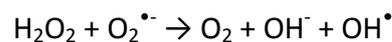


Abbildung 5: Ellagsäure, vorkommend in Früchten.

Ellagsäure beeinflusst in der Zelle verschiedene Signalwege. Wenn es in entsprechend hohen Konzentrationen eingesetzt wird, induziert das Polyphenol *in vitro* einen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase und die Auslösung der Apoptose [146] [158] [159]. Dies kann mit der Regulierung der Expression des IGF-II-Rezeptors (Insulin-like growth factor II) durch Ellagsäure in Zusammenhang stehen [160] [161] [162] [163]. IGF-II ist in der Kolonkarzinom-Zelllinie SW480 hochreguliert und wird oft in verschiedenen Karzinomen bei Kindern beobachtet, wie Wilm's Tumor und Ewing's Sarcoma [160]. Die Überexpression von IGF-II fördert die Proliferation der Krebszellen. In SW480-Zellen wurde die Expression der mRNA von IGF-II, p21 und p53 nach der Behandlung mit Ellagsäure untersucht. Der Tumorsuppressor p53 hat in diesen Zellen einen Gendefekt. Der Wildtyp von p53 aktiviert p21, was weiterhin die DNA-Replikation inhibiert und die Zellen in der G₁-Phase arretieren lässt. Dabei wird die Cyclin-abhängige Kinase-2 (CDK2) von p21 inhibiert [164]. Die Behandlung mit Ellagsäure erhöhte die Expression der mRNA von p21 und verringerte die

Expression der mRNA von IGF-II. Die Expression von mRNA von p53 wurde moderat verändert [160]. Die Regulierung der mRNA-Expression von p21 durch Ellagsäure wurde ebenfalls in der Zelllinie T24 (Blasenkarzinom) und in verschiedenen Karzinomen, die in der Mundhöhle vorkommen (beispielsweise Cal27), beobachtet [147] [162]. Eine Erhöhung der Expression von p53 und p21 und die daraus resultierende Arretierung des Zellzyklus leiten die Apoptose ein. Dies erfolgt ebenfalls nach irreversibler DNA-Schädigung [165] [166]. Die orale Aufnahme von Ellagsäure schützt vor der Toxizität des Alkoholkonsums. Die Aktivität von Enzymmarker in der Leber (γ -Glutamyltransferase und Alkalinphosphatase) sowie von Marker von Lipidperoxidation (TBARS (Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen)) wurde gesenkt. Zudem wurde die antioxidative Kaskade, bestehend aus Glutathion und Superoxiddismutase, hochreguliert [167]. Ellagsäure inhibiert die Substanz-induzierte Bildung von ROS [168] und verringert das basale ROS-Level in den Zellen (Abbildung 6) [159]. Somit wirkt es, wie das bekannte Vitamin C, antioxidativ [169]. In HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) wurde beobachtet, dass oxLDL (oxidized low-density lipoprotein) die ROS-Produktion induziert. Außerdem aktiviert oxLDL NF- κ B (nuclear transcription factor κ B), akkumuliert intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen, dephosphoryliert Akt und eNOS (endothelial nitric oxide synthase) und reduziert das mitochondriale transmembrane Potential. In der Membran der Mitochondrien öffnen sich Poren, durch die Cytochrom c ins Zytoplasma gelangt und schließlich die Aktivierung der Caspase 3 zur Folge hat [168]. Ellagsäure aktiviert den PI3K/Akt/eNOS-Weg, sodass eNOS NO produziert. NO fängt das Superoxidanion ab und vermindert die Zellschädigung [168]. NF- κ B befindet sich im Zytoplasma, wo es durch verschiedene Faktoren, wie freie Radikale und Karzinogenen, aktiviert wird [170]. Das aktivierte NF- κ B wandert in den Nukleus, wo es die Expression von verschiedenen Genen induziert. Dazu gehören Bcl-2, Bcl-xL, VEGF und cIAP. Diese Faktoren unterdrücken die Apoptose und fördern die Proliferation, Metastasierung und Chemoresistenz. Ellagsäure inhibiert die Aktivierung von NF- κ B und dessen Translokation in den Nukleus [170]. In HeLa-Krebszellen, die mit Ellagsäure und γ -Strahlen behandelt wurden, wurde eine erhöhte Superoxid-Produktion und p53-Expression beobachtet. Zudem wurde der Spiegel an antioxidativen Enzymen gesenkt [148]. In Kombination mit anderen Naturstoffen, Resveratrol oder Quercetin, induziert Ellagsäure in den humanen Läkemiezellen MOLT-4 vermehrt Apoptose [158].

Durch die Atmungskette der Mitochondrien werden in aeroben Organismen ROS gebildet. Dabei wird über mehreren Stufen ein Elektron vom Sauerstoff zu anderen reaktiven Zwischenverbindungen übertragen und der Sauerstoff unter Energiegewinnung zu Wasser reduziert [171] [172]. Im Komplex III der Atmungskette wird Ubichinon von der NADH-Ubichinon-Reduktase-Untereinheit durch Elektronen-Übertragung zum Ubichinol reduziert. Dieses überträgt Elektronen auf Cytochrom c, wodurch Superoxidradikalanionen entstehen [172] [173]. Das Superoxidradikalanion wird von der Superoxiddismutase zu dem stabileren Wasserstoffperoxid umgewandelt, welches wiederum in einer Fenton-Reaktion mit Metallionen zu Hydroxylradikalen oxidiert wird. In einer Haber-Weiss-Reaktion reagiert das Superoxidradikalanion mit Wasserstoffperoxid katalytisch zu Wasser und Sauerstoff.



ROS wirken schädlich auf den Organismus, wenn das physiologische Gleichgewicht zwischen der Produktion und dem Abbau von ROS zugunsten der Produktion verschoben ist. Die Zellen geraten in oxidativen Stress [175] [176]. Die exogene Entstehung von ROS wird durch Strahlungen, Hitze oder metallkatalysierte Reaktionen verursacht. Die Metallverbindungen, wie z.B. Eisen(II/III)- und Kupfer(II)-Verbindungen, werden zu reaktiven elektrophilen Verbindungen metabolisiert, welche ROS generieren [177]. Dabei können neben dem Superoxidanion auch Singulett-Sauerstoff Spezies (O^\bullet), Hydroxylradikale (OH^\bullet), Peroxyradikale (ROO^\bullet) und Stickstoffmonoxidradikale (NO^\bullet) entstehen [148]. Diese können mit der DNA, mit Proteinen und mit Lipiden reagieren. Die Peroxidation von Lipiden kann zu intramolekulare Zyklisierungsreaktionen führen, bei der das Malondialdehyd (MDA) entsteht. MDA reagiert weiter mit den Basen Adenin, Cytosin und Guanin der DNA. Außerdem kann es zum Cross-linking zwischen den Lipiden kommen und die Viskosität innerhalb der Zelle erhöht sich [148]. Die Radikalfänger Vitamin C, Vitamin E und Glutathion fördern in Zusammenarbeit mit den Enzymen Katalase, Peroxidase und Superoxiddismutase den Abbau von ROS und dadurch die Reparatur der geschädigten DNA [169] [178] [179].

Durch ROS verursachte Schäden der DNA, wie Strangbrüche oder oxidativ generierte, angehäufte DNA Läsionen können zu Mutationen führen [172]. In einem Leberzellkarzinom induzieren ROS die Methylierung von CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin)-Insel II des Cadherin- und Catalase-Promotors, was die Expression von Tumorsuppressoren inaktiviert [180]. Die induzierte Hypermethylierung der DNA durch Wasserstoffperoxid führt zur Aktivierung von ErbB2 und ErbB3, was wiederum das Zellwachstum des Karzinoms induziert [181]. Zudem wird die Expression der DNA Methyltransferase I durch Wasserstoffperoxid hochreguliert und sowohl die Expression als auch die Aktivierung der Histondeacetylase 1 (HDAC1) erhöht [182] [183]. Histondeacetylasen deacetylieren Lysinreste im Histon an der ϵ -Amino-Gruppe. Als Gegenspieler überträgt die Histon-Acetyltransferase (HAT) einen Acetylrest auf den N-Terminus des Histons. Durch die Abspaltung des Acetylrestes durch HDAC wird Histon positiv geladen und hat eine erhöhte Affinität zu dem negativ geladenen Phosphatgerüst der DNA. Die Bindung des Histons an der DNA behindert die Bindung von Transkriptionsfaktoren und die DNA-Transkription wird herunter reguliert [184]. In normalen Zellen schützt Ellagäure die Zelle vor Schäden, verursacht durch ROS. In Krebszellen, die mit ionisierender Strahlung behandelt wurden, steigt der Spiegel von ROS. In Kombination mit Ellagsäure wird dieser Level durch die Reduzierung der Superoxiddismutase, der Katalase und von Glutathion erhöht [148].

Die Zellproliferation und -migration, welche durch VEGF in HUVECs stimuliert wurden, werden durch die Behandlung von Ellagsäure herunter reguliert [185] [186]. Außerdem wird die Kinase-Aktivität von VEGFR-2 inhibiert, indem Ellagsäure an die ATP-Bindestelle bindet [186]. Das Polyphenol inhibiert die VEGF-stimulierte Phosphorylierung von ERK, die Proliferation und die Schlauchbildung der HUVECs [186]. In Mäusen wurde die Verbreitung der Krebsmasse von MDA-MB-231 Zellen *in vivo* unterdrückt [186].

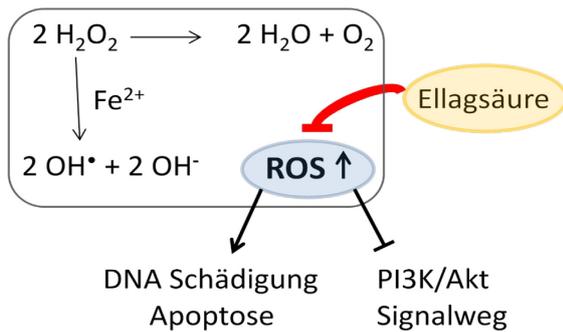


Abbildung 6: Inhibition der ROS-Entwicklung durch Ellagsäure modifiziert nach [168]. Ein hoher Spiegel an ROS hemmt den PI3K/Akt Signalweg und schädigt die DNA. Ellagsäure verringert den oxidativen Stress durch Inhibition von oxLDL und vermindert das Apoptose-Risiko durch ROS in HUVECs.

3.4.3 Resveratrol

Ein weiterer, in roten Früchten vorkommender Naturstoff ist Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben) (Abbildung 7) [187]. Resveratrol wird aus Hydroxyzimtsäure und Malonyl-CoA enzymatisch biosynthetisiert [188]. Zunächst wird Phenylalanin über die Phenylalanin-Lipase zu Zimtsäure umgewandelt, welche weiter zu Hydroxyzimtsäure umgewandelt wird. Anschließend transformiert die Hydroxyzimtsäure-Coenzym A Ligase die Hydroxyzimtsäure in Hydroxyzimtsäure-CoA. Folgend kondensiert die Stilbensynthase drei Malonyl-CoA-Moleküle mit dem Hydroxyzimtsäure-CoA. Nach der Ringbildung der Malonyl-Reste entsteht das Resveratrol [157] [189].

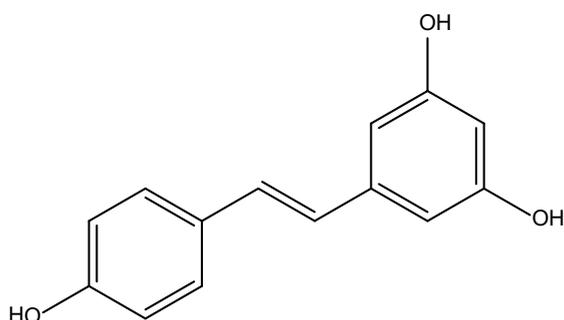


Abbildung 7: Resveratrol, unter anderem in roten Trauben vorkommend.

In der Literatur wird beschrieben, dass Resveratrol in entsprechenden hohen Konzentrationen in Krebszellen *in vitro* Apoptose auslöst [158] [182] [190] [191] [192] [193].

Eine Ursache dafür ist die Bildung von ROS [194]. Zusätzlich kann Resveratrol die Sensitivität gegenüber Zytostatika erhöhen, insbesondere wenn die Karzinome bereits resistent gegenüber dem eingesetzten Zytostatikum sind [193] [195]. Die Behandlung mit Resveratrol reguliert viele verschiedene Signalwege. Die Sekretion und der extrazelluläre Spiegel von VEGFR werden herunter reguliert. Zudem wird die Phosphorylierung von ERK1 (p44 MAPK) und ERK2 (p42 MAPK) reduziert [21] [190]. ERK1 und ERK2 werden von mitogenen Rezeptoren, wie dem EGFR oder dem IGFR, aktiviert und fördern das Zellwachstum, die Angiogenese [196] [197] und die Migration (Abbildung 8). In verschiedenen Zelllinien von Ovarial- und Mammakarzinomen sowie von Gebärmutterhals- und Knochenkrebs als auch von Neuroblastomzellen wurde die Inhibition der Akt-Phosphorylierung an Ser473 durch das Stilbenderivat beobachtet. Im Gegensatz dazu wird die Expression von p21 und p53 hoch reguliert und die Zellmigration inhibiert [187] [198]. Außerdem wird Resveratrol in Zusammenhang mit Zellzyklusarrest gebracht. Verschiedene Literaturstellen besagen, dass der Naturstoff die Krebszellen in der G₁-Phase (Hep G2 Leberkrebszellen) [199], in der S-Phase (Ovcar-3, PA-1, SKOV-3, CaOv-4 Ovarialkarzinomzellen) [200] [201] [202] oder in der G₂/M-Phase verharren lässt (HT29 Kolonkarzinomzellen) [203]. In vaskulären glatten Muskelzellen induziert Resveratrol einen G₁-Phasenarrest [204]. Dies scheint abhängig vom jeweiligen Zelltyp zu sein. Der Zellzyklusarrest wird durch die Hemmung der Cyclin D1-Aktivität und der CDK-Aktivität hervorgerufen [170]. Die Apoptosefaktoren, wie Bax und Caspasen, werden nach der Behandlung mit Resveratrol aktiviert [170]. In humanen Leukämiezellen (CEM) wurde beobachtet, dass der Naturstoff die Bildung von mitochondrialen Superoxiden induziert und somit die Zellviabilität negativ beeinflusst [205]. TNF ist ein Wachstumsfaktor in den meisten Karzinomen, wie Ovarial-, Mamma- und Nierenkarzinomen sowie in akuter myeloischer Leukämie [170]. Dieser aktiviert NF-κB, was die Expression von COX-2 (Cyclooxygenase-2) und iNOS (inducible nitric oxide synthase) anregt. Die Expression von COX-2 wird von Wachstumsfaktoren reguliert. Das Enzym wandelt Arachidonsäure zu Prostaglandin um. Resveratrol inhibiert die Aktivierung von TNF und somit das Wachstum der Krebszellen [170]. Bei der MAPK-Kaskade aktiviert MAP3K das Enzym MAP2K. Dieses aktiviert weiterhin entweder ERK, JNK (c-Jun N-terminal kinase) oder p38, die weiterhin NF-κB aktivieren. Resveratrol moduliert den MAPKinase-Weg und verhindert das Zellüberleben [170].

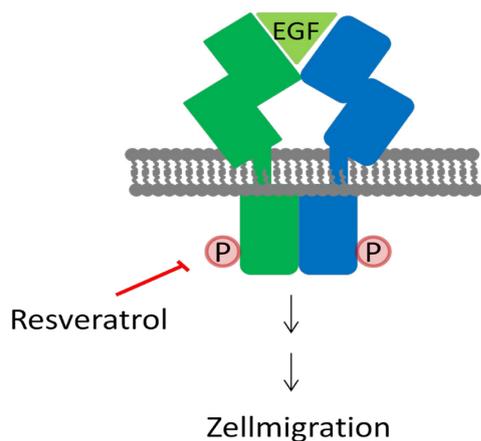


Abbildung 8: Inhibition der Zellmigration durch Resveratrol modifiziert nach [206]. Die Aktivierung der EGF-Rezeptoren durch ihren Liganden EGF kann durch Resveratrol inhibiert werden. Somit wird die Migration der Zellen gehemmt.

3.4.4 Phomoxanthon A

Isaka et al. isolierten aus den endophytischen Fungi *Phomopsis* Spezies das Phomoxanthon A (Abbildung 9) [207]. Die Struktur wird als Dimer von zwei identischen Tetrahydroxanthanon-Derivaten beschrieben [208]. Das Phomoxanthon A wird biosynthetisch aus Polyketiden hergestellt, welche wiederum aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA enzymatisch aufgebaut werden. Durch Zyklisierungsreaktionen innerhalb des Polyketids wird das Anthrachinon gebildet, welches nach weiteren Schritten in ein Xanthon-Derivat umgewandelt wird. Anschließend dimerisiert das Derivat zum Phomoxanthon A [209].

Charakteristisch für die Substanz ist die signifikante Aktivität gegenüber dem multi-drug resistenten (MDR) Parasit *Plasmodium falciparum*, der Krankheitserreger der Malaria tropica ist. Außerdem ist die Substanz toxisch für die Krebszelllinien KB (epidermales Karzinom aus dem Mund) und BC-1 (malignes Lymphom) sowie für Leukämiezellen aus der Maus [210]. Elsässer et al. beobachteten eine hohe toxische Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien [211]. Die Substanz zeigt großes Potenzial für die Krebstherapie.

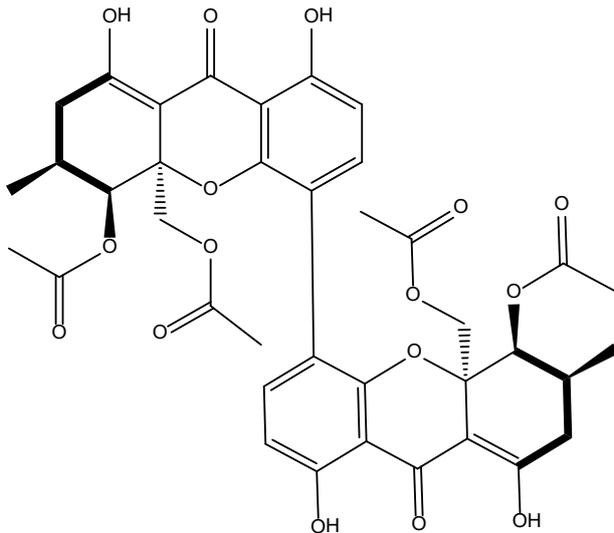


Abbildung 9: Phomoxanthon A aus dem endophytischen Fungus *Phomopsis longicolla*.

Proksch et al. isolierten das Tetrahydroxanthanon-Dimer aus dem endophytischen Pilz *Phomopsis longicolla*. Die Substanz wurde an verschiedenen Karzinomzelllinien, wie kolorektales Karzinom, Bronchial-, Ösophagus-, Zungen- und Ovarialkarzinom, und an PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) auf ihre Toxizität untersucht. Konzentrationen im mikromolaren Bereich sind ausreichend, um in den Zellen Apoptose zu induzieren [153]. Die Substanz ist im Vergleich zu platinhaltigen Zytostatika toxischer für Krebszellen und ist äquipotent an cisplatin-sensitiven und -resistenten Zellpaaren.

3.4.5 Embellicin A und Embellicin B

Aus dem endophytischen Fungus *Embellisia eureka* wurden die Metabolite Embellicin A und Embellicin B isoliert [152]. Die Strukturen leiten sich von den bekannten Antibiotika Pyrrocidin A und B ab. Die Pyrrocidine bestehen aus einem Pyrrolidinon-Derivat, an das ein Phenylrest und ein trizyklischer Kern gebunden sind. Die beiden Substanzen weisen antibiotische Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien auf [212] [213]. Die Strukturen von Embellicin A und B besitzen anstelle eines trizyklischen einen tetrazyklischen Kern (Abbildung 10). Die Substanzen werden wahrscheinlich aus Aminosäuren und Polyketiden biosynthetisiert [212]. Zunächst werden Acetyl-CoA und Malonyl-CoA durch die Polyketid-

Synthese zu Polyketiden enzymatisch umgesetzt. Das an der „non ribosomal peptide synthase“ gebundene Tyrosin wird über eine nukleophile Substitution auf das Polyketid übertragen. Durch anschließende Zyklisierung der Aminosäure mit dem Polyketid entsteht der Pyrrolidinon-Baustein. Intramolekulare Diels-Alder Reaktionen wandeln den Polyketid-Rest in den polyzyklischen Kern um und das Phenol bindet durch elektrophile Zyklisierung an das Polyketid [214].

Die Substanzen sind in nano- bzw. mikromolaren Konzentrationen zytotoxisch gegenüber verschiedenen Krebszelllinien, wogegen nicht maligne PBMCs weniger sensitiv auf Embellicin B reagieren. Zudem wird die TNF α -induzierte NF- κ B Aktivität und die Proliferation in den Leukämiezellen K562 durch den Einsatz von geringen Konzentrationen inhibiert. Embellicin B ist über einen längeren Zeitraum nicht stabil. In der Substanz liegt eine sechs-gliedrige Konformation vor, die eine intramolekulare Dehydratation ermöglicht. Nach Abspaltung des Wassers entsteht das Embellicin A [152]. Embellicin A erreicht nicht dieselbe Zytotoxizität wie Embellicin B. Die Doppelbindung im Pyrrolidon-Ring in Embellicin A könnte als Michael-Akzeptor fungieren, allerdings erhöhen wahrscheinlich die Hydroxylgruppen in Embellicin B die Affinität der Substanz zum Target entweder durch die Bildung von Wasserstoffbrücken oder durch Dehydratations-Reaktionen mit dem Target.

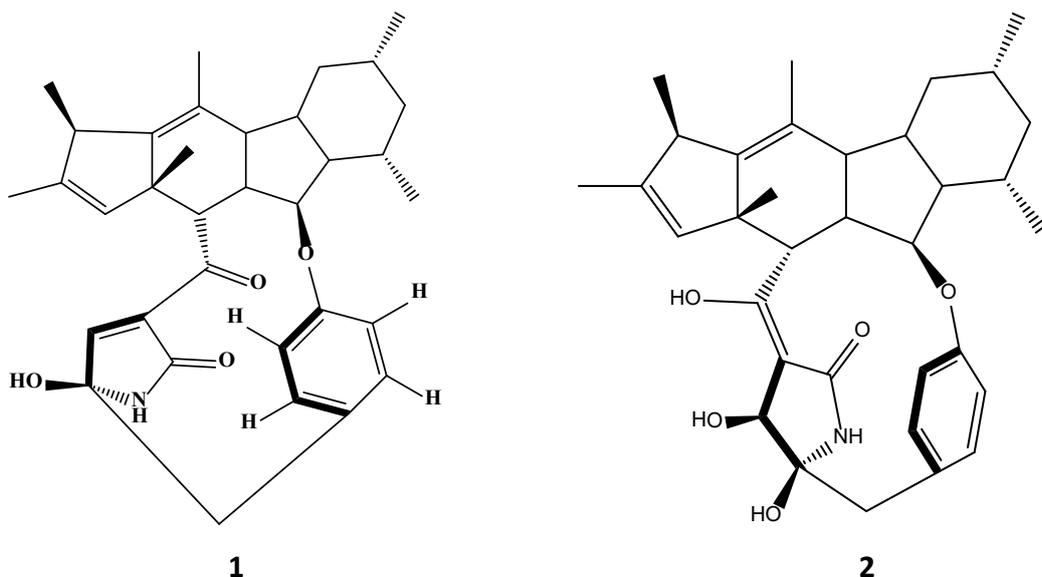


Abbildung 10: Embellicin A (1) und Embellicin B (2) aus dem endophytischen Fungus *Embellisia eureka*.

4 Zielsetzung der Arbeit

4.1 Untersuchung der Cisplatinresistenz

Ziel dieser Arbeit war es, die verschiedenen Aspekte der Cisplatinresistenz zu untersuchen. Dabei sollte das Verhalten verschiedener cisplatinempfindlicher und -resistenter Krebszelllinien, wie Mamma-, Ovarial-, Ösophagus-, Zungen-, Kolonkarzinom und chronisch myeloische Leukämiezellen, auf Naturstoffe in Kombination mit Cisplatin erforscht werden. Außerdem sollte die Wirkungsweise verschiedener Naturstoffe untersucht werden.

4.1.1 Inhibition der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin in der Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780 durch den Einsatz der Naturstoffe Ellagsäure und Resveratrol

Schädigungen oder Mutationen in der DNA und in Proteinen können den Metabolismus gesunder Zellen verändern, sodass maligne Zellen entstehen können. Für die Behandlung dieser Krebszellen kommen Strahlen- und Chemotherapie sowie operative Eingriffe in Betracht. In manchen Fällen entwickelt die Krebszelle jedoch Resistenzen gegenüber den eingesetzten Wirkstoffen, beispielsweise Cisplatin.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Naturstoffe Ellagsäure und Resveratrol auf die Cisplatinempfindlichkeit der Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780CisR untersucht werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob das Auftreten einer Resistenz in der A2780-Zelllinie durch die dauerhafte Anwesenheit der Naturstoffe verhindert werden kann. Die Zellen wurden dafür permanent mit Ellagsäure bzw. Resveratrol kultiviert und regelmäßig, analog zu der Generierung der cisplatinresistenten Subzelllinie A2780CisR, mit Cisplatin behandelt.

4.1.2 Überwindung der Cisplatinresistenz in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231CisR durch Verringerung der Expression des glykolytischen Enzyms PGK1

Ein Charakteristikum von malignen Zellen ist die Schädigung der Atmungskette in den Mitochondrien (Warburg Effekt). Da unter hypoxischen Bedingungen die aerobe Energiegewinnung reduziert ist, wird die anaerobe Energieproduktion hochreguliert, bei der für die ATP-Produktion die Glucose überwiegend in Lactat umgewandelt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von PGK1 in Mammakarzinom-Zelllinien betrachtet und durch molekular-biologische Methoden reduziert. Außerdem wurde die Aktivität der Glykolyse und der Atmungskette durch bekannte Inhibitoren gehemmt. Die Auswirkungen der Inhibition des Energiestoffwechsels auf die Cisplatinsensitivität der Zellen sollte untersucht werden.

4.1.3 Apoptoseauslösung in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780CisR mit dem Tetrahydroxanthenon-Dimer Phomoxanthon A und den Alkaloiden Embellicin A und Embellicin B

Das Zytostatikum cis-Diammindichloridoplatin(II) (Cisplatin) wird in der Zelle nach Austausch der Chloridoliganden durch Wasser aktiviert und führt anschließend zu einer Quervernetzung der DNA. Die Zellen arretieren in der S- und der G₂/M-Phase, wodurch die Zellteilung inhibiert wird. Wenn die DNA nicht repariert werden kann, induziert die Zelle anschließend Apoptose.

Die Bioaktivität des endophytischen Tetrahydroxanthenon-Dimers Phomoxanthon A und der endophytischen Alkaloide Embellicin A und Embellicin B wurde an ausgewählte Krebszelllinien untersucht [153] [152]. Neben den toxischen Effekten der Naturstoffe an verschiedenen cisplatinsensitiven und -resistenten Krebszelllinien (Mamma-, Ovarial-, Ösophagus- und Zungenkarzinom) sollte der Wirkmechanismus betrachtet werden. Die Auslösung von Apoptose und Arretierung des Zellzyklus wurden mit dem Mechanismus von Cisplatin verglichen. Zudem sollte untersucht werden, ob die Substanz-induzierte Apoptose die Caspase-Kaskade mit einschließt.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Reagenzien, Chemikalien und Medien

In dieser Arbeit verwendete Reagenzien, Chemikalien und Medien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Nährmedien.

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Merck KgaA, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampuwa® (Aqua ad injectabilia)	AlleMan Pharma GmbH, Pfullingen
Aprotinin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
3-Brompyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau-Natriumsalz	ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt a. M.
BSA	AppliChem, Darmstadt
Buffer RLT	QIAGEN, Hilden
Calciumchlorid-Dihydrat	KMF Laborchemie, Leipzig
Cisplatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2'-7'-Dihydrodichlorofluorescein-diacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO), p.a.	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Dnase-freie Rnase A	Thermo Scientific, Rockford, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Ellagsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Eosin B (C.I. 45400)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol AnalAR NORMAPUR	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Fetales Kälberserum	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
D-Glucose-Monohydrat Riedel-de Haën	Sigma-Aldrich, Steinheim

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Glycerin ROTIPURAN® ≥ 99,5%, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycerol wasserfrei, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Helipur®	B Braun Melsungen AG, Melsungen
HEPES (freie Säure)	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol, techn.	Abfüllung Zentrales Chemikalienlager HHU
Kaliumchlorid AnalaR NORMAPUR	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin Hemisulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen™/life Technologies GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
2-Mercaptoetanol 99%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol, techn.	Abfüllung Zentrales Chemikalienlager HHU
Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
N-Acetylcystein	Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel
Natriumchlorid AnalaR NORMAPUR	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Natriumchlorid-Lösung 0,9% (isotonisch)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Natriumcitrat tribasisch Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat AnalaR NORMAPUR	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat NORMAPUR analytical reagent	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Natriumhydroxid	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oligo(dT)23 anchored Primer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Opti-MEM [®] I Reduced Serum Medium	life technologies GmbH, Darmstadt
Oregon Green [®] 488 BAPTA-1, AM	life technologies GmbH, Darmstadt
Paclitaxel (Taxol)	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
PageRuler [™] , vorgefärbte Proteinleiter	Fermentas, St. Leon Rot
PageRuler [™] , vorgefärbte Proteinleiter	Thermo Scientific, Rockford, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung [10.000 U/ml; 10 mg/ml]	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Pepstatin A	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pierce [®] BCA Protein Assay Reagents	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pluronic [®] F-127	Sigma-Aldrich, Steinheim
Power SYBR [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Warrington, UK
Propidiumiodid	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Q-VD-Oph Hydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reinstwasser (Aqua bidestillata)	Eigene Herstellung
Resveratrol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure 37% AnalaR NORMAPUR	VWR [®] BDH PROLABO [®] , Darmstadt
SDS Ultra pure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Steriles Reinstwasser	Bidestilliertes Wasser autoklaviert
20X TE Buffer	Molecular Probes [™] Invitrogen detection technologies, Leiden, Niederlande
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
Triton [®] X-100	AppliChem, Darmstadt
Trypsin-EDTA Lösung 1x	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30% p.a.	AppliChem, Darmstadt
Western Blotting Luminol Reagents	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

5.1.2 Kits

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Reagenzienkits bzw. Bestandteile aus den Kits aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Reagenzienkits.

Kit/Kit-Bestandteil	Hersteller
Annexin V Apoptosis Detection Kit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
ATP Determination Kit	Molecular Probes™ Invitrogen detection technologies, Leiden, Niederlande
Caspase-Glo® 8 Assay	Promega, Madison, WI, USA
Caspase-Glo® 9 Assay	Promega, Madison, WI, USA
High Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Warrington, UK
Lysispuffer No. 6 aus Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array Kit	R&D Systems, Wiesbaden
my-Budget RNA Mini Kit	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
Proteome Profiler™ Antibody Array Human Apoptosis Array Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Proteome Profiler™ Antibody Array Human Phospho-Kinase Array Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Proteome Profiler™ Array Human Phospho- RTK Array Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Rnase-free Dnase Set	QIAGEN, Hilden

5.1.3 Antikörper

Nachfolgend sind die im Western Blot verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnung aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Goat Anti-EGFR	R&D Systems, Wiesbaden	1:250
Goat Anti-ErbB2	R&D Systems, Wiesbaden	1:500
Goat Anti-ErbB3	R&D Systems, Wiesbaden	1:100
Goat Anti-PGK1 (Y-12)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:500
Mouse Anti- β -Actin (C4)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:2000
Rabbit Anti-phospho-EGFR	R&D Systems, Wiesbaden	1:250
Rabbit Anti-phospho-ErbB2	R&D Systems, Wiesbaden	1:100
Rabbit Anti-phospho-ErbB3	R&D Systems, Wiesbaden	1:200
Sekundärantikörper		
Hersteller	Verdünnung	
Anti-goat IgG-HRP	R&D Systems, Wiesbaden	1:3000
Anti-mouse IgG-HRP	R&D Systems, Wiesbaden	1:3000
Anti-rabbit IgG-HRP	R&D Systems, Wiesbaden	1:3000

5.1.4 Verbrauchsmaterialien

Folgende Materialien wurden während dieser Arbeit benutzt.

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmateriel	Hersteller
Adhäsive qPCR Folie	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
BD Discardit™ II Spritzen 2 ml	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
Biosphere® Pipettenspitzen mit Aerosolfilter 10 µl 100 µl 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cell Scraper	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Chromatography Paper	Whatman® International Ltd, Maldstone, UK
Costar® Cell Culture Plate 96-well	Corning Inc., Corning, USA
Immobilon®-P Transfer Membrane	Millipore Corporation, Billerica, USA
Kryoröhrchen Cryo Pure	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Micro Clear Platte, Kaminform, 96K, weiß, -TC-	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR-Reaktionsgefäße MicroAmp Tubes 0,2 ml	Applied Biosystems/Applera, Darmstadt
Petrischalen	Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen 10 µl 200 µl 1000 µl 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Kapillare für Gelbeladung	VWR, Darmstadt
PP-Microplatte weiß, 96K	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Verbrauchsmateriel	Hersteller
PP-Röhre 15 ml 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhren 3,5 ml, 55 x 12 mm, PS	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterile Einmalpipetten 10 ml	VWR, Darmstadt
Sterilfilter aus Celluloseacetat 0,2 µm	VWR, Darmstadt
Thermofast® PCR Platten AB-0700 weiß	Abgene®/Thermo Scientific, Epsom, UK
Tissue Culture Flask T25 T75 T175	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Tissue Culture Plate 24-well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Tissue Culture Plate 6-well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
96 Well Multiply®-PCR Plate clear, Halbrand	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

5.1.5 Primer

In der folgenden Tabelle sind die Sequenzen der verwendeten Primer für die qPCR (quantitative polymerase chain reaction) aufgeführt. Als Housekeeper Gene wurden für die Experimente β -Actin (ACTB) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT1) ausgewählt.

Tabelle 5: Sequenzen der in der qPCR-Experimenten verwendeten Primer. *entworfen bei Primer-BLAST (NCBI). **vgl. Dissertation S. Eberle [85], *** vgl. [215].

Primer für qPCR		Sequenz 5'→3'
PGK1*	forward	GCTGGCTGGATGGGCTTGGAC
	reverse	CCCCACAGGACCATTCCACAC
ACTB**	forward	GACTTCGAGCAAGAGGATGG
	reverse	GCACTGTGTTGGCGTACAG
HPRT1***	forward	CTGGCGTCGTGATTAGTG
	reverse	CACACAGAGGGCTACAATG

5.1.6 Plasmide

Nachfolgend sind die eingebauten Sequenzen der verwendeten SureSilencing™ shRNA Plasmide (SABiosciences/Qiagen, Hilden) aufgelistet, welche zur Transfektion herangezogen wurden. Es wurden vier verschiedene shRNA Ids separat zur Inhibition der PGK1 mRNA Expression in den Experimenten eingesetzt. Die Sequenz des Leervektors, der als Negativ-Kontrolle (NC) dient, wurde in Kleinbuchstaben gehalten. Alle Plasmide enthalten die Sequenz für Ampicillin- und Neomycin-Resistenz und verwenden außerdem einen U1 Promotor, um die Expression der shRNA sicherzustellen.

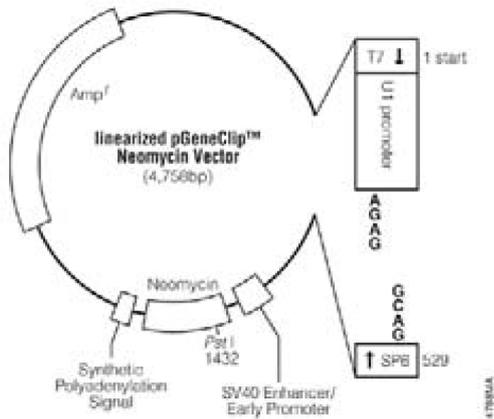


Abbildung 11: Schematische Darstellung des SureSilencing™ Vektors mit integrierter U1 Promotor Funktion.

Quelle: Handbuch von Qiagen „SureSilencing shRNA Plasmids“ (www.sabioscience.com/manuals/RNAi.pdf)

Copyright © 2000 – 2012 SABiosciences, a Qiagen company)

Tabelle 6: Eingebaute Sequenz der shRNA in den Plasmiden für die Inhibition der Expression von PGK1 RNA.

Clone ID	Eingebaute Sequenz 5'→3'
1	AGATCCAGCTCATCAATAATA
2	GGCTAAGCAGATTGTGTGGAA
3	CAGCTCCATGGTAGGAGTCAA
4	GCCTGACAAGTACTCCTTAGA
NC	Ggaatctcattcgatgcatac

5.1.7 Geräte

Folgende Geräte wurden für die entsprechenden Experimenten genutzt.

Tabelle 7: Verwendete Gerätschaften und Zubehör.

Gerät	Hersteller
Heizblock AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet International Inc., Edison, USA
Autoclac Systec V-65	Systec GmbH, Wettengel
Blottingapparatur Semi-Dry-Blotter	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Blottingapparatur Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
C1000™ Thermal Cycler mit CFX96® Real-Time-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Durchflusszytometer CyFlow space	Partec GmbH, Münster
Feinwaage ABS 220-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommen
Feinwaage BP 221S	Sartorius AG, Göttingen
Gelelektrophoresekammer Bio-Rad MINI-SUB® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NanoPhotometer P300	Implen GmbH, München
Inkubator Heraeus® Function-line	Heraeus®/Thermo Electron Corporation, Dreieich
Laminar air flow Werkbank MSC-advantage	Thermo Scientific, Dreieich
Laminar air flow Werkbank Hera Safe	Heraeus®/Thermo Electron Corporation, Dreieich
Magnetrührer IKA® RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Microplate-Reader FLUOstar	BMG Labtechnologies, Offenburg
Microplate-Reader LUMIstar	BMG Labtechnologies, Offenburg
Microplate-Reader NOVOstar	BMG Labtechnologies, Offenburg
Mikroskop Primo Vert	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Motic® AE 20/21 Inverted Microscope	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar
NanoKüvette IMPLLEN	Implen GmbH, München

Gerät	Hersteller
Neubauerzählkammer	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg
Orbitalschüttler TH30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
PCR-Cycler Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Werkbank	BIO-FLOW Technik, Meckenheim
pH-Meter 713	Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt
Roller mixer SRT6	Bibby Scientific LTD, Stone (Staffordshire),UK
Schwenker Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwalbach
Spannungsquellen: Power Pack 3000 Standard Power Pack P25	Bio-Rad Laboratories GmbH, München Biometra GmbH, Göttingen
Trockenschrank	Heraeus Instrument GmbH, Hanau
Ultraschallbad Sonorex Super RK514BH	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV-Vis-Spektrometer Spectronic Genesys 10 Bio	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Waage SBA52	SCALTEC Instruments, Heiligenstadt
Wasserbad mit Heizelement Julabo 19/ED	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach
Western Blot-Detektionssystem INTAS ChemiLux ECL Imager HR16 Pro	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Zentrifugen: MIKRO 200R ROTINA 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifugiergefäße	Beckmann, Brea, USA

5.1.8 Programme und Software

Folgende Programme wurden für die Detektion und die Auswertung der erhobenen Daten verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Auswertungs- und Detektionsprogramme.

Programm	Hersteller
CFX Manager Software 1.5	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
FloMax 2.7 und 2.82	Partec GmbH, Münster
GraphPad Prism® 4.03	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ V1.47h	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
INTAS ChemoStar	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Office Word 2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Picture it!® Foto Premium V10.0.612.0	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Motic Images Plus 2.0	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar

5.2 Puffer und Lösungen

5.2.1 Zellkultur

Eosin-Lösung 0,4% (m/V) zur Zellzahlbestimmung

60 mg Eosin wurden in 15 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9% (m/V) gelöst. Die Lösung wurde bei 2-8°C gelagert.

PBS^(-/)

Zum Waschen der Zellen wurde Ca²⁺- und Mg²⁺-freier PBS-Puffer verwendet.

NaCl	1,4 M
KCl	30 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	80 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM

Die Salze wurden in Aqua bidest. gelöst und anschließend autoklaviert.

Nährmedien

DMEM bzw. RPMI 1640 wurden je nach Zelllinie mit 10% oder 15% FKS versetzt, welches zuvor bei 56°C für zwei Stunden inaktiviert wurde. Den Nährmedien wurden außerdem 120 U/ml Penicillin und 120 µg/ml Streptomycin zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C. Für die Experimente am Durchflusszytometer wurde phenolrotfreies Nährmedium ohne Zusatz von Antibiotika verwendet. Die Nährmedien wurden von PAN Biotech bezogen.

5.2.2 Bakterienkultur

Ampicillin-Lösung

500 mg Ampicillin wurden in 10 ml Aqua bidest. gelöst und durch einem Filter mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

LB-Agar-Platten

Agar	0,7 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl	1 g
Trypton	1 g

Die Substanzen wurden ad 100 ml Aqua bidest. gelöst und hiernach autoklaviert. Nachdem die Lösung auf 40°C abgekühlt war, wurden final 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Anschließend wurden die Petrischalen mit dem Medium befüllt. Nach dem Aushärten des Agars wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und bei 2-8°C gelagert.

Glycerol-Lösung (60%)

30 ml Glycerol wurden mit 20 ml Aqua bidest. verdünnt und steril filtriert. Die Lösung wurde bei 2-8°C gelagert.

LB-Medium

Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	5 g
Trypton	5 g

Die Substanzen wurden ad 500 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Sobald die Lösung auf 40°C abgekühlt war, wurden final 50 µg/ml Ampicillin hinzugegeben. Das Medium wurde bei 2-8°C gelagert.

SOC-Medium

Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,2 g
MgCl ₂ [2 M]	5 ml
Trypton	20 g

Die Substanzen wurden ad 1000 ml gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 20 ml einer Glucose-Lösung (1 M) hinzugegeben. Das Medium wurde bei 2-8°C gelagert.

5.2.3 Protein PräparationNP-40 Lysis-Puffer

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80 – 90% erreicht haben, wurden die Zellen mit einem NP-40 Lysis Puffer behandelt, um die Proteine zu extrahieren.

NP-40	1% (V/V)
Tris	20 mM
NaCl	137 mM
Glycerol	10% (V/V)
EDTA	2 mM
Natriumorthovanadat	1 mM

Die Komponenten wurden in Aqua bidest. gelöst und der pH auf 8 eingestellt. Kurz vor der Verwendung wurden die Protease-Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin mit der finalen Konzentration von 10 µg/ml zugesetzt.

5.2.4 BCA Protein Assay

BSA-Standard

Der BSA-Standard wurde in Aqua bidest. zu einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst. Für die Standard-Verdünnungsreihe wurden folgende Konzentrationen in Aqua bidest. hergestellt: 1.500, 1.000, 700, 500, 250, 125 und 25 µg/ml. Die Verdünnungsreihe wurde bei -20°C gelagert.

BCA-Mischung

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration in der Lysat-Probe wurden das BCA Protein Assay Reagenz mit Kupfersulfat-Lösung (4% (m/V)) 50:1 gemischt. Die Mischung wurde stets frisch kurz vor der Verwendung hergestellt.

5.2.5 Elektrophoresen

Laemmli-Puffer 2X mit 2-Mercaptoethanol

Tris	125 mM
SDS 20 % (m/V)	3% (m/V)
2-Mercaptoethanol	10% (V/V)
Glycerin	30% (V/V)
Bromphenolblau	1 Spatelspitze

Die Substanzen wurden ad 10 ml Aqua bidest. gelöst. Nachdem der pH-Wert auf 6,7 eingestellt wurde, wurde Bromphenolblau hinzugefügt.

APS-Lösung

1 g Ammoniumperoxodisulfat wurden in 10 ml Aqua bidest. gelöst (10%-ige Lösung), anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

SDS-Lösung (20%)

500 g SDS wurden in 2500 ml Aqua bidest. gelöst.

Sammelgelpuffer 4X (SDS-PAGE)

Tris	0,5 M
SDS	0,4% (m/V)

Die Substanzen wurden ad 1000 ml Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert auf 6,8 eingestellt.

Trenngelpuffer 4X (SDS-PAGE)

Tris	1,5 M
SDS	0,4% (m/V)

Die Substanzen wurden ad 1000 ml Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert auf 8,8 eingestellt.

SDS-Laufpuffer 10X

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	1% (m/V)

Die Substanzen wurden ad 1000 ml Aqua bidest. gelöst, wobei sich der pH-Wert selbstständig einstellt. Der Puffer wurde 1:10 mit Aqua bidest. zur weiteren Anwendung verdünnt.

5.2.6 Western Blot

Semi-Dry Puffer

SDS-Laufpuffer 1X mit 10 % Methanol versetzt.

Blocking Puffer

In TBST 1X wurden 3 % Milchpulver gelöst.

TBS 10X

Tris 200 mM

NaCl 90 g

Die Salze wurden ad 1000 ml Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Der Puffer wurde 1:10 mit Aqua bidest. zur weiteren Anwendung verdünnt.

TBST 10X

Tris 200 mM

NaCl 90 g

Tween 20 1% (m/V)

Die Substanzen wurden ad 1000 ml in Aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Der Puffer wurde 1:10 mit Aqua bidest. zur weiteren Anwendung verdünnt.

Stripping Puffer

Glycin 200 mM

SDS 0,1% (m/V)

Tween 20 1% (m/V)

Die Substanzen wurden ad 1000 ml in Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert auf 2,2 eingestellt. Die Lösung wurde maximal zwei Wochen lang verwendet.

5.2.7 Lösungen zur Isolierung von RNA

Die Zellen wurden mit dem RLT-Puffer von Qiagen lysiert, der mit 1% (V/V) β -Mercaptoethanol versetzt wurde. Die Mischung wird bei 2-8°C gelagert.

Das Rnase-freie Dnase I Lyophilisat (1500 Kunitz Units) wurde in 550 μ l Rnase-freiem Wasser gelöst. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde Aqua bidest. 2 Stunden mit 0,1% (V/V) DEPC im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung von DEPC wurde die Lösung autoklaviert. Das DEPC-Wasser wurde bei 2-8°C gelagert.

Zur Herstellung von 70% DEPC-Ethanol wurde der Alkohol mit DEPC-Wasser verdünnt.

5.2.8 PCR

TE Puffer

TE-Puffer (Tris-EDTA) 20X von Molecular Probes® Invitrogen detection technologies wurde 1:20 mit Ampuwa®-Wasser verdünnt.

Primer-Stammlösung

Die Primerlyophilisate wurden in TE Puffer 1X zu 125 μ M gelöst und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Primer-Arbeitslösung

Die Primer-Stammlösung wurde 1:10 mit TE Puffer 1X zu 12,5 μ M verdünnt und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Primer Mischung für die qPCR

Die Arbeitslösungen wurden mit 24 μ l rechtem und 24 μ l linkem Primer in 177 μ l TE Puffer 1X zu 1,3 μ M hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

5.2.9 MTT Assay

Natriumchlorid-Lösung (0,9 % (m/V))

Von Natriumchlorid wurden 0,9 g in 100 ml Aqua bidest. gelöst und anschließend autoklaviert. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

Cisplatin-Stammlösung

Cisplatin (Sigma-Aldrich) wurde in 0,9 % (m/V) Natriumchlorid-Lösung zu 5 mM gelöst und bei -20°C gelagert.

Die Cisplatin-Verdünnungsreihe wurde aus der Stammlösung mit 0,9 % (m/V) NaCl-Lösung zu $10^{-2,5}$ M und 10^{-3} M verdünnt. Diese wurden anschließend jeweils 1:10 mit 0,9 % (m/V) NaCl-Lösung bis zu den Konzentrationen $10^{-5,5}$ M und 10^{-7} M verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde ebenfalls bei -20°C gelagert.

0,9 %-ige NaCl-Lösung wurde im MTT Assay als Kontroll-Lösung verwendet.

Die verwendeten finalen Konzentrationen von Cisplatin auf den Zellen waren 316 μ M, 100 μ M, 31,6 μ M, 10 μ M, 3,16 μ M, 1 μ M, 316 nM, 100 nM und 10 nM.

MTT-Lösung

250 mg MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wurden in 50 ml PBS gelöst und bei 2-8°C im Dunkeln gelagert.

5.2.10 ROS Assay

H₂DCF-DA-Stammlösung

H₂DCF-DA (2'-7'-Dihydrodichlorofluorescein-diacetat) wurde in DMSO zu einer Konzentration von 10 mM gelöst. Auf die Zellen wurden final 10 µM H₂DCF-DA gegeben. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei -20°C.

Wasserstoffperoxid-Lösung (2 mM)

Konzentrierte Wasserstoffperoxid-Lösung (30 %) wurde in Aqua bidest. zu einer Konzentration von 2 mM gelöst. Die verdünnte Lösung wurde stets frisch kurz vor dem Gebrauch hergestellt und vor Lichteinwirkung geschützt. Auf die Zellen wurden final 200 µM Wasserstoffperoxid-Lösung gegeben.

5.2.11 Annexin V Assay

Annexin V Binding Buffer

Annexin V Binding Buffer 10X (Annexin V Apoptosis Detection Kit) wurde 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C. Alternativ wurde der Puffer nach den Angaben von Santa Cruz Biotechnology selbst hergestellt:

HEPES	10 mM
NaCl	140 mM
CaCl ₂	2,5 mM

Die Substanzen wurden ad 1000 ml in Aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

5.2.12 Apoptose Assay

Lysis-Puffer

Für den hypotonischen Puffer zum Lysieren der Zellen wurde Aqua dest. verwendet, das zusätzlich steril filtriert wurde, um mögliche Partikel zu entfernen. Der Puffer wurde im Dunkeln bei 2-8°C gelagert.

Na-Citrat	0,1% (m/V)
Triton X-100	0,1% (V/V)
Propidiumiodid	100 µg/ml

5.2.13 Zellzyklusanalyse

Ethanol-Lösung

Absoluter Ethanol wurde mit Aqua bidest. zu 70% verdünnt und bei 4°C gelagert.

Propidiumiodid-Lösung

Propidiumiodid wurde zu einer Konzentration von 500 µg/ml in Aqua bidest gelöst, das zusätzlich steril filtriert wurde, um das Wasser frei von Partikeln zu haben. Die Lösung wurde bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Färbelösung

Triton X-100	0,1% (V/V)
Propidiumiodid-Lösung	400 µl
Dnase-freie Rnase A	2 mg

Zunächst wurde Triton X-100 in 10 ml PBS^(-/-) gelöst. Anschließend wurden die anderen Substanzen hinzugegeben. Die Lösung wurde stets frisch hergestellt und vor Licht geschützt.

5.2.14 ATP Bestimmung

Lysis-Puffer

Triton X-100	0,5% (V/V)
EDTA	1 mM
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	10 mM

Zunächst wurden die Salze in Aqua bidest. gelöst und der pH auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde Triton X-100 zugegeben. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

20X Reaktionspuffer (20X RB)

Tris	500 mM
MgSO ₄	100 mM
EDTA	2 mM
NaN ₃	2 mM

Die Salze wurden in Aqua bidest. gelöst und der pH auf 7,8 eingestellt. Der Reaktionspuffer wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

D-Luciferin-Stammlösung

Der 20X Reaktionspuffer wurde mit Aqua bidest. 1:20 verdünnt, um 1X Reaktionspuffer zu erhalten. Von dem 1X Reaktionspuffer wurde 1 ml auf 3 mg D-Luciferin Lyophilisat gegeben, um eine D-Luciferin-Stammlösung mit 10 mM zu erhalten. Die Stammlösung wurde bei -20°C im Dunkeln gelagert.

Luciferase-Stammlösung (5mg/ml)

Die Luciferase war in Puffer mit folgenden Komponenten gelöst:

Tris-Acetat	25 mM
(NH ₃) ₂ SO ₄	200 mM
Glycerol	15% (V/V)
Ethylenglykol	30% (V/V)

Der pH-Wert des Puffers betrug 7,8. Die Stammlösung wurde bei -20°C im Dunkeln gelagert.

Dithiothreitol (DTT)

25 mg DTT wurden in 1,62 ml Aqua bidest. gelöst, um eine Konzentration von 100 mM zu erhalten.

ATP Standard-Lösungen

Die Stammlösung von ATP besaß eine Konzentration von 5 mM ATP in TE-Puffer. Die weiteren Standard-Lösungen wurden zu folgenden Konzentrationen in Aqua bidest. verdünnt: 10 µM, 8 µM, 6 µM, 4 µM und 2 µM.

Die ATP Standard-Lösungen wurden in der Mikrotiter-Platte 1:10 verdünnt.

Standard-Reaktions-Lösung

10 ml Standard-Reaktions-Lösung wurde aus folgenden Komponenten zusammen gesetzt:

Aqua bidest.	8,9 ml
20X RB	0,5 ml
DTT (100 mM)	0,1 ml
D-Luciferin-Stammlösung	0,5 ml
Luciferase-Stammlösung	2,5 µl

5.2.15 Calcium Assay

Krebs-HEPES-Puffer 5X (KHP 5X)

Der Krebs-HEPES-Puffer (KHP) wurde in einer 5-fach konzentrierten Lösung hergestellt.

NaCl	17,330 g
KCl	0,878 g
KH ₂ PO ₄	0,408 g
NaHCO ₃	0,882 g
D-Glucose-Monohydrat	5,796 g
HEPES (freie Säure)	5,958 g

Die Komponenten wurden in einem Becherglas vereinigt und in ungefähr 400 ml Aqua bidest. gelöst. Der pH wurde mit 5 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen Messkolben überführt und mit Aqua bidest bis zur Marke auf 500 ml aufgefüllt. Der Puffer wurde zu je 100 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Stammlösung von Calciumchlorid und Magnesiumsulfat (1 M)

In 10 ml Aqua bidest. wurden 1,47 g Calciumchlorid-Dihydrat bzw. 2,465 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat gelöst. Die beiden Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

Krebs-HEPES-Puffer 1X (KHP 1X)

Zur Herstellung der einfach konzentrierten Lösung wurden 100 ml von KHP 5X in ein Becherglas überführt und 650 µl Calciumchlorid-Stammlösung dazu pipettiert. Die Lösung wurde mit Aqua bidest. auf ungefähr 450 ml aufgefüllt und dann mit 600 µl der Magnesiumsulfat-Stammlösung versetzt. Anschließend wurde die Lösung in einen Messkolben überführt und mit Aqua bidest. bis zur Marke auf 500 ml aufgefüllt. Der Puffer wurde in Volumen von 125 ml aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Stammlösung von Pluronic® F-127

Von dem Tensid wurden 0,2 g abgewogen und in 720 µl DMSO gelöst.

Stammlösung von Oregon Green® 488 BAPTA-1, AM

Zu 50 µg Oregon Green® wurden 39,7 µl DMSO gegeben. Die Mischung wurde ungefähr 3 Minuten bei 600 rpm (Schüttler für Eppendorf-Reaktionsgefäße) geschüttelt und anschließend in 3 µl Aliquots aufgeteilt. Die Lösungen wurden bei -20°C im Dunkeln gelagert.

5.2.16 Bestimmung der Caspaseaktivität

Caspase-Glo® Reagenz

Zu dem lyophilisierten Caspase-Glo® Substrat wurden 2,5 ml Caspase-Glo® Puffer zugegeben. Zusätzlich wurden 7,5 µl des Proteasom-Inhibitors MG-132 zugegeben, um das Hintergrundsignal zu reduzieren. Die finale Konzentration betrug 60 µM. Die Mischung wurde bei -20°C im Dunkeln gelagert. Vor der Verwendung wurde die Mischung bei Raumtemperatur aufgetaut.

5.2.17 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Pärchen sensitiver und cisplatinresistenter Krebszelllinien. „-I“: mit inaktiviertem FKS kultiviert. Mit „*“ markierte Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Brigitte Royer-Pokora (Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf)

Zelllinie	Gewebetyp	Nährmedium	Herkunft
A2780	Ovarialkarzinom	RPMI-I (10% FKS)	ECACC, Salisbury, Whiteshire, UK
A2780CisR			
A2780Resv		RPMI-I (10% FKS) + 10 µM Resveratrol	
A2780CisR+Resv			
A2780Ellag		RPMI-I (10% FKS) + 3,16 µM Ellagsäure	
A2780CisR+Ellag		RPMI-I (10% FKS) + 10 µM Ellagsäure	
Cal27	Zungenkarzinom	DMEM-I (10% FKS)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig
Cal27CisR			

Zelllinie	Gewebetyp	Nährmedium	Herkunft
HCT116	Kolonkarzinom	DMEM-I (10% FKS)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM-I (10% FKS)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig
K562	Chronisch myeloische Leukämie	RPMI-I (10% FKS)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig
Kyse510	Ösophaguskarzinom	RPMI-I (10% FKS)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig
Kyse510CisR			
MDA-MB-231*	Mammakarzinom (Adenokarzinom, triple-negativ, aus Pleuraerguss)	DMEM-I (15% FKS)	ECACC, Salisbury, Whiteshire, UK
MDA-MB-231CisR			
T-47D*	Mammakarzinom (duktal, aus Pleuraerguss)	RPMI-I (10% FKS)	ECACC, Salisbury, Whiteshire, UK
T-47DcisR			

Die Zelllinie A2780 wurde in Anwesenheit von 3,16 μM Ellagsäure oder 10 μM Resveratrol wöchentlich für 6 Stunden mit 1,6 μM Cisplatin über 26 Wochen behandelt. Die dadurch neu generierten Zelllinien A2780Ellag und A2780Resv wurden weiterhin mit Ellagsäure bzw. Resveratrol in Kultur gehalten. Die cisplatinresistente Zelllinie A2780CisR wurde permanent mit 10 μM Ellagsäure bzw. 10 μM Resveratrol in Kultur gehalten. Die daraus resultierenden Zelllinien wurden A2780CisR+Ellag und A2780CisR+Resv benannt.

Zur Inhibition der PGK1 mRNA Expression wurden die Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D sowie ihre cisplatinresistenten Subklone MDA-MB-231CisR und T-47DcisR verwendet. Die SureSilencingTM Vektoren wurden transient transfiziert.

5.3 Methoden

5.3.1 Transformation und Vermehrung von Vektoren in *E. Coli*

Die Vektoren aus der Reihe der SureSilencingTM shRNA Plasmide (siehe Abbildung 11 und Tabelle 6) wurden in kompetente XL-1 *E. Coli* Bakterien ähnlich nach [85] transformiert, welche ein Ampicillin-Resistenzgen besitzen. Die Plasmide besitzen 4758 bp und enthalten die Gensequenz für die Resistenz gegenüber den Antibiotika Ampicillin und Neomycin. Die eingebaute Sequenz für die shRNA richtet sich spezifisch gegen die mRNA von PGK1. Die Bindung der shRNA an die mRNA führt zum Knock-down der PGK1 Expression. In 50 μl Bakteriensuspension wurde 1 μl Vektorlösung gegeben. Die Suspension inkubierte für 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Bakterien auf 42°C für 45 Sekunden erhitzt und wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt. Die Suspension wurde mit 500 μl SOC-Medium aufgefüllt, welches auf 37°C temperiert wurde, und bei 125 rpm, 37°C für 1 Stunde geschüttelt. Jeweils 50 μl der Suspension wurden auf LB-Agar-Platten verteilt, die 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin enthielten. Nach 18 Stunden bei 37°C bildeten sich auf den Platten Kolonien. Ein Klon wurde in 6 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und 8 Stunden bei 150 rpm, 37°C geschüttelt. Die Suspension wurde in 250 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C, 150 rpm geschüttelt. Die entstandene Bakterienkultur wurde aufgeteilt. Ein

Teil wurde bei -80°C gelagert (900 μl Suspension + 300 μl Glycerol) und der Rest zur Aufreinigung der DNA weiter verarbeitet.

5.3.2 Aufreinigung der Vektoren

Die Vektoren wurden aus den Bakterien gewonnen, die sich nach erfolgreicher Transformation des Vektors über Nacht im LB-Medium vermehrt hatten. Die Suspension wurde bei 5 000 rcf, 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde mit dem Plasmid Maxi Kit von Qiagen weiterbehandelt. Zunächst wurde das Pellet in Puffer 1 resuspendiert. Nachdem Puffer 2 zugegeben wurde, wurde die Suspension mehrmals invertiert und anschließend bei Raumtemperatur für 5 Minuten ruhen gelassen. Anschließend wurde Puffer 3 zugefügt und die Mischung mehrmals invertiert. Nach 10 Minuten wurde die Lösung durch einen Filter gespritzt. Dem Filtrat wurde der Puffer ER zugefügt, dann mehrmals invertiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde durch einen Filter getropft, der mit dem Puffer QBT äquilibriert war. Der Filter wurde zwei Mal mit dem Puffer QC gewaschen und die DNA mit dem Puffer QN eluiert. Das Eluat wurde mit Isopropanol vermischt und zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurde das Pellet in endotoxin-freiem 70% Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Das Pellet wurde schließlich in TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoPhotometer der Firma Implen bestimmt. Auf das Glas der Nano-Küvette wurde 1 μl der DNA-Lösung pipettiert. Die Absorptionen bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) wurden gegen reinen TE-Puffer bestimmt. Das Verhältnis von A_{260} und A_{280} ist ein Maß für die Stärke der Verunreinigungen durch Proteine in der DNA-Lösung. Eine reine DNA-Lösung liegt vor, wenn das Verhältnis bei 1,8 liegt [216]. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

5.3.3 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in den entsprechenden Nährmedien (s. Materialien) mit 120 µg/ml Streptomycin und 120 U/ml Penicillin im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Der CO₂-Gehalt gewährleistete die Einstellung des physiologischen pH-Werts von 7,2 – 7,4 durch die Pufferung des in den Nährmedien enthaltenen Hydrogencarbonats. Die Zusätze von Antibiotika vermieden die Kontamination der Zellen durch streptomycin- bzw. penicillinsensitive Bakterien. Kontaminationen durch weitere Krankheitserreger wurden durch das Arbeiten unter Laminar-Air-Flow-Sterilbänken ausgeschlossen. Außerdem wurden die Arbeitsmaterialien und Handschuhe mit Isopropanol 70% (V/V) oder Helipur® 1,5% (V/V) desinfiziert.

5.3.4 Passagieren und Ernten

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 – 100% passagiert. Zum Ernten der Zellen aus einer T75-Flasche wurde das Nährmedium komplett entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 7 ml PBS^(-/-) gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin 0,02%-EDTA im Inkubator für ca. 4 Minuten inkubiert. Trypsin spaltet die extrazellulären Proteine, mit denen adhärente Zellen am Boden der Zellkulturflasche haften. Zum Inaktivieren des Trypsins und zum vollständigen Ablösen wurden die Zellen im Nährmedium aufgenommen und mehrmals durchmischt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und bei 266 rcf und 4°C für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 5 ml Nährmedium resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde in einer neuen Zellkulturflasche mit frischem Nährmedium ausgesät und für mindestens 2 Tage bis zum weiteren Gebrauch ruhen gelassen. Der restliche Teil wurde für Experimente verarbeitet.

5.3.5 Zellzählung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet und im Nährmedium resuspendiert. Ähnlich wie in [85] beschrieben, wurden 10 bzw. 20 μl der Zellsuspension in 90 bzw. 80 μl Eosin-Lösung (1:10 bzw. 1:5) verdünnt. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Eosin kann nur durch poröse Zellmembranen gelangen und somit die permeabilisierten Zellen dunkel rot anfärben. Die lebenden, intakten Zellen wurden nicht durch Eosin angefärbt und konnten somit durch ihr helleres Erscheinen von den abgestorbenen Zellen unterschieden und gezählt werden. Die Zählkammer erfasst vier Quadranten, die jeweils in 16 Quadrate unterteilt sind. Die Zellen, die sich in den jeweiligen 16 Quadranten befanden, wurden mäanderförmig gezählt. Dabei wurden nur die Zellen in den Teilquadranten und an der oberen und linken Grenze der Teilquadrate berücksichtigt. Somit wurden die Zellen auf den Grenzen nicht doppelt gezählt. Die Formel zur Bestimmung der Zellzahl ist abhängig von der verwendeten Neubauerkammer und vom Verdünnungsfaktor (VF). Nach der Zellzählung mit der in dieser Arbeit verwendeten Neubauerkammer wird mit der folgenden Formel die Anzahl der Zellen pro μl Zellsuspension errechnet:

Formel 1

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{\sum n_{1-4}}{0,4} \times VF$$

5.3.6 Generierung neuer Zelllinien

Aus den Zelllinien A2780 und A2780CisR wurden vier weitere Subzelllinien generiert. Die A2780 Zelllinie wurde wöchentlich für 6 Stunden mit Cisplatin (1,6 μM) behandelt, jedoch zusätzlich permanent mit der IC_{10} von Ellagsäure (3,16 μM) bzw. Resveratrol (10 μM) in Kultur gehalten. Dadurch wurden die Zelllinien A2780Ellag (mit Ellagsäure kultiviert) und A2780Resv (mit Resveratrol kultiviert) erhalten. Zudem wurde die A2780CisR Zelllinie permanent mit der IC_{10} von Ellagsäure (10 μM) oder von Resveratrol (10 μM) kultiviert. Diese Zelllinien wurden als A2780CisR+Ellag und A2780CisR+Resv bezeichnet.

5.3.7 Transfektion der Vektoren in die Krebszelle

Die verschiedenen Plasmide mit der eingebauten shRNA, die sich gegen PGK1 richtet, sowie der Leervektor (negative Kontrolle) wurden in die Triple-negative Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 und in die ER+ Mammakarzinom-Zelllinie T-47D sowie in deren cisplatinresistenten Subzelllinien (CisR) transfiziert. Die Triple-negative Mammakarzinom-Zelllinie wurde zu 300 000 Zellen/well und die ER+ Mammakarzinom-Zelllinie zu 500 000 Zellen/well in 6-well Platten ausplattiert, sodass die Zellen nach 24 Stunden eine Konfluenz von 90% erreichten. Am Tag der Transfektion wurde das Nährmedium der Zellen mit FKS-freiem Nährmedium ausgetauscht. Das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000® (10 µl) wurde in 250 µl Opti-MEM verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Jeweils 4 µg DNA wurden ebenfalls in 250 µl Opti-MEM verdünnt. Die DNA-Lösung wurde mit der Lipofectamine 2000® Lösung gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit die DNA mit dem Lipofectamine 2000® komplexiert. Der Komplex wurde für 6 Stunden auf die Zellen gegeben. Außerdem wurde die Mock-Kontrolle zu den Zellen gegeben, welche aus Lipofectamine 2000® in Opti-MEM ohne DNA bestand. Während der Transfektion inkubierten die Zellen bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Inkubator. Nach der Inkubation wurde das Medium mit FKS-haltigem Nährmedium ausgetauscht und die Zellen über Nacht ruhen gelassen. Die transient transfizierten Zellen wurden für einen MTT Assay ausplattiert, um den Effekt auf die Cisplatinempfindlichkeit zu bestimmen. Zudem wurden die RNA und die Proteine isoliert und deren Expressionsverhältnis zu den unbehandelten Zellen verglichen.

5.3.8 MTT Assay

Die Zellen wurden, ähnlich wie in [85] beschrieben, in 96-well Mikrotiter-Platten ausgesät. Die entsprechende cisplatinresistente (CisR) Zelllinie und andere Subtypen wurden mit derselben Zellzahl wie die Ausgangszelllinie ausplattiert. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C mit 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

Tabelle 10: Zellzahl der jeweiligen Zelllinien, die für den MTT Assay ausplattiert wurde. Die Zellzahlen beziehen sich auf Experimente mit 72 Stunden Inkubationszeit.

Zelllinie	Anzahl der Zellen/well
A2780	9 000
Cal27	7 000
HCT116	6 000
HEK293	5 000
K562	35 000
Kyse510	7 000
MDA-MB-231	5 000
T-47D	10 000

Am nächsten Tag wurde das Nährmedium ausgetauscht und die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt. Nach 72 Stunden wurde 25 µl MTT-Lösung zu den Zellen pipettiert. Je nach Zelllinie betrug die Inkubationszeit mit MTT zwischen 10 und 30 Minuten. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit dem entstandenen Formazan mit DMSO 75 µl/well lysiert. Die Absorption vom Formazan wurde bei 544 nm bestimmt. Da bei dieser Wellenlänge ebenso Zelltrümmer erfasst werden, wurde der Hintergrund bei 690 nm gemessen. Die Werte, die bei der Wellenlänge von 690 nm erhalten wurden, wurden von den Werten, die bei 544 nm bestimmt wurden, subtrahiert. Die neu berechneten Absorptionswerte wurden gegen den Logarithmus der Konzentration in einem XY-Punkt-Diagramm aufgetragen. Wenn die Anfangs- und Endwerte unterschiedliche Plateaus besaßen, konnte eine sigmoidale Kurve durch die Punkte gelegt werden. Der Wendepunkt der Kurve beschreibt die inhibitorische Konzentration (IC), bei der 50% der Zellviabilität zurückging.

Alternativ wurden diese Konzentrations-Effekt-Kurven auch nach 24 oder 48 Stunden bestimmt. Durch die kürzeren Inkubationszeiten konnten Aussagen über das zeitliche Verhalten der Zytotoxizität der zu untersuchenden Substanzen gemacht werden. Die Zellzahl wurde auf die modifizierten MTT Experimente angepasst, welche hauptsächlich mit den Zelllinien A2780 und A2780CisR durchgeführt wurden. Für die 24-stündige Inkubationszeit wurden 50 000 Zellen/well und für die 48-stündige Inkubation wurden 20 000 Zellen/well ausplattiert.

5.3.9 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA wurde das my-Budget RNA Mini Kit verwendet. Nachdem die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80-90% gewachsen waren, wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit RLT Puffer, der mit β -Mercaptoethanol versetzt ist, behandelt. Nach kurzem Schwenken wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und auf Eis gehalten. Das Lysat wurde in die Zentrifugationssäule D gegeben und bei 12 000 rpm für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Filtrat wurde mit derselben Menge an 70% DEPC-Ethanol vermengt, anschließend in die Zentrifugationssäule R überführt und wie zuvor zentrifugiert. Der Filter der Säule wurde mit 350 μ l Waschpuffer HS gewaschen. In 70 μ l RDD Puffer des Rnase-freien Dnase Sets wurden 10 μ l Dnase verdünnt und auf den Filter der Säule gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule erst mit dem Waschpuffer HS (500 μ l) und mit dem Waschpuffer LS (700 μ l) gewaschen. Die RNA wurde mit Rnase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration wurde mit dem NanoPhotometer von Implem bestimmt. Die Absorptionen bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) wurden gegen Rnase-freies Wasser bestimmt. Das Verhältnis von A_{260} und A_{280} ist ein Maß für die Stärke der Verunreinigungen durch DNA in der RNA-Lösung. Eine reine RNA-Lösung liegt vor, wenn das Verhältnis bei 2,0 liegt [216]. Die RNA wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

5.3.10 Reverse Transkription (RT)-PCR und quantitative PCR (qPCR)

In einer RT-PCR wurden 1 µg RNA in cDNA in einer Ansatzgröße von insgesamt 10 µl, ähnlich wie in [85], umgeschrieben. Es wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 11: Pipettierschema für die RT-PCR.

Komponente	Menge
RNA	1 µg
Reaktionspuffer 10X	1 µl
dNTP 25X	0,4 µl
Oligo(dT) ₂₃ -Primer [0,5 µg/µl]	0,5 µl
Reverse Transkriptase [1:5 verdünnt in Ampuwa-Wasser]	2,5 µl
Ampuwa-Wasser	Ad 10 µl

Die Oligo(dT)₂₃-Primer von Sigma wurden verwendet, da diese einen Poly-Thymidin-Rest besitzen und somit nur polyadenylierte mRNA umgeschrieben wird. Die Reverse Transkriptase, der Reaktionspuffer und die dNTPs stammen aus dem High Capacity cDNA Archive Kit von Applied Biosystems. Der Mastermix, bestehend aus Reaktionspuffer, dNTPs und Oligo(dT)₂₃-Primer, wurde als n+1 (n = Anzahl der Proben) zusammen pipettiert und gemischt. Pro Reaktionsansatz wurden 1,9 µl Mastermix pipettiert und mit der entsprechenden Menge an Ampuwa-Wasser aufgefüllt. Nachdem die RNA zugefügt wurde, wurde die verdünnte Reverse Transkriptase zugesetzt. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt und mittels Short Spin herunter zentrifugiert. Im Thermocycler wurde der Ansatz zunächst auf 25°C für 10 Minuten temperiert und anschließend die PCR bei 37°C für 2 Stunden durchgeführt. Das cDNA-Produkt wurde 1:10 mit TE-Puffer verdünnt und bei -20°C gelagert. Die qPCR wurde in einer 96-well Platte mit klarem Boden und klaren Wänden in einer Ansatzgröße von insgesamt 10 µl durchgeführt. Alle Komponenten und die Platte wurden auf Eis gehalten. Zunächst wurden pro Ansatz 1 µl cDNA mit 5 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix vermischt (n+2). Das SYBR®-Green lagert sich in doppelsträngige DNA ein. Somit wird die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes verstärkt. Neben dem Gene of Interest (GOI) wurden die Housekeeper Gene (HKG) ACTB und HPRT1 betrachtet, da bei der RNA-

Quantifizierung und der RT-PCR Ungenauigkeiten auftreten können. Diese Gene stehen für Proteine, die unbeeinflusst von äußeren Veränderungen gleich stark exprimiert werden. Von der Template/SYBR® Green –Mischung wurden 6 µl an die Wand der Einbuchtungen pipettiert. Um 90° gedreht wurden 4 µl der jeweiligen Primer-Mischungen an die Wand der Einbuchtungen pipettiert. Die Platte wurde mit einer hitzebeständigen, klaren Folie versiegelt und bei 4 500 rpm, 4°C zentrifugiert. Im Thermocycler wurde die qPCR mit folgenden Schritten durchgeführt:

Tabelle 12: Schema der Zyklen für die qPCR.

Schritt Nummer	Teilreaktion	Temperatur [°C]	Zeit
1	Erste Denaturierung/ Polymerase-Aktivierung	95	15 Minuten
2	Denaturierung	94	20 Sekunden
3	Annealing	57	30 Sekunden
4	Elongation	72	35 Sekunden
Platte lesen	Fluoreszenzmessung		
	39 x Wiederholung ab Schritt 2		
5	Finale Elongation	50	1 Minute
6	Schmelzpunktkurve	65-95; Inkrement: 0,5	0,5 Sekunden/ Inkrement
Platte lesen	Fluoreszenzmessung		
7	Kühlung	16	∞

Die cDNA wird zunächst durch hohe Temperaturen denaturiert. Beim Abkühlen binden die Primer an die DNA-Stränge. Im Elongationsschritt wird die DNA-Polymerase wieder aktiv und verlängert den DNA-Strang am 3'-Ende des Primers. Die Reaktionskinetik verläuft exponentiell und wird mit der Messung der Fluoreszenz von SYBR® Green nachverfolgt. Die Fluoreszenzintensität steigt mit jedem Zyklus der qPCR, da sich die DNA nach jedem Zyklus unter optimalen Bedingungen verdoppelt. Wenn die dNTPs und Primer verbraucht sind und die Polymeraseaktivität nachlässt, erreicht die Kurve der Fluoreszenz einen Grenzwert. Nach

Erhalt der Fluoreszenzkurve am Ende der Reaktion wird die Kurve halblogarithmisch dargestellt. Im linearen Bereich wird ein Fluoreszenzschwellenwert parallel zur x-Achse gelegt. Der Schnittpunkt mit der Kurve gibt den C_T -Wert (Threshold Cycle) wieder, der ein Maß für die Expression darstellt. Jedes GOI und HKG wurde in Duplikaten untersucht. Aus den C_T -Werten der Duplikate wurde das arithmetische Mittel gebildet und die Standardabweichung berechnet. Nach Abzug der gemittelten C_T -Werte der HKG von denen der GOI, wurde die normalisierte Expression (NE) bezogen auf die zwei verschiedenen HKG berechnet.

Formel 2

$$\Delta C_{T1} = C_T(GOI) - C_T(HKG1)$$

$$\Delta C_{T2} = C_T(GOI) - C_T(HKG2)$$

$$SD_{\Delta C_T} = \sqrt{(SD_{C_T(GOI)})^2 + (SD_{C_T(HKG)})^2}$$

C_T = Mittelwert der C_T -Duplikate

Formel 3

$$NE_1 = 2^{-\Delta C_{T1}}$$

$$NE_2 = 2^{-\Delta C_{T2}}$$

$$SD_{NE} = SD_{\Delta C_T} \times NE \times \ln 2$$

Aus den beiden normalisierten Expressionen wurde anschließend das geometrische Mittel nach Vandesompele et al. gebildet.

Formel 4

$$NE_{GEO} = \sqrt{NE_1 \times NE_2}$$

$$SD_{NE_{GEO}} = NE_{GEO} \times \sqrt{\left(\frac{SD_{NE_{HKG1}}}{2 \times NE_{HKG1}}\right)^2 + \left(\frac{SD_{NE_{HKG2}}}{2 \times NE_{HKG2}}\right)^2}$$

Die Genexpression von PGK1 wurde sowohl in der Triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 und deren cisplatinresistenter Subzelllinie MDA-MB-231CisR als auch in den ER+ Brustkrebs-Zelllinien T-47D und T-47DcisR untersucht. Die differenzierte Expression durch die Transfektion mit den verschiedenen shRNA Plasmiden wurde mit der Expression in den unbehandelten Zelllinien verglichen.

Die Spezifität der qPCR für die jeweiligen Gene wurde mit der Aufnahme einer Schmelzpunktkurve überprüft. Je nach Länge und Mengenanteil an Cytidin/Guanosin-Paaren und Thymin/Adenosin-Paaren besitzt das entstandene PCR-Produkt einen spezifischen Schmelzpunkt. Nach der finalen Elongation wird die Schmelzpunktkurve im Thermocycler aufgenommen. Dafür wird die Temperatur sukzessiv von 65°C bis 95°C erhöht und die Fluoreszenzintensität nach jeder Erhöhung von 0,5°C gemessen. Am Schmelzpunkt beginnen die Wasserstoffbrücken im PCR-Produkt sich zu spalten und das SYBR® Green wird von den DNA-Strängen gelöst. Die Freisetzung des Farbstoffs führt zu einer Senkung des Fluoreszenzsignals. Die erste Ableitung der Kurve wird gegen die Temperatur aufgetragen. Somit wird ein abgegrenzter Peak erhalten, dessen Maximum die Schmelztemperatur wiedergibt. Die Reaktion ist optimal verlaufen, wenn die Schmelztemperatur für das jeweilige Gen immer identisch ist.

5.3.11 Isolierung von Proteinen

Wenn die Zellen eine Konfluenz von 80-90% erreicht haben, wurden die Proteine, ähnlich wie in [85] beschrieben, isoliert. Für Western Blot Experimente wurde der NP-40 Lysis Puffer und für die Proteome Profiler Experimente der entsprechende Lysis-Puffer aus dem jeweiligen Kit verwendet. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zu den Zellen wurde der entsprechende Lysis-Puffer gegeben, die Zellkulturflasche kurz geschwenkt und die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Die Zellen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten bei 4°C gerollt. Anschließend wurde das Lysat bei 14 000 rpm, 4°C für 10 bis 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entnommen. Gegebenenfalls wurde das Lysat mehrfach zentrifugiert. Das Lysat wurde aliquotiert und die Proteinkonzentration im BCA Protein Assay bestimmt. Ein Aliquot wurde für die Western Blot Experimente 1:1 mit 2X Laemmli-Puffer mit β -Mercaptoethanol verdünnt und 3-5 Minuten bei 95°C erhitzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Tabelle 13: Zugaben vom Lysis-Puffer in das entsprechende Zellkultur-Gefäß.

Zellkultur-Gefäß	Menge an Lysis-Puffer [μ l]
6-well-Platte	50 μ l
T25-Flasche	100 μ l
T75-Flasche	250 μ l
T175-Flasche	500 μ l

5.3.12 BCA Protein Assay

Das Lysat aus der Proteinisolierung wurde 1:10 in Aqua bidest. oder steril filtriertem Aqua dest. Verdünnt. Jeweils 25 μ l vom verdünnten Lysat wurde in Duplikaten in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert, die auf Eis gehalten wurde. Die BSA-Standardreihe wurde auf Eis aufgetaut und ebenfalls in Duplikaten vermessen. Zu den Proben wurden 200 μ l der frisch hergestellten BCA Protein Assay Mischung gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 544 nm gemessen. Eine Farbänderung von ursprünglich grün zu violett zeigt das Vorhandensein von Proteinen in der Probe an. Die Konzentrationen der BSA-Standardreihe wurden gegen die Absorption aufgetragen. Durch den linearen Verlauf wurde eine Regressionsgerade gelegt. Nach Umformung der Geradengleichung wurde die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt.

Formel 5

$$y = x \cdot m + n$$

$$x = \frac{y}{m} - n$$

y = Absorption bei 544 nm

x = Proteinkonzentration [μ g/ml]

m = Steigung der Geraden

n = Schnittpunkt mit der Ordinatenachse

5.3.13 SDS-PAGE

Zur Bestimmung der Proteinexpression der EGFR-Familie wurde ein 8% SDS-Trenngel verwendet. Die PGK1 Expression wurde mit einem 12% SDS-Trenngel untersucht. Zunächst wurde, ähnlich wie in [85] beschrieben, das Trenngel hergestellt und zwischen die Glasplatten vom Mini-Protean® System (Bio-Rad) bis etwa 2 cm unterhalb der Oberkante der Glasplatte gefüllt. Um eine gerade Kante zu erhalten, wurde vorsichtig Isopropanol auf das Gel gegeben. Nachdem das Gel polymerisiert ist, wurde Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel bis kurz vor der Oberkante der Glasplatte gefüllt. In das Sammelgel wurde ein Kamm für 10 Taschen von Mini-PROTEAN® (Bio-Rad) gesteckt. Nachdem das Gel polymerisiert ist, wurde es bis zur Verwendung mindestens einen Tag bei 2-8°C in feuchten Tüchern gelagert.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Trenngele.

Komponenten	8% Trenngel	12% Trenngel
Rotiphorese Gel 30	1,6 ml	2,4
Aqua bidest.	2,9 ml	2,1
Trenngelpuffer 4X	1,5 ml	1,5
APS-Lösung 10%	60 µl	60 µl
TEMED p.a.	6 µl	6 µl

Tabelle 15: Zusammensetzung der Sammelgel. Die Menge ist für 2 Gele ausreichend.

Komponenten	Sammelgel
Rotiphorese Gel 30	1 ml
Aqua bidest.	3,5 ml
Trenngelpuffer 4X	1,5 ml
APS-Lösung 10%	60 µl
TEMED p.a.	6 µl

Am Tag der Elektrophorese wurden die entsprechenden Gele in den Glasplatten in die Elektrophorese-Apparatur geklemmt und das Innere der Apparatur mit 1X SDS-Laufpuffer

gefüllt. Der Kamm wurde entfernt und eine Tasche mit 10 µl Proteinleiter und die übrigen Taschen mit den Proben befüllt. Zur Bestimmung von PGK1, das 48 kDa groß ist, wurde die PageRuler Prestained Proteinleiter verwendet, welche Proteine in ausgesuchten Größen zwischen 10 und 170 kDa beinhaltet. Zur Bestimmung der EGFR-Familie, die zwischen 170 und 185 kDa groß sind, wurde die PageRuler Plus Prestained Proteinleiter verwendet, die zusätzlich Proteine mit der Größe 250 kDa beinhaltet. Die Proteine der Leitern sind farblich markiert. Die meisten sind blau angefärbt. Die Proteine bei 70 kDa sind rot und bei 10 kDa grün angefärbt. In der PageRuler Plus Prestained Protein Leiter sind die Proteine bei 25 kDa ebenfalls rot gefärbt. Somit können die zu untersuchenden Proteine nach ihrer Größe zugeordnet werden. Nachdem die Taschen des Gels beladen wurden, wurde die Elektrophorese-Apparatur außerhalb der Kammer mit 1X SDS-Laufpuffer bis zur Markierung aufgefüllt. Die Elektrophorese mit dem 12% SDS-Trenngel wurde zunächst 30 Minuten mit 80V und anschließend 1 Stunde mit 160 V betrieben. Für das 8% SDS-Trenngel wurde der zweite Schritt nur 30 bis 45 Minuten durchgeführt. Die angefärbten Proteine der Leiter ermöglichen es, das Fortschreiten der Elektrophorese zu beobachten. Das Trenngel wurde für Western Blot Experimente weiter verwendet.

5.3.14 Western Blot

Die Polyvinylidenfluorid (PVDF) Folie wurde, ähnlich wie in [85] beschrieben, zunächst mit Methanol für mindestens 15 Sekunden aktiviert und anschließend mit Semi-dry Puffer äquilibriert (mindestens 15 Minuten). Auf die Kathodenplatte der Blotting-Apparatur wurden zunächst drei Filterpapiere, die in Semi-dry Puffer getränkt wurden, gelegt. Durch Ausstreichen wurden Luftblasen entfernt. Auf die Filter wurde die äquilibrierte Folie gelegt, auf die das Trenngel aus der SDS-PAGE überführt wurde. Anschließend wurden wieder drei in Semi-dry Puffer getränkte Filterpapiere oben auf gelegt. Nach dem erneuten Ausstreichen von Luftblasen wurde das Sandwich mit der Anoden-Platte der Apparatur verschlossen. Die Stromstärke wurde 1 Stunde bei 40 mA gehalten, wenn Proteine von einem Gel auf eine Membran transferiert wurden, oder bei 80 mA, wenn Proteine aus zwei Gelen auf zwei Membranen transferiert wurden. Nach dem Blotten wurde die Membran 1 Stunde mit 3%

Milch in TBST (Blocking-Puffer) bei Raumtemperatur geschwenkt und anschließend im entsprechenden primären Antikörper, der ebenfalls in Blocking-Puffer verdünnt wurde, über Nacht bei 2-8°C geschwenkt. Den Antikörper-Lösungen wurde 0,01% (m/V) Natriumazid zugegeben. Sie wurden bis zur Verwendung bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Wenn mehrere Proteine mit unterschiedlicher Größe auf einer Membran betrachtet wurden, wurde die Membran entsprechend zerschnitten und die Teile in die jeweiligen Antikörper-Lösungen gelegt. Dabei helfen die angefärbten Proteine der Leiter, die ebenfalls auf die Membran transferiert wurden, um an der richtigen Position zu schneiden. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran zweimal in TBST 1X und einmal in TBS 1X für jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde die Folie in dem sekundären Antikörper, der 1:3000 in Blocking-Puffer verdünnt wurde, für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Der sekundäre Antikörper ist mit lichtempfindlicher Horseradish peroxidase (HRP = Meerrettichperoxidase) markiert und wird deshalb im Dunkeln bei 2-8°C gelagert. Stets kurz vor dem Gebrauch wurde der Antikörper in Blocking-Puffer verdünnt. Danach wurde die Membran wieder zweimal mit TBST 1X und einmal mit TBS 1X für jeweils 30 Minuten gewaschen. Die Membran wurde zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und das überschüssige TBS weggewischt. Die beiden Western Blotting Luminol Reagenzien wurde 1:1 miteinander vermischt. Davon wurde 1 ml auf die Membran gegeben und 2 Minuten inkubiert. Das Luminol wird von der HRP in den Triplet-Zustand umgesetzt. Der anschließende Übergang vom Triplet- in den Singulett-Zustand setzt Photonen frei, die mit der Kamera gemessen werden. Nachdem das überschüssige Reagenz weggewischt wurde, wurde die Chemilumineszenz mit dem INTAS Imager gemessen. Dafür wurde das 1x1-Binningmode/Single eingestellt, um die erhaltenen Banden semi-quantitativ auswerten zu können. In diesem Modus wird jeder Pixel einzeln abgebildet und eine Aufnahme gemacht. Zuletzt wird die Lampe eingeschaltet, um die Leiter mit den angefärbten Proteinen im gleichen Modus aufzunehmen. Dabei wird die Membran zwischendurch nicht bewegt. Somit kann die Leiter direkt in die Aufnahme mit den Lumineszenz-Banden eingefügt werden, um den detektierten Banden die jeweilige Größe zuzuweisen. Der Housekeeper β -Actin wurde zusätzlich detektiert, um die Auftragung einer gleichmäßigen Proteinmenge zu kontrollieren.

Um auf einer Membran zwei unterschiedliche Proteine gleicher oder ähnlicher Größe detektieren zu können, kann die Membran nicht zerschnitten werden. Sie wurde stattdessen

nach der Detektion des ersten Proteins gestriipt. Dies war der Fall, wenn die Expression von PGK1 (48 kDa) betrachtet wurde und β -Actin (42 kDa) als Housekeeper verwendet wurde. Dafür wurde die Membran zunächst zweimal mit TBST für 30 Minuten gewaschen und anschließend zweimal mit dem Stripping-Puffer für 30 Minuten inkubiert, um die Antikörper von den Proteinen zu lösen. Die Membran wurde dann kurz mit reinem Wasser gewaschen und wieder mit TBST für 30 Minuten äquibriert. Mit Methanol wurde die PVDF-Folie wieder kurz aktiviert und dann in 3% Milch in TBST für eine Stunde geschwenkt. Anschließend wurde die Membran im primären Antikörper über Nacht bei 2-8°C geschwenkt. Dann wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

5.3.15 Cisplatinbehandlung zur Generierung der resistenten Subzelllinien

Die benötigte Menge an Cisplatin, mit der die Zelllinie behandelt wurde, erschließt sich aus dem IC_{50} -Wert für Cisplatin der ursprünglichen Zelllinie, der über mindestens drei MTT-Tests bestimmt wurde. Das Behandeln mit Cisplatin erfolgte in Abhängigkeit der Zellzahl wöchentlich. Wenn die Zelllinie 60-70% konfluent war, wurde diese, ähnlich wie in [22] beschrieben, 6 bis 7 Stunden mit der entsprechenden Cisplatinkonzentration inkubiert. Drei Tage nach einer Cisplatinbehandlung wurde die Zelllinie in zwei neue Zellkultur-Flaschen ausgesät und ein MTT-Test vorbereitet. Die Zellkultur in der einen Flasche wurde für weitere Behandlungen verwendet. Die Zellen in der zweiten Flasche wurden bei ausreichend hoher Konfluenz geerntet, mit 10% DMSO versetzt und in Kryovials bei -20°C gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen bei -80°C und zuletzt in flüssigem Stickstoff gelagert. Der MTT-Test nach jeder Cisplatinbehandlung diente zur Beobachtung des IC_{50} -Wertes. Über den IC_{50} -Wert kann eine Aussage über die Änderung des Resistenzfaktors der Zelllinie getroffen werden.

Formel 6

$$\mathbf{Resistenzfaktor} = \frac{IC_{50(t=n)}}{IC_{50(t=0)}}$$

Nach mindestens 26 Wochen bzw. sobald der erhaltene Resistenzfaktor konstant blieb, wurden die Behandlungen beendet. Die Zelllinien bekamen den Zusatz „CisR“

(cisplatinresistent) zu ihrer Bezeichnung. Die Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780CisR wurde alle vier Wochen mit der jeweiligen IC_{50} von Cisplatin behandelt. Diese Zelllinie verlor nach längerer Zeit ohne Cisplatinbehandlung ihre Resistenz gegenüber Cisplatin, welche sich durch eine einmalige Behandlung mit Cisplatin wieder entwickelte.

Das oben beschriebene Vorgehen zur Generierung cisplatinresistenter Subklone wurde für die A2780 Zelllinie in permanenter Anwesenheit von 3,16 μ M Ellagsäure bzw. 10 μ M Resveratrol wiederholt. Die gewählten Konzentrationen der Naturstoffe wurden mittels MTT Assay bestimmt und waren minimal toxisch für die Zelllinie. Nach 26 Wochen wurden die neu erhaltenen Zelllinien A2780Ellag (mit Ellagsäure kultiviert) und A2780Resv (mit Resveratrol kultiviert) benannt. Nach Beendigung der Cisplatinbehandlungen wurden die neu erhaltenen Zelllinien weiterhin mit ihren Naturstoffen kultiviert.

5.3.16 Verdopplungszeit

Die Proliferation der Zellen wurde über die Messung der Verdopplungszeit bestimmt. Die Zelllinien A2780 und A2780CisR sowie A2780Resv, A2780Ellag, A2780CisR+Ellag und A2780CisR+Resv wurden mit 1 000 Zellen in einem well von fünf 6-well Platten ausgesät. Nach 72-stündigem Anwachsen wurden die Zellen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen geerntet und die Zellzahl am Durchflusszytometer bestimmt. Dafür wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Behandlung mit Trypsin-EDTA für zwei Minuten wurden die Zellen im Nährmedium aufgenommen und bei 266 rcf, 4°C für 4 Minuten zentrifugiert. Das Nährmedium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und schließlich in PBS aufgenommen. Die Menge der Zellen in der Suspension wurde mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Die Werte aller Tage ergaben eine Exponentialkurve, die mit GraphPad Prism analysiert wurde. Die Verdopplungszeit berechnet sich wie folgt:

Formel 7 $VZ = \frac{\ln(2)}{K}$

VZ = Verdopplungszeit [Tage]

K = Konstante, die den reziproken Wert der Ordinate wiedergibt [Tage]

5.3.17 Detektion apoptotischer Zellen

Zur Bestimmung apoptotischer Zellen wurden zwei Methoden am Durchflusszytometer verwendet. Bei der ersten Methode wurde das frühe Stadium der Apoptose bestimmt, indem das nach außen verlagerte Phosphatidylserin mithilfe eines Antikörpers-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexes markiert wurde (Annexin V Assay). Dafür wurde der Annexin V-FITC Komplex (Fluoresceinisothiocyanat; Ex = 488 nm und Em = 520 nm [217]) verwendet. Durch die Bindung des Antikörpers Annexin V an das Phosphatidylserin findet am Fluoresceinisothiocyanat eine Konformationsänderung statt, durch die das Molekül zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Zusätzlich wurde Propidiumiodid (Ex = 488 nm und Em > 600 nm [217] [218]) als DNA-interkalierende Substanz eingesetzt. Die sich im frühen Stadium der Apoptose befindlichen Zellen transferieren Phosphatidylserin zur Außenseite der Membran, haben jedoch noch eine intakte Zellmembran. Daher werden diese nur mit dem Antikörper markiert und mithilfe des Durchflusszytometers kann nur eine Fluoreszenz bei der Wellenlänge 520 nm gemessen werden. Im späten Stadium der Apoptose beginnt die Zellmembran zu degradieren und Propidiumiodid gelangt durch die entstandenen Löcher in die Zelle. Neben dem markierten Phosphatidylserin wird auch die DNA durch Propidiumiodid markiert. Dadurch ist sowohl bei 520 nm als auch bei über 600 nm Fluoreszenz messbar (Abbildung 12). Somit kann zwischen früh- und spät-apoptotischen Zellen unterschieden werden [219] [220] [221].

In der Literatur ist bekannt, dass Cisplatin an der sensitiven Zelllinie A2780 Apoptose induziert [222]. Daher wurde Cisplatin als Kontrolle in weiteren Apoptose Assays verwendet. Die Sensitivität der neu generierten Zelllinien A2780Ellag, A2780Resv, A2780CisR+Ellag und A2780CisR+Resv gegenüber Cisplatin wurde mit der ihrer Ausgangszelllinien A2780 und A2780CisR verglichen. Die Zellen wurden in einer 6-well Platte mit 300 000 Zellen pro well ausplattiert und 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt ruhen gelassen. Anschließend erhielten die Zellen neues 37°C warmes RPMI (ggf. mit Zusatz der jeweiligen Naturstoffe) und wurden 48 Stunden mit 10 µM Cisplatin oder PBS im Inkubator behandelt. Die gewählte Cisplatinkonzentration entspricht dem IC₉₀-Wert, der an A2780 Zellen nach 72 Stunden im MTT Assay gemessen wurde. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand entnommen, mit den geernteten Zellen vereinigt und das so erhaltene Zellpellet mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in Annexin V Binding Buffer resuspendiert, sodass eine

Konzentration von 1 000 000 Zellen/ml vorlag. Von der Suspension wurden 4 Teile mit jeweils 100 000 Zellen entnommen. Eine Probe blieb unbehandelt, eine Probe wurde nur mit 2,5 µl Annexin V-FITC (0,2 µg/µl), eine nur mit 10 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) und eine mit beiden Farbstoffen angefärbt. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Proben mit Annexin V Binding Buffer verdünnt und mit dem CyFlow space analysiert.

Die Eigenfluoreszenz der Zellen wurde mit der ungefärbten Probe bestimmt und in die erste Dekade des Dotplots FL1 FITC vs. FL2 PI, in den Quadranten Q3, verschoben (Abbildung 12A). Fluoreszenzintensitäten oberhalb der ersten Dekade stammen somit von den Fluorophoren. Alle Zellen, die nur mit Annexin V-FITC angefärbt wurden, befinden sich in früher Apoptose und sind im Quadranten Q4 zu sehen (Abbildung 12B). Die mit Propidiumiodid markierten Zellen erscheinen im Quadranten Q1 (Abbildung 12C). Die Zellen, die sowohl mit Annexin V-FITC als auch mit Propidiumiodid angefärbt sind, befinden sich im späten Stadium der Apoptose und werden im Quadranten Q2 detektiert (Abbildung 12D). Die Analyse der einfach gefärbten Proben ergab, dass die Fluoreszenzintensität der Farbstoffe trotz gleicher Anregungswelle nicht in den jeweils anderen Detektor streut. Die beiden Fluorophore sind für dieses Experiment ideal kombinierbar. Zur Betrachtung aller apoptotischer Zellen, wurden die Daten aus den mit Annexin V-einfach gefärbten Proben und den mit beiden Fluorophor-markierten Proben zusammengefasst. Für die Auswertung wurden die Anzahl der apoptotischen Zellen der unbehandelten Kontrolle von der Anzahl der apoptotischen Zellen der behandelten Proben subtrahiert.

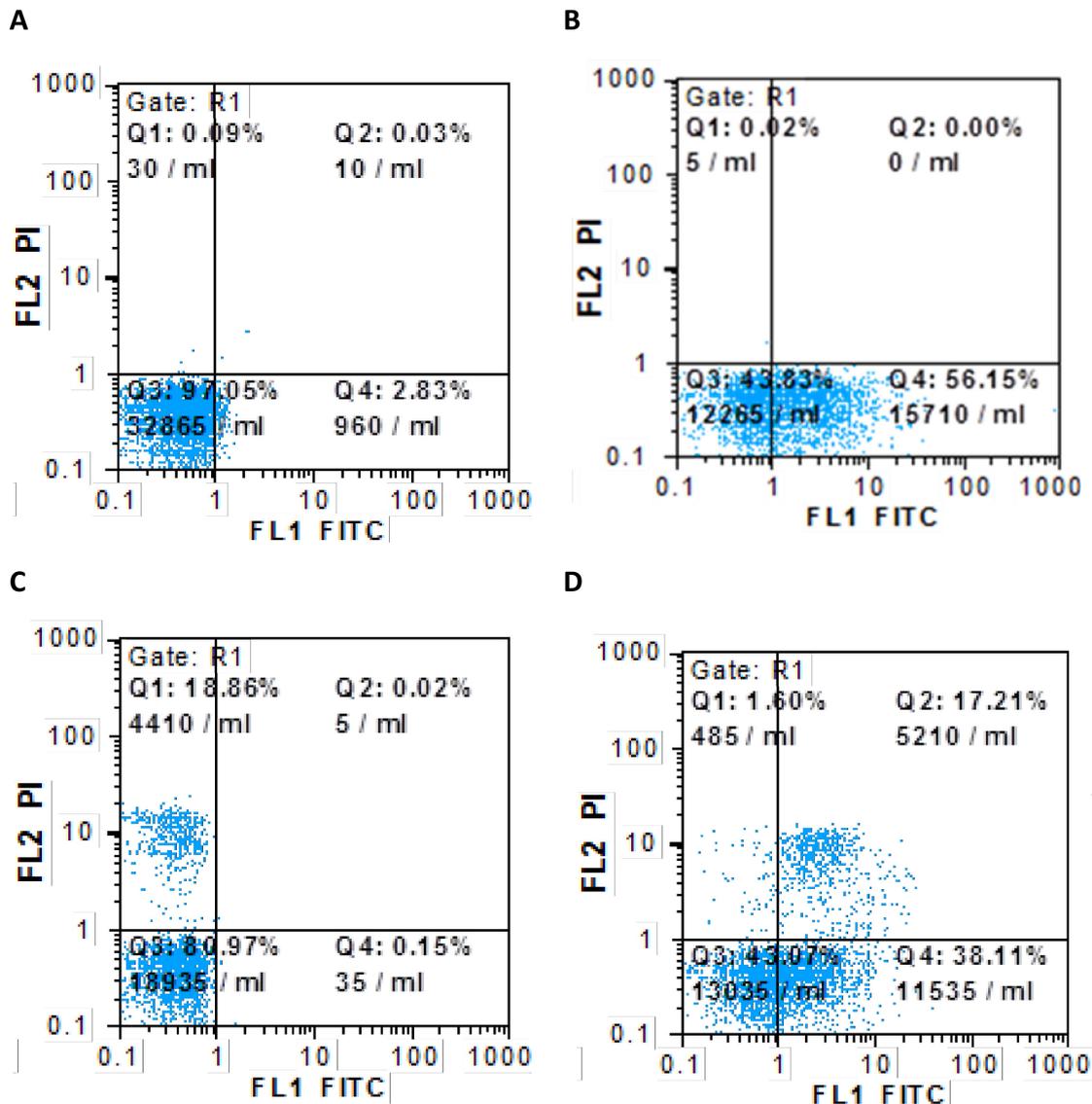


Abbildung 12: Auftragung der FITC- gegen die PI-Fluoreszenz im Annexin V Assay. In diesem Beispiel wurden A2780 Zellen verwendet, die (A) ohne Fluorophore, (B) nur mit Annexin V-FITC, (C) nur mit PI oder (D) mit beiden Fluorophoren markiert wurden. Die Zellen wurden 48 Stunden mit 10 μ M Cisplatin behandelt.

Bei der zweiten Methode wurde nur das späte Stadium der Apoptose betrachtet (Apoptose Assay). Die A2780 und A2780CisR Zellen wurden in einer 24-well Platte mit 150 000 Zellen pro well ausplattiert und 24 Stunden im Inkubator ruhen gelassen. Nachdem die Zellen neues, auf 37°C erwärmtes RPMI erhalten haben, wurden diese mit der zu untersuchenden Substanz für 24 Stunden behandelt. Da die Inkubationszeit verkürzt wurde, wurde die eingesetzte Konzentration von Cisplatin auf 20 μ M erhöht, um Apoptose nach 24 Stunden in A2780 Zellen beobachten zu können. Die Platte wurde anschließend bei 1200 rpm, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entnommen und

verworfen. Die Zellen wurden mit 500 µl hypotonem PI-Lysis-Puffer versetzt und mindestens 6 bis 18 Stunden bei 2-8°C lysiert. Das Detergens Triton X-100 permeabilisiert die Membran des Zellkerns, sodass Propidiumiodid an die DNA binden kann. Das Lysat wurde mit isotonischer NaCl-Lösung (0,9%) verdünnt und im Durchflusszytometer vermessen. Bei der Methode wurde die Messung auf FL2 PI getriggert. Dies bedeutet, dass nur Signale beachtet wurden, deren Fluoreszenz in den Detektor von FL2 PI strahlt. Alle ungefärbten Ereignisse wurden ignoriert. Die Signale der Zellkerne wurden mit einem Polygon im Dotplot FSC gegen SSC von den mit PI-versetzten Zelltrümmern getrennt (Abbildung 13).

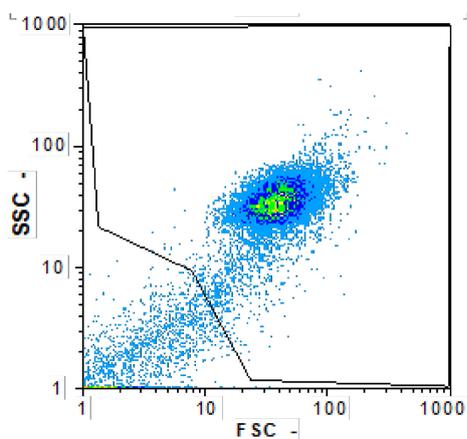


Abbildung 13: Isolierte Zellkerne innerhalb des Polygons im Dotplot FSC gegen SSC. In diesem Beispiel wurden A2780 Zellen lysiert. Die Signale im mittleren Bereich des Dotplots sind die isolierten Zellkerne. Die Signale unterhalb des Dreieck-ähnlichen Polygons geben die mit PI-versetzten Zelltrümmern wieder.

Im Histogramm FL2 PI wurde die mit PI markierte DNA gemessen. Die Signale wurden in 4 Bereiche (Ranges = RN) unterteilt. In RN1 und RN4 wurden die zu niedrigen bzw. zu hohen Fluoreszenzsignale ausgeschlossen. Die Signale in RN3 spiegeln die DNA in den einzelnen Phasen des Zellzyklus in gestauchter Form wider. Die fragmentierte DNA mit entsprechend geringerer Fluoreszenz wird in RN2 dargestellt. Die Bereiche werden zunächst in der unbehandelten Probe festgelegt und anschließend für die anderen Messungen in dem jeweiligen Experiment übernommen. Abbildung 14 zeigt das Beispiel von A2780 Zellen, die entweder unbehandelt sind und demnach einen normalen Zellzyklus und keine fragmentierte DNA aufweisen (Abbildung 14A) oder mit 20 µM Cisplatin behandelt wurden, wodurch Apoptose induziert und die DNA gespalten wurde (Abbildung 14B). Zudem kann zusätzlich eine Steigerung der DNA-Syntheseaktivität (S-Phase) beobachtet werden, da

zwischen den G_0/G_1 - und G_2/M -Phasen kein Tal, sondern ein Anstieg des Signals detektiert wurde.

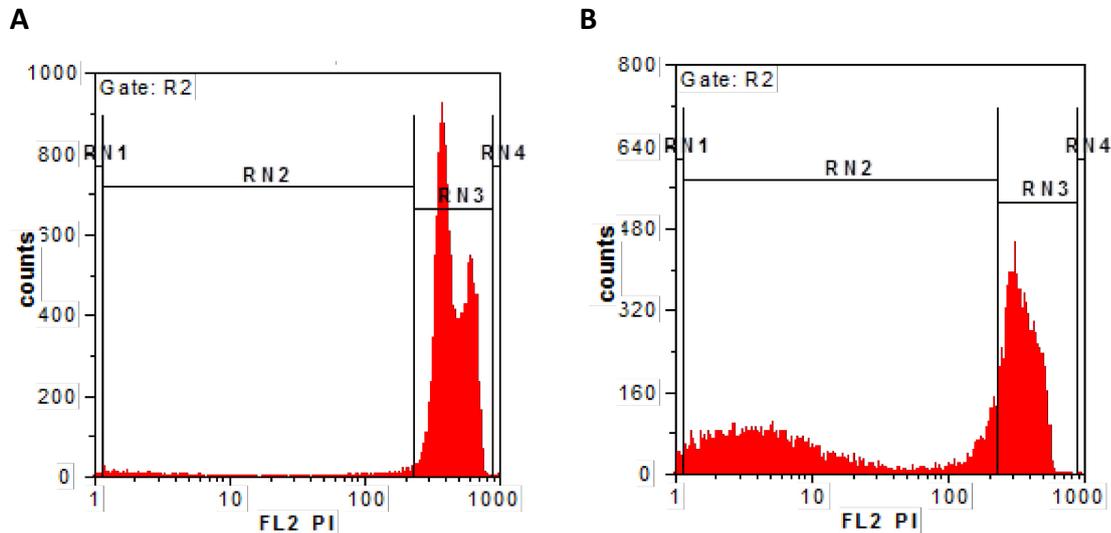


Abbildung 14: Messung des Propidiumiodid-Signals. Im Beispiel sind A2780 Zellen abgebildet, die entweder (A) unbehandelt oder (B) mit 20 μM Cisplatin behandelt wurden. In RN1 wurden die zu niedrigen Signalen ausgeschlossen. In RN2 wird die Anzahl der Zellkerne mit fragmentierter DNA wiedergegeben. RN3 zeigt den Zellzyklus in gestauchter Form. In RN4 wurden die zu hohen Fluoreszenzsignalen ausgeschlossen.

5.3.18 Zellzyklusanalyse

Zur Analyse des Zellzyklus wurden A2780 und A2780CisR Zellen nach der Behandlung mit den Kontrollen oder den zu untersuchenden Substanzen mit Propidiumiodid angefärbt. Dafür wurden die Zellen in 6-well-Platten mit 600 000 Zellen/well ausplattiert und über Nacht im Inkubator ruhen gelassen. Nachdem die Zellen neues, warmes Nährmedium erhalten haben, wurden diese 24 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Als Kontrolle wurde Cisplatin (10 μM) eingesetzt, um einen S-Phasenarrest zu erhalten. Außerdem wurde Paclitaxel (50 nM) verwendet, um einen G_2/M -Phasenarrest zu induzieren. Anschließend wurde der Überstand entnommen, mit den geernteten Zellen vereinigt und mit PBS gewaschen. Ungefähr 2 Millionen Zellen wurden in eiskaltem PBS resuspendiert. Die Suspension wurde langsam in kaltes Ethanol (70%) getropft und bei -20°C gelagert. Nach ungefähr 24 Stunden wurden die Proben 20 bis 30 Minuten bei 266 rcf und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig, jedoch nicht vollständig abgesaugt. Einige Zellen

schwammen an der Oberfläche und durfte nicht mit abgesaugt werden. Die Proben wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, sodass das Ethanol entfernt wurde. Die Zellen wurden mit 500 μ l Färbelösung angefärbt. Das PI wurde in isotonischer Natriumchloridlösung 0,9% gelöst und mit 0,01% Natriumazid, 0,1% Triton X-100 und DNase-freier RNase A versetzt. Das Detergenz Triton X-100 permeabilisiert die Membranen, so dass das PI in die Zelle gelangen und in die DNA interkalieren kann. Da PI ebenfalls in die RNA interkaliert, wurde RNase verwendet, um die RNA zu zerstören. Ansonsten würden falsch positive Signale durch die angefärbte RNA detektiert werden. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurden die Proben lichtgeschützt auf Eis gelagert und mit dem CyFlow space analysiert. Zunächst wurde die Probe analysiert, die mit Paclitaxel behandelt wurde. Die Zellen arretieren überwiegend in der G₂/M-Phase, welche die höchste Fluoreszenzintensität aufweist. Mit dieser Probe kann die Verstärkung des detektierten Signals eingestellt werden. Zwei Parameter des Signals werden gemessen: die Höhe und die Fläche des Signals. Laut Herstellerinformation ist die Signalweite für diese Messung ein vernachlässigbares Signal. Durch Auftragung der Signalthöhe gegen die Signalfläche können Zelldoubletten oder –cluster von vereinzelt Zellen mit Hilfe eines Polygons abgegrenzt werden. Dies ist entscheidend, da die Doubletten oder Cluster falsch-positive Signale geben. Zum Beispiel erscheinen zwei aneinander haftende Zellen in der G₀/G₁-Phase in der Signalthöhe wie eine einzige Zelle in der G₂/M-Phase. In Abbildung 15 sind die Signale, die linear verlaufen und von Blau bis ins Schwarz übergehen, die einzelnen Zellen (mit einem Polygon eingegrenzt). Die Ereignisse rechts daneben besitzen im Vergleich zur Höhe eine zu große Fläche des Fluoreszenzsignals und stellen somit Zelldoubletten oder –cluster dar. Diese sind Zelldoubletten bis hin zu Zellclustern. Die Verfärbung von Blau über Rot bis ins Schwarz stellt die Häufigkeit der Ereignisse dar.

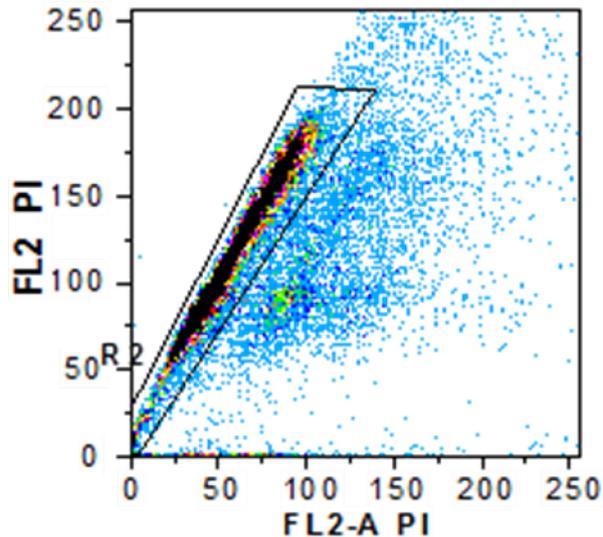


Abbildung 15: Dubletten-Diskriminierung bei der Zellzyklusanalyse. Signalhöhe (FL2 PI) gegen –fläche (FL2-A PI). Signalverteilung im linearen Verlauf zeigt die vereinzelteten Zellen in den entsprechenden Phasen. Signale rechts vom linearen Bereich sind Zelldubletten und –cluster.

Anschließend wurden die unbehandelten Zellen vermessen. Mit den Kontrollen der unbehandelten und mit Paclitaxel-behandelten Zellen wurden die Bereiche festgesetzt, die die einzelnen Phasen abgrenzen. In RN2 wurde die fragmentierte DNA, die sub-G₁-Phase, detektiert. In RN4 wurden die Zellen in der G₀/G₁-Phase, in RN7 in der S-Phase und in RN8 in der G₂/M-Phase gemessen. Die unbehandelte Kontrolle zeigte die übliche Verteilung der Zellen in den jeweiligen Phasen an: ein hoher Peak für die G₁-Phase und eine niedrigere Anzahl an Zellen in den S- und G₂/M-Phasen (Abbildung 16A). Im Falle von Paclitaxel verschiebt sich die Verteilung in die G₂/M-Phase (Abbildung 16B). Nur wenige Zellen sind noch in der G₁-Phase vorhanden, was das Fehlen des ausgeprägten Peaks in RN4 verdeutlicht. Hier kann von einem G₂/M-Phasenarrest gesprochen werden. Wie in Abbildung 16C gezeigt, induziert Cisplatin einen S-Phasenarrest. Dies ist durch die Zunahme der detektierten Ereignisse in RN7 zu sehen. Anhand dieser Kontrollen kann eine Abgrenzung zwischen den Phasen gesetzt werden, die auf die Messergebnisse von anderen zu untersuchenden Proben übertragen wird.

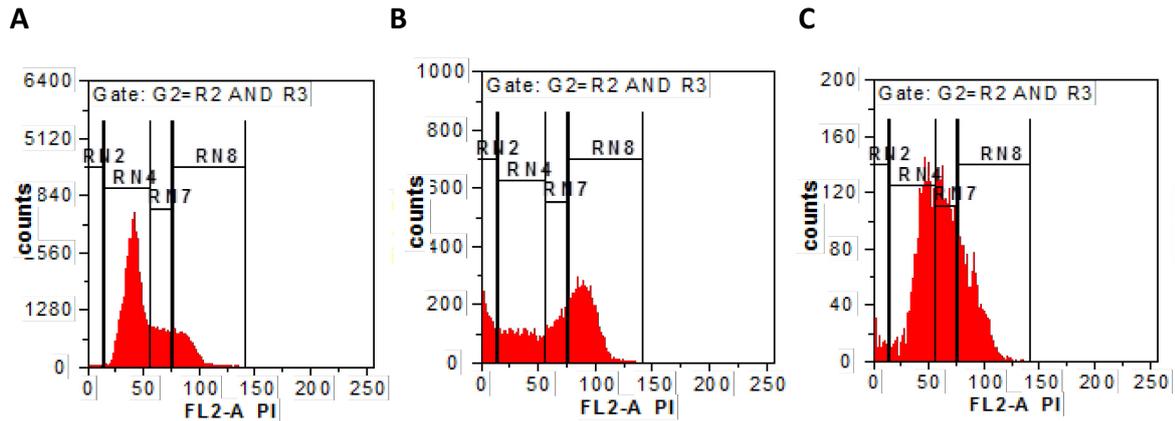


Abbildung 16: Zellzyklusbestimmung durch PI-Färbung. (A) Natriumchlorid-Kontrolle mit normaler Verteilung der Phasen, (B) Paclitaxel-Behandlung induziert G_2/M -Phasenarrest und Apoptose, (C) Cisplatin-Behandlung induziert S-Phasenarrest und Apoptose. RN2: sub- G_1 , RN4: G_1/G_0 , RN7: S und RN8: G_2/M -Phase.

5.3.19 Reaktive Oxidative Spezies

Die Bestimmung von ROS in A2780 und A2780CisR Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzintensitätsmessung unter Verwendung von Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H_2DCF -DA) angelehnt an das Protokoll aus der Dissertation von Ricarda Rohrig [145]. Der Farbstoff wird in der Zelle von unspezifischen Esterasen metabolisiert und von ROS zum Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert (Abbildung 17). Die oxidierte Form kann zur Fluoreszenz angeregt werden ($Ex = 488 \text{ nm}$ und $Em = 520 \text{ nm}$ [223] [224]).

Die Zellen wurden in 24-well Platten mit 150 000 Zellen pro well ausplattiert und über Nacht im Inkubator ruhen gelassen. Zunächst wurde das Nährmedium ausgetauscht und, nach mindestens 30 Minuten Ruhezeit, die zu untersuchenden Substanzen und Kontrollen zu den Zellen gegeben und für 18 Stunden inkubiert. Als Kontrollen wurden Kochsalz-Lösung, Ascorbinsäure als Antioxidans [169] und Cisplatin als ROS-induzierende Substanz verwendet. Nach 18 Stunden wurde das vorhandene Nährmedium gegen phenolrotfreies Nährmedium ohne FKS und ohne Antibiotika ausgetauscht.

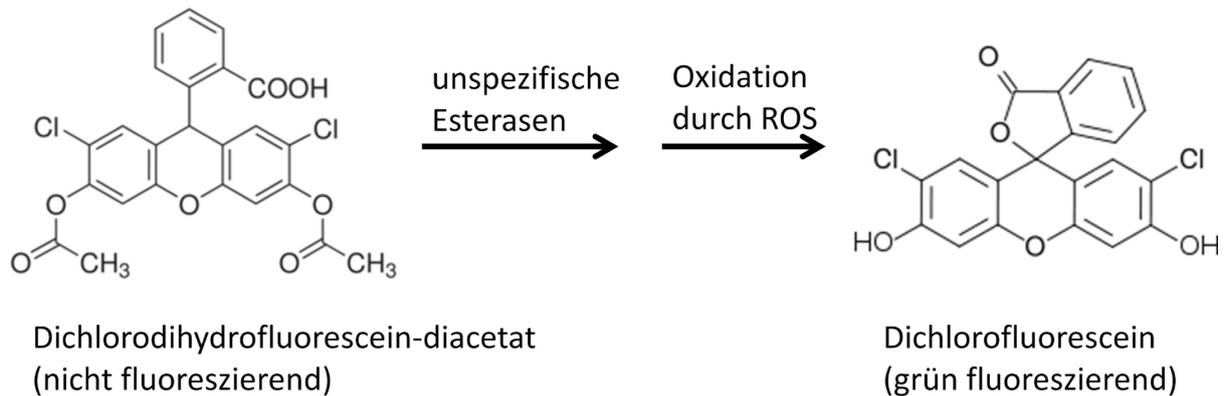


Abbildung 17: Umwandlung vom H₂DCF-DA in das fluoreszierende DCF in der Zelle. Durch die Acetat-Reste diffundiert der Fluorophor durch die Membran in die Zelle. Dort wird der Stoff durch unspezifische Esterasen deacetyliert. Nach der Oxidation durch ROS kann die Substanz zur Fluoreszenz angeregt werden.

Anschließend wurden die Zellen mit 10 μM H₂DCF-DA für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln beladen. Nachdem der Überstand entfernt wurde und die Zellen mit PBS gewaschen wurden, wurden diese geerntet und in phenolrotfreiem Nährmedium ohne FKS und ohne Antibiotika resuspendiert. Ein Teil der Proben wurde direkt mit dem CyFlow space analysiert (bis zu 20 000 Ereignisse) (Abbildung 18A bis C). Wasserstoffperoxid induziert kurzfristig ROS und wurde als zusätzliche Kontrolle verwendet [225] [226]. Dafür wurde der übrige Teil der Probe mit 200 bzw. 250 μM H₂O₂ bei 37°C im Dunkeln für eine Stunde behandelt und anschließend mit dem CyFlow space analysiert (bis zu 20 000 Ereignisse) [223]. Für die Auswertung wurden die Zellen im FSC gegen SSC Dotplot von den Zelltrümmern mithilfe des Polygons gefiltert. Das Signal von DCF wurde mit dem Detektor FL1 FITC gemessen. Die nicht angefärbte Probe wurde zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Zellen verwendet. Diese wurde durch Anpassung der Verstärkung des Fluoreszenzsignals in die erste Dekade zwischen 0,1 und 1 geschoben. Die mit DCF angefärbten Proben zeigten Fluoreszenzintensitäten über 1 AU. Dieser Bereich wurde mit RN2 eingegrenzt. Dadurch kann der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten bestimmt werden und mit der Menge an gebildetem DCF und somit mit dem intrazellulären ROS-Spiegel in Relation gesetzt werden.

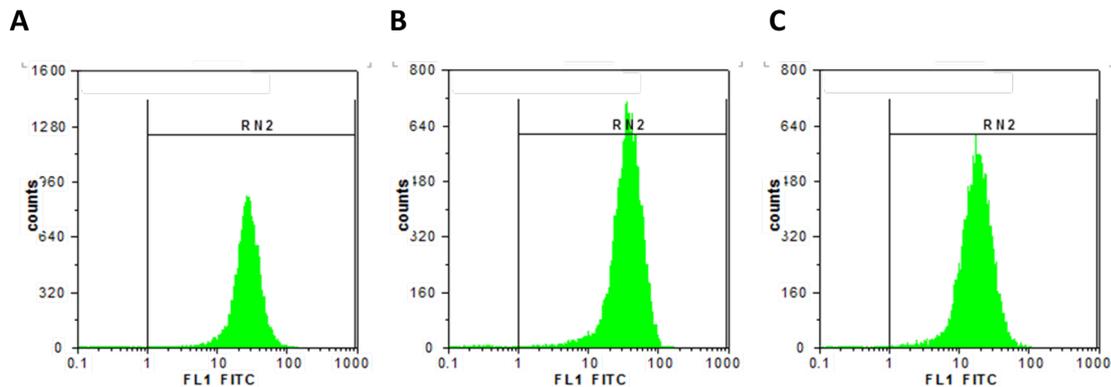


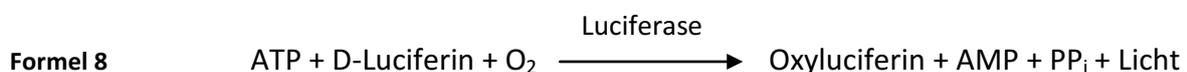
Abbildung 18: Fluoreszenzmessung von DCF im ROS Assay. (A) Natriumchlorid-Kontrolle: mittlere Fluoreszenzintensität bei 29,60 AU, (B) Cisplatin erhöht die ROS-Bildung und damit die Menge an DCF. Die Fluoreszenz steigt: mittlere Intensität bei 39,65 AU und (C) Ascorbinsäure inaktiviert ROS, sodass weniger DCF gebildet wird und Fluoreszenzintensität sinkt: mittlere Intensität bei 20,11 AU.

5.3.20 Migration

Das Migrationsverhalten von den neu erhaltenen Zelllinien A2780Resv und A2780Ellag sowie A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag wurde mit deren Ausgangszelllinien A2780 und A2780CisR in einem Scratch Assay verglichen. Die Zellen wurden in einer 6-well Platte in ihrem Wachstumsmedium konfluent ausplattiert (ca. 3 000 000 Zellen/well). Nach 6 Stunden waren die Zellen angewachsen. Zu diesem Zeitpunkt wurde mit einer 200 µl Pipettenspitze ein Kratzer in den Zellrasen gezogen [227] und das Nährmedium gegen serumfreies Nährmedium ausgetauscht. Mittig vom Well wurde von außen eine Markierung am Kratzer gesetzt. Der Kratzers wurde unter dem Mikroskop an der markierten Position mit der Motic Kamera fotografiert. Der Abstand des Kratzers wurde mit der Software Motic Images Plus 2.0 vermessen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen wieder an der markierten Position fotografiert und der verbleibende Abstand vermessen. Die Abstände wurden auf die Breite kurz nach dem Kratzen normiert und die prozentualen Migrationsstrecken bestimmt.

5.3.21 Intrazellulärer ATP-Gehalt

Den Gehalt von intrazellulärem ATP wurde mittels Luciferin/Luciferase-Assay bestimmt. Die Zellen wurden in 6-well Platten ausplattiert (MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR: 300 000 Zellen/well). Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium gegen FKS-freies Nährmedium ausgetauscht und die Zellen entweder mit shRNA enthaltendem Plasmid, Leervektor, Mock-Kontrolle (s. Transfektion der Vektoren in die Krebszelllinien) oder mit 3-BrPy für 6 Stunden behandelt. Anschließend wurde das Nährmedium wieder gegen das normale Nährmedium ausgetauscht und nach 18 bzw. 42 Stunden wurden die Zellen lysiert. Dafür wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen 30 Minuten auf Eis mit dem Lysis Puffer inkubiert. Nach dem Abschaben wurde die Suspension bei 14 000 rpm, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und auf Eis gehalten oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Von dem Lysat wurden 10 µl pro well in eine weiße 96-well Platte pipettiert. Zusätzlich wurden 10 µl von den Verdünnungen der ATP-Standard-Konzentrationsreihe in die Einbuchtungen vorgelegt. Die Platte wurde im LumiStar auf 28°C temperiert. Über die Pumpe wurden 90 µl der Standard-Reaktions-Lösung zugegeben und der Anstieg der Biolumineszenz gemessen. Die Standard-Reaktionslösung enthielt neben DTT auch D-Luciferin und Luciferase. In Anwesenheit von ATP wandelt die Luciferase das D-Luciferin unter Abgabe von Photonen zu Oxyluciferin um. Das ATP wird dabei zu AMP dephosphoryliert. Die Intensität der Biolumineszenz ist proportional zum ATP-Gehalt [228] [229]. Die Menge an ATP wird auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen [112], die mittels BCA Protein Assay bestimmt wurde.



5.3.22 Bestimmung von intrazellulären Calcium-Ionen

Zur Bestimmung der Menge an intrazellulären Calcium-Ionen wurden die A2780 und A2780CisR Zellen mit 50 000 Zellen/well in einer 96-well Platte, ähnlich wie in [230] beschrieben, ausgesät. Damit die Zellen am Tag der Messung fest angewachsen waren, wurden die Zellen nach dem Ausplattieren zwei Tage im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt ruhen gelassen. Zwischendurch wurde das Nährmedium einmal ausgetauscht. Am Tag der Messung wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen wurden zwei Mal mit 37°C temperierten KHP 1X (40 µl/well) gewaschen. Zu den 3 µl Oregon Green® 488 BAPTA-1 (OG) Lösung, die bei Raumtemperatur aufgetaut wurde, wurden 3 µl der Pluronic® F-127-Stammlösung und 2 ml KHP 1X zugegeben. Diese Mischung wurde stets frisch kurz vor Gebrauch hergestellt. Die Zellen wurden mit 20 µl/well der OG-Mischung für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Dunkeln beladen. Durch die Acetoxymethylester-Reste im OG kann der Fluorophor durch die Membran in die Zellen diffundieren. Innerhalb der Zellen werden die Ester-Gruppen durch unspezifische Esterasen gespalten, wodurch der Fluorophor in der Zelle verbleibt. Währenddessen wurde die Verdünnungsreihe von Phomoxanthon A mit den Konzentrationen 10 µM, 100 µM und 300 µM hergestellt. Da Phomoxanthon A lipophil ist, wurde es in DMSO zu 10 mM gelöst und anschließend in KHP 1X verdünnt. Die Verdünnungen wurden immer frisch kurz vor dem Gebrauch hergestellt. Als Kontrollen wurden KHP 1X und KHP 1X + 10% DMSO (final 1% DMSO) verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überstehende OG entfernt und die Zellen mit KHP 1X gewaschen. Zu den Zellen wurden jeweils 180 µl vorgewärmter (37°C) KHP 1X pipettiert und die Platte in den vorgewärmten (37°C) NOVOstar gestellt. Nach 15 Minuten Inkubation wurde der Hintergrund aufgenommen (Ex = 488 nm, Em = 520 nm). Danach wurden die verschiedenen Phomoxanthon A Konzentrationen und die Kontrollen mit 20 µl/well (1:10 Verdünnung) dazu pipettiert. Final wurden also die Konzentrationen 1 µM, 10 µM und 30 µM untersucht. Die Messung wurde im Plate Mode mit 30 Zyklen durchgeführt. Dies bedeutet, dass der Messkopf jedes well in der Platte hintereinander innerhalb eines Zyklus abfährt und die Fluoreszenz misst. Ein Zyklus dauerte eine Minute, somit betrug die gesamte Messzeit 30 Minuten. Freie Ca²⁺-Ionen komplexieren mit OG, was einen Anstieg der Fluoreszenz bewirkt. Somit kann die Intensität des Fluoreszenzanstiegs mit der Menge an freigesetzten Ca²⁺-Ionen korreliert werden.

Zwischen 9 und 15 Minuten wurde ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet. Danach sank die Fluoreszenzintensität auf den basalen Level zurück. Daher wurde zur Berechnung der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentrationen der Zeitraum zwischen 9 und 15 Minuten berücksichtigt. Nachdem die Fluoreszenzintensität bestimmt wurde, wurden die Zellen mit 1% Triton X-100 lysiert, um die maximale Fluoreszenzintensität F_{\max} zu bestimmen. Anschließend wurde 10 mM EDTA zugegeben, um jegliche Calcium-Ionen zu komplexieren und die minimale Fluoreszenzintensität F_{\min} zu messen. Für die Berechnung des Gehalts der freien Calcium-Ionen in den Zelllinien wurde folgende Gleichung verwendet [231]:

Formel 9
$$[Ca^{2+}] = K_D * \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F}$$

F = Fluoreszenzintensität

F_{\min} = minimale Fluoreszenzintensität

F_{\max} = maximale Fluoreszenzintensität

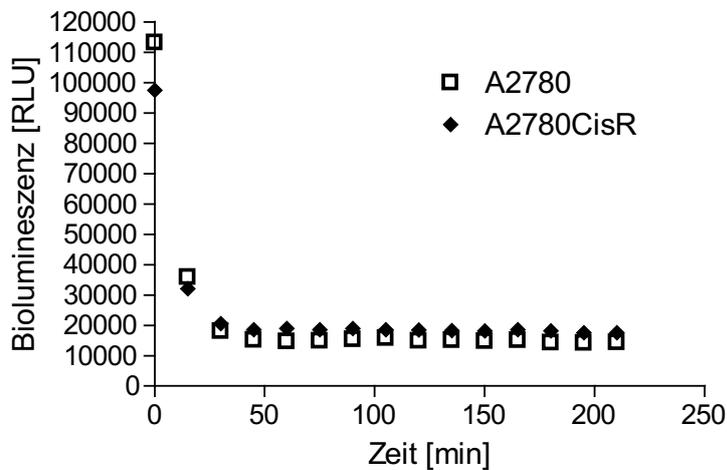
Die Dissoziationskonstante K_D von OG liegt laut Hersteller bei 170 nM.

5.3.23 Bestimmung der Aktivität von Caspase 8 und Caspase 9

Die Zellen der Zelllinien A2780 und A2780CisR wurden mit 30 000 Zellen/well in eine 96-well Mikrotiterplatte mit weißen Wänden ausplattiert. Dabei wurden mindestens zwei wells ausgelassen, die als Blank-Kontrolle dienten. Nachdem die Zellen einen Tag im Inkubator geruht haben, wurde das Nährmedium ausgetauscht. Die Proben die mit dem Caspaseinhibitor Q-VD-OPh (QVD) behandelt wurden, wurden eine Stunde mit 20 μ M des Inhibitors vorbehandelt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden 1:10 verdünnt zu den Zellen gegeben. Die finalen Konzentrationen von Phomoxanthon A und Embellicin A waren jeweils 5 μ M. Als Kontrolle zur Induktion der Caspase-Aktivität wurde Cisplatin verwendet. Die A2780 Zellen wurden mit 20 μ M Cisplatin und die A2780CisR Zellen mit 50 μ M Cisplatin behandelt. Als weitere Kontrolle blieben Zellen unbehandelt.

A

Caspase 8 Aktivität



B

Caspase 9 Aktivität

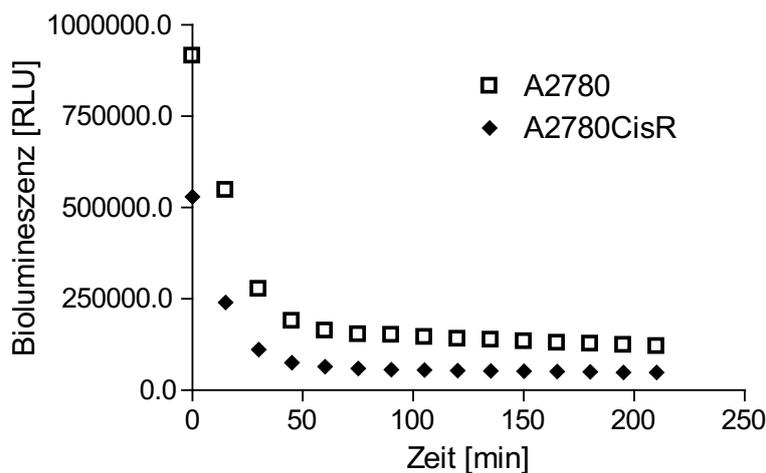


Abbildung 19: Zelllyse durch Caspase-Glo® Substrat von Promega. Nach Zugabe des Caspase-Glo® Substrats wurden die Zellen lysiert. Die Enzym-Aktivität von Caspase 8 (A) und Caspase 9 (B) wurde durch die Detektion der Biolumineszenz gemessen, die bei der Abspaltung von Luciferin vom Caspase-Substrat und dessen weitere Umsetzung durch Luciferase entstanden ist. Die Biolumineszenz wurde alle 15 Minuten gemessen, um den Zeitpunkt zu ermitteln, ab dem die Werte konstant bleiben.

Nach 24 Stunden im Inkubator wurde entweder das Caspase-Glo® 8 Substrat oder das Caspase-Glo® 9 Substrat aus den jeweiligen Kits von Promega im Verhältnis 1:1 zu den Zellen und in die Blank-Kontrollen gegeben. Die Substrate, die in Puffer gelöst und mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 versetzt waren, wurden vor der Verwendung auf

Raumtemperatur gebracht. Nach Zugabe der Substrate wurde die Platte im LUMIstar bei 25°C und 350 rpm für eine Minute geschüttelt. Anschließend wurde die Messung der Biolumineszenz gestartet, wobei alle 15 Minuten die Platte im Plate Mode vermessen wurde. Sobald die Intensität der gemessenen Biolumineszenz konstante Werte annahm, konnte die Messung beendet werden. Dies war bereits eine Stunde nach Substratzugabe der Fall (Abbildung 19). Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen vollständig lysiert und die Caspasen freigesetzt. Die aktivierte Caspase spaltet das Luciferin von ihrem Substrat ab. Das freigeordnete Luciferin wird anschließend von der Luciferase zu Oxyluciferin umgesetzt, wobei Photonen emittiert werden (s. Formel 8). Die Intensität der Biolumineszenz ist proportional zur Stärke der Aktivität der jeweiligen Caspase. Die Werte der Blank-Kontrollen wurden von den Werten der unbehandelten Kontrollen und der behandelten Proben subtrahiert.

5.3.24 Statistik

Die Experimente wurden mindestens zwei Mal durchgeführt. Die Konzentrations-Effekt-Kurven aus den MTT Assays wurden mit einer nicht-linearen Regression generiert, wobei die 4-Parameter logistische Gleichung mit variabler Steigung verwendet wurde (GraphPad Prism Version 4, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Die IC_{50} ist die Konzentration der verwendeten Substanz, bei der das aufgenommene Signal um 50% reduziert war. Der pIC_{50} -Wert ist der $-\log IC_{50}$. Für die Auswertung wurden die Daten der jeweiligen Experimente auf die entsprechende Kontrolle normalisiert. Die Ergebnisse der einzelnen Experimente wurden gemittelt und mit Standardfehler angegeben. Die Resistenzfaktoren bzw. Shiftfaktoren sind der Quotient aus den IC_{50} -Werten der behandelten Probe und der unbehandelten Kontrolle (Formel 6). Die statistische Signifikanz in allen Assays bis auf die qPCR Experimente wurde mit dem two-tailed Student's t-test berechnet. Für die statistische Analyse der qPCR Daten wurden die Formel 2 bis Formel 4 verwendet (siehe Kapitel 5.3.10 Reverse Transkription (RT)-PCR und quantitative PCR (qPCR)). Für die statistische Signifikanz der Analyse der Daten aus dem Kaplan-Meier-Plot wurde der logrank-Test berücksichtigt. Wenn $p < 0,05$ ist, wurde dies als signifikant betrachtet.

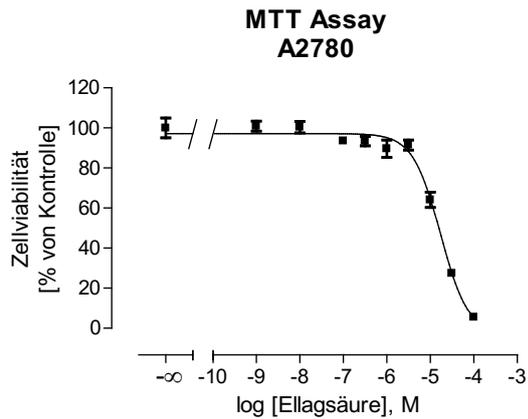
6 Ergebnisse

6.1 Die Wirkung von Ellagsäure und Resveratrol auf die Cisplatinresistenz in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780CisR

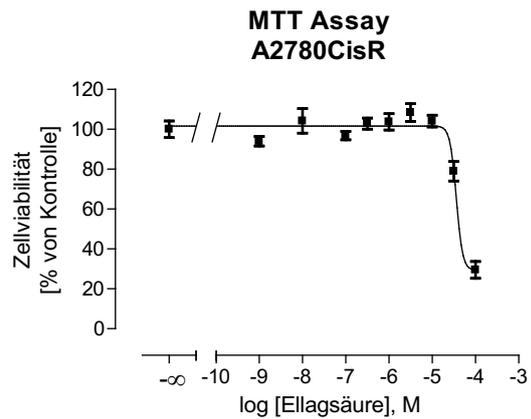
Die zytotoxische Aktivität von Ellagsäure und Resveratrol wurde an den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780CisR durch einen MTT Assay nach 72 Stunden Inkubationszeit bestimmt.

Der IC_{50} -Wert für Ellagsäure an A2780CisR ist mit 36,3 μ M ungefähr 2-fach höher als der IC_{50} -Wert an A2780 mit 17,0 μ M (Abbildung 20A und B). Für die kurzzeitige und langfristige Inkubation wurden die A2780 Zellen mit 3,2 μ M Ellagsäure und die A2780CisR Zellen mit 10 μ M Ellagsäure behandelt. Diese Konzentrationen waren nicht toxisch für die Zellen. Höhere Konzentrationen hätten bereits die Zellviabilität beeinflusst. Der erhaltene IC_{50} -Wert für Resveratrol war für beide Zelllinien mit 60,3 μ M bzw. 70,8 μ M ähnlich (Abbildung 20C und D). Für Kurz- und Langzeitinkubationen mit Resveratrol wurde die Konzentration von 10 μ M gewählt, bei der Resveratrol keinen toxischen Effekt hat. Die zytotoxische Aktivität von Cisplatin wurde nach 72 Stunden im MTT Assay bestimmt (Abbildung 21). An A2780 lag der IC_{50} von Cisplatin bei 1,86 μ M und an A2780CisR bei 10,2 μ M. Nach der 48-stündigen Vorbehandlung der Zellen mit Ellagsäure bzw. Resveratrol vor der Cisplatin-Zugabe wurde die Sensitivität von Cisplatin in A2780 und A2780CisR erhöht (Shiftfaktor Ellagsäure: A2780: 2,4; A2780CisR: 1,3; Shiftfaktor Resveratrol: A2780: 3,1; A2780CisR: 1,4). Die Shiftfaktoren in A2780 Zellen sind mit $p < 0,05$ signifikant (Abbildung 21). Die Shiftfaktoren in A2780CisR waren nicht signifikant verschieden von 1.

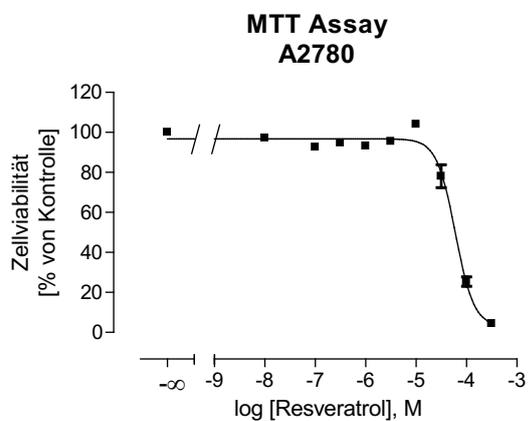
A



B



C



D

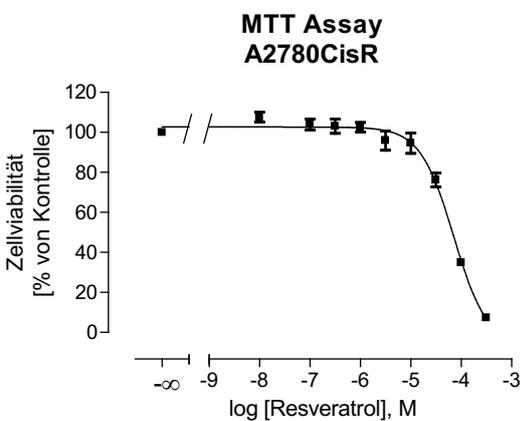


Abbildung 20: Konzentrations-Effekt-Kurven von Ellagsäure und Resveratrol an A2780 und A2780CisR Zellen (MTT Assay). In A2780 (A) ist Ellagsäure potenter ($pIC_{50} = 4,77 \pm 0,07$) als in der cisplatinresistenten A2780CisR Zelllinie (B) ($pIC_{50} = 4,44 \pm 0,95$). Im Gegensatz zu Ellagsäure ist Resveratrol ähnlich toxisch für beide Zelllinien. In A2780 (C) wurde $pIC_{50} = 4,22 \pm 0,03$ und in A2780CisR Zellen (D) $pIC_{50} = 4,15 \pm 0,08$ bestimmt. Die gezeigten Daten zeigen ein typisches Experiment aus einer Reihe von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Replikaten.

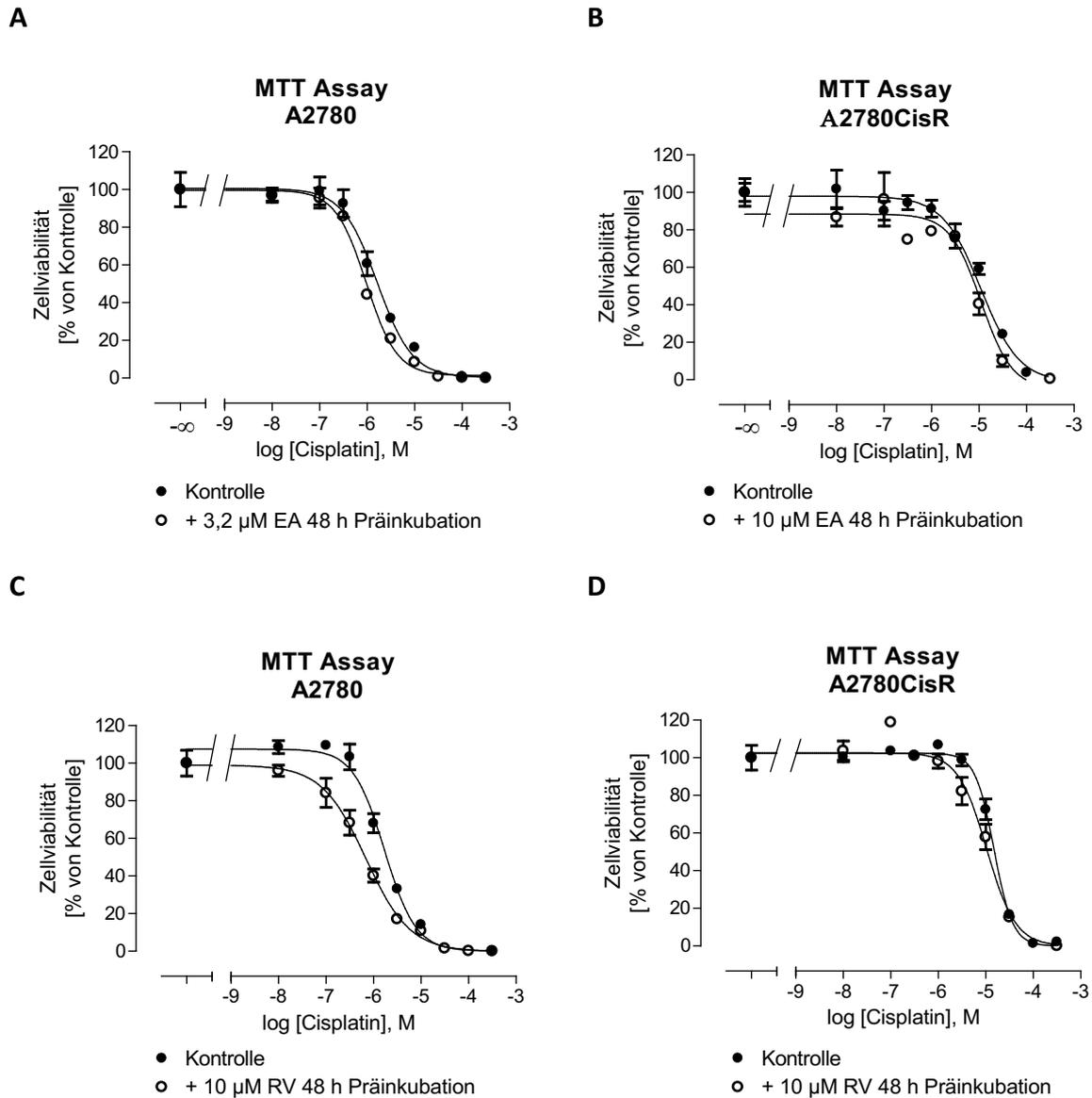
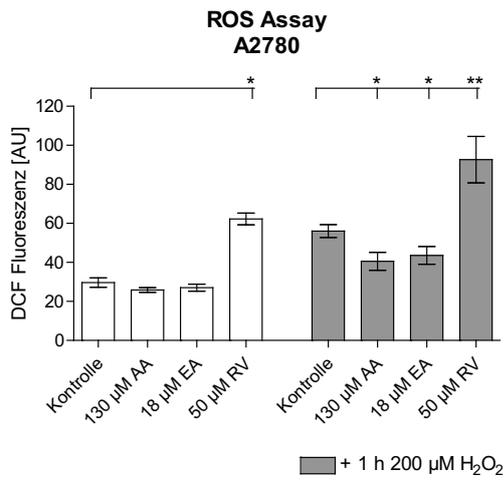


Abbildung 21: Modulation der Zytotoxizität von Cisplatin durch Ellagsäure und Resveratrol (MTT Assay).

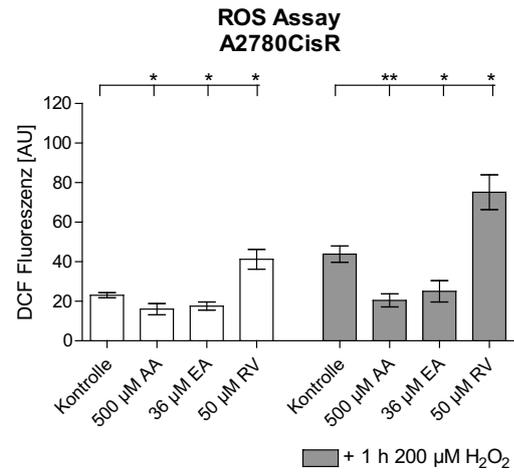
Inkubation mit 3,2 μ M bzw. 10 μ M Ellagsäure (EA) oder 10 μ M Resveratrol (RV) 48 Stunden vor der Zugabe von Cisplatin erhöhte die Zytotoxizität von Cisplatin in A2780 und A2780CisR. (A) Der pIC_{50} -Wert für Cisplatin in der unbehandelten A2780 betrug $5,73 \pm 0,04$ und in Anwesenheit von 3,2 μ M EA lag dieser bei $6,04 \pm 0,04$. (B) Der pIC_{50} -Wert für Cisplatin betrug in der unbehandelten A2780CisR $4,87 \pm 0,02$ und in Anwesenheit von 10 μ M EA $4,99 \pm 0,05$. (C) Die Präinkubation mit 10 μ M RV für 48 Stunden erhöhte den pIC_{50} für Cisplatin in A2780 auf $6,14 \pm 0,01$. (D) In A2780CisR wurde der pIC_{50} in Anwesenheit von 10 μ M RV auf $5,05 \pm 0,12$ erhöht (kein signifikanter Shift). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler aus einem typischen Experiment aus einer Reihe von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Replikaten.

Ellagsäure ist als Antioxidans bekannt und kann Apoptose in Zellen von Krebszelllinien induzieren [146] [158] [159] [168]. Resveratrol kann ebenfalls Apoptose induzieren und den ROS-Gehalt der Zelle in verschiedenen Zelllinien beeinflussen [158] [182] [190] [191] [192] [193] [194]. Die Auswirkung von Ellagsäure und Resveratrol wurden auf den Spiegel von ROS in A2780 und A2780CisR untersucht. Ähnlich wie das Antioxidans Ascorbinsäure reduzierte Ellagsäure den ROS-Spiegel in A2780 und A2780CisR Zellen, die mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden. In A2780 (Abbildung 22A) wurde die ROS-Produktion nach Wasserstoffperoxid durch Ellagsäure um 12% und in A2780CisR (Abbildung 22B) um 19% gesenkt. Ellagsäure hatte, ähnlich wie Ascorbinsäure, keinen signifikanten Effekt auf den basalen Level von ROS in beiden Zelllinien (unbehandelte Kontrolle). Im Gegensatz zu Ellagsäure erhöhte Resveratrol den Spiegel von ROS in A2780 und A2780CisR sowohl in den unbehandelten Kontrollen als auch nach der Behandlung mit Wasserstoffperoxid (Abbildung 22A und B). In der sensitiven Zelllinie wurde der ROS-Gehalt um 32% und in der resistenten Zelllinie um 18% signifikant erhöht (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Cisplatin induzierte ebenfalls die Bildung von ROS in A2780 (Abbildung 22C). In A2780CisR Zellen induzierte Cisplatin keinen signifikanten Anstieg von ROS (Abbildung 22D). Ellagsäure reduzierte signifikant die Bildung von Cisplatin-induzierten ROS in beiden Zelllinien (Abbildung 22C und D). Die alleinige Behandlung mit Resveratrol steigerte die ROS-Produktion. Eine Kombination von Resveratrol mit Cisplatin hatte keinen weiteren Effekt.

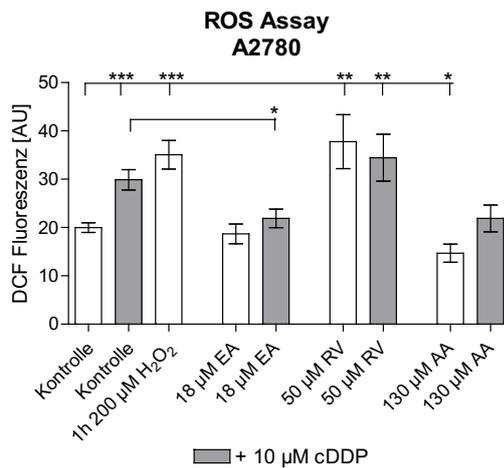
A



B



C



D

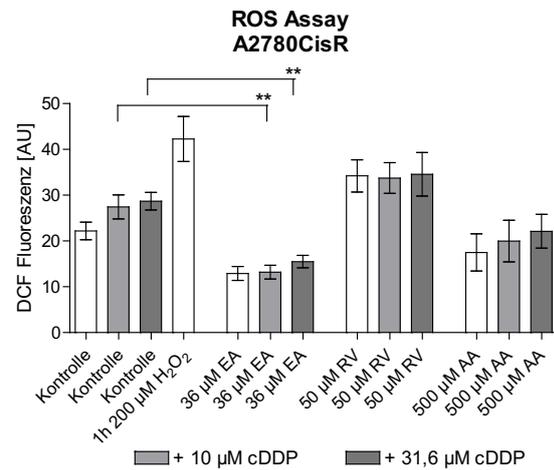


Abbildung 22: Modulation der ROS-Induktion durch Ellagsäure und Resveratrol (ROS Assay). Die Zugabe von Ellagsäure (EA) reduzierte den Spiegel von ROS nach der Behandlung mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) ähnlich wie Ascorbinsäure (AA). Im Gegensatz zu EA förderte Resveratrol (RV) die Bildung von ROS in beiden Zelllinien (A und B). Zusätzlich inhibierte EA die Bildung von ROS durch die Behandlung mit Cisplatin. Die Kombination von RV und Cisplatin hatte keinen weiteren Effekt (C und D). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Der geringe, jedoch signifikante, Effekt der 48-stündigen Präinkubation von Resveratrol und Ellagsäure auf die Chemosensitivität von Cisplatin in A2780 und der geringe Effekt in A2780CisR (Abbildung 21, Tabelle 16) veranlasste den Effekt von Ellagsäure und Resveratrol auf die Entwicklung der Chemoresistenz gegen Cisplatin zu untersuchen. Daher wurde die cisplatin-sensitive Zelllinie A2780 mit der Cisplatin IC_{50} in permanenter Anwesenheit von 10 μ M Resveratrol bzw. 3,2 μ M Ellagsäure in wöchentlichen Zyklen (6 Stunden) für 26 Wochen ausgesetzt (Abbildung 23A), ähnlich dem zuvor publiziertem Protokoll von Eckstein et al. [22].

Tabelle 16: Zusammenfassung der IC_{50} -Werte von Cisplatin. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. (Ellagsäure: EA; Resveratrol: RV).

Zelllinie	$pIC_{50} \pm SEM$	$IC_{50} [\mu M]$	Shift- oder Resistenzfaktor
A2780	5,73 \pm 0,04	2,24	
A2780 + 3,2 μ M EA 48 h Präinkubation	6,04 \pm 0,04	0,92	2,4*
A2780 + 10 μ M RV 48 h Präinkubation	6,14 \pm 0,01	0,72	3,1*
A2780CisR	4,87 \pm 0,02	13,9	6,2*
A2780CisR + 10 μ M EA 48 h Präinkubation	4,99 \pm 0,05	10,8	1,3 ⁺
A2780CisR + 10 μ M RV 48 h Präinkubation	5,05 \pm 0,12	9,90	1,4 ⁺
A2780Ellag	5,64 \pm 0,05	2,63	1,2 [#]
A2780Resv	5,67 \pm 0,04	2,38	1,1 [#]
A2780CisR+Ellag	4,91 \pm 0,02	12,6	1,1 ⁺
A2780CisR+Resv	4,81 \pm 0,05	15,7	0,9 ⁺

*Resistenz- / Shiftfaktor signifikant unterschiedlich von 1 verglichen zu A2780;

⁺Resistenz- / Shiftfaktor nicht signifikant unterschiedlich von 1 verglichen zu A2780CisR;

[#]Resistenz- / Shiftfaktor nicht signifikant unterschiedlich von 1 verglichen zu A2780.

Die neu erhaltenen Zelllinien wurden als A2780Resv (mit 10 μM Resveratrol kultiviert) und A2780Ellag (mit 3,2 μM Ellagsäure kultiviert) bezeichnet. Die Entwicklung einer Cisplatinresistenz durch die wöchentliche Behandlung mit Cisplatin konnte durch die permanente Anwesenheit der Naturstoffe unterdrückt werden. Die Resistenzfaktoren blieben bis zum Ende der Behandlungen konstant und betrugen 1,1 für A2780Resv und 1,2 für A2780Ellag. Diese Faktoren sind nicht signifikant unterschiedlich von 1 (Abbildung 23A, Tabelle 16). Da die permanente Anwesenheit von Ellagsäure und Resveratrol die Entwicklung der Chemoresistenz von Cisplatin verhinderte, wurde weiterhin der Effekt der beiden Naturstoffe auf die Cisplatin-Zytotoxizität in A2780CisR Zellen untersucht (Abbildung 23B). Die A2780CisR Zellen wurden mit 10 μM Resveratrol oder 10 μM Ellagsäure permanent über 6 Monate kultiviert, woraus die Zelllinien A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag resultierten. Die Sensitivität gegenüber Cisplatin wurde im MTT Assay getestet. Die Cisplatin IC_{50} -Werte in A2780CisR+Resv (15,7 μM) und A2780CisR+Ellag (12,6 μM) blieben im Vergleich zu dem Wert von Cisplatin in A2780CisR (13,9 μM) unverändert (Tabelle 16). Dies zeigt, dass die permanente Anwesenheit von Ellagsäure oder Resveratrol eine voll entwickelte Cisplatinresistenz nicht revertieren kann, jedoch die Entwicklung dieser Resistenz verhindern kann.

Als nächstes wurde der basale Gehalt von ROS in A2780Resv und A2780Ellag mit dem der A2780 und A2780CisR Zellen verglichen. Die kurzzeitige Präinkubation von Ellagsäure und Resveratrol hatte unterschiedliche Effekte auf die ROS-Produktion (Abbildung 22). Der basale Gehalt von ROS in A2780Ellag und A2780Resv war verglichen mit der Ausgangszelllinie A2780 signifikant reduziert (Abbildung 23C). Zudem wurde die Induktion von ROS durch Cisplatin oder Wasserstoffperoxid in der A2780Resv Zelllinie vollständig inhibiert. In der A2780Ellag wurde ein geringer, jedoch kein signifikanter, Anstieg von ROS durch Wasserstoffperoxid bzw. Cisplatin beobachtet. Insgesamt war der Spiegel von ROS in A2780Ellag höher als in A2780Resv, allerdings noch signifikant geringer als in der A2780 Kontrolle (Abbildung 23C).

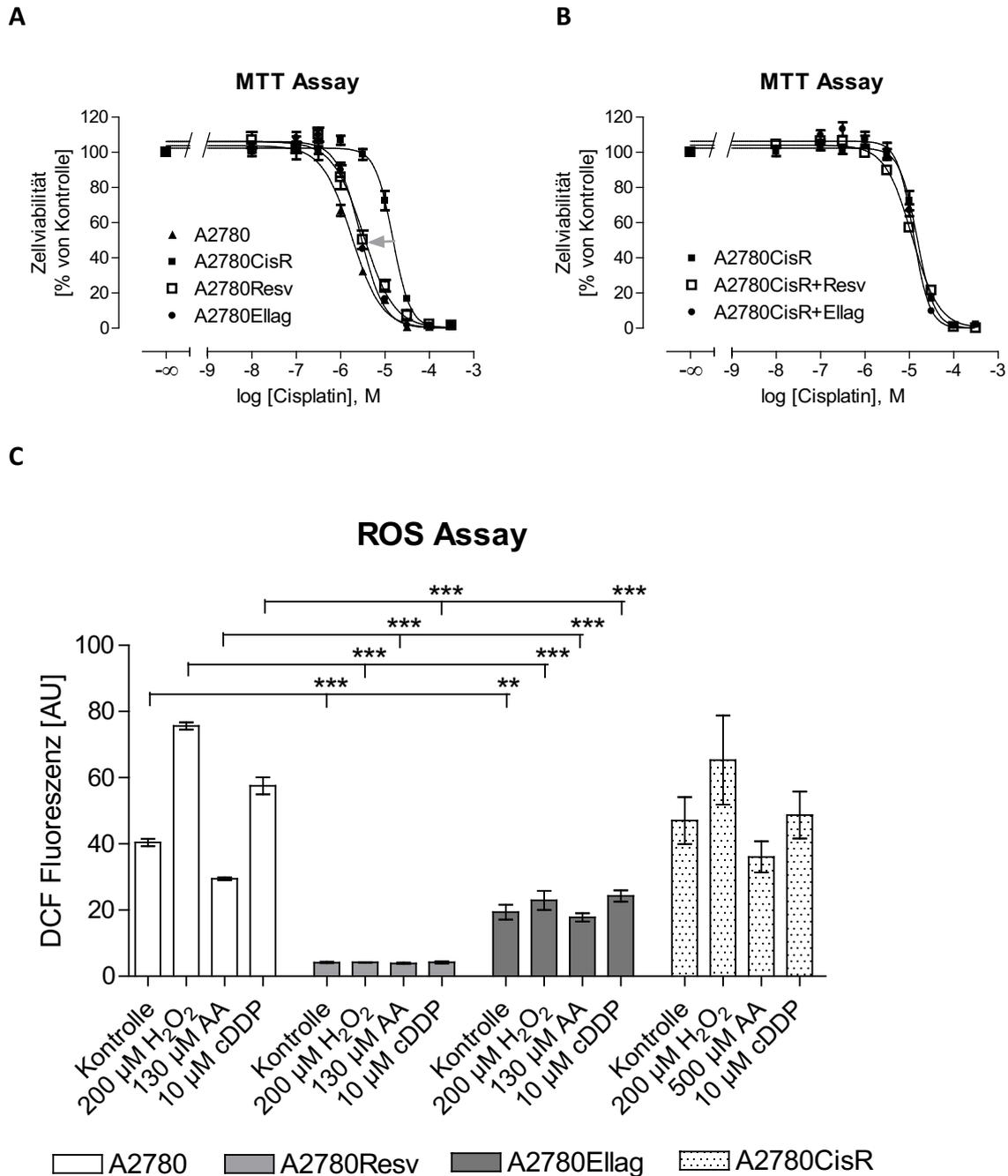


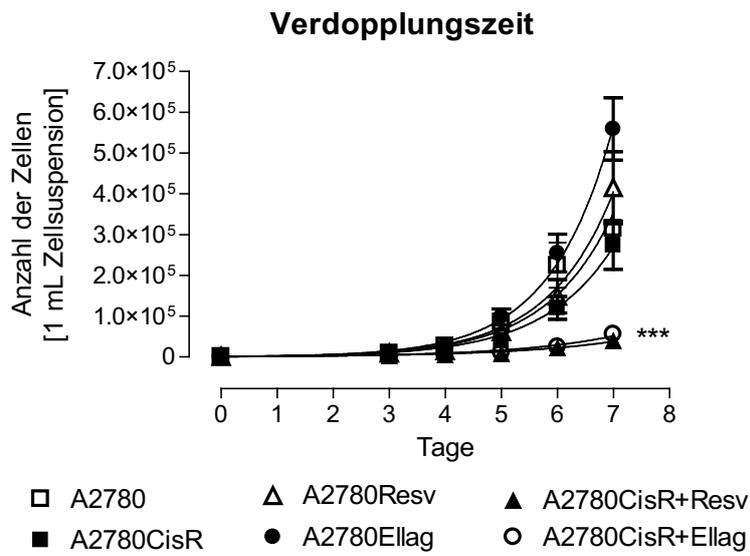
Abbildung 23: Ellagsäure und Resveratrol verhindern die Entwicklung der Cisplatinresistenz in A2780 Zellen.

A2780 Zellen wurden mit der IC_{50} von Cisplatin wöchentlich für 6 Stunden über 26 Zyklen in permanenter Anwesenheit von $3,2 \mu\text{M}$ Ellagsäure oder $10 \mu\text{M}$ Resveratrol behandelt. (A) Die generierten Zelllinien A2780Resv und A2780Ellag entwickelten keine Resistenz. Die berechneten Resistenzfaktoren waren nicht signifikant unterschiedlich von 1. (B) Im Gegensatz dazu, blieb der IC_{50} -Wert für Cisplatin in A2780CisR trotz der langfristigen Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Resveratrol (A2780CisR+Resv) oder $10 \mu\text{M}$ Ellagsäure (A2780CisR+Ellag) konstant. (C) Die langfristige Inkubation mit Ellagsäure bzw. Resveratrol reduzierte den basalen Spiegel von ROS. Beide Substanzen inhibierten die ROS-Produktion durch Wasserstoffperoxid oder Cisplatin. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Um das Potential für die Krebstherapie von Ellagsäure und Resveratrol einzuschätzen, wurde das Wachstums- und Migrationsverhalten der neu generierten Zelllinien mit ihren Ausgangszelllinien verglichen. Die Zellen wurden mit derselben Zellzahl ausgesät und anschließend die Verdopplungszeit mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. Die Zelllinien A2780 und A2780CisR zeigten ein identisches Wachstumsverhalten (Abbildung 24A). Die Proliferation von A2780Resv und A2780Ellag war moderat stärker, jedoch nicht signifikant, als bei A2780 und A2780CisR. Dagegen wurde das Wachstum der Zelllinien A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag durch die permanente Anwesenheit der Naturstoffe signifikant verringert (Abbildung 24A).

In einem *in vitro* Scratch Assay wurde das Migrationspotential aller Zelllinien untersucht. Die Bilder der Abbildung 24B stellen die Zelllinien unmittelbar und 24 Stunden nach dem angesetzten Kratzer dar. Die Zelllinie A2780CisR zeigte eine signifikant erhöhte Migration verglichen zu der A2780 (22% verglichen zu 11%). Obwohl die Zelllinien A2780Resv und A2780Ellag verglichen zu A2780 eine leicht erhöhte Proliferation aufwiesen (Abbildung 24A), ist das Migrationspotential der neu generierten Zelllinien signifikant niedriger. Die Zelllinien A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag zeigten ein viel niedrigeres Migrationspotential als A2780CisR ($***p < 0,001$). Die Migration war sogar niedriger als bei den A2780 Zellen, obwohl die Cisplatinresistenz in diesen neu generierten Zelllinien ähnlich wie der in der A2780CisR erhalten blieb (Tabelle 16). Der Effekt von Ellagsäure und Resveratrol in A2780CisR+Ellag und A2780CisR+Resv auf das Migrationsverhalten kann aus der stark reduzierten Proliferation resultieren (Abbildung 24A).

A



B

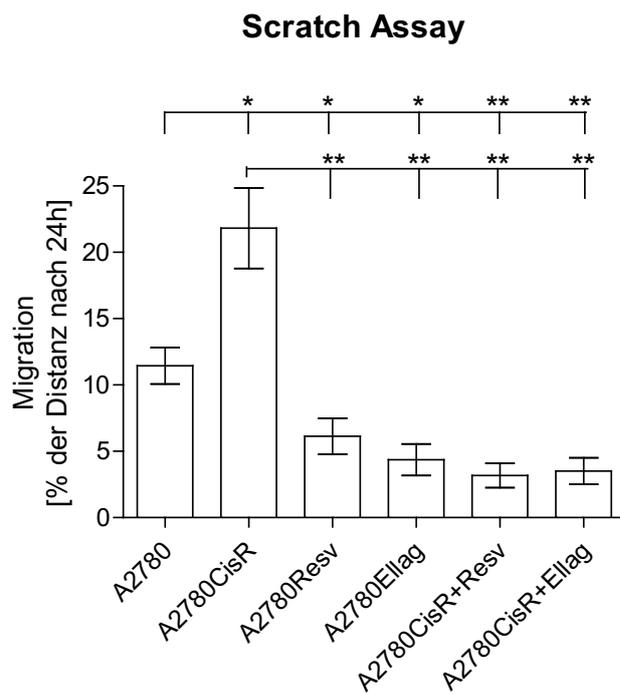
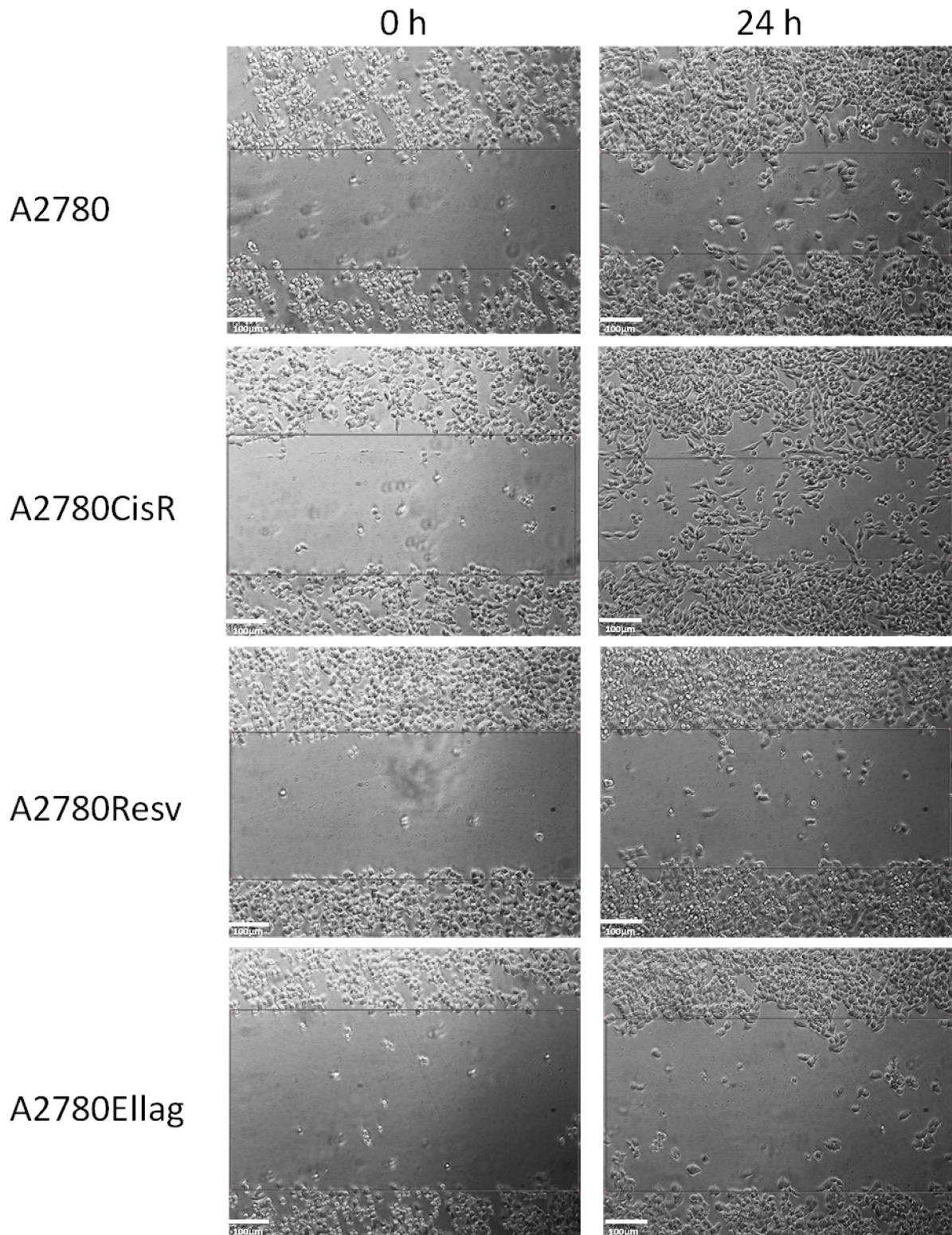
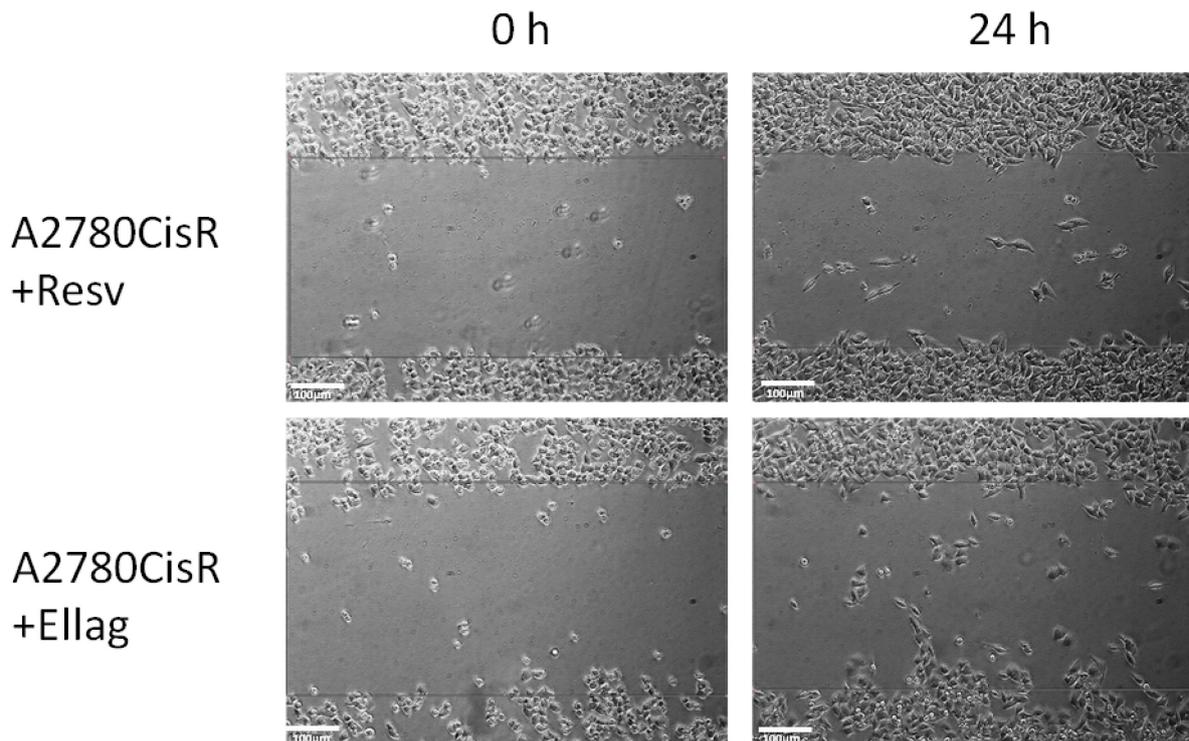


Abbildung 24: Legende siehe Ende der Abbildung auf Seite 115.



Fortsetzung Abbildung 24: Legende siehe Ende der Abbildung auf Seite 115.



Fortsetzung Abbildung 24: Wachstums- und Migrationsverhalten von A2780Resv und A2780Ellag sowie von A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag im Vergleich zu A2780 und A2780CisR. (A) A2780 und A2780CisR zeigten ein identisches Wachstumsverhalten. A2780Resv und A2780Ellag zeigten eine leicht erhöhte Proliferation. Dagegen zeigten A2780CisR+Ellag und A2780CisR+Resv verglichen zu der Ausgangszelllinie eine stark reduzierte Proliferation ($***p < 0,001$). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten. **(B)** Analyse der Zellmigration durch einen *in vitro* Scratch Assay. Die Bilder wurden zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden nach Anlegen des Kratzers mit einem Phasen-Kontrast Mikroskop aufgenommen und repräsentieren ein typisches Experiment aus einer Reihe von mindestens drei Experimenten. A2780CisR zeigte das größte Migrationspotential, wogegen die Zelllinien A2780Resv, A2780Ellag, A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag langsamer migrierten als die Ausgangszelllinie A2780 (weißer Balken: 100 μm). Dies wurde in einem Balkendiagramm analysiert ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Der Effekt von Cisplatin auf die Auslösung von Apoptose wurde in den neu generierten Zelllinien im Vergleich zu den ursprünglichen Zelllinien untersucht (Abbildung 25). Nach 48-stündiger Inkubation mit 10 μM Cisplatin waren 38% der Zellen der Zelllinie A2780 frühapoptotisch und 5% der Zellen spätapoptotisch, also insgesamt 43% der Zellen apoptotisch. In Bezug auf die Gesamtzahl der apoptotischen Zellen verhielten sich die Zelllinien A2780Resv und A2780Ellag ähnlich wie die Zellen der A2780. Allerdings war die Verteilung der Zellen in Früh- und Spätapoptose unterschiedlich. In der A2780Resv Zelllinie waren 20% der Zellen frühapoptotisch und 17% der Zellen spätapoptotisch. Insgesamt waren 37% der Zellen apoptotisch. In der A2780Ellag Zelllinie waren 17% der Zellen frühapoptotisch und 23% der Zellen spätapoptotisch. Somit waren insgesamt 40% der Zellen in Apoptose. Dies zeigt, dass die Zellen der Zelllinien A2780Resv und A2780Ellag die Phasen der Apoptose schneller durchlaufen als die Ausgangszelllinie A2780. Letztendlich haben A2780Resv und A2780Ellag eine ähnliche Sensitivität für Cisplatin wie A2780. Dagegen konnte die eingesetzte Konzentration von Cisplatin in der Zelllinie A2780CisR (5%) keine nennenswerte Apoptose induzieren. A2780CisR+Ellag und A2780CisR+Resv verhielten sich in Bezug auf Apoptoseinduktion nach der Cisplatinbehandlung ähnlich wie A2780CisR.

Der Zellzyklus von A2780, A2780CisR, A2780Resv und A2780Ellag wurde nach der 24-stündigen Inkubation von 3,5 μM bzw. 10 μM Cisplatin oder 50 nM Paclitaxel analysiert (Abbildung 26). Die Behandlung von 3,5 μM Cisplatin führte in A2780 Zellen zum S-Phasenarrest (34%). Ebenso arretierten ähnlich viele Zellen der A2780Resv Zelllinie (34%) und der A2780Ellag Zelllinie (32%) in der S-Phase (Abbildung 26). Im Gegensatz dazu befanden sich nur 25% der cisplatinresistenten Zellen in der Synthese-Phase (* $p < 0,05$ verglichen zu A2780). Die Behandlung mit 10 μM Cisplatin erhöhte die Anzahl der Zellen in S-Phase: A2780 46%; A2780Ellag 41%; A2780Resv 39% und A2780CisR 36% (Abbildung 26). Die Zellen aller Zelllinien arretierten nach der Behandlung mit Paclitaxel überwiegend in der G_2/M -Phase. Die Verteilung der Zellen nach der Behandlung mit 10 μM Cisplatin oder Paclitaxel wurde durch die langfristige Behandlung mit Ellagsäure oder Resveratrol nicht signifikant beeinflusst. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Apoptose-Analyse (Apoptose V Assay), dass A2780Resv und A2780Ellag Zellen einen ähnlichen cisplatin sensitiven Phänotyp aufweisen wie die Ausgangszelllinie A2780.

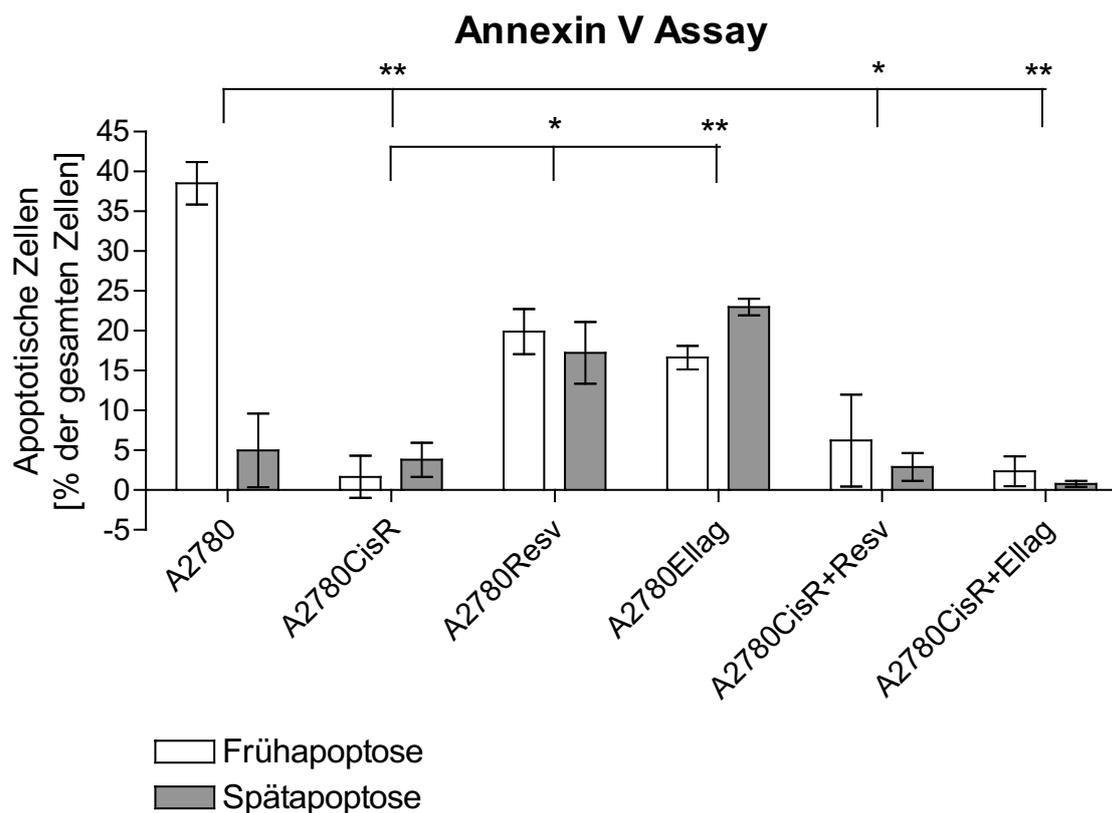


Abbildung 25: Cisplatininduzierte Apoptose in mit Ellagsäure oder Resveratrol behandelten versus unbehandelten A2780 und A2780CisR Zellen. Alle Zelllinien wurden mit 10 μ M Cisplatin für 48 Stunden behandelt. Die Gesamtmenge an cisplatininduzierter Apoptose in A2780Resv (20% früh- und 17% spätapoptotische Zellen = 37% Apoptose) und A2780Ellag (17% früh- und 23% spätapoptotische Zellen = 40% Apoptose) war ähnlich wie die in der sensitiven Zelllinie A2780 (38% früh- und 5% spätapoptotische Zellen = 43% Apoptose). In A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag induzierte Cisplatin insgesamt nur 9% bzw. 3% Apoptose. Die Werte sind vergleichbar mit dem der A2780CisR Zellen (5% insgesamt). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten und analysiert mit dem Durchflusszytometer (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

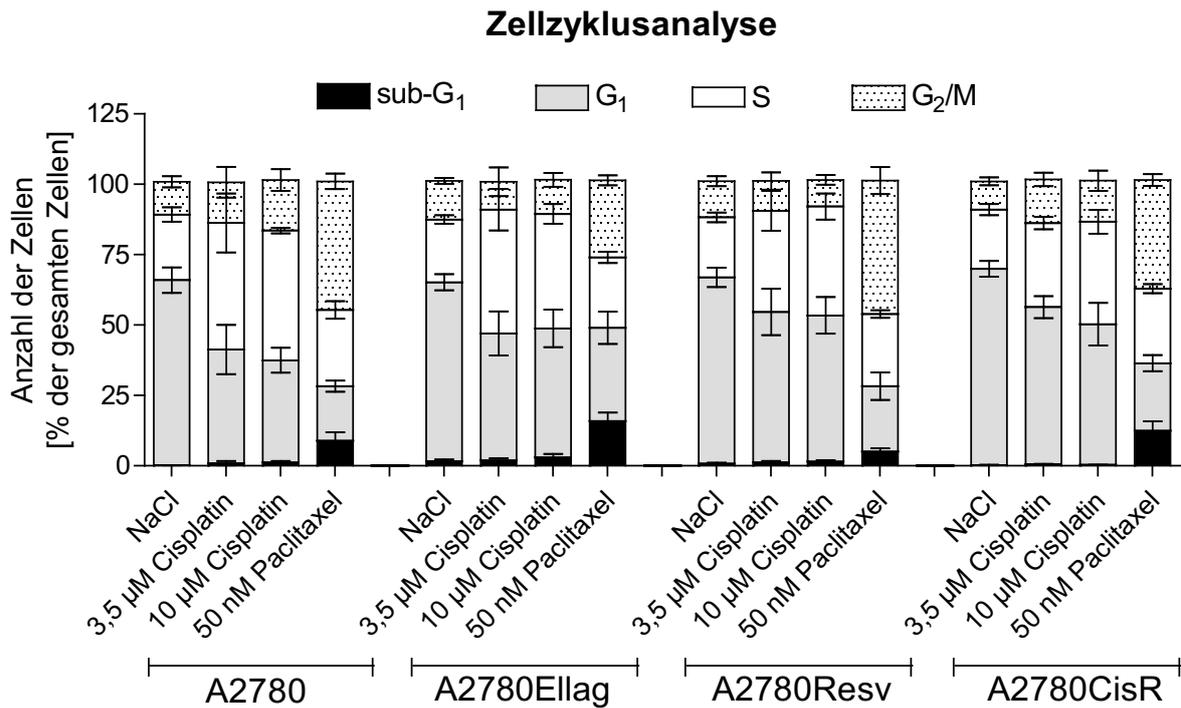


Abbildung 26: Zellzyklusarrest in den neu generierten Zelllinien im Vergleich zu A2780 und A2780CisR. Die Zellen wurden entweder mit 3,5 µM oder 10 µM Cisplatin für 24 Stunden behandelt. Paclitaxel wurde als Kontrolle für den G₂/M-Phasenarrest verwendet. Der Gehalt der Zellen, die nach der Zugabe von 3,5 µM Cisplatin in der S-Phase arretierten, betrug in A2780Ellag 32% und in A2780Resv 34%, ähnlich wie in A2780 mit 34%. Im Gegensatz dazu befanden sich nur 25% der resistenten Zellen in der S-Phase, was signifikant verschieden von A2780 ist (*p < 0,05). Durch die Behandlung mit 10 µM Cisplatin befanden sich 46% der A2780 Zellen in der S-Phase. Ähnlich viele Zellen arretierten in A2780Resv (39%) und A2780Ellag (41%) in der S-Phase. Dagegen war die Menge der A2780CisR Zellen in der S-Phase am geringsten (36%). Alle Zellen arretierten nach der Behandlung mit Paclitaxel in der G₂/M-Phase. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert ± Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten.

Eckstein et al. publizierte, dass ein Grund für die Entwicklung der Cisplatinresistenz in A2780CisR Zellen die Hochregulierung von IGF1R und IGF1 ist [22]. In dieser Arbeit wurde nach weiteren Ursachen geforscht. Es wurde untersucht, mit welchen Faktoren Ellagsäure und Resveratrol interagieren, was die Inhibition der Entwicklung der Cisplatinresistenz in A2780 Zellen (letztendlich A2780Ellag und A2780Resv) zur Folge hatte. In unterschiedlichen Proteom Profiler Analysen wurde der Status der Phosphorylierung verschiedener Kinasen und Rezeptor-Tyrosinkinasen untersucht. Im Phospho-Kinase Array wurden unterschiedliche Kinasen in A2780Resv und A2780Ellag mit denen von A2780 und A2780CisR verglichen (Abbildung 27). Dabei ist die unterschiedliche Phosphorylierung von ERK1/2 in den Zelllinien am prominentesten. In A2780CisR ist ERK1/2 stärker phosphoryliert als in A2780. Die permanente Behandlung mit Ellagsäure bzw. Resveratrol während den Cisplatinbehandlungen inhibierte die Aktivierung von ERK1/2. Die Phosphorylierung von ERK1/2 in A2780Resv und A2780Ellag ist schwächer als in A2780CisR und ähnlich wie in A2780. Die Serin/Threonin-Kinase Akt ist in A2780CisR an der Position S473 stärker phosphoryliert als in A2780. In diesem Fall haben Ellagsäure und Resveratrol die Phosphorylierung nicht gehemmt. Die Behandlung mit Ellagsäure induzierte die Aktivierung von eNOS. In den anderen Zelllinien wurde keine Phosphorylierung von eNOS beobachtet. Bei den anderen Kinasen in diesem Array wurde kein auffälliger Unterschied in der Phosphorylierung der Kinasen beobachtet (Abbildung 27).

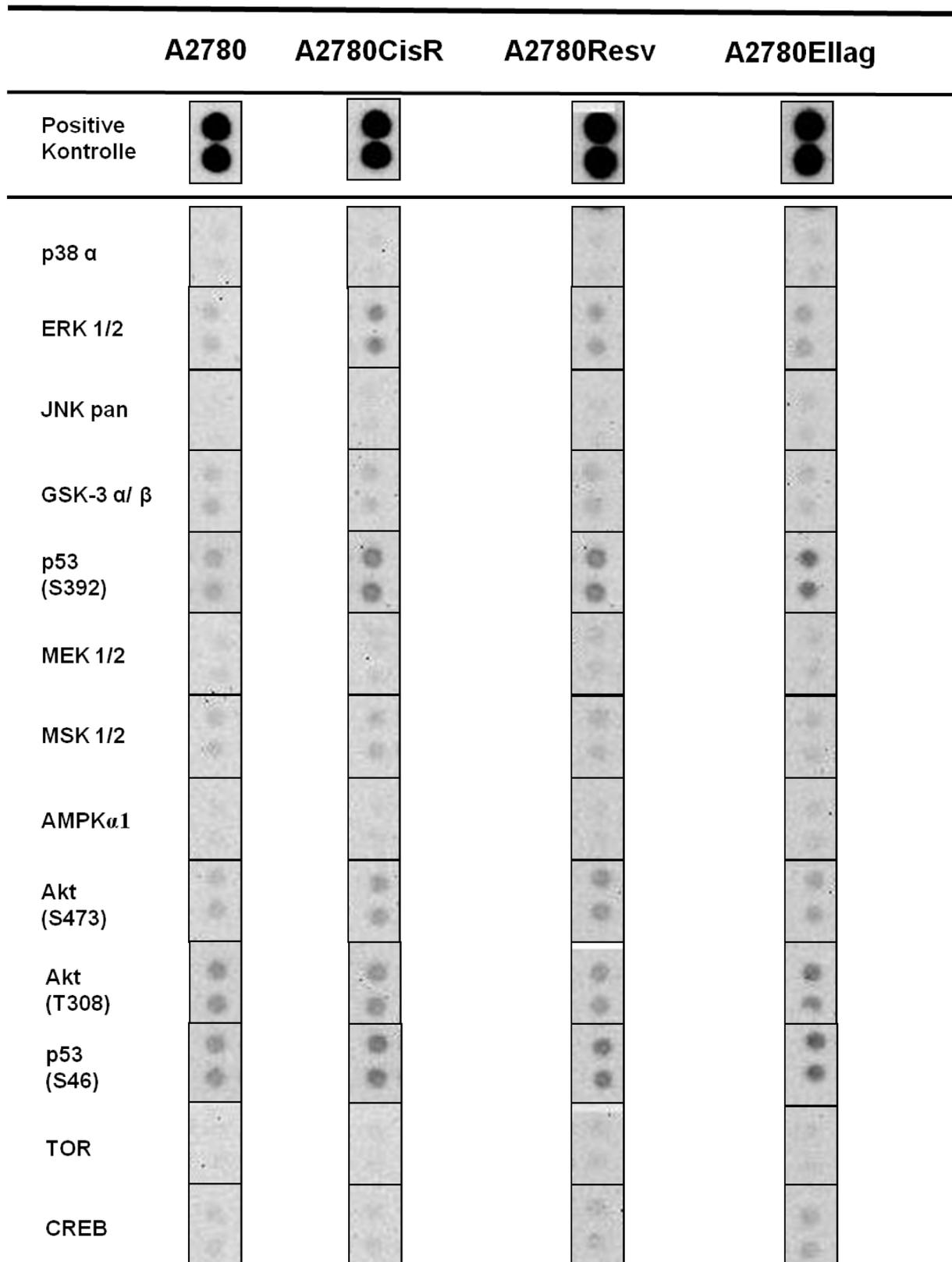
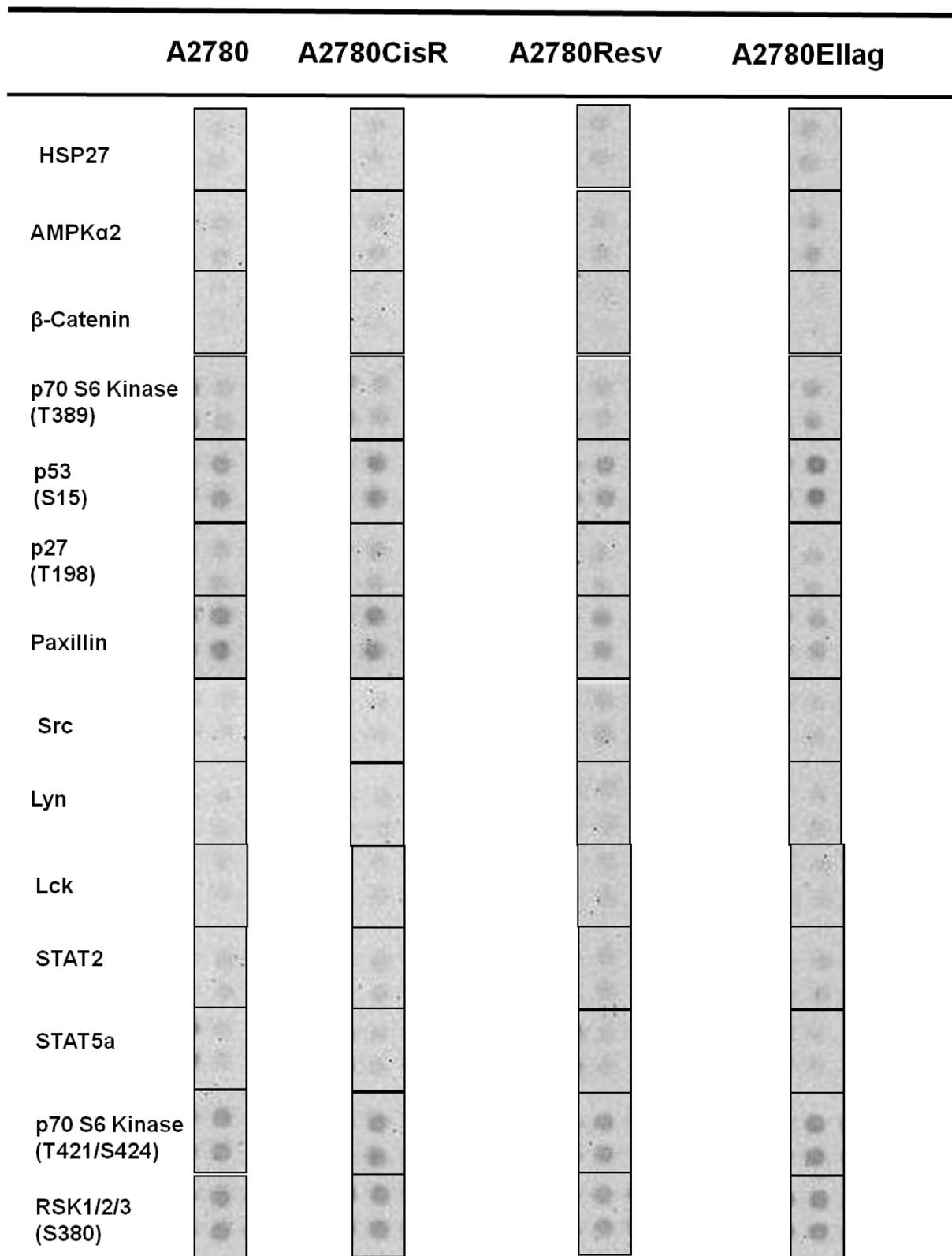
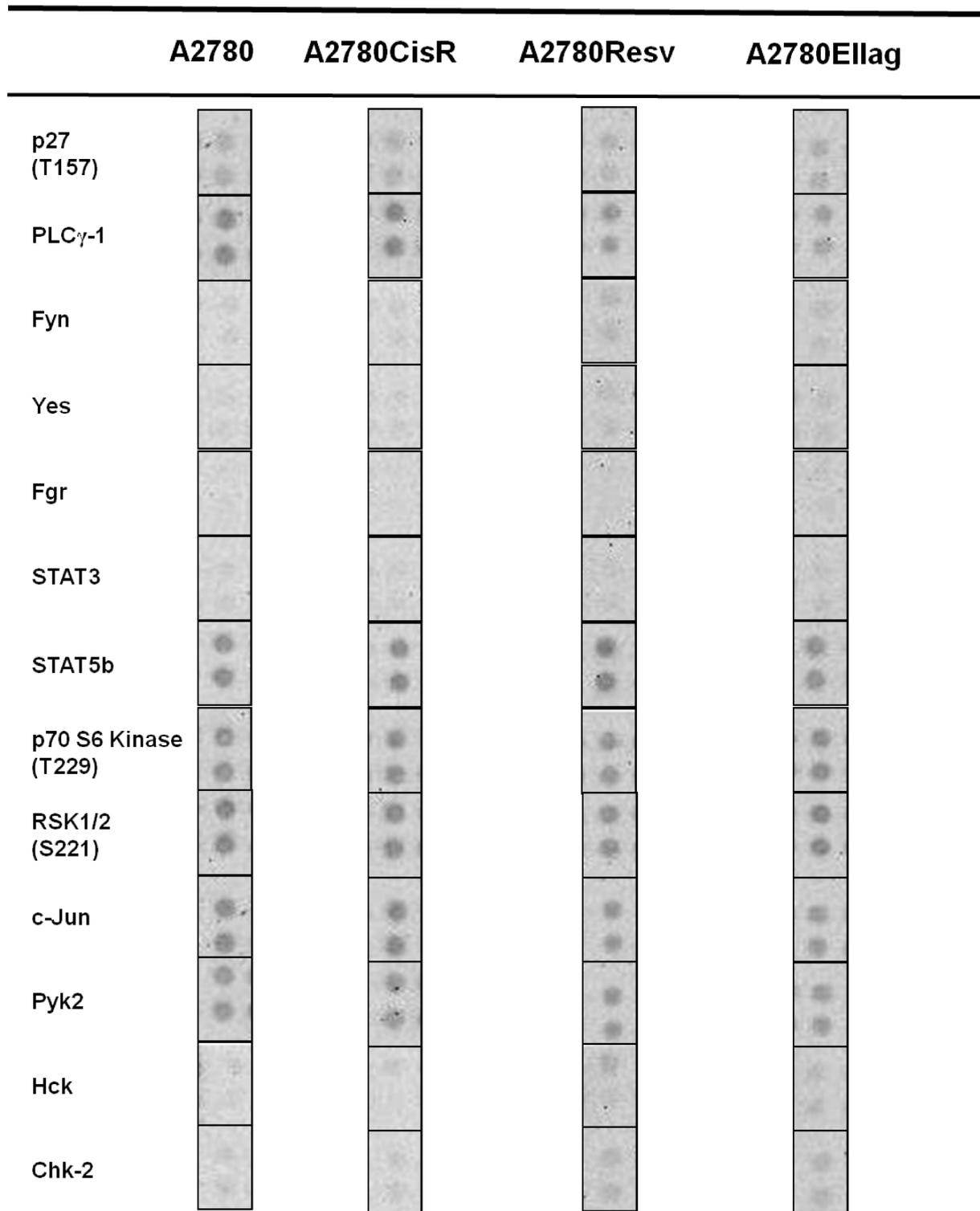


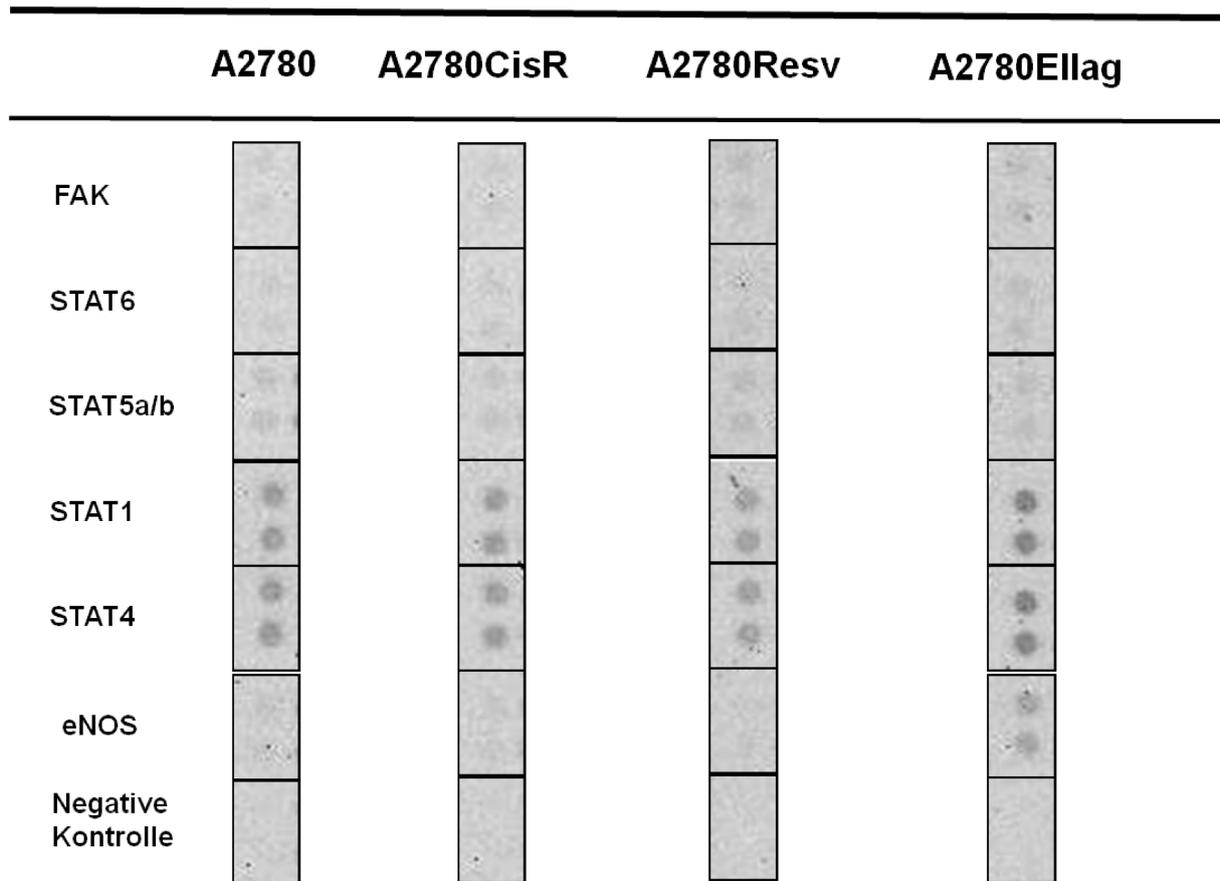
Abbildung 27: Legende siehe Ende der Abbildung auf Seite 123.



Fortsetzung Abbildung 27: Legende siehe Ende der Abbildung auf Seite 123.



Fortsetzung Abbildung 27: Legende siehe Ende der Abbildung auf Seite 123.



Fortsetzung Abbildung 27: Phospho-Kinase Array von A2780, A2780CisR, A2780Resv und A2780Ellag. Der prominenteste Unterschied ist die Phosphorylierung von ERK1/2. In A2780CisR ist ERK1/2 stärker phosphoryliert als in A2780 Zellen. In den neu generierten Zelllinien A2780Resv und A2780Ellag ist die Phosphorylierung von ERK1/2 reduziert und erreicht das Niveau vom ERK1/2 in A2780.

Im Phospho-RTK Array wurde der Status der Phosphorylierung verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen in A2780, A2780CisR, A2780Resv, A2780Ellag, A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag betrachtet (Abbildung 28A). Bei der Entwicklung der Cisplatinresistenz in A2780CisR wurde EGFR phosphoryliert. Diese Aktivierung ist in A2780 nicht gegeben. Ellagsäure und Resveratrol haben die Aktivierung von EGFR weder während den regelmäßigen Behandlungen mit Cisplatin (A2780Resv und A2780Ellag) noch nach der vollständigen Ausbildung der Resistenz (A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag) inhibiert. In A2780CisR ist ErbB2 im Vergleich zu dem Rezeptor in A2780 stärker phosphoryliert. Die permanente Anwesenheit der beiden Naturstoffe inhibierte die Aktivierung von ErbB2 in A2780Resv und A2780Ellag sowie in A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag. Die Phosphorylierung von ErbB3 in A2780CisR verglichen mit der nicht vorhandenen Aktivierung von ErbB3 in A2780 ist sehr prominent. Dies wurde durch die langfristige Inkubation mit Ellagsäure oder Resveratrol in den resistenten Zelllinien A2780CisR+Ellag und A2780CisR+Resv reduziert. Durch die permanente Anwesenheit von Resveratrol oder Ellagsäure konnte die Phosphorylierung des Rezeptors durch die wöchentliche Cisplatinbehandlung komplett in A2780Resv und A2780Ellag inhibiert werden. Das vierte Mitglied der EGFR Familie, ErbB4, wurde durch Cisplatin nicht aktiviert. Daher konnte kein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ErbB4 und der Inhibition der Phosphorylierung durch Ellagsäure bzw. Resveratrol beobachtet werden. In der sensitiven Zelllinie A2780Resv aktiviert Resveratrol PDGF R α . Diese Aktivierung wurde weder in A2780 noch in A2780CisR beobachtet. In der resistenten A2780CisR+Resv hat Resveratrol diesen Rezeptor nicht aktiviert. Ellagsäure hat PDGF R α weder in A2780Ellag noch in A2780CisR+Ellag beeinflusst. In A2780 und A2780CisR ist VEGF R1 nicht phosphoryliert. Dieser Rezeptor wird jedoch von Resveratrol und Ellagsäure beeinflusst. In den Zelllinien A2780Resv, A2780Ellag, A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag ist VEGF R1 durch die dauerhafte Inkubation der Zellen mit den Naturstoffen phosphoryliert. In A2780CisR ist IGF-1 R etwas stärker phosphoryliert als in A2780. Diese Aktivierung durch Cisplatin wurde durch Ellagsäure oder Resveratrol nicht inhibiert. Die anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen wurden durch Ellagsäure oder Resveratrol nicht beeinflusst (Abbildung 28A).

A

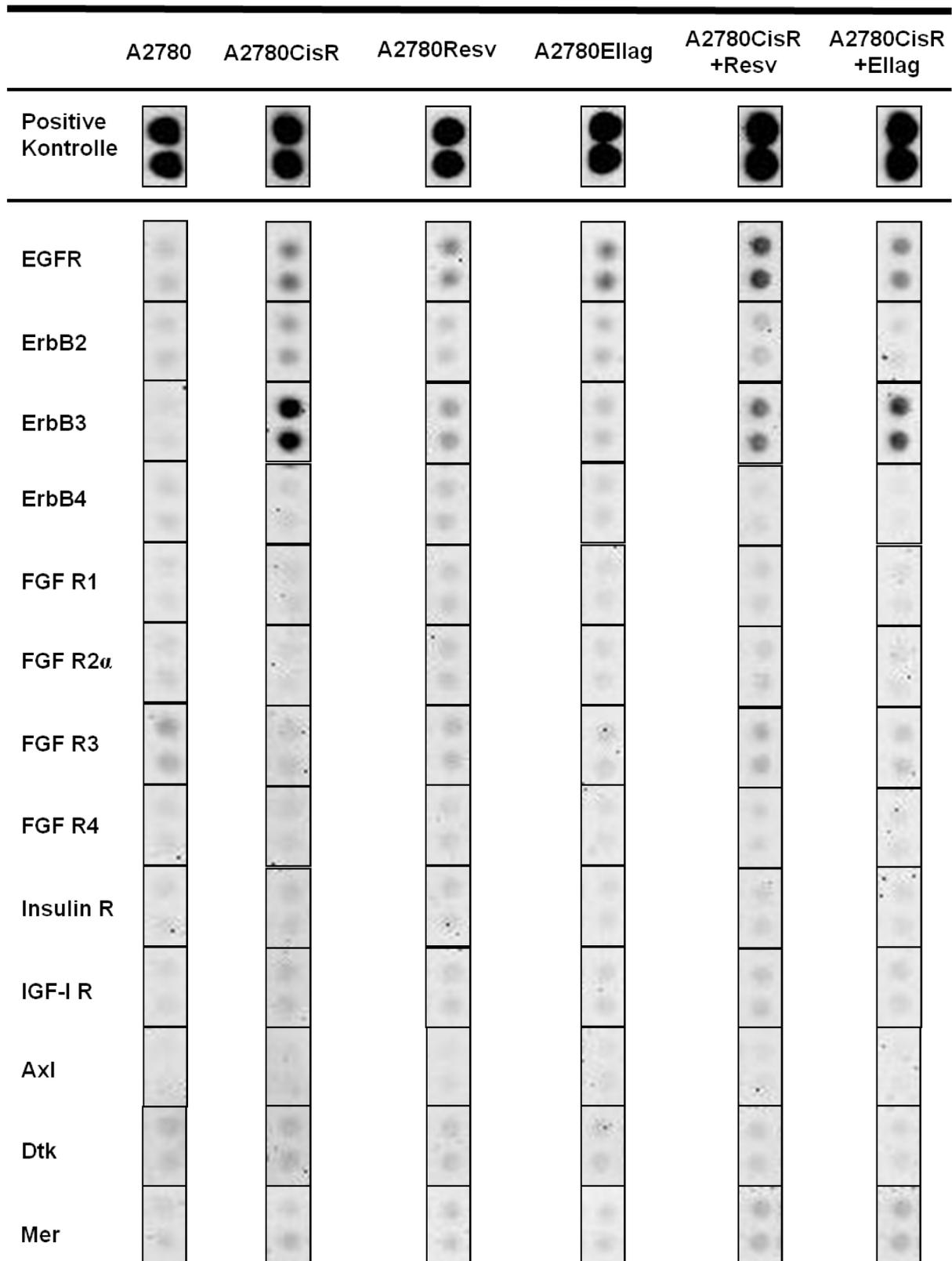
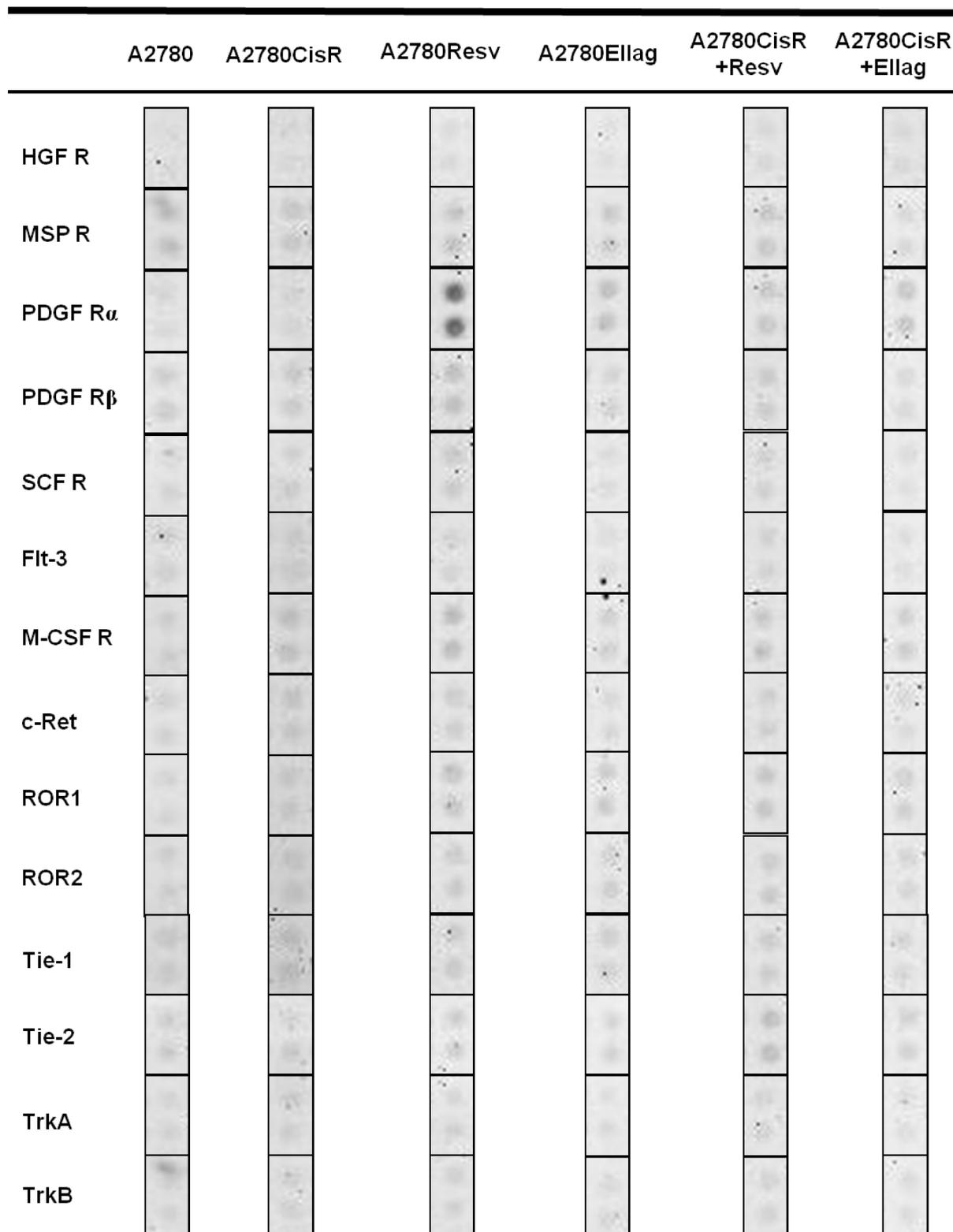
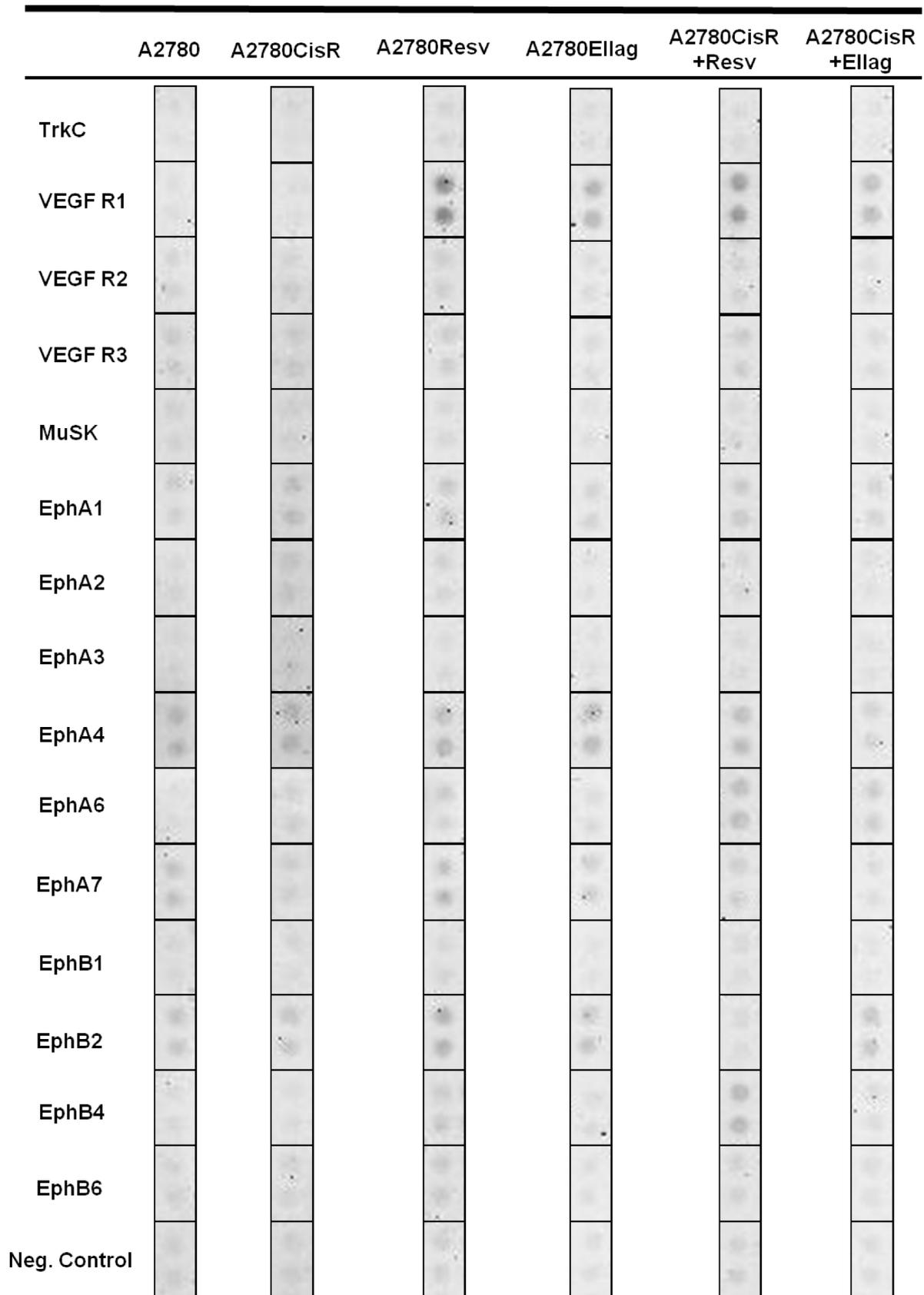


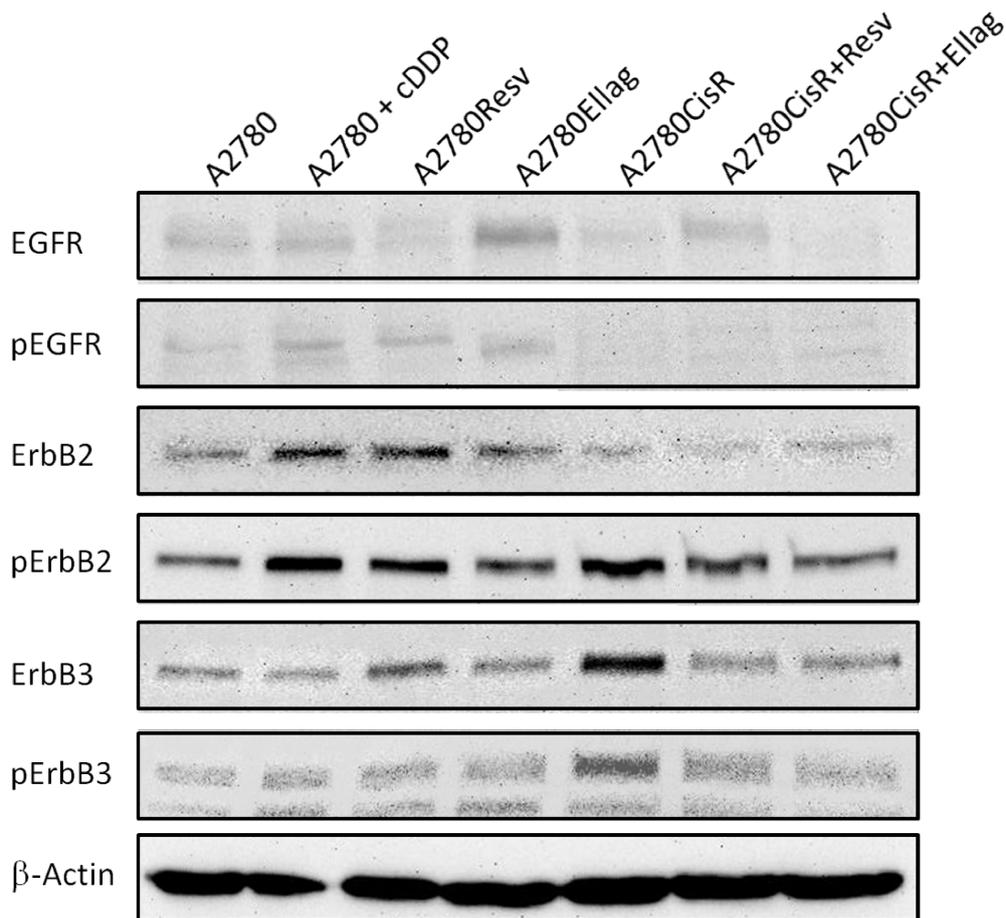
Abbildung 28: Legende siehe Ende der Abbildung auf Seite 128.



Fortsetzung Abbildung 28: Legende siehe Ende der Abbildung auf Seite 128.



Fortsetzung Abbildung 28: Legende siehe Ende der Abbildung auf Seite 128.

B

Fortsetzung Abbildung 28: Immunoblot Analyse aller Zelllinien. (A) Phospho-RTK Array wurde verwendet, um die Phosphorylierung relevante Zielproteine zu bestimmen. (B) Die Aktivierung von ErbB2 und ErbB3 in der cisplatinresistenten Zelllinie wurde durch Western Blot Experimente bestätigt. Die Zelllinie A2780 wurde zusätzlich für 6 Stunden mit der IC_{50} von Cisplatin behandelt (A2780 + cDDP).

Die Expression und Phosphorylierung von EGFR, ErbB2 und ErbB3 in A2780, A2780CisR, A2780Resv, A2780Ellag, A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag wurde im Western Blot untersucht (Abbildung 28B). Die Expression und Phosphorylierung von EGFR ist in A2780 und A2780CisR ähnlich. Allerdings induzierte eine kurzzeitige Behandlung (6 Stunden) mit Cisplatin die Aktivierung von EGFR in A2780 (A2780 + cDDP). Die Expression von ErbB2 ist in A2780 und A2780CisR ebenfalls wie bei EGFR ähnlich. Die Expression wird jedoch durch die kurzzeitige Cisplatinbehandlung in A2780 erhöht. Die Phosphorylierung von ErbB2 ist in A2780CisR deutlich stärker als in A2780. Dies wird auch bei A2780 + cDDP beobachtet.

Demnach induziert eine kurzzeitige und eine mehrfache Cisplatinbehandlung die Aktivierung von ErbB2 in A2780 bzw. A2780CisR Zellen. Ellagsäure und Resveratrol inhibieren die Phosphorylierung von ErbB2 sowohl in den cisplatin sensitiven Zelllinien A2780Resv und A2780Ellag als auch in den cisplatinresistenten Zelllinien A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag. Der Rezeptor ErbB3 wird in A2780CisR stärker exprimiert als in A2780. Die kurzzeitige Behandlung mit Cisplatin induzierte keine erhöhte Expression von ErbB3 in A2780 Zellen. In A2780CisR ist ErbB3 neben der erhöhten Expression auch stärker phosphoryliert. Dies wird in A2780 + cDDP nicht beobachtet. Somit wird die Expression und Aktivierung von ErbB3 erst nach mehrfacher Cisplatinbehandlung reguliert. Trotz der regelmäßigen Cisplatinbehandlungen inhibierte die permanente Anwesenheit von Ellagsäure bzw. Resveratrol die Hochregulierung der Expression und der Phosphorylierung von ErbB3 in A2780Resv und A2780Ellag. Die beiden Naturstoffe reduzierten ebenfalls die Expression und Phosphorylierung von ErbB3 in A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag.

6.2 Überwindung der Cisplatinresistenz durch molekular-biologische Inhibition von PGK1

Die Überexpression von PGK1 kann das Risiko erhöhen, frühzeitig durch Brustkrebs zu sterben. Die Daten von 1117 Patientinnen mit Mammakarzinom wurden in einem Kaplan-Meier-Plot analysiert [232]. Dabei wurde die Wahrscheinlichkeit der gesamten Überlebensrate (overall survival) der Patientinnen in Abhängigkeit des Expressionsstatus von PGK1 gegen einen Zeitfaktor betrachtet. Die Patientinnen hatten eine geringere Überlebenschance, wenn ein Mammakarzinom eine erhöhte Expression von PGK1 aufwies (Abbildung 29) [232].

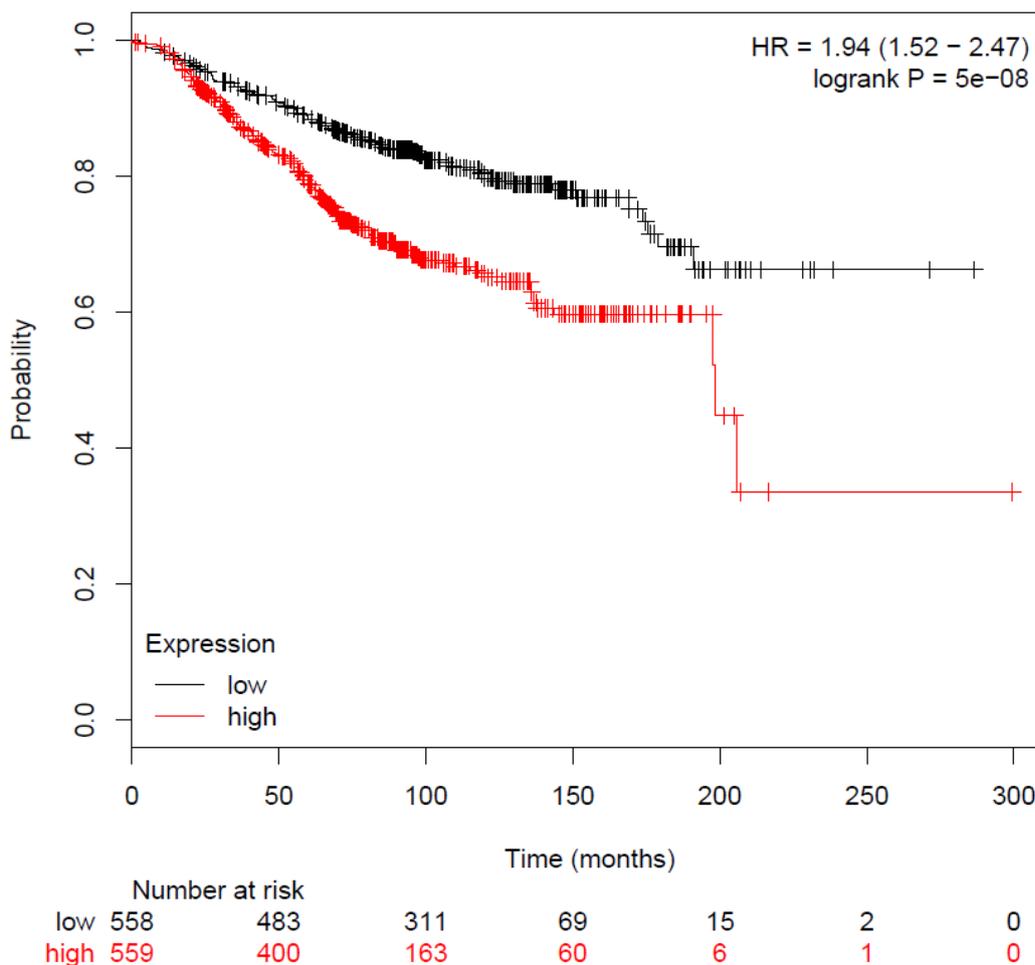


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Plot der gesamten Überlebensrate abhängig von der PGK1 Expression in allen Mammakarzinomtypen [232]. Eine erhöhte Expression von PGK1 (rot) in Brustkrebs verringert die Überlebenserwartung. Die Wahrscheinlichkeit erhöht sich, wenn die PGK1-Expression reduziert ist (schwarz). HR = hazard ratio (HR > 1: Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Krankheit ist gegeben, wenn PGK1 überexprimiert wird).

Eine niedrige Expression von PGK1 (schwarz) führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit, eine längere Überlebenszeit zu haben. Eine hohe Expression von PGK1 (rot) reduziert die Wahrscheinlichkeit. Das Hazard Ratio (HR) liegt bei 1,94 unter Berücksichtigung aller Typen des Mammakarzinoms. Wenn das HR > 1 ist, dann ist die Wahrscheinlichkeit höher, an Krebs zu erkranken und daran frühzeitig zu sterben, wenn das betrachtete Protein, hier PGK1, überexprimiert wird. Die Analyse des logrank-Tests ergab, dass die Aussage, eine erhöhte Expression von PGK1 ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs darstellt, sich in den meisten Fällen bestätigt hat ($P = 5 \cdot 10^{-8}$).

Bei der Betrachtung der PGK1-Expression in den jeweiligen intrinsischen Subtypen der Mammakarzinome wird deutlich, in welchem Subtyp sich die Überexpression von PGK1 besonders schlecht auswirkt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Rezeptorstatus in den jeweiligen intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms [232]. Luminal A und Luminal B: Mammakarzinome, in denen ER exprimiert wird. HER+: Mammakarzinome, in denen ErbB2 exprimiert wird. TNBC: Triple-negative Mammakarzinome, keine oder verminderte Expression von ER, PR und ErbB2. Hazard Ratio (HR) > 1 bedeutet, dass die Überexpression von PGK1 die Wahrscheinlichkeit erhöht, an Brustkrebs zu erkranken und deswegen frühzeitig zu sterben.

Rezeptorstatus	HR	Logrank P
Alle Brustkrebstypen	1,94 (1,52 – 2,47)	$5 \cdot 10^{-8}$
Luminal A	1,98 (1,34 – 2,93)	$5 \cdot 10^{-4}$
Luminal B	1,61 (1,06 – 2,45)	0,026
HER2+	0,94 (0,44 – 2)	0,87
Basal (=TNBC)	1,65 (0,95 – 2,89)	0,075

Durch die hohe Expression von PGK1 in den Subtypen Luminal A und Luminal B ist die Wahrscheinlichkeit, früher an der Krankheit zu sterben, signifikant erhöht. Insbesondere für das Karzinom Luminal A ist die Signifikanz mit $5 \cdot 10^{-4}$ außerordentlich hoch. In HER2+ Karzinomen wurde kein signifikanter Unterschied bestimmt, wenn PGK1 höher oder niedriger exprimiert wird. Für diese Arbeit wurde daher keine HER2+ Zelllinie untersucht. Die Überlebenswahrscheinlichkeit mit TNBC ist nicht signifikant von der PGK1-Expression abhängig. Jedoch liegt der P-Wert bei 0,075. Somit ist die Untersuchung von PGK1 in TNBC

interessant. Da keine Luminal B Zelllinie zur Verfügung stand, wurden in dieser Arbeit nur Luminal A und TNBC Zelllinien im Hinblick auf die PGK1 Expression untersucht.

Die Analyse der Proteinexpression von PGK1 in MDA-MB-231 (TNBC) und T-47D (Luminal A) sowie ihrer cisplatinresistenten Subzelllinien MDA-MB-231CisR und T-47DCisR ergab, dass PGK1 in den MDA-MB-231CisR und T-47DCisR im Vergleich zu deren Ausgangszelllinien überexprimiert ist (Abbildung 30).

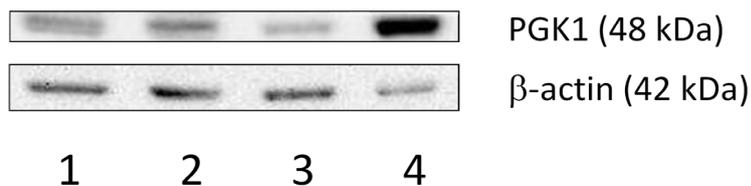
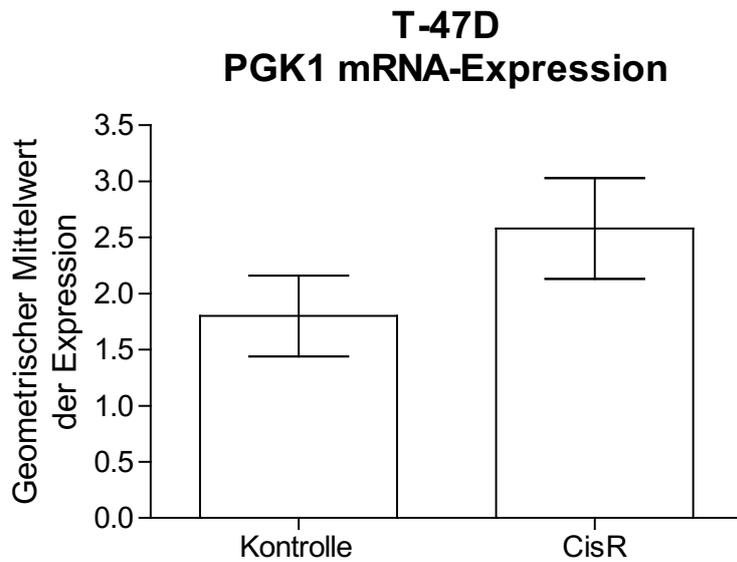


Abbildung 30: Detektion von PGK1 Protein im Western Blot. Die PGK1-Expression war in T47DCisR (Bahn 2) und MDA-MB-231CisR (Bahn 4) höher als in den Zelllinien T-47D (Bahn 1) und MDA-MB-231 (Bahn 3).

Der Unterschied in der PGK1-Expressionsrate zwischen der ER+ T-47D Zelllinie und ihrer cisplatinresistenten T-47DCisR Subzelllinie war moderat (Abbildung 30). PGK1 ist in der MDA-MB-231CisR stärker exprimiert als in MDA-MB-231 (Abbildung 30). Verglichen zu den Zelllinien T-47D und T-47DCisR ist die Expression des Proteins in MDA-MB-231CisR stärker.

In T-47D, T47DCisR, MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR wurde die Expression von PGK1 auf Transkriptionsebene analysiert (Abbildung 31). Der Unterschied in der Expression der mRNA von PGK1 ist in T-47DCisR verglichen mit T-47D moderat und nicht signifikant (Abbildung 31A). In MDA-MB-231CisR ist die mRNA von PGK1 verglichen mit der mRNA in MDA-MB-231 signifikant überexprimiert (Abbildung 31B). Die Überexpression von PGK1 in den cisplatinresistenten Zelllinien könnte ein Indiz für die Resistenz der Zelllinien sein.

A



B

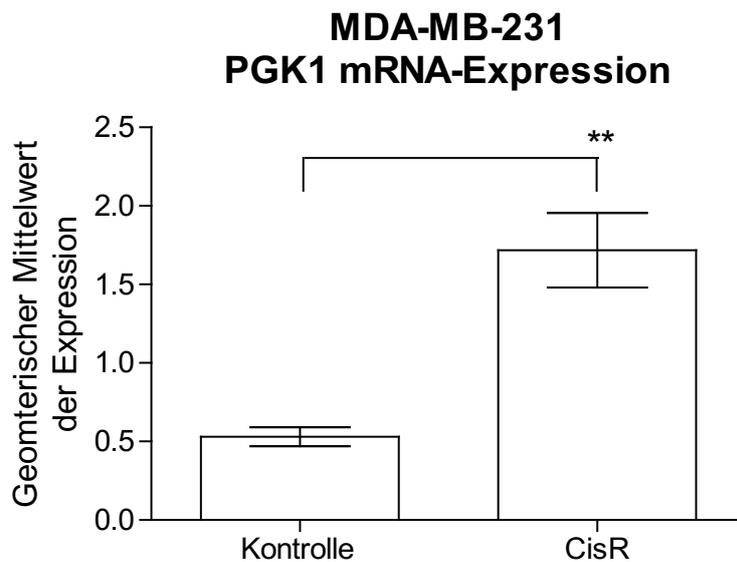


Abbildung 31: Expression der mRNA von PGK1 in T-47D und T-47DCisR (A) sowie in MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR (B). In den cisplatinresistenten Zelllinien wird PGK1 mRNA stärker exprimiert als in den cisplatin sensitiven Kontrollen. In T-47D Zellpaar ist der Unterschied moderat, wogegen die Expression in dem MDA-MB-231 Zellpaar signifikant erhöht ist (** $p < 0,01$). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit Duplikaten und beziehen sich auf die Housekeeper ACTB und HPRT1.

Die Expression des Proteins wurde durch die transiente Transfektion verschiedener Plasmide mit shRNA gehemmt. Die Plasmide ID1, ID2, ID3 und ID4 codieren shRNAs, die spezifisch die mRNA von PGK1 blockieren (Tabelle 6). Zudem wurde ein Leervektor als negative Kontrolle verwendet (NC) und die alleinige Zugabe des Transfektionsreagenzes Lipofectamine 2000® als Mock-Kontrolle eingesetzt.

Tabelle 18: Zusammenfassung der pIC_{50} von Cisplatin an MDA-MB-231, T-47D und deren cisplatinresistenten Subzelllinien. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten.

Klone	$pIC_{50} \pm SEM$		$pIC_{50} \pm SEM$	
	MDA-MB-231		T-47D	
	Kontrolle	CisR	Kontrolle	CisR
Unbehandelt	4,71 \pm 0,03	4,44 \pm 0,03	4,61 \pm 0,05	4,44 \pm 0,05
ID1	4,88 \pm 0,04	4,61 \pm 0,07	4,85 \pm 0,07	4,72 \pm 0,05
ID2	4,92 \pm 0,05	4,72 \pm 0,04	4,89 \pm 0,05	4,77 \pm 0,05
ID3	5,09 \pm 0,05	4,47 \pm 0,07	4,88 \pm 0,05	4,69 \pm 0,05
ID4	5,13 \pm 0,08	4,67 \pm 0,05	4,82 \pm 0,07	4,68 \pm 0,04
NC	4,87 \pm 0,06	4,64 \pm 0,05	4,86 \pm 0,07	4,72 \pm 0,06
Mock	4,73 \pm 0,04	4,52 \pm 0,03	4,50 \pm 0,06	4,61 \pm 0,08

Die transiente Transfektion von ID1 führte zu einer signifikanten Sensitivierung der Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-231CisR, T-47D und T-47DCisR gegenüber Cisplatin (Tabelle 18). In allen Zelllinien waren die Klone mit der shRNA ID2 signifikant sensitiver gegenüber Cisplatin. In den MDA-MB-231 Zellen führte die Transfektion von ID3 ebenfalls zu einer signifikanten Sensitivierung der Zellen gegenüber Cisplatin. In MDA-MB-231CisR wurde keine signifikante Veränderung durch ID3 beobachtet. Die Zelllinien T-47D und T-47DCisR wurden durch den Vektor ID3 signifikant sensitiver gegenüber Cisplatin. Nach der transienten Transfektion von ID4 wurden alle Zelllinien signifikant sensitiver gegenüber Cisplatin. In der Zelllinie MDA-MB-231 bewirkte die transiente Transfektion von ID2 und ID3 den stärksten sensitivierenden Effekt. In den Zelllinien MDA-MB-231CisR, T-47D und T-47DCisR war der sensitivierende Effekt der ID2 am stärksten. In allen Zelllinien verursachte die transiente Transfektion der NC ebenfalls eine Sensitivierung der Zellen gegenüber Cisplatin. Diese molekular-biologische Methode verursacht wahrscheinlich Stress in den Zellen.

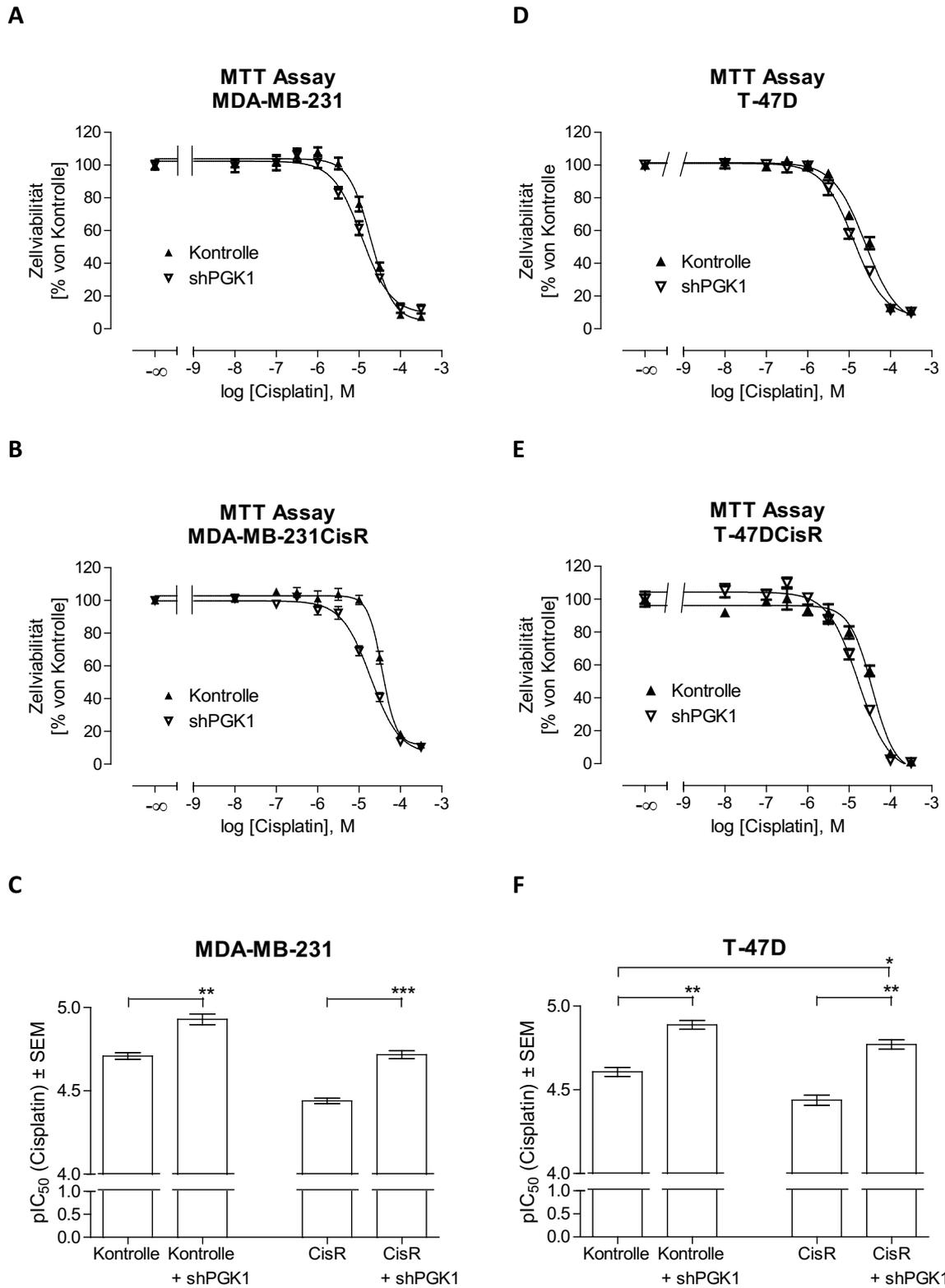


Abbildung 32: Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin an MDA-MB-231, MDA-MB-231CisR, T-47D und T-47DCisR. Die transiente Transfektion von ID2 erhöhte signifikant die Zytotoxizität von Cisplatin in MDA-MB-231 (A, C), MDA-MB-231CisR (B, C), T-47D (D, F) und T-47DCisR (E, F). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler aus einer Reihe von drei unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die transiente Transfektion von ID2 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Zytotoxizität von Cisplatin in den Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR (Abbildung 32A, B und C, Tabelle 18). Die Sensitivität für Cisplatin in MDA-MB-231CisR ist nach der transienten Transfektion von ID2 mit 19,1 μM (IC_{50}) ähnlich der Sensitivität für Cisplatin in der unbehandelten MDA-MB-231 mit 19,5 μM (IC_{50}). In T-47D und T-47DCisR wurde die Zytotoxizität von Cisplatin nach der transienten Transfektion von ID2 signifikant erhöht (Abbildung 32D, E und F, Tabelle 18). Die Sensitivität für Cisplatin in T-47DCisR ist zudem nach der transienten Transfektion von ID2 mit 17,0 μM (IC_{50}) signifikant größer als die Sensitivität für Cisplatin in der unbehandelten T-47D mit 24,5 μM (IC_{50}) (* $p < 0,05$).

Die Western Blot Analyse ergab, dass in MDA-MB-231 die transiente Transfektion der Vektoren ID1, ID2, ID3 und ID4 die Proteinexpression von PGK1 reduzierte (Abbildung 33A). Allerdings war die Expressionsrate in den Klonen NC und Mock ebenfalls reduziert. In MDA-MB-231CisR wurde die Expression von PGK1 durch die transiente Transfektion der Vektoren ID2 und ID3 reduziert (Abbildung 33A). Die Expression von PGK1 blieb nach der Behandlung mit ID1, ID4 und NC unverändert. In T-47D und T-47DCisR wurde keine Reduktion der PGK1-Expression durch die transiente Transfektion der Vektoren beobachtet (Abbildung 33B). Allerdings zeigte die unbehandelte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie nur eine geringe Expression von PGK1, sodass keine definitive Aussage über den Effekt der transienten Transfektion gemacht werden kann.

Die Analyse der mRNA-Expression von PGK1 ergab, dass PGK1 durch die transiente Transfektion von ID2 sowohl in der MDA-MB-231 als auch in der MDA-MB-231CisR Zelllinie signifikant reduziert wurde (Abbildung 34A und B). Die Vektoren ID3 und ID4 reduzierten ebenfalls signifikant die Genexpression von PGK1 in MDA-MB-231. In MDA-MB-231CisR wurde keine signifikante Veränderung durch ID3 oder ID4 beobachtet. Die shRNA ID1 hatte keinen signifikanten Effekt in dem Zellpaar. Bei der Bestimmung der differentiellen Expression von PGK1 wurden die erhaltenen Werte auf die Werte der Housekeeper ACTB und HPRT1 bezogen (Tabelle 5) und somit das geometrische Mittel der normalisierten Expression berechnet (Formel 4). Western Blot und qPCR-Analyse zeigten, dass in T-47D und in T-47DCisR Zellen die PGK1-Expression weder durch ID2 noch durch die anderen Vektoren verringert wurde (Abbildung 30 und Abbildung 34C und D).

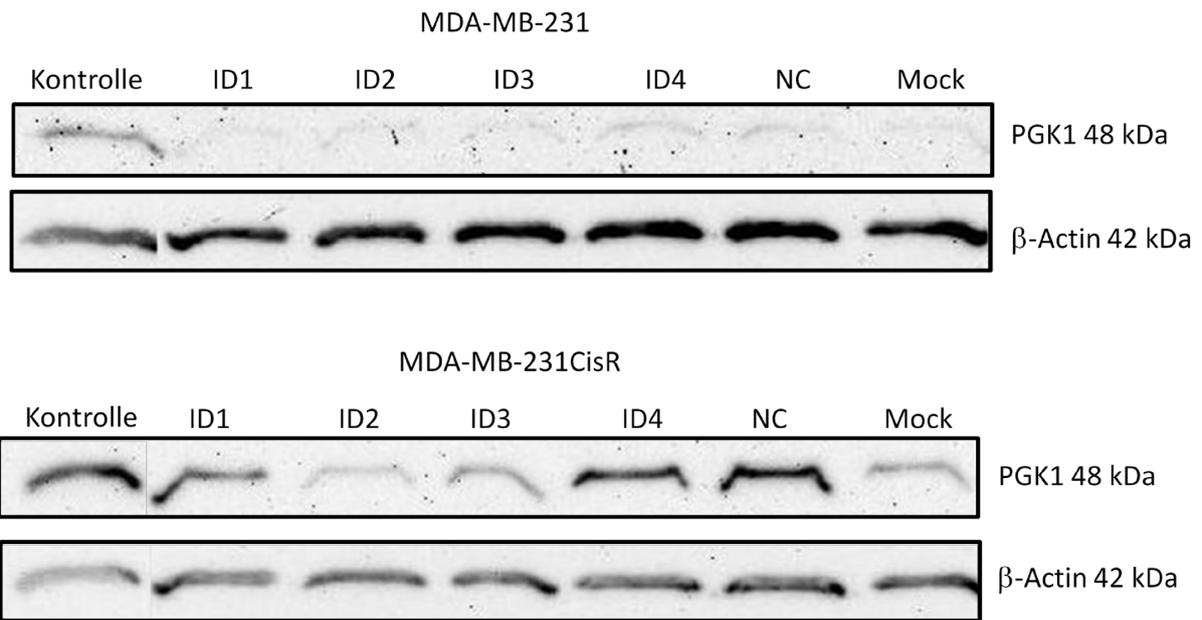
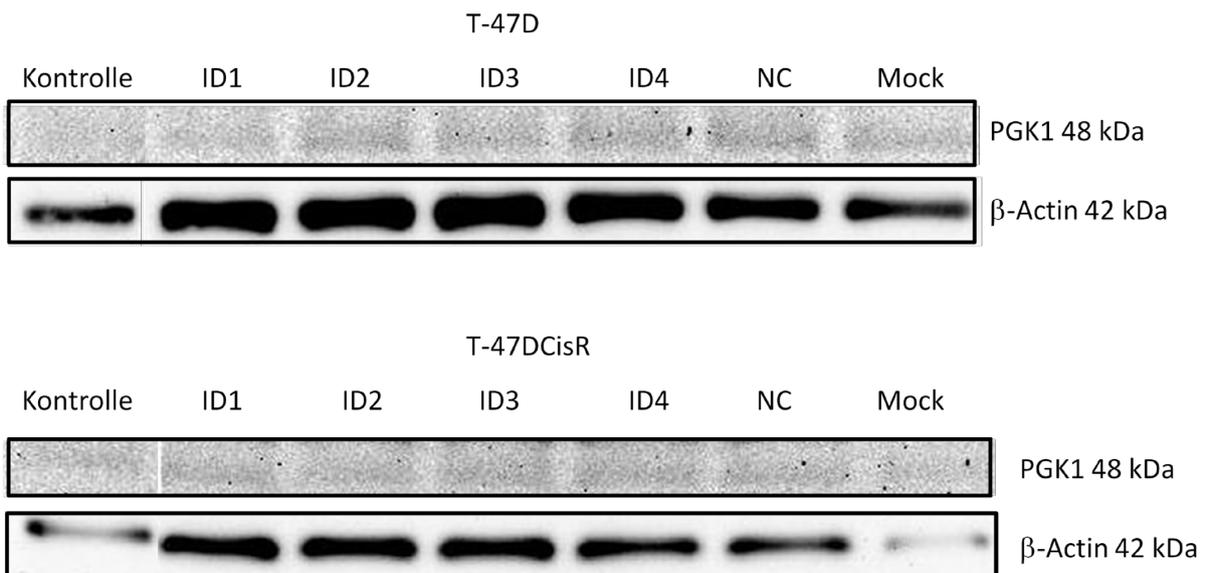
A**B**

Abbildung 33: Western Blot Analyse der Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB231CisR, T-47D und T-47DCisR nach der transienten Transfektion der verschiedenen Vektoren. (A) In MDA-MB-231 reduzierte die transiente Transfektion aller Vektoren die PGK1-Expression. In MDA-MB-231CisR wurde die Expression hauptsächlich von ID2 und ID3 reduziert. **(B)** Die transiente Transfektion der Vektoren reduzierte nicht die PGK1-Expression in T-47D und T-47DCisR. Die gezeigten Blots sind ein exemplarisches Experiment aus drei verschiedenen Experimenten.

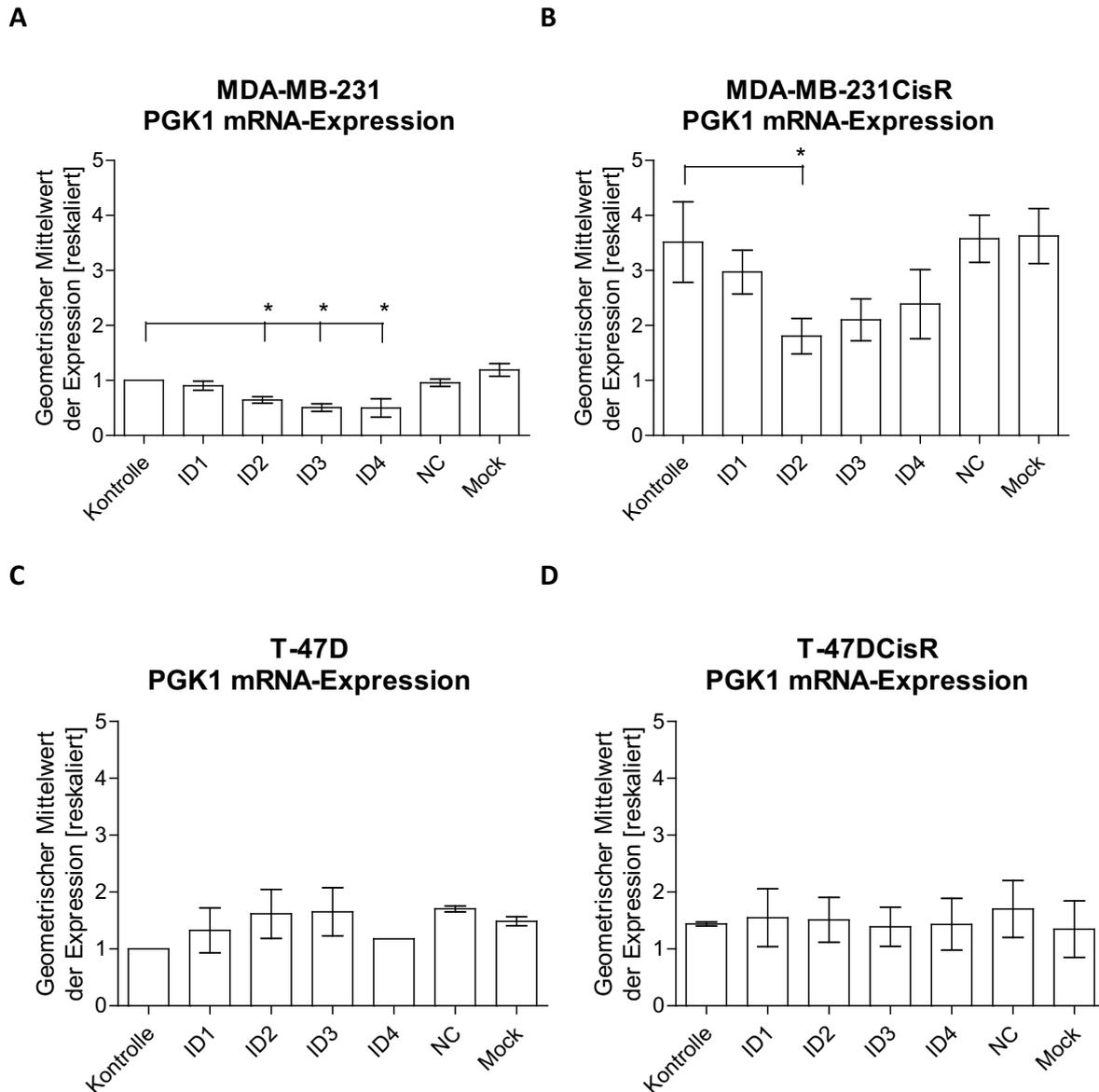


Abbildung 34: Vergleich der mRNA Expression nach der transienten Transfektion der verschiedenen Vektoren zu den Kontroll-Zellen in der qPCR. (A) Die Genexpression wurde durch ID2, ID3 und ID4 in MDA-MB-231 Zellen signifikant inhibiert. (B) In MDA-MB-231CisR wurde die PGK1-Expression von ID2 signifikant inhibiert. (C) In T-47D wurde keine Reduzierung der mRNA Expression beobachtet. Ein Wert bei der transienten Transfektion von ID4 wurde ausgeschlossen. (D) Keiner der Vektoren reduzierte die mRNA von PGK1 in T-47DCisR Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler aus einer Reihe von mindestens 2 unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$).

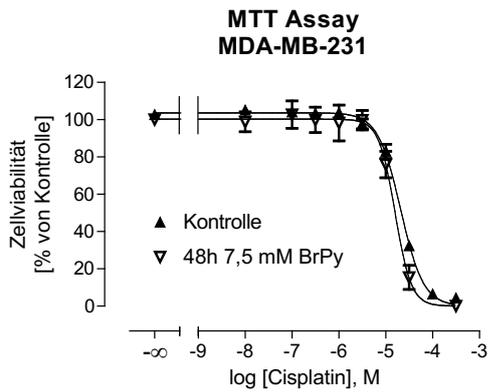
Der sensitivierende Effekt in den Zelllinien T-47D und T-47DCisR nach der transienten Transfektion der jeweiligen Vektoren, auch der NC, wurde wahrscheinlich nicht durch die Reduzierung der PGK1-Expression verursacht, sondern durch die molekular-biologische Methode selbst (Tabelle 18). Die Methode verursachte wahrscheinlich einen unspezifischen Zellstress. Da weder in der Western Blot Analyse noch in der qPCR eine Reduktion der PGK1-Expression durch die Vektoren beobachtet wurde, scheint die transiente Transfektion der verwendeten Vektoren für die Zelllinien T-47D und T-47DCisR ungeeignet zu sein.

Neben der transienten Transfektion von shRNA wurde der Glykolyseinhibitor 3-BrPy an den Triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien verwendet und als Kontrolle einbezogen. Weiterhin wurde Metformin eingesetzt, um die Atmungskette zu inhibieren. Die Zytotoxizität beider Inhibitoren wurde mittels MTT Assay bestimmt (Tabelle 19). Hohe Konzentrationen im millimolaren Bereich sind notwendig, um die Zellviabilität durch die Inhibitoren zu beeinflussen. Bei MDA-MB-231 liegt der IC_{50} von 3-BrPy bei 8,71 mM und von Metformin bei 28,8 mM. Bei MDA-MB-231CisR liegt der IC_{50} von 3-BrPy bei 22,3 mM und von Metformin bei 8,91 mM. Bei T-47D liegt der IC_{50} von 3-BrPy bei 1,05 mM und von Metformin bei 2,57 mM. Bei T-47DCisR liegt der IC_{50} von 3-BrPy bei 1,95 mM und von Metformin bei 1,66 mM. Die Substanzen sind ähnlich potent für das jeweilige Zellpaar.

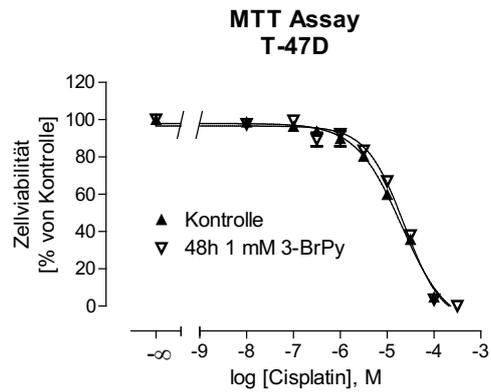
Tabelle 19: Zytotoxizität von 3-BrPy und Metformin an den Zelllinien MDA-MB-231 (Kontrolle) und MDA-MB-231CisR sowie an den Zelllinien T-47D (Kontrolle) und T-47DCisR. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten.

Substanz	$pIC_{50} \pm SEM$			
	MDA-MB-231		T-47D	
	Kontrolle	CisR	Kontrolle	CisR
3-BrPy	2,06 \pm 0,04	1,65 \pm 0,04	2,98 \pm 0,02	2,71 \pm 0,03
Metformin	1,54 \pm 0,07	2,05 \pm 0,11	2,59 \pm 0,07	2,78 \pm 0,03

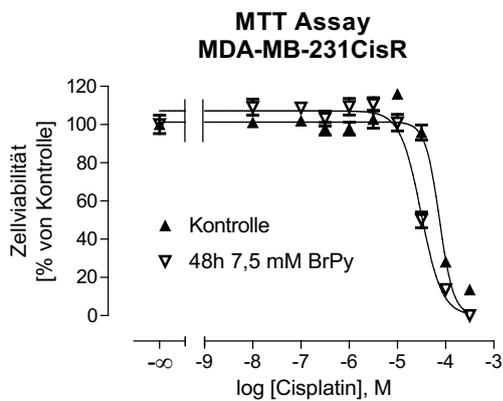
A



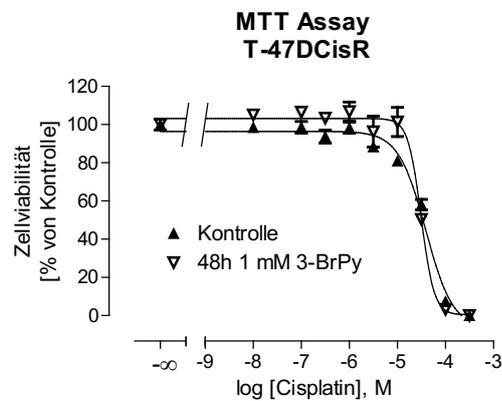
D



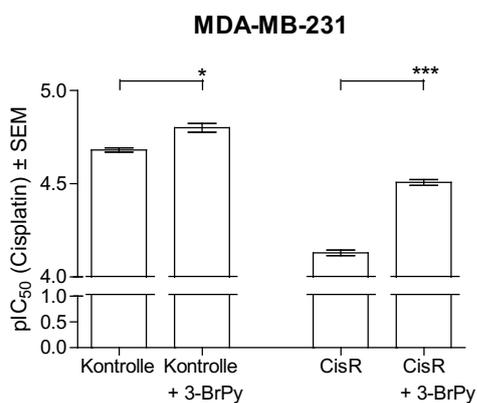
B



E



C



F

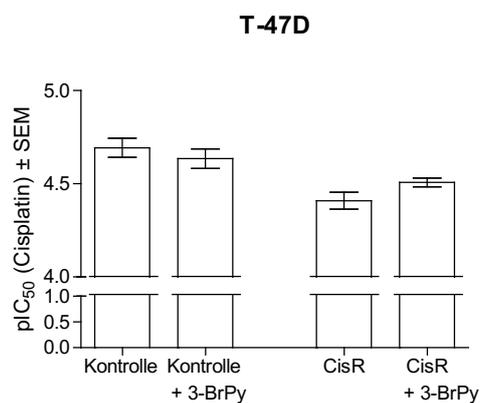


Abbildung 35: Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin an MDA-MB-231, MDA-MB-231CisR, T-47D und T-47DCisR. Die 48-stündige Präinkubation von 7,5 mM 3-BrPy erhöhte signifikant die Zytotoxizität von Cisplatin in MDA-MB-231 (**A, C**) und MDA-MB-231CisR (**B, C**). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert ± Standardfehler aus einer Reihe von drei unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Die 48-stündige Präinkubation von 1 mM 3-BrPy hatte keinen Effekt in T-47D (**D, F**) und T-47DCisR (**E, F**). Die gezeigten Daten sind aus einem typischen Experiment mit Triplikaten.

Die Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR wurden 48 Stunden mit 7,5 mM 3-BrPy oder 5 mM Metformin vor der Zugabe von Cisplatin präinkubiert. Mittels MTT Assay wurde die Zellviabilität bestimmt. Die 48-stündige Präinkubation von 3-BrPy führte in der Zelllinie MDA-MB-231 zu einer moderaten, jedoch signifikanten, Sensitivierung der Zellen gegenüber Cisplatin (Tabelle 20, Abbildung 35A und C). In MDA-MB-231CisR war der sensitivierende Effekt signifikant und stärker verglichen mit dem Effekt in MDA-MB-231 (Tabelle 20, Abbildung 35B und C). Allerdings erreichte die Sensitivität der MDA-MB-231CisR Zellen für Cisplatin nach der Behandlung mit 3-BrPy mit 30,9 μM (IC_{50}) nicht dasselbe Niveau wie in der unbehandelten MDA-MB-231 mit 20,9 μM (IC_{50}). Die 48-stündige Präinkubation von 5 mM Metformin erhöhte nicht die Sensitivität der Zellen von MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR für Cisplatin (Tabelle 20). Die Inhibition der Glykolyse in Triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien, in denen PGK1 überexprimiert wird, kann zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Cisplatin führen.

Die 48-stündige Präinkubation von 1 mM 3-BrPy in T-47D bzw. in T-47DCisR vor der Cisplatin-Zugabe hatte keinen sensitivierenden Effekt (Abbildung 35D, E und F, Tabelle 20). An dem Zellpaar wurde die Präinkubation von Metformin nicht untersucht.

Tabelle 20: Zusammenfassung der pIC_{50} von Cisplatin an den Zelllinien MDA-MB-231 (Kontrolle) und MDA-MB-231CisR nach 48-stündiger Präinkubation mit 7,5 mM 3-BrPy oder 5 mM Metformin. T-47D und T-47DCisR wurden 48 Stunden mit 1 mM 3-BrPy präinkubiert. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten.

Substanz	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$		$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$	
	MDA-MB-231		T-47D	
	Kontrolle	CisR	Kontrolle	CisR
unbehandelt	4,68 \pm 0,02	4,13 \pm 0,03	4,69 \pm 0,05	4,41 \pm 0,05
3-BrPy	4,80 \pm 0,04	4,51 \pm 0,03	4,66 \pm 0,05	4,51 \pm 0,02
Metformin	4,55 \pm 0,02	4,11 \pm 0,07	-	-

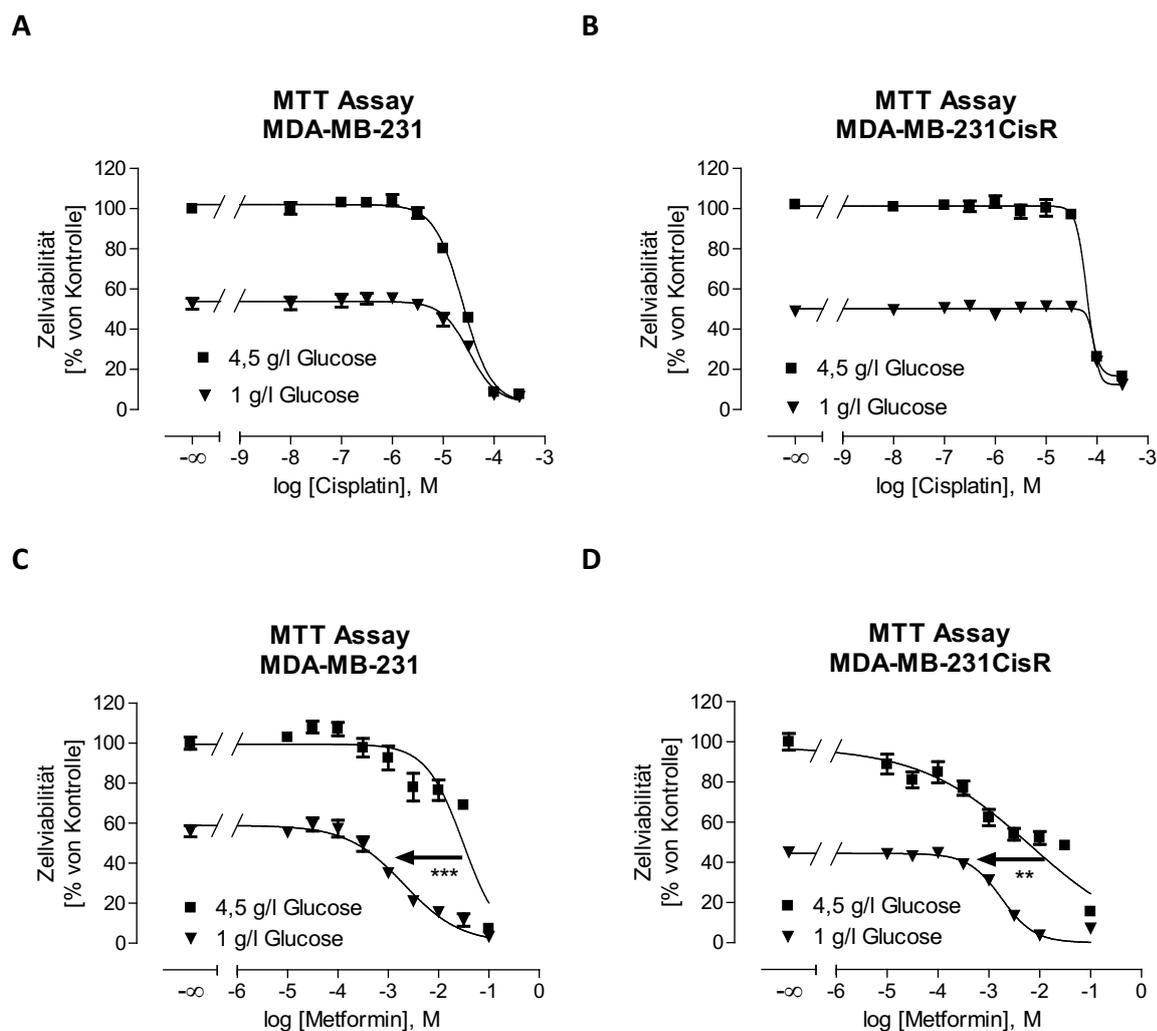


Abbildung 36: Konzentrations-Effekt-Kurve von Cisplatin und Metformin an den Triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien. Die Reduktion des Glucosegehalts im Nährmedium reduzierte die Proliferation von MDA-MB-231 (A) und MDA-MB-231CisR (B) und erhöhte die Zytotoxizität von Metformin in MDA-MB-231 (C) und in MDA-MB-231CisR (D). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler aus einer Reihe von drei unabhängigen Experimenten (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Als Alternative zu dem Einsatz der shRNA und der Inhibitoren wurde den Zellen weniger Glucose im Nährmedium zur Verfügung gestellt. Die Reduktion des Glucosegehalts von 4,5 g/l auf 1 g/l verlangsamte die Zellproliferation der Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR (Abbildung 36). Allerdings erhöhte sich nicht die Zytotoxizität von Cisplatin (Abbildung 36A und B), sondern sank geringfügig (Tabelle 21). Der Shiftfaktor der Cisplatinempfindlichkeit lag im Bereich von 1,4 für beide Zelllinien. Nach der Inkubation der Zellen im Nährmedium mit dem reduzierten Glucosegehalt erhöhte sich die Sensitivität der Zellen für Metformin um den Faktor 14 für die sensitive MDA-MB-231 Zelllinie (Tabelle 21,

Abbildung 36C) und um den Faktor 4 für die resistente MDA-MB-231CisR Zelllinie (Tabelle 21, Abbildung 36D/Abbildung 37). Der niedrige Glucosegehalt im Nährmedium hatte keinen signifikanten Effekt auf die Sensitivität der Zellen für den Glykolyseinhibitor 3-BrPy (Tabelle 21).

Tabelle 21: Effekt des Glucosegehalts im Nährmedium auf die Zytotoxizität von Cisplatin, 3-BrPy und Metformin in MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR Zellen. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten (**p < 0,01; ***p < 0.001).

Substanz	pIC ₅₀ \pm SEM			
	MDA-MB-231		MDA-MB-231CisR	
	1 g/l Glucose	4,5 g/l Glucose	1 g/l Glucose	4,5 g/l Glucose
Cisplatin	4,47 \pm 0,05	4,61 \pm 0,03	4,05 \pm 0,75	4,20 \pm 0,03
3-BrPy	1,99 \pm 0,05	2,06 \pm 0,04	1,47 \pm 0,05	1,65 \pm 0,38
Metformin	2,69 \pm 0,08***	1,50 \pm 0,07	2,75 \pm 0,03**	2,20 \pm 0,14

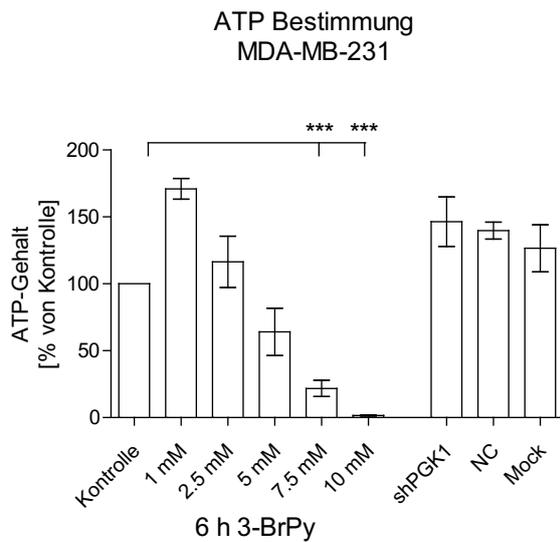
In einem Luciferin/Luciferase Assay wurde der Gehalt an ATP in den Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR ermittelt. Die ATP-Produktion wurde, in Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen, durch 3-BrPy inhibiert. Niedrigere Konzentrationen (1 mM und 2,5 mM) förderten zunächst die Bildung von ATP, wohingegen 10 mM 3-BrPy die ATP-Produktion vollständig blockierte (Abbildung 37A und B). In MDA-MB-231 Zellen wurde der Gehalt an ATP durch 7,5 mM 3-BrPy auf 22% reduziert. In MDA-MB-231CisR verringerte sich der Gehalt auf 12% (Abbildung 37A und B). Verglichen zu 3-BrPy wurde keine signifikante Abnahme an gebildetem ATP nach der transienten Transfektion von ID2 beobachtet (Abbildung 37A und B). Der Gehalt von ATP in MDA-MB-231 nach der transienten Transfektion von ID2 war ähnlich zu dem ATP-Gehalt nach der transienten Transfektion von NC und in der Mock-Kontrolle. In der resistenten Zelllinie blieb die Menge an ATP nach der transienten Transfektion der Vektoren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unverändert.

Neben der konzentrationsabhängigen Inhibition der ATP-Produktion durch 3-BrPy wurde ebenfalls eine zeitabhängige Inhibition in den Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR beobachtet (Abbildung 37C und D). Nach einer Stunde reduzierten 10 mM 3-BrPy den Gehalt

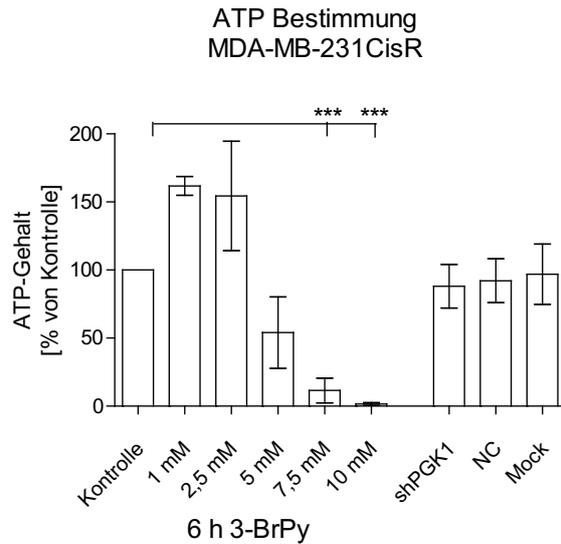
an ATP auf 24% in der sensitiven und auf 13% in der resistenten Zelllinie. Nach drei Stunden wurde die Produktion in beiden Zelllinien bereits vollständig gehemmt.

Durch die transiente Transfektion von ID2 konnte eine Verminderung der PGK1-Expression der mRNA als auch des Proteins in den Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR beobachtet werden. Dies hatte in beiden Fällen eine Sensitivierung für Cisplatin zur Folge. Die Tatsache, dass die Menge an gebildetem ATP durch die Transfektion nicht reduziert werden konnte, zeigt, dass die PGK1-Expression durch die shRNA nicht vollständig gehemmt, sondern nur vermindert wurde. Die Inhibition der Glykolyse durch den Inhibitor 3-BrPy erzielte ebenfalls einen sensitivierenden Effekt in MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR für Cisplatin. Die Glykolyse könnte demnach ein neues Target in der Behandlung von TNBC sein. Die Überexpression von PGK1 in T-47DCisR im Vergleich zur Expression in T-47D war moderat. Die molekular-biologische Inhibition von PGK1 blieb in diesen Zelllinien aus. Ein sensitivierender Effekt gegenüber Cisplatin wurde nach der transienten Transfektion zwar beobachtet, jedoch spielte die PGK1-Expression dabei keine Rolle. Da auch die transiente Transfektion der NC einen starken Effekt auf die Zelllinien T-47D und T-47DCisR hatte, ist diese Methode für diese beiden Zelllinien wahrscheinlich nicht geeignet.

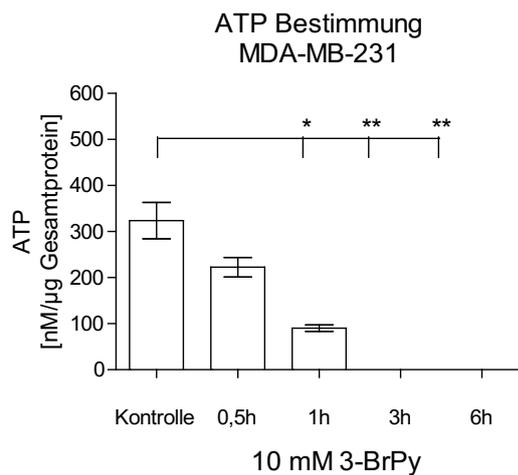
A



B



C



D

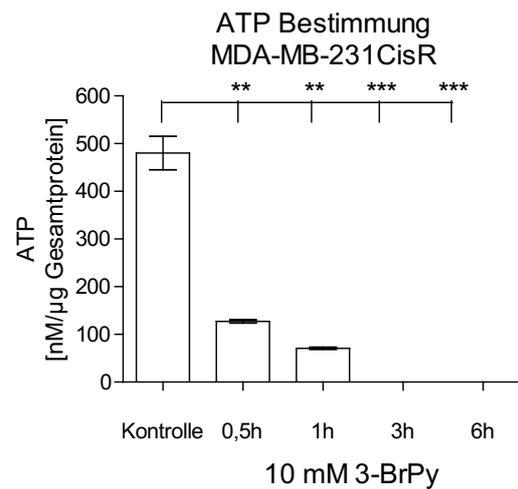


Abbildung 37: Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts in der MDA-MB-231 Zelllinie und ihrem Subtyp MDA-MB-231CisR. Die Zellen MDA-MB-231 (A) und MDA-MB-231CisR (B) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von 3-BrPy für 6 Stunden behandelt. Die Inhibition der ATP-Produktion war von der Höhe der eingesetzten Konzentration abhängig. Durch ID2 wurde keine signifikante Reduzierung des ATP-Spiegels beobachtet. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler aus einer Reihe von mindestens 2 unabhängigen Experimenten mit Duplikaten ($***p < 0,001$). Die MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR Zellen wurden mit 10 mM 3-BrPy verschieden lang inkubiert (C and D). Eine zeitabhängige Inhibition der ATP-Produktion wurde bestimmt. Die gezeigten Daten sind von einem typischen Experiment mit Duplikaten.

6.3 Wirkung von Phomoxanthon A in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780CisR

An der epithelialen Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780, der Triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231, der Ösophaguskarzinom-Zelllinie Kyse510 und der Zungenkarzinom-Zelllinie Cal27 sowie deren cisplatinresistenten Varianten wurde die Zytotoxizität von Phomoxanthon A im MTT Assay bestimmt (Tabelle 22). Außerdem wurde die Zytotoxizität des Naturstoffs an den chronischen myeloischen Leukämie-Zellen K562, an der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 und an der nativen Zelllinie HEK293 (human embryonic kidney) untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde die Zytotoxizität von Phomoxanthon A mit der von Cisplatin verglichen.

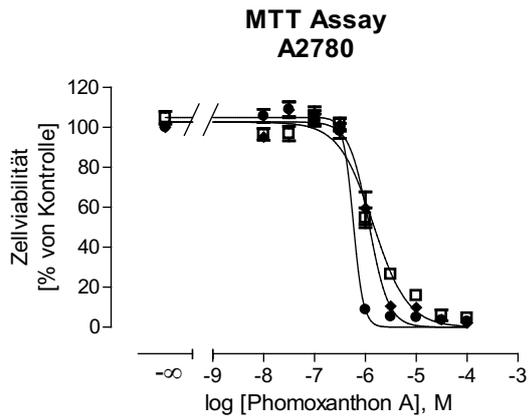
Tabelle 22: Zusammenfassung der pIC_{50} von Cisplatin und Phomoxanthon A an verschiedenen Zelllinien. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert des $pIC_{50} \pm$ Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

Zelllinien	$pIC_{50} \pm SEM$		Ratio [IC_{50} (Cisplatin)/ IC_{50} (Phomoxanthon A)]
	Cisplatin	Phomoxanthon A	
A2780	5,95 \pm 0,03	6,24 \pm 0,03	2
A2780CisR	4,96 \pm 0,02	5,86 \pm 0,03	8
MDA-MB-231	4,61 \pm 0,02	5,43 \pm 0,56	7
MDA-MB-231CisR	4,35 \pm 0,02	5,36 \pm 0,06	10
Cal27	4,99 \pm 0,04	5,28 \pm 0,03	2
Cal27CisR	4,42 \pm 0,05	5,25 \pm 0,05	7
Kyse510	5,60 \pm 0,05	6,12 \pm 0,11	3
Kyse510CisR	5,07 \pm 0,03	6,10 \pm 0,05	11
K562	5,02 \pm 0,04	5,73 \pm 0,05	5
HCT116	4,79 \pm 0,04	5,74 \pm 0,04	9
HEK293	5,45 \pm 0,04	5,46 \pm 0,04	1

In den Zelllinien A2780 und A2780CisR sowie in den oben genannten Krebszelllinien zeigte Phomoxanthon A eine höhere Zytotoxizität als Cisplatin. In A2780 Zellen lag diese um den Faktor 2, in der resistenten Subzelllinie um den Faktor 8 höher (Tabelle 22). In dem Zellpaar MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR betrug der Faktor 7 bzw. 10 (Tabelle 22). Die IC_{50} von Phomoxanthon A war in der Cal27 Zelllinie um den Faktor 2 und in der Cal27CisR Zelllinie um den Faktor 7 niedriger als die IC_{50} von Cisplatin (Tabelle 22). Für Kyse510 und Kyse510CisR Zellen war die Substanz um den Faktor 3 bzw. 11 potenter (Tabelle 22). Die K562 Zelllinie war um den Faktor 5 und die HCT116 Zelllinie um den Faktor 9 sensitiver für den Naturstoff im Vergleich zu Cisplatin (Tabelle 22). Die native Zelllinie HEK293 bildete mit ihrer ähnlichen Sensitivität gegenüber Cisplatin und Phomoxanthon A eine Ausnahme (Tabelle 22). Bis auf A2780 und A2780CisR ist Phomoxanthon A äquipotent für alle Zellpaare. In A2780 ist Phomoxanthon A um den Faktor 2 toxischer als in A2780CisR.

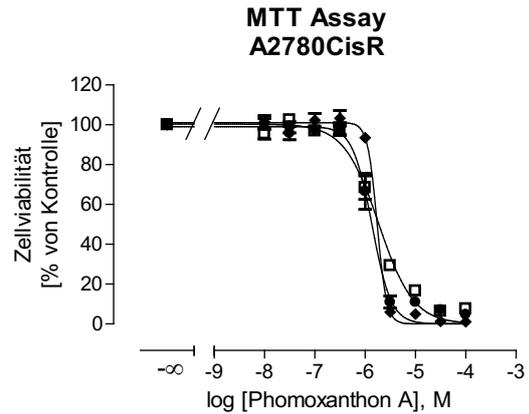
Die IC_{50} von Phomoxanthon A und Cisplatin wurde zusätzlich nach 24 und 48 Stunden an A2780 und A2780CisR Zellen bestimmt (Abbildung 38). Bereits nach 24 Stunden wurde eine hohe Zytotoxizität von Phomoxanthon A gemessen, die lediglich um den Faktor 2 in A2780 verschieden war von der Toxizität nach 72 Stunden (Abbildung 38A). Der Unterschied der IC_{50} -Werte nach 24 und 72 Stunden war in A2780CisR nicht signifikant verschieden von 1 (Abbildung 38B). In A2780 lag der IC_{50} von Cisplatin bei 29,8 μ M nach 24 Stunden und bei 4,62 μ M nach 72 Stunden (Abbildung 38C). In A2780CisR änderte sich der IC_{50} von Cisplatin von 39,1 μ M (24 Stunden) auf 7,51 μ M (72 Stunden) (Abbildung 38D). Die Toxizität von Cisplatin ist in diesem Zellpaar zeit- und konzentrationsabhängig, wogegen die Toxizität von Phomoxanthon A überwiegend konzentrationsabhängig und nur in A2780 geringfügig zeitabhängig ist.

A



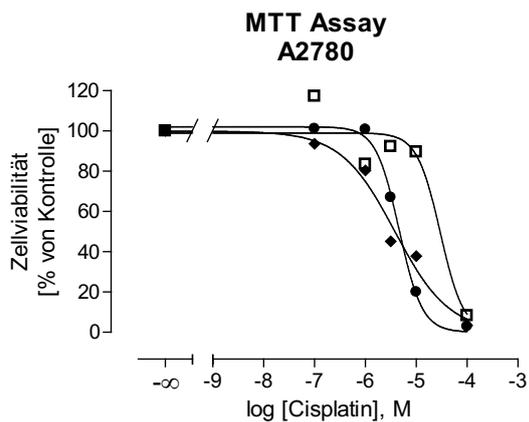
- 24h $plC_{50} = 5,84 \pm 0,04$; $IC_{50} = 1,44 \mu M$
- ◆ 48h $plC_{50} = 5,93 \pm 0,03$; $IC_{50} = 1,18 \mu M$
- 72h $plC_{50} = 6,24 \pm 0,03$; $IC_{50} = 0,58 \mu M$

B



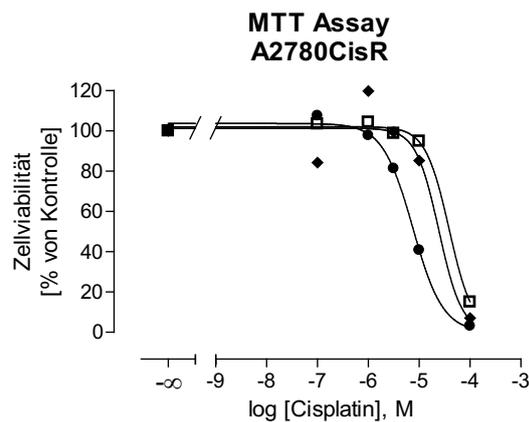
- 24h $plC_{50} = 5,73 \pm 0,04$; $IC_{50} = 1,87 \mu M$
- ◆ 48h $plC_{50} = 5,76 \pm 0,03$; $IC_{50} = 1,73 \mu M$
- 72h $plC_{50} = 5,86 \pm 0,03$; $IC_{50} = 1,37 \mu M$

C



- 24 h $plC_{50} = 4,53 \pm 0,27$; $IC_{50} = 29,8 \mu M$
- ◆ 48 h $plC_{50} = 5,42 \pm 0,13$; $IC_{50} = 3,83 \mu M$
- 72 h $plC_{50} = 5,43 \pm 0,03$; $IC_{50} = 4,62 \mu M$

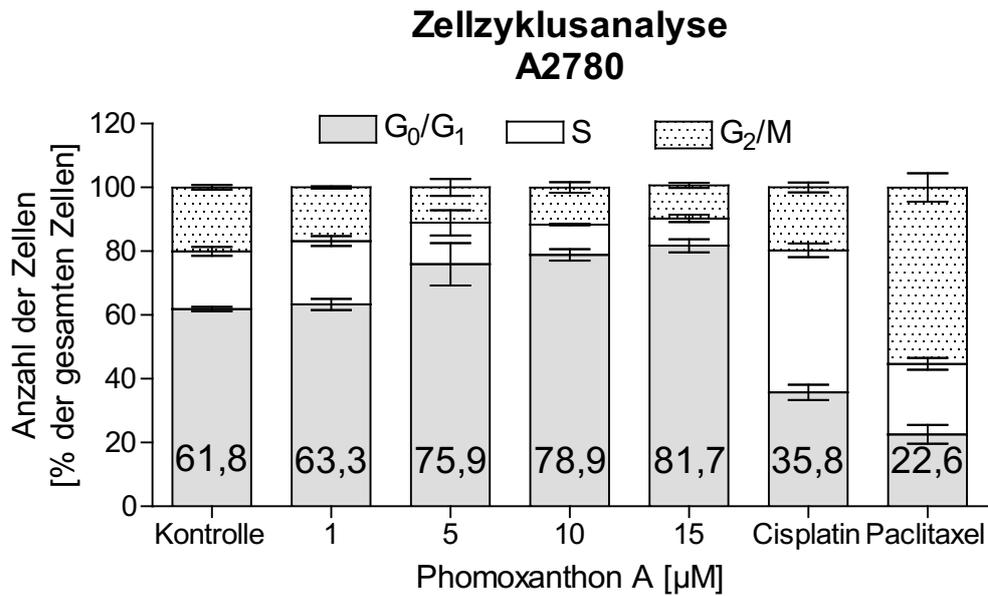
D



- 24 h $plC_{50} = 4,41 \pm 0,05$; $IC_{50} = 39,1 \mu M$
- ◆ 48 h $plC_{50} = 4,61 \pm 0,28$; $IC_{50} = 24,4 \mu M$
- 72 h $plC_{50} = 5,12 \pm 0,04$; $IC_{50} = 7,51 \mu M$

Abbildung 38: Konzentrations-Effekt-Kurven von Phomoxanthon A und Cisplatin an A2780 und A2780CisR nach verschiedenen Inkubationszeiten. Phomoxanthon A war nach 72 Stunden an A2780 (A) signifikant potenter als an A2780CisR (B). Zu den anderen Zeitpunkten wurden ähnliche IC_{50} -Werte bestimmt. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. Cisplatin ist in A2780 (C) und A2780CisR (D) nach 24 Stunden weniger toxisch als nach 72 Stunden Inkubation. Die gezeigten Daten sind ein exemplarisches Experiment.

A



B

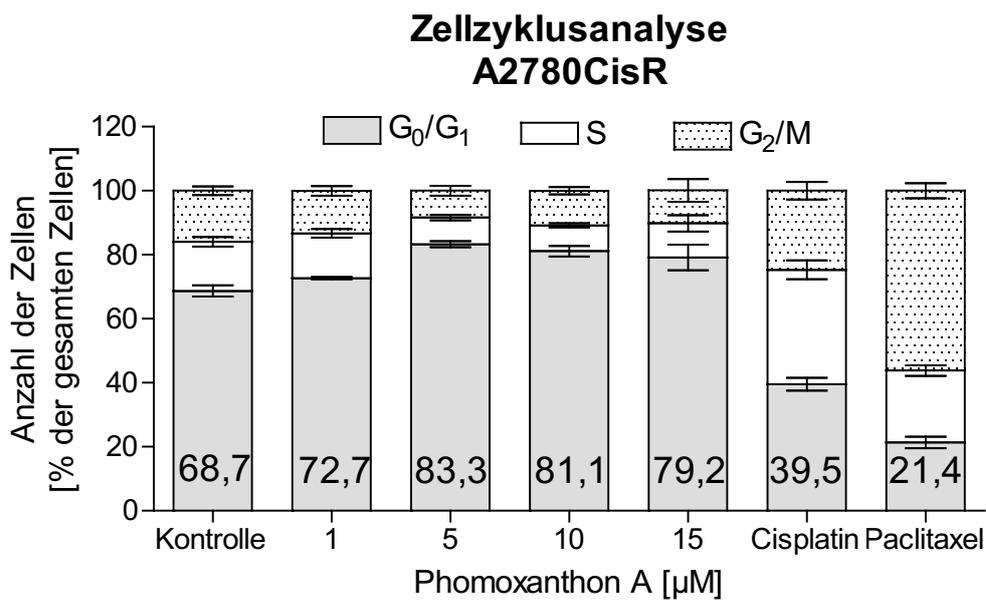
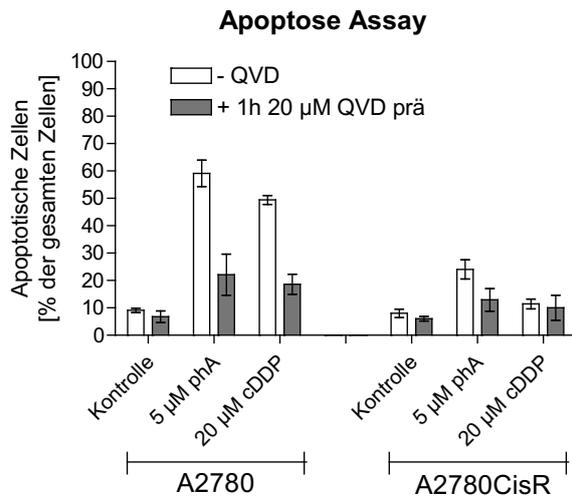


Abbildung 39: Zellzyklusanalyse von A2780 und A2780CisR Zellen nach 24 Stunden Phomoxanthon A Behandlung. Phomoxanthon A induzierte einen G₁-Phasenarrest in A2780 (A) und A2780CisR (B) Zellen abhängig von der eingesetzten Konzentration. Als Kontrollen wurden 10 µM Cisplatin und 50 nM Paclitaxel verwendet. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

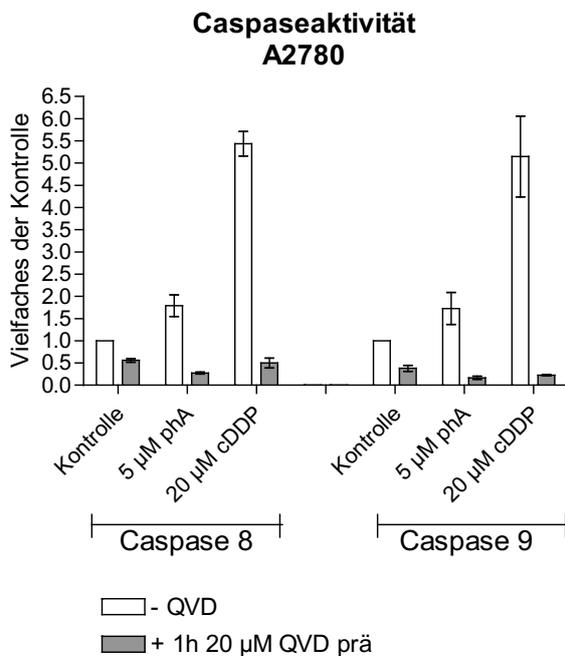
In A2780 und A2780CisR Zellen wurde der Zellzyklus nach der 24-stündigen Inkubation mit Phomoxanthon A analysiert und mit der Wirkung von 10 μM Cisplatin und 50 nM Paclitaxel verglichen. Cisplatin induziert in beiden Zelllinien einen S-Phasenarrest (Abbildung 39). In A2780CisR arretieren zudem einige Zellen in der G_2/M -Phase. Paclitaxel induziert in den Zellen beider Zelllinien einen Arrest in der G_2/M -Phase (Abbildung 39). A2780 und A2780CisR wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Phomoxanthon A behandelt. Dies führte zu einem konzentrationsabhängigen Arrest in der G_1 -Phase in beiden Zelllinien (Abbildung 39). Von den unbehandelten A2780 Zellen befanden sich 61,8% der Zellen in der G_1 -Phase. Der Anteil erhöhte sich auf 63,3% durch 1 μM Phomoxanthon A und stieg stetig auf 81,7% durch die höchste Konzentration von 15 μM an. Analog zu den sensitiven Zellen wurde der Arrest in der G_1 -Phase in A2780CisR Zellen beobachtet. Der höchste gemessene Gehalt an Zellen in der G_1 -Phase betrug 83,3% nach der Behandlung mit dem Naturstoff. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse beweisen, dass die Toxizität von Phomoxanthon A konzentrationsabhängig ist.

Nach dem Arrest in der G_1 -Phase wird die Apoptose eingeleitet. Im späten Stadium der Apoptose wird die DNA durch verschiedene Faktoren fragmentiert. Der Gehalt an fragmentierter DNA wird mit der sub- G_1 -Phase im Zellzyklus assoziiert und kann zur Bestimmung von Apoptose genutzt werden.

A



B



C

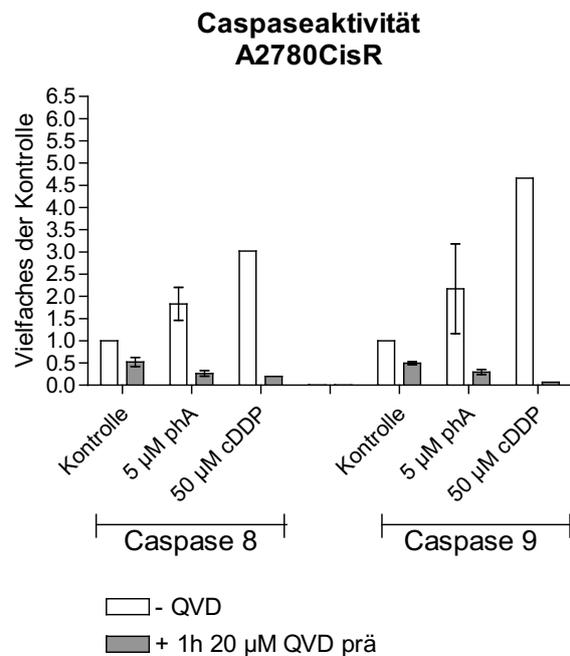


Abbildung 40: Induktion von Apoptose (sub-G₁) in A2780 und A2780CisR Zellen (A) und von Caspase Aktivität in A2780 (B) und A2780CisR Zellen (C) durch Phomoxanthon A nach 24 Stunden Inkubationszeit. Cisplatin (cDDP) und Phomoxanthon A (phA) induzierten Apoptose, welche durch den unspezifischen Caspase Inhibitor QVD reduziert wurde. Die Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor (20 µM) vorbehandelt. Cisplatin und Phomoxanthon A steigerten die Aktivitäten von Caspase 8 sowie von Caspase 9. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert ± Standardfehler von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. 50 µM Cisplatin an A2780CisR wurde nur ein Mal vermessen.

Nach 24 Stunden Inkubation induzierten 5 μM Phomoxanthon A (ungefähre 10-fache IC_{50} an A2780 gemessen nach 72 Stunden im MTT Assay) sowohl in A2780 als auch in A2780CisR Zellen Apoptose, was über den Anteil an sub- G_1 bestimmt wurde. Der Anteil an Zellen, die sich in der Apoptose befanden, war in der sensitiven Zelllinie mit 57% allerdings deutlich höher als in der resistenten mit 21% (Abbildung 40A). Dies spiegelt die unterschiedliche Toxizität von Phomoxanthon A an dem Zellpaar A2780 und A2780CisR wieder, die ebenfalls im MTT Assay bestimmt wurde (Abbildung 38). Die ungefähre 10-fache IC_{50} von Cisplatin (20 μM gemessen nach 72 Stunden im MTT Assay) induzierte in A2780 51% Apoptose (Abbildung 40A). In A2780CisR wurde durch Cisplatin keine Apoptose induziert. Der Inhibitor QVD hemmt unspezifisch die Aktivität verschiedener Caspasen. Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde in der A2780 Zelllinie durch die Präinkubation mit QVD auf 22% reduziert. In A2780CisR Zellen konnte die Apoptose durch QVD nahezu vollständig inhibiert werden. QVD inhibierte ebenfalls die Induktion der DNA-Fragmentierung durch Cisplatin. Dies zeigt, dass Phomoxanthon A ähnlich wie Cisplatin mit der ungefähren 10-fachen IC_{50} an A2780, Apoptose über die Caspase-Kaskade in beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien induziert.

Der extrinsische Apoptoseweg wird über die Bindung von extrazellulären Liganden an die Todesrezeptoren aktiviert, welche in der Zellmembran lokalisiert sind. Die Todesrezeptoren aktivieren im weiteren Verlauf die Caspase 8 innerhalb der Zelle. Dahingegen wird während des intrinsischen Apoptoseweges die Caspase 9 aktiviert. Dies geschieht nach der Schädigung der DNA, woraufhin Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma ausgeschüttet wird. Dies bewirkt die Aktivierung von Caspase 9. Sowohl Caspase 8 als auch Caspase 9 induzieren am Ende der Kaskade die Aktivierung von Caspase 3, welche wiederum die DNA-Fragmentierung reguliert. Die Aktivität der Caspase 8 und der Caspase 9 wurde über die Messung der Biolumineszenz in A2780 und A2780CisR Zellen bestimmt (Abbildung 40B und C). Die Messung der Biolumineszenz zeigte, dass Phomoxanthon A und Cisplatin sowohl Caspase 8 als auch Caspase 9 aktivierten. In A2780 Zellen wurde die Aktivität von Caspase 8 durch Phomoxanthon A um den Faktor 1,79 erhöht. In ähnlichem Ausmaß wurde Caspase 9 mit dem Faktor 1,73 in dieser Zelllinie durch Phomoxanthon A aktiviert. Die Behandlung mit 20 μM Cisplatin steigerte die Aktivitäten der Caspasen um den Faktor 5,44 (Caspase 8) bzw. 5,15 (Caspase 9) in A2780 Zellen. In A2780CisR steigerten 50 μM Cisplatin die Aktivität von Caspase 8 um den Faktor 3,02 und von Caspase 9 um den Faktor 4,66. Phomoxanthon A steigerte in A2780CisR die Aktivität von Caspase 9 um den Faktor 2,17. Die Aktivität der

Caspase 8 wurde um den Faktor 1,83 erhöht. Durch Vorbehandlung mit QVD (20 μ M, 1 Stunde) wurde die Steigerung der Caspaseaktivitäten, die durch Cisplatin bzw. Phomoxanthon A ausgelöst wurden, komplett unterdrückt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Signalweg durch Phomoxanthon A ausgelöst wird.

Die A2780 Zellen wurden 6 Stunden mit der IC_{50} von Cisplatin bzw. Phomoxanthon A behandelt. In diesem Experiment wurde die IC_{50} anstatt der 10-fachen IC_{50} verwendet, um keine Apoptose zu induzieren. Anschließend wurden die Histone γ -H2AX und der Zellkern mittels Immunofluoreszenzmikroskopie angefärbt. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Die Histone wurden zunächst mit einem monoklonalen anti- γ -H2AX Antikörper aus der Maus markiert. Anschließend wurde ein sekundärer anti-Maus-Antikörper aus der Ziege eingesetzt, der mit Alexa488 konjugiert war. Wenn die Helix der DNA aufgebrochen wird, kann der Primärantikörper an die Histone binden und nach Bindung des Sekundärantikörpers zur Fluoreszenz angeregt werden (grün). Die markierten Histone wurden ausgezählt und zu der Gesamtmenge der Zellen in Relation gesetzt (Abbildung 41). Cisplatin induzierte bereits nach 6 Stunden Inkubation Doppelstrangbrüche. Wie im MTT gezeigt, sterben die Zellen erst nach einigen Tagen (Abbildung 21A). Obwohl Phomoxanthon A bereits nach einem Tag das Zellüberleben reduziert (Abbildung 38A und B), wurden gemäß der Färbung der γ -H2AX keine Doppelstrangbrüche beobachtet. Dies ist ein Indiz, dass die Apoptose nach der Behandlung mit Phomoxanthon A durch die Aktivierung anderer Faktoren induziert wird.

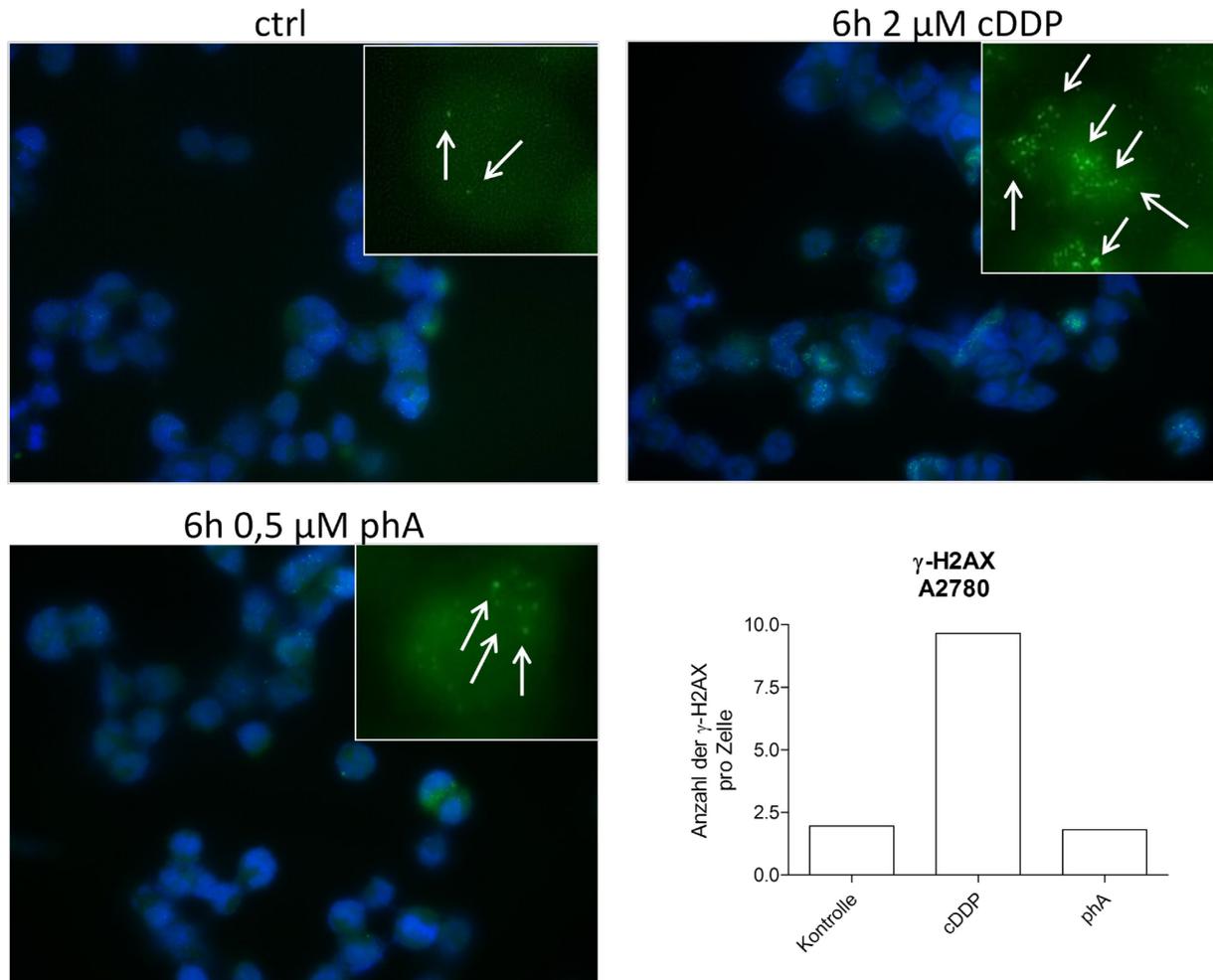


Abbildung 41: Bestimmung der Doppelstrangbrüche über die Markierung von γ -H2AX in A2780 Zellen. Die Zellen wurden 6 Stunde mit 2 μ M Cisplatin (cDDP) oder 0,5 μ M Phomoxanthon A (phA) inkubiert und anschließend fixiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Histone γ -H2AX wurden mit einem primären und sekundären Antikörper markiert (grün), wenn diese nach dem Bruch der DNA-Helix zugänglich waren.

Zur weiteren Aufklärung des Wirkmechanismus wurde die Expression bzw. Aktivierung von apoptoserelevanten Proteinen in den Zelllinien A2780 und A2780CisR nach der Behandlung mit Phomoxanthon A mittels eines Apoptose Proteom Profilers untersucht (Abbildung 42). In A2780 werden die pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie, Bax und Bad, exprimiert (Abbildung 42). Dagegen wurde keine Expression der anti-apoptotischen Mitglieder Bcl-2 und Bcl-x beobachtet. Die Expression der zelleigenen Inhibitoren der Apoptose (IAP) cIAP-1, XIAP und Survivin wurde beobachtet, jedoch nicht von cIAP-2. Survivin wird hauptsächlich in Krebszellen exprimiert und wird durch die Aktivierung von p53

herunter reguliert [233]. Die Zellen der A2780-Zelllinie exprimieren den Wildtyp von p53 [26]. Das Protein ist an Position S392 stark phosphoryliert, jedoch kaum an den Positionen S15 und S46 (Abbildung 42). Die Antagonisten, Smac/DIABLO und HTRA2/Omi, der IAP-Familie werden in A2780 exprimiert. Die Todesrezeptoren TRAIL R1/DR4 und TNF RI/TNFRSF1A werden in A2780 nicht exprimiert. Jedoch sind Die Todesrezeptoren TRAIL R2/DR5 und Fas/TNFRSF6/CD95 in dieser Zelllinie vorhanden. Zudem wird die Todesdomäne FADD exprimiert. In A2780 wurde eine starke Expression der inaktiven pro-Caspase 3 bestimmt, jedoch keine Aktivierung der Caspase 3. Zudem wurde eine hohe Expression von Cytochrom c beobachtet. Desweiteren wurde die Expression von Claspin beobachtet. Claspin reguliert im Zellzyklus die Transition aus der S- in die G₂/M-Phase und stoppt den Zyklus, wenn die DNA geschädigt wurde oder die Zelle Stress hat [234] [235]. Die Heat Shock Proteine (HSP) HSP27, HSP60 und HSP70 werden in A2780 exprimiert (Abbildung 42). HSPs regulieren die Zellproliferation und inhibieren die Apoptose unter anderem durch die Faltung von Proteinen [236]. In A2780 wird Hypoxie-induzierte Faktor 1 α (HIF-1 α) exprimiert (Abbildung 42). Bei hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α aktiviert und hilft der Zelle, sich den hypoxischen Gegebenheiten anzupassen und zu wachsen [237]. Eventuell waren zum Zeitpunkt der Messung einige der A2780 Zellen hypoxisch.

In A2780CisR sind Bad und Bax weniger stark exprimiert als in A2780 (Abbildung 42). Dies könnte ein Indiz für die bestehende Cisplatinresistenz sein. Bcl-2 und Bcl-x sind wie in A2780 nicht exprimiert. Die Expressionsmuster der Mitglieder der IAP-Familie und deren Antagonisten sowie der Caspasen sind in A2780CisR ähnlich der Expressionsmuster in A2780. Wie in A2780 ist p53 an der Position S392 phosphoryliert. Allerdings ist dies um 36% weniger stark ausgeprägt (bestimmt mit ImageJ). Die schwächere Phosphorylierung von p53 könnte ein Hinweis für die Cisplatinresistenz der Zelllinie sein. Die Expressionsmuster der Todesrezeptoren und von FADD sind ebenfalls ähnlich der Expressionsmuster in A2780. Jedoch wird der Rezeptor Fas/TNFRSF6/CD95 in A2780CisR stärker exprimiert als in A2780. Cytochrom c wird geringfügig weniger in A2780CisR exprimiert als in A2780. Wenn in der cisplatinresistenten Zelle Apoptose induziert wird, erfolgt dies wahrscheinlich überwiegend über den extrinsischen Weg. Claspin wird geringfügig weniger in A2780CisR exprimiert als in A2780. Dies könnte ebenfalls die Folge der Cisplatinresistenz sein. Cisplatin induziert den Zellzyklusarrest in der S- und G₂/M-Phase. Claspin fördert diesen Arrest. Wenn Claspin herunter reguliert ist, wäre die Wahrscheinlichkeit für den Phasenarrest geringer. Die drei

HSPs werden ebenfalls in A2780CisR exprimiert, allerdings wird HSP60 in A2780CisR stärker exprimiert als in A2780. Da HSP60 zur Erhaltung der Zellen beiträgt, könnte die gesteigerte Expression dieses Proteins eine Folge der Cisplatinresistenz sein. HIF-1 α wird weniger stark in A2780CisR exprimiert als in A2780. Eventuell waren zum Zeitpunkt der Messung nicht so viele A2780CisR Zellen hypoxisch wie die A2780 Zellen.

Nach der Behandlung mit 5 μ M Phomoxanthon A für 24 Stunden wurde die Expression von Bax in A2780 moderat erhöht (Abbildung 42). In A2780CisR blieb diese unverändert. Phomoxanthon A hatte keinen Einfluss auf die Expression von Bad, Bcl-2 und Bcl-x in beiden Zelllinien. In A2780 und A2780CisR wurde die Expression von cIAP-1 und Claspin fast vollständig gehemmt. Die Expression von Survivin und XIAP wurde durch Phomoxanthon A nur moderat gehemmt. Demnach wurde die Induktion der Apoptose durch Phomoxanthon A durch die zelleigenen Inhibitoren kaum gehemmt. Außerdem wurde ein etwas geringerer Gehalt von Smac/DIABLO und HTRA2/Omi nach der Behandlung mit Phomoxanthon A bestimmt. Die Antagonisten wurden entweder nicht benötigt und daher abgebaut oder sie wurden nach der Inhibition der IAPs abgebaut. In beiden Zelllinien wurde p53 an der Position S392 geringfügig stärker phosphoryliert. Dies könnte die Ursache für die Abnahme des Survivins sein. In A2780 wurde kaum Cytochrom c detektiert. In A2780CisR blieb der Cytochrom c Gehalt unverändert. Der Verbrauch von Cytochrom c und die Erhöhung der Bax-Expression in A2780 deutet darauf hin, dass Phomoxanthon A in A2780 überwiegend den intrinsischen Apoptoseweg induziert. Die Expression der Todesrezeptoren und von FADD blieb in A2780 unverändert. In A2780CisR nahm der Gehalt von FADD und Fas/TNFRSF6/CD95 durch die Behandlung mit Phomoxanthon A ab. Da zudem der Gehalt von Cytochrom c in A2780CisR nicht beeinflusst wurde, induziert Phomoxanthon A in A2780CisR wahrscheinlich hauptsächlich den extrinsischen Apoptoseweg. In beiden Zelllinien steigt die Aktivität der Caspase 3 und der Gehalt an Pro-Caspase 3 verringert sich gleichermaßen durch Phomoxanthon A. Dies ist ein Beweis, dass Phomoxanthon A in A2780 und A2780CisR Apoptose induziert. In beiden Zelllinien wird HSP60 nach der Behandlung mit Phomoxanthon A herunter reguliert. Die Reduzierung von HSP70 ist in beiden Zelllinien moderat. Somit werden zwei anti-apoptotische Faktoren gehemmt. In den behandelten A2780-Zellen ist weniger HIF-1 α vorhanden als in der unbehandelten Kontrolle. Somit waren zum Zeitpunkt der Messung weniger Zellen hypoxisch. Der Status von HIF-1 α blieb in A2780CisR unverändert (Abbildung 42). Phomoxanthon A induziert in beiden Zelllinien

Apoptose. In A2780 wird überwiegend der intrinsische Weg induziert und in A2780CisR hauptsächlich der extrinsische Weg. Dabei werden anti-apoptotische Faktoren inhibiert.

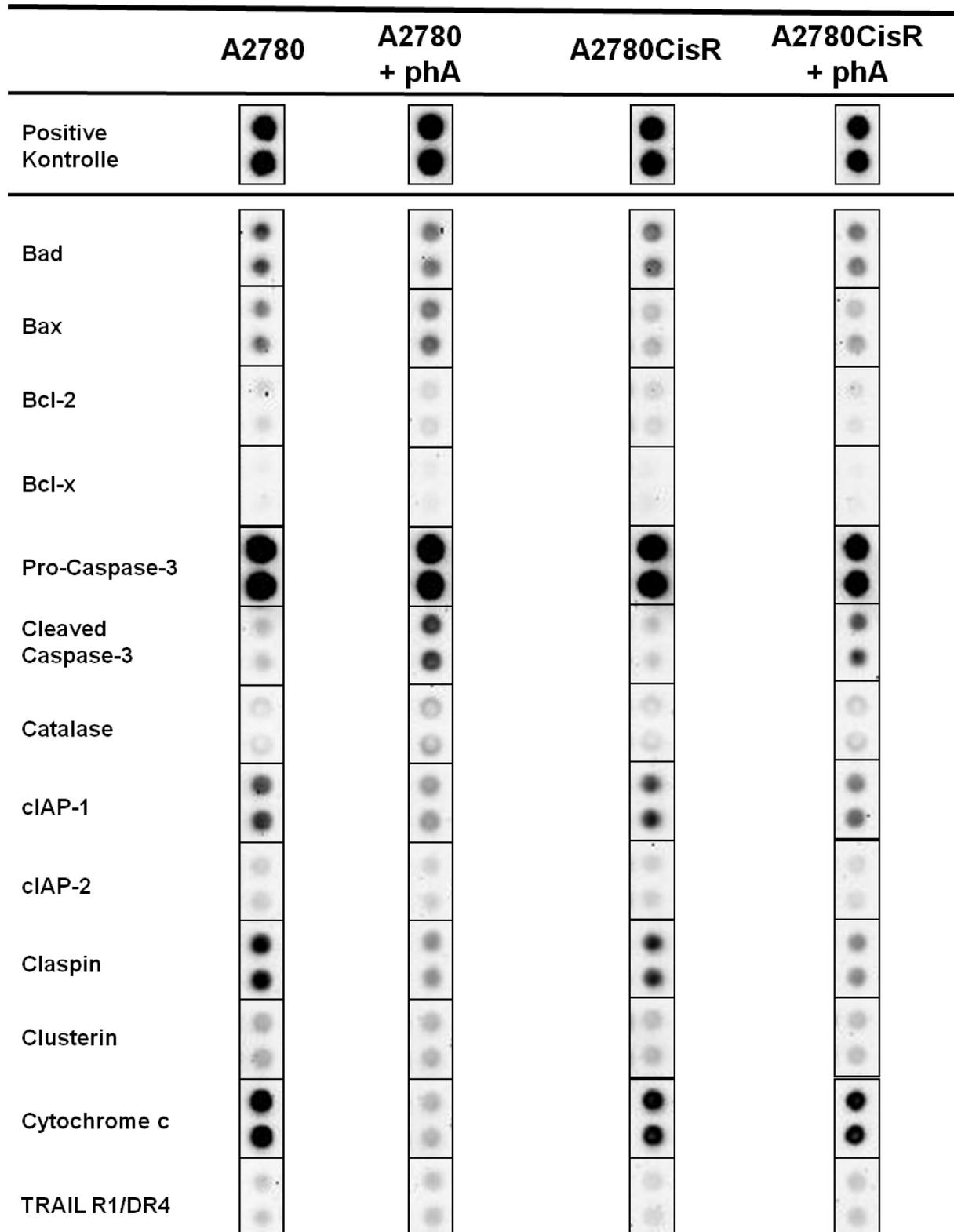
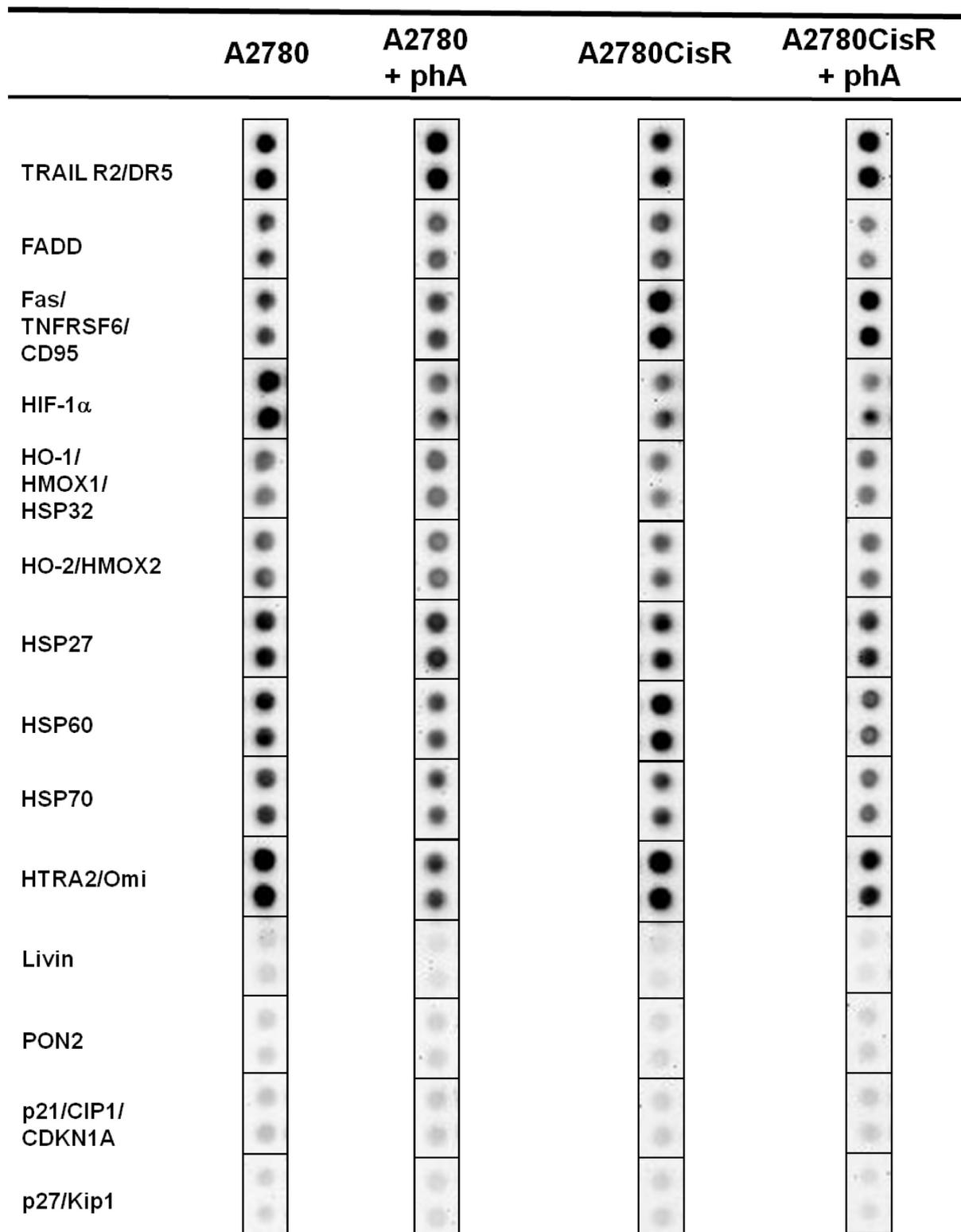
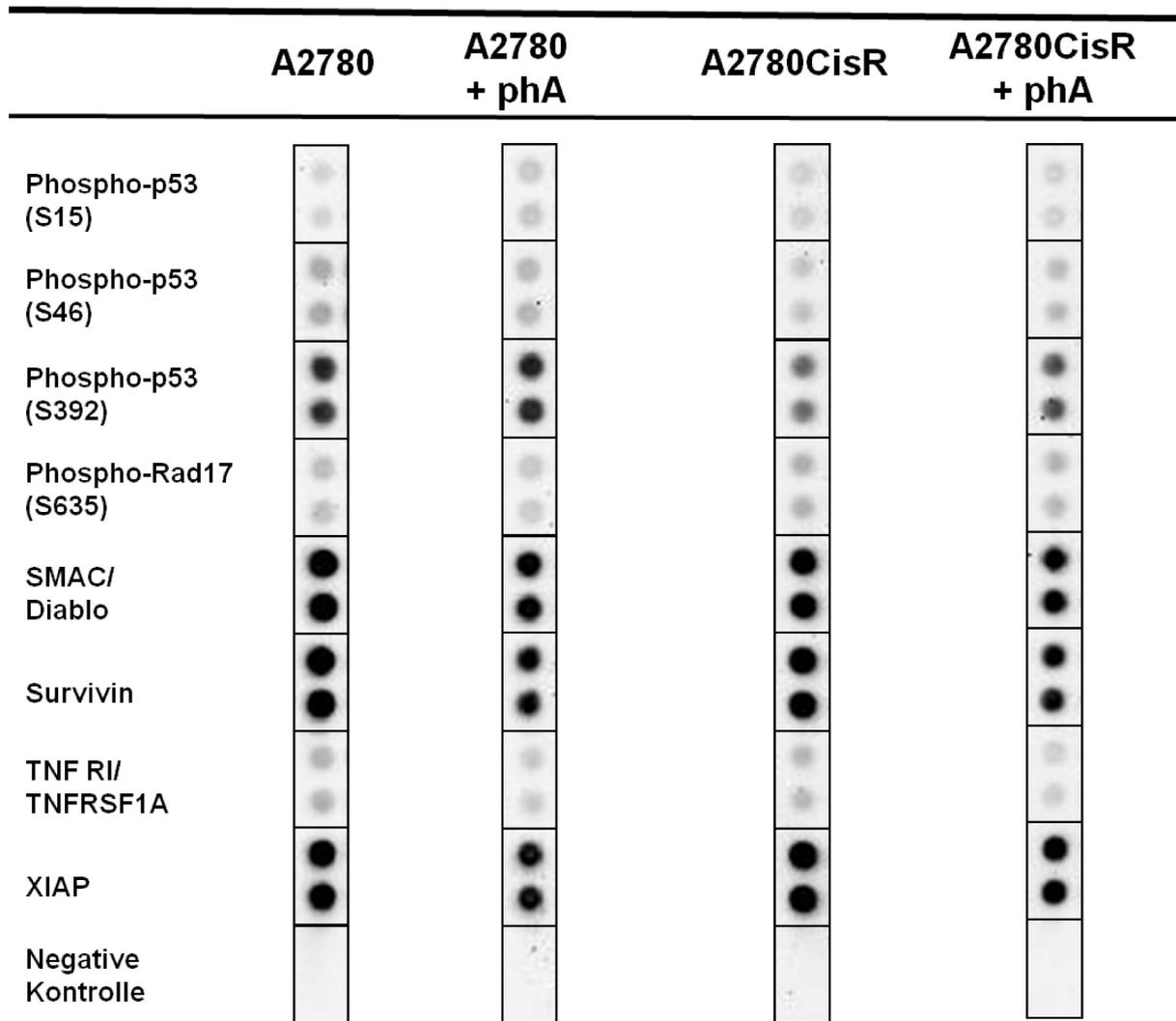


Abbildung 42: Legende siehe Ende der Abbildung auf Seite 159.



Fortsetzung Abbildung 42: Legende siehe Ende der Abbildung auf Seite 159.



Fortsetzung Abbildung 42: Human Apoptosis Array von den Zelllinien A2780 und A2780CisR. Die Zelllinien wurden 24 Stunden mit 5 μ M Phomoxanthon A (phA) vorbehandelt. Die differentielle Expression bzw. Aktivierung der apoptoserelevanten Proteine in den behandelten Zelllinien wurde mit der in den unbehandelten Zelllinien verglichen.

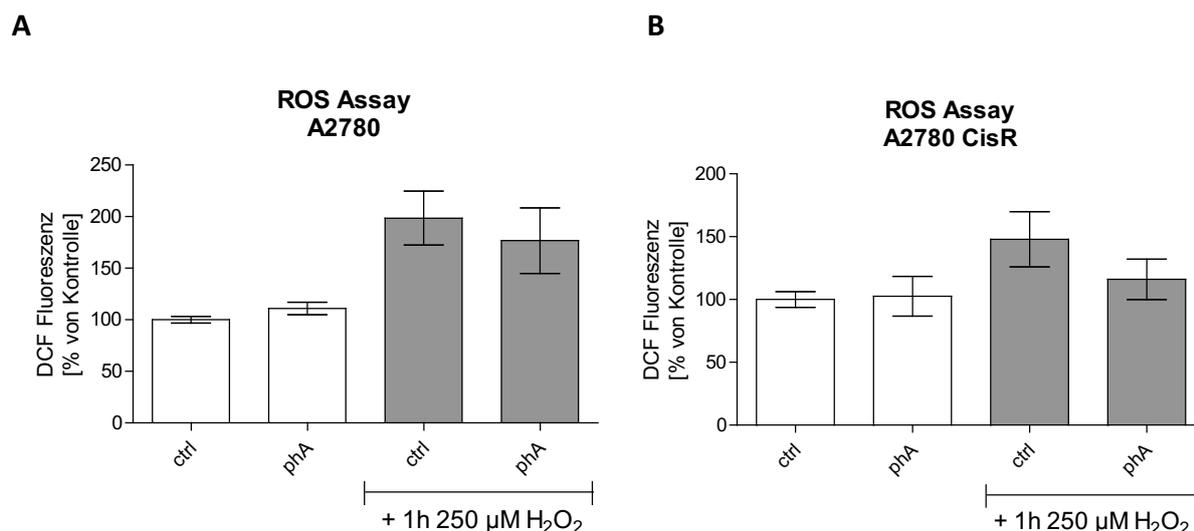
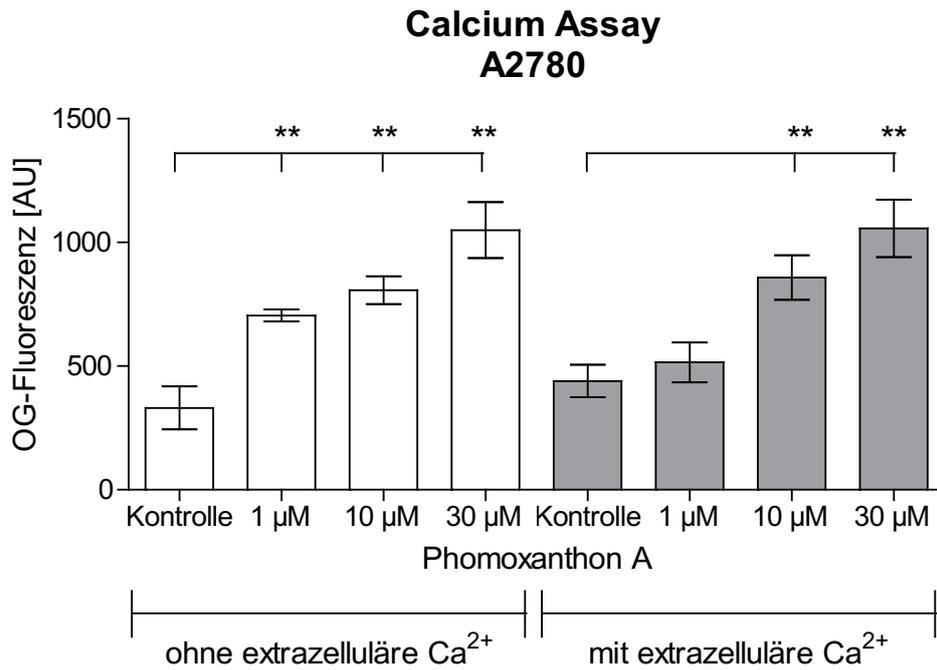


Abbildung 43: ROS in A2780 (A) und A2780CisR (B) nach der Behandlung mit Phomoxanthon A (pha) für 18 Stunden. Phomoxanthon A wurde in der Konzentration 316 nM verwendet (IC_{10}). Nach der Behandlung mit dem Naturstoff wurden die Zellen mit $H_2DCF\text{-DA}$ 10 μM für 30 Minuten beladen. Ein Teil wurde direkt vermessen, der andere erst mit H_2O_2 250 μM für 1 Stunde behandelt. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten.

ROS können bei erhöhtem Vorkommen in der Zelle die DNA schädigen und Mutationen verursachen. Einige Naturstoffe, wie Ellagsäure oder Ascorbinsäure, sind als Antioxidantien bekannt und machen ROS unwirksam [238]. Die Zelllinien A2780 und A2780CisR wurden mit einer nicht-toxischen Konzentration von Phomoxanthon A (316 nM) für 18 Stunden behandelt und anschließend wurde der intrazelluläre ROS-Gehalt mithilfe eines Durchflusszytometers bestimmt (Abbildung 43A und B). Nach der Behandlung mit Phomoxanthon A wurde keine Veränderung des ROS-Spiegels in beiden Zelllinien beobachtet. Der basale Level an ROS ist in A2780 und A2780CisR nicht signifikant verschieden (Abbildung 23C). Die geringfügige Reduktion der Wasserstoffperoxid (250 μM) induzierten ROS durch Phomoxanthon A war nicht signifikant. Eine höhere Konzentration von Phomoxanthon A wurde nicht verwendet, um die Zellen nicht zu schädigen (Abbildung 40A). Ebenso wurde die Inkubationszeit nicht verlängert, um keine Apoptose zu induzieren (Abbildung 38A und B).

A



B

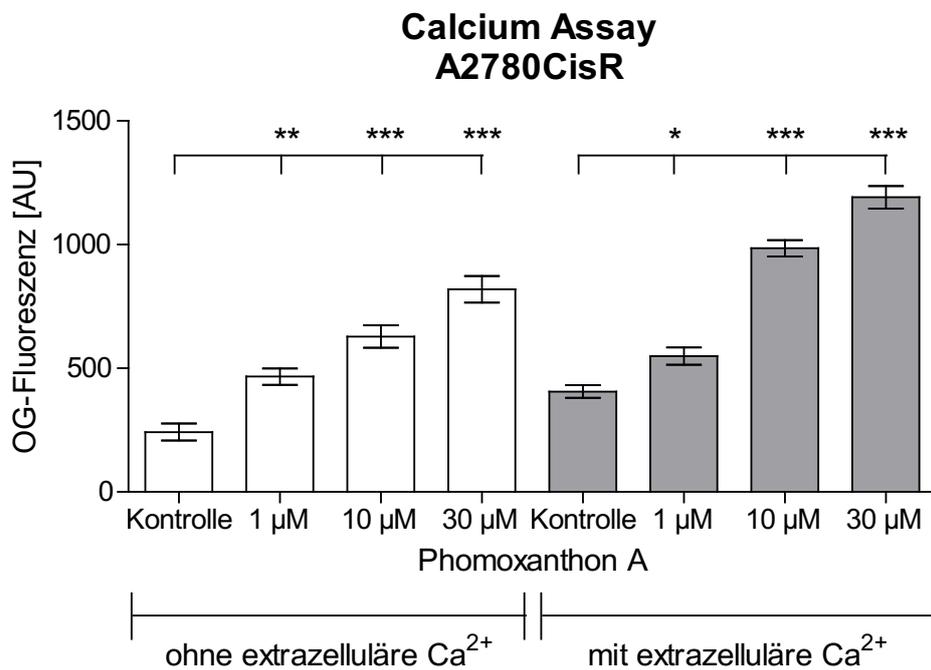


Abbildung 44: Bestimmung der Konzentration von freien Calcium-Ionen in A2780 (A) und A2780CisR (B). In beiden Zelllinien wird der intrazelluläre Calcium-Ionen-Gehalt durch Phomoxanthon A in Ab- und Anwesenheit von extrazellulären Ca²⁺ (1 mM) erhöht. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p < 0,001$).

In A2780 und A2780CisR wurde die Konzentration der intrazellulären, freien Calcium-Ionen nach Zugabe verschiedener Phomoxanthon A-Konzentrationen in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Ca^{2+} bestimmt (Abbildung 44). In A2780 wurden intrazelluläre Ca^{2+} durch alle eingesetzten Phomoxanthon A-Konzentrationen in Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} freigesetzt (Abbildung 44A). Der Anstieg an freien intrazellulären Ca^{2+} ist signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Fluoreszenzintensität wurde nach der Zugabe von 30 μM Phomoxanthon A um den Faktor 3 gesteigert. In Anwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} wurde nur ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} in A2780 nach Zugabe von 10 μM bzw. 30 μM Phomoxanthon A beobachtet, und nicht nach 1 μM Phomoxanthon A. Die Fluoreszenzintensität wurde durch 30 μM Phomoxanthon A um den Faktor 2 gesteigert. In A2780CisR wurde ein signifikanter Anstieg von freien Ca^{2+} nach der Zugabe jeglicher Phomoxanthon A-Konzentration beobachtet (Abbildung 44B). In Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} wurde die Fluoreszenzintensität nach der Zugabe von 30 μM Phomoxanthon A um den Faktor 3, ähnlich wie in A2780, gesteigert. In Anwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} wurde eine höhere Fluoreszenzintensität gemessen als in Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} . Die Fluoreszenzintensität wurde nach 30 μM Phomoxanthon A ebenfalls um den Faktor 3 gesteigert. In beiden Zelllinien ist ein kontinuierlicher Anstieg der Fluoreszenz in Korrelation mit steigenden Konzentrationen von Phomoxanthon A zu beobachten. Dies ist ein Indiz, dass Phomoxanthon A in A2780 und A2780CisR intrazelluläre Ca^{2+} freisetzt.

6.4 Der Wirkmechanismus von Embellicin A und Embellicin B

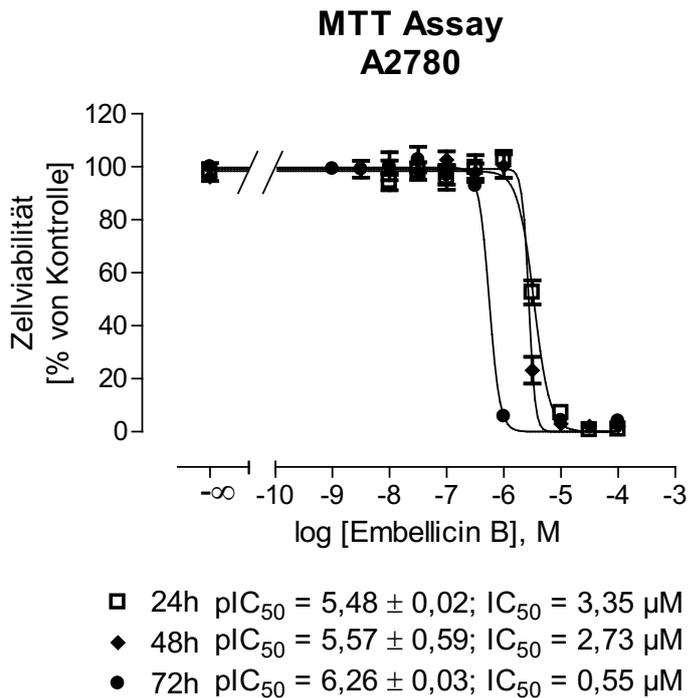
Der Naturstoff Embellicin B aus dem endophytischen Fungus *Embellisia eureka* wurde auf seine zytotoxischen Eigenschaften an cisplatinempfindlichen und -resistenten Zellpaaren im MTT Assay untersucht. Dafür wurden die Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780CisR, die triple-negative Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR, die Ösophaguskarzinom-Zelllinien Kyse510 und Kyse510CisR und die Zungenkarzinom-Zelllinien Cal27 und Cal27CisR verwendet. Außerdem wurden die chronisch myeloische Leukämie-Zelllinie K562 und die native Zelllinie HEK293 (Human Embryonic Kidney) herangezogen. Die Zytotoxizität von Embellicin B wurde mit der von Cisplatin verglichen (Tabelle 23). In allen Zelllinien ist Embellicin B potenter als Cisplatin. Die A2780 Zellen reagierten um das 2-fache und die A2780CisR Zellen um das 19-fache sensitiver für Embellicin B als für Cisplatin. Letztendlich war Embellicin B an diesem Zellpaar äquipotent mit einem pIC_{50} von 6,26 (A2780) bzw. 6,25 (A2780CisR). Die MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR Zellen waren das 13 bzw. 20-fache sensitiver für Embellicin B als für Cisplatin. Embellicin B war um den Faktor 6 potenter als Cisplatin bei der sensitiven Cal27 und um den Faktor 21 bei der resistenten Cal27CisR Subzelllinie. Wie in dem Zellpaar A2780 und A2780CisR ist Embellicin B in dem Zellpaar Cal27 und Cal27CisR äquipotent (Tabelle 23). Die Toxizität von Embellicin B war in den Zelllinien Kyse510 und Kyse510CisR verglichen mit der Toxizität von Cisplatin deutlich weniger ausgeprägt als in den anderen Zelllinien. Dennoch war die Substanz auch in diesem Zellpaar potenter als Cisplatin (Faktor 1,5 für Kyse510CisR und Faktor 6 für Kyse510). Die CisR Zelllinien sind resistent gegen Cisplatin, jedoch nicht gegen Embellicin B. Die pIC_{50} -Werte für Embellicin B sind innerhalb der Zellpaare MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR sowie Kyse510 und Kyse510CisR um den Faktor 1,2 geringfügig, jedoch nicht signifikant, verschieden (Tabelle 23). Für die K562 Zelllinie war Embellicin B um den Faktor 10 und für die Zelllinie HEK293 um das 6-fache toxischer als Cisplatin.

Tabelle 23: Zusammenfassung der pIC_{50} von Cisplatin und Embellicin B an verschiedenen Zelllinien. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert des $pIC_{50} \pm$ Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten.

Zelllinien	$pIC_{50} \pm SEM$		Ratio
	Cisplatin	Embellicin B	$IC_{50}(\text{Cisplatin}) / IC_{50}(\text{Embellicin B})$
A2780	5,95 \pm 0,03	6,26 \pm 0,03	2
A2780CisR	4,96 \pm 0,02	6,25 \pm 0,07	19
MDA-MB-231	4,61 \pm 0,02	5,72 \pm 0,10	13
MDA-MB-231CisR	4,35 \pm 0,02	5,65 \pm 0,12	20
Cal27	4,99 \pm 0,04	5,74 \pm 0,27	6
Cal27CisR	4,42 \pm 0,05	5,74 \pm 0,39	21
Kyse510	5,60 \pm 0,05	5,77 \pm 0,17	1,5
Kyse510CisR	5,07 \pm 0,03	5,85 \pm 0,79	6
K562	5,02 \pm 0,04	6,04 \pm 0,02	10
HEK293	5,45 \pm 0,04	6,26 \pm 0,04	6

Die Zytotoxizität von Embellicin B wurde an A2780 und A2780CisR Zellen zusätzlich für verschiedene Inkubationszeiten im MTT Assay bestimmt. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden mit dem Naturstoff behandelt und anschließend vermessen (Abbildung 45A und B). Bereits nach 24 Stunden wurde die Zellviabilität der Ovarialkarzinom-Zellen durch die Behandlung mit Embellicin B in geringen Konzentrationen (3,4 μ M bei A2780 und 4,8 μ M bei A2780CisR) um 50% inhibiert. Der Unterschied der ermittelten pIC_{50} -Werte nach 24 Stunden sind ist signifikant ($***p < 0,001$). Nach 48 Stunden erhöhte sich die Zytotoxizität von Embellicin B geringfügig in beiden Zelllinien. Die Substanz war für die A2780 Zellen um den Faktor 1,2 und für die A2780CisR Zellen um den Faktor 1,4 toxischer. Eine größere Differenz in der Zytotoxizität bestand zwischen den Zeiten 48 und 72 Stunden. Nach drei Tagen Inkubationszeit wurde die Zellviabilität bereits durch Konzentrationen des Alkaloids im nanomolaren Bereich gehemmt. Die Zytotoxizität der Substanz war sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig. Zu allen Zeitpunkten war Embellicin B äquipotent für die cisplatinsensitive und –resistente Zelllinie.

A



B

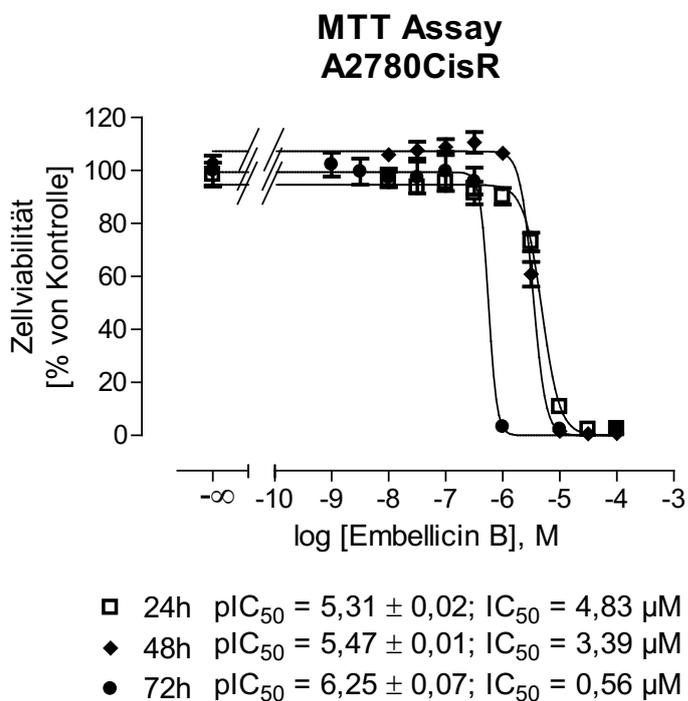


Abbildung 45: Konzentrations-Effekt-Kurven von Embellicin B an A2780 (A) und A2780CisR (B). Die Zellen wurden nach 24, 48 bzw. 72 Stunden Inkubationszeit im MTT Assay vermessen. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten.

In einem Annexin V Assay wurde untersucht, ob das Alkaloid in den Zellen Apoptose induziert. Dafür wurden die Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Somit wurden Zellen detektiert, die sich in der frühen und späten Phase der Apoptose befanden. Die Ovarialkarzinom-Zellen wurden 48 Stunden mit der ungefähren doppelten IC_{50} ($1 \mu\text{M}$, nach 72 Stunden ermittelt) von Embellicin B behandelt und anschließend wurde die Induktion von Apoptose in den Zellen untersucht. Als Vergleich wurden die Zellen mit der jeweiligen ungefähren doppelten IC_{50} ($7 \mu\text{M}$ an A2780 und $22 \mu\text{M}$ an A2780CisR) von Cisplatin behandelt. In der A2780 Zelllinie induzierte Cisplatin insgesamt in 43% der Zellen Apoptose. In der Zelllinie A2780CisR waren insgesamt 25% der Zellen apoptotisch (Abbildung 46). Die doppelte IC_{50} von Embellicin B induzierte in A2780 Zellen insgesamt 47% und in den A2780CisR Zellen insgesamt 33% apoptotische Zellen. In beiden Zelllinien induzierte Embellicin B eine ähnliche Menge an Apoptose wie Cisplatin in vergleichbaren inhibitorischen Konzentrationen.

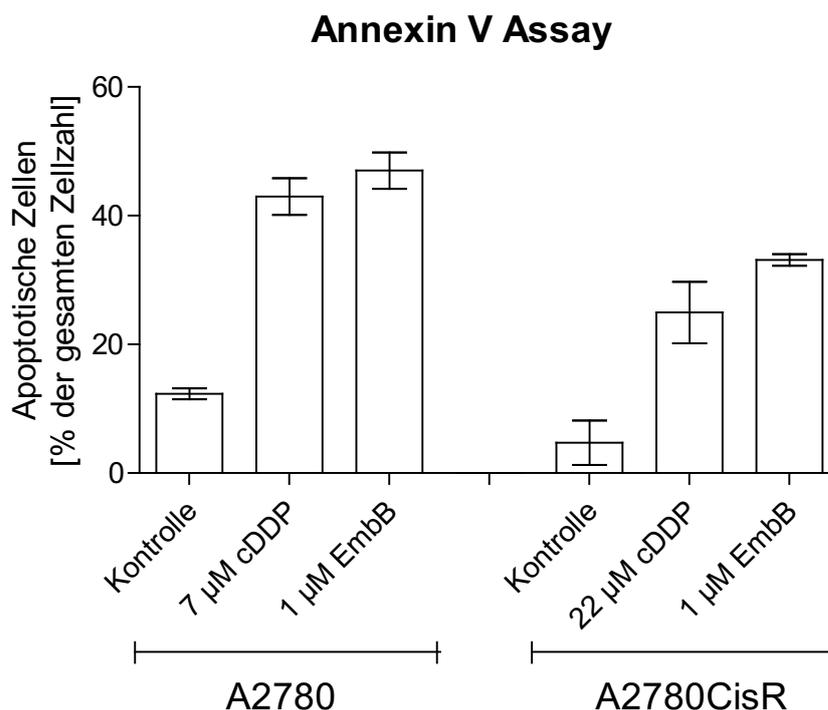


Abbildung 46: Induktion von Apoptose in A2780 und A2780CisR Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit Cisplatin (cDDP) oder Embellicin B (EmbB). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

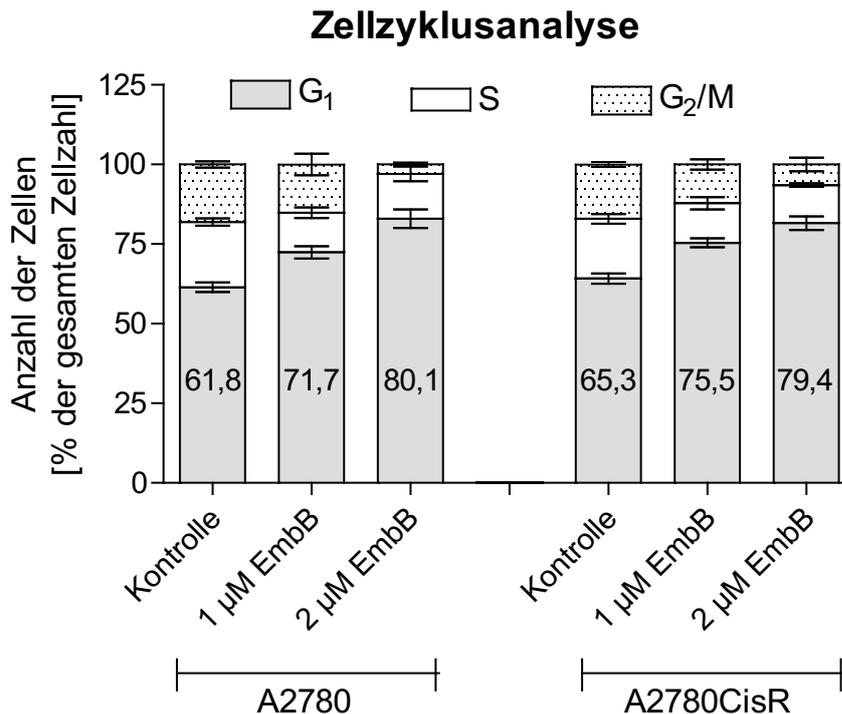
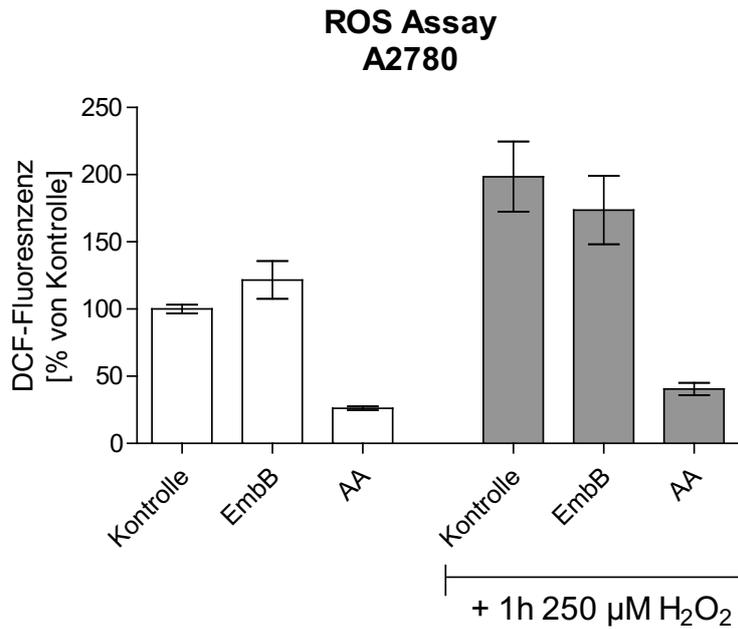


Abbildung 47: Zellzyklus Analyse von A2780 und A2780CisR nach 24 Stunden Behandlung mit Embellicin B (EmbB). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Zellzyklusanalyse zeigt, in welcher Phase sich die Zellen nach der Behandlung mit Embellicin B befinden. Nach der Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die mit Propidiumiodid gefärbten Zellen im Durchflusszytometer analysiert. In den unbehandelten Zellen befanden sich 62% (A2780) bzw. 65% (A2780CisR) der Zellen in der G₁-Phase (Abbildung 47). 19% bzw. 20% der Zellen beider Zelllinien wurden in der S-Phase bestimmt und in der G₂/M-Phase wurden etwa 17% bzw. 18% der Zellen detektiert. Die Behandlung mit Embellicin B führte zu einem signifikanten G₁-Phasenarrest in beiden Zelllinien. Die Menge an Zellen, die in dieser Phase arretieren, war von der eingesetzten Embellicin B-Konzentration abhängig. Die ungefähr doppelte IC₅₀ von Embellicin B (1 µM, ermittelt nach 72 Stunden) erhöhte signifikant den Gehalt an Zellen in der G₁-Phase auf 72% in A2780 (**p < 0,01) und auf 76% in A2780CisR (***p < 0,001). Die Behandlung der Zellen mit der ungefähren 4-fachen IC₅₀ (2 µM, ermittelt nach 72 Stunden) von Embellicin B erhöhte die Anzahl der Zellen in der G₁-Phase auf 79% (A2780CisR) bzw. 80% (A2780), unabhängig von der Sensitivität der Zellen für Cisplatin (***p < 0,001).

A



B

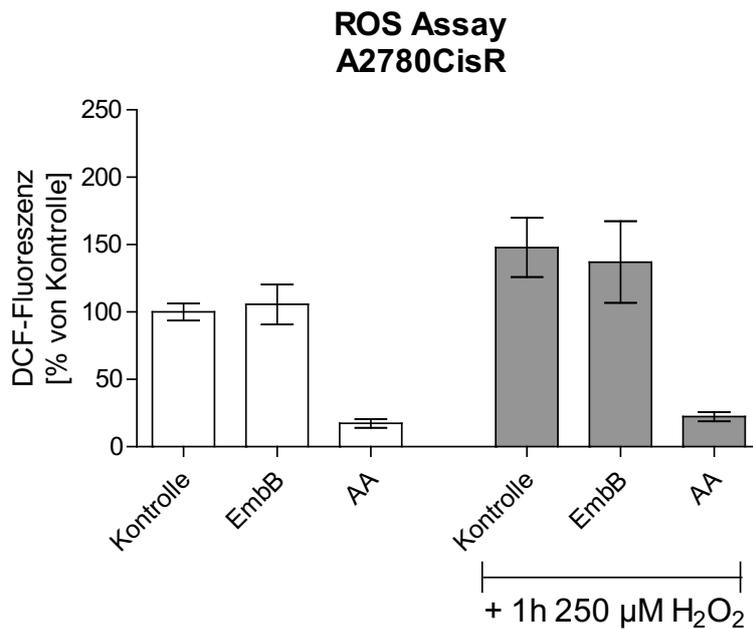


Abbildung 48: Bestimmung der ROS in A2780 (A) und A2780CisR (B) nach der Behandlung mit Embellicin B (EmbB) 316 nM (halbe IC₅₀) für 18 Stunden. Als antioxidative Kontrolle wurde 130 µM (in A2780) bzw. 500 µM (in A2780CisR) Ascorbinsäure (AA) eingesetzt. Die Zellen wurden mit 10 µM H₂DCF-DA für 30 Minuten behandelt. Die Proben wurden entweder ohne Wasserstoffperoxid verarbeitet oder 1 Stunde mit 250 µM Wasserstoffperoxid behandelt und anschließend vermessen. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die A2780 und A2780CisR Zellen wurden mit Embellicin B in nicht-toxischen Konzentrationen behandelt, um die Zellviabilität nicht zu beeinflussen. Die Steigung der Kurve von Embellicin B im MTT Assay ist sehr steil (Abbildung 45). Eine geringfügige Erhöhung der Konzentration würde die Zellviabilität innerhalb der 18 Stunden Inkubation stark beeinträchtigen. Nach der Inkubationszeit mit Embellicin B wurde der ROS-Spiegel der Zellen mittels Durchflusszytometer bestimmt. Die Behandlung mit Embellicin B führte zu keiner signifikanten Veränderung des ROS-Spiegels in A2780 und A2780CisR Zellen (Abbildung 48). Den Zellen wurde Wasserstoffperoxid appliziert, um den intrazellulären Gehalt an ROS zu steigern. Die Präinkubation von Embellicin B hatte keinen signifikanten Effekt auf die ROS-Produktion durch Wasserstoffperoxid in beiden Zelllinien (Abbildung 48). Die Behandlung mit Ascorbinsäure führte sowohl mit als auch ohne den Zusatz von Wasserstoffperoxid zu einer signifikanten Verminderung des ROS-Spiegels. Embellicin B hatte somit in nicht-toxischen Konzentrationen keinen Effekt auf den intrazellulären ROS-Spiegel in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780CisR.

Im Arbeitskreis von Prof. Proksch wurden Spektren von Embellicin A und Embellicin B im Positiv- und Negativ-Modus am Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometer (LC-MS) mit Elektrospray-Ionisation (ESI) aufgenommen. Für diese Arbeit wurden die Spektren der Abbildung 49 und der Abbildung 50 zur Verfügung gestellt. Embellicin B ist nicht lagerstabil, weswegen keine weiteren Experimente durchgeführt wurden. Die Substanz wandelt sich durch intramolekulare Dehydratation in Embellicin A um [153]. Das Massenspektrum zeigt, dass zu Beginn der Experimente Embellicin B und Embellicin A im Verhältnis 5:1 vorlagen (Abbildung 49). Die Substanz wurde in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Experimente wurde die Lösung ungefähr 5 Mal aufgetaut und wieder eingefroren. Nach 1 ½ Jahren war das Verhältnis zwischen Embellicin B und Embellicin A bereits 2:1 und es wurden vermehrt Verunreinigungen gemessen (Abbildung 50). Da Embellicin A als Feststoff bei -20°C stabil lagerfähig ist und dem Embellicin B ähnelt, wurden mit Embellicin A weitere Experimente durchgeführt.

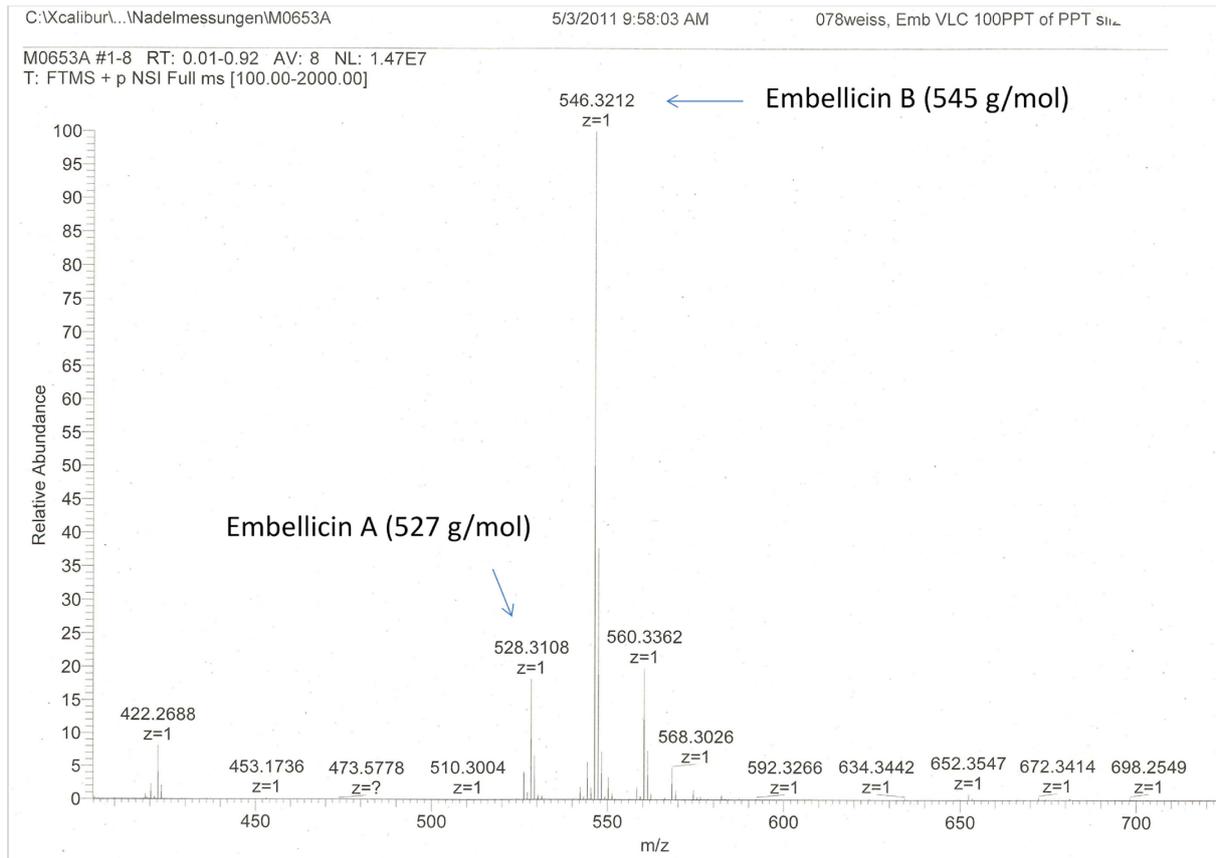


Abbildung 49: Massenspektrum von Embellicin B im Positiv-Modus (aus dem Arbeitskreis Prof. Proksch, Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Embellicin B hatte sich bereits teilweise zu Embellicin A umgewandelt (Verhältnis 5:1). Messung an einem LC-MS mit ESI.

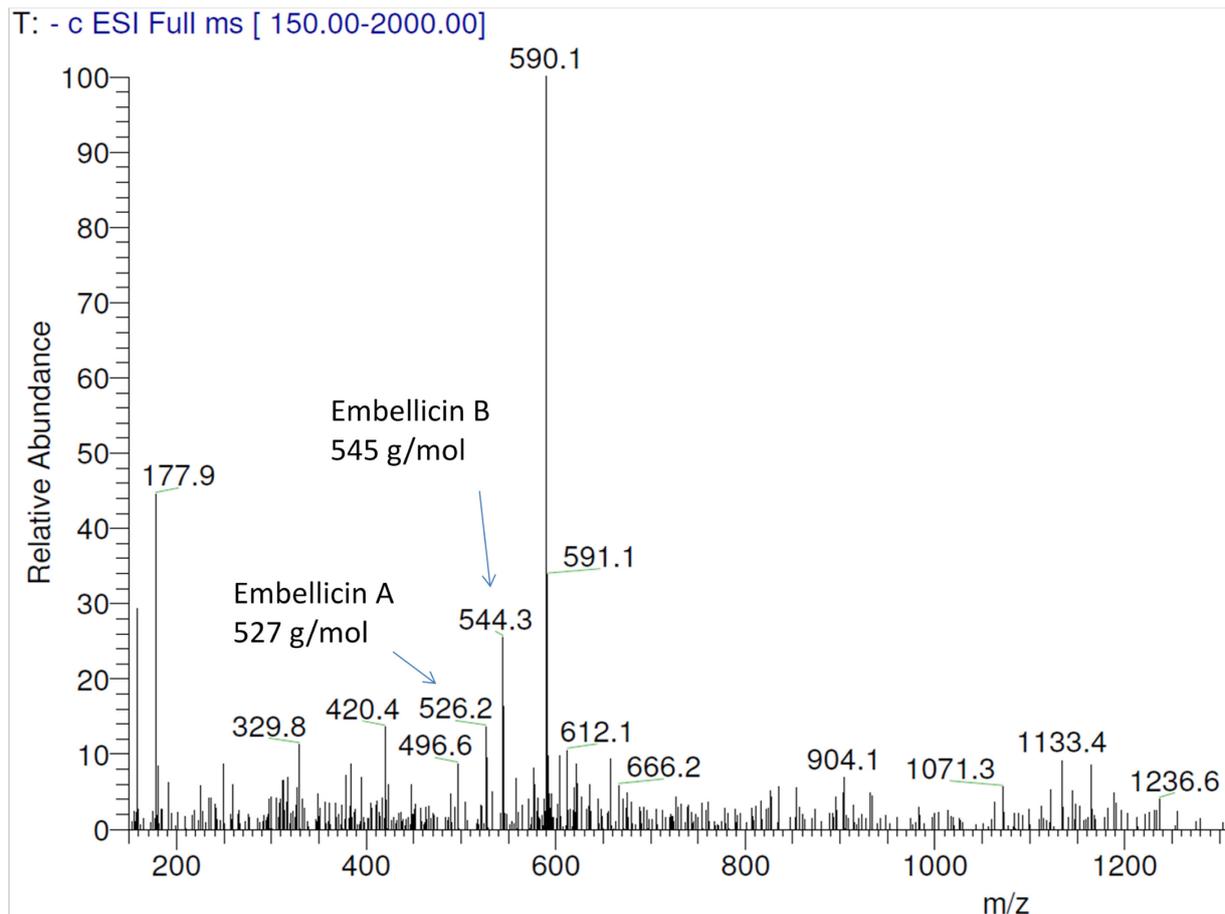
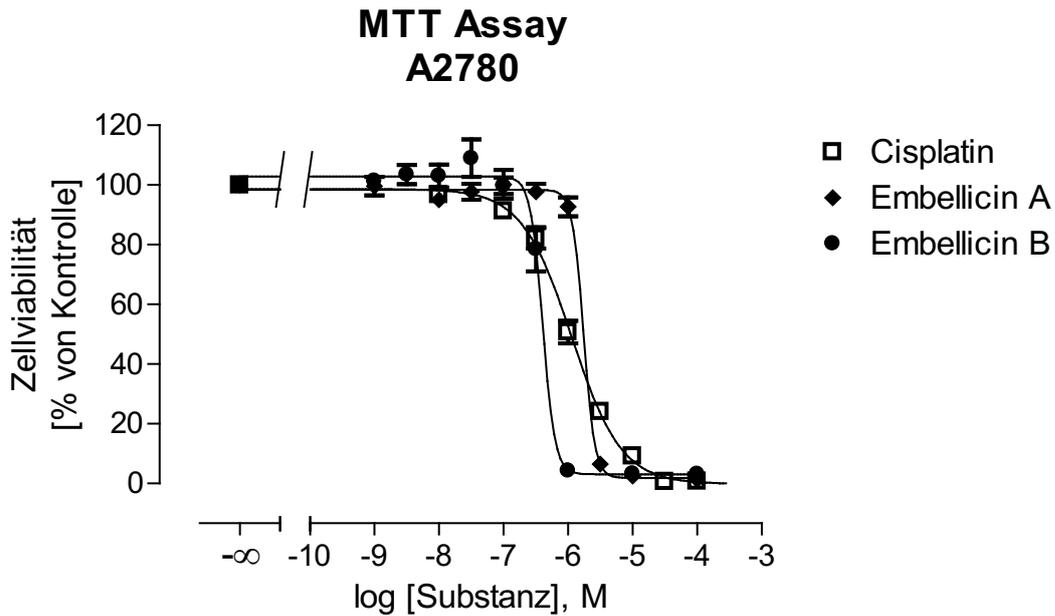


Abbildung 50: Massenspektrum von Embellicin B im Negativ-Modus (aus dem Arbeitskreis Prof. Proksch, Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Der Basispeak entspricht nicht dem reinen Embellicin B. Das Verhältnis von Embellicin B und A ist 2:1. Messung an einem LC-MS mit ESI.

A



B

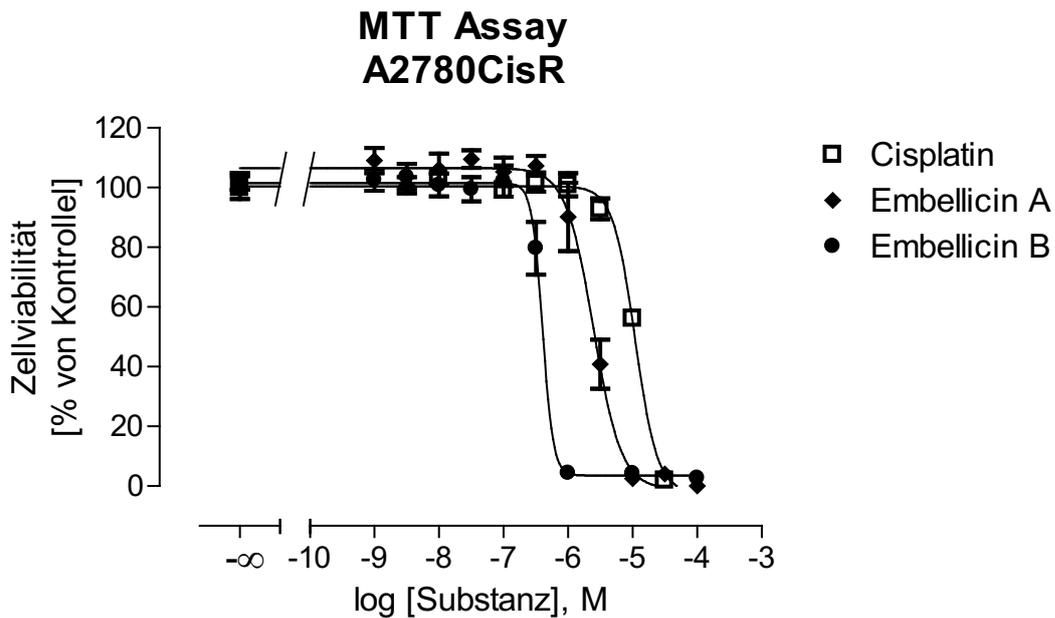


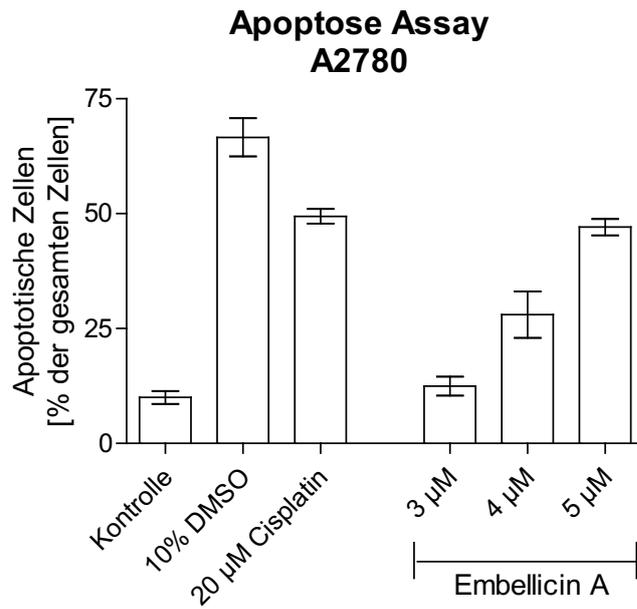
Abbildung 51: Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin, Embellicin A und Embellicin B an A2780 (A) und A2780CisR (B) nach 72 Stunden Inkubationszeit. Embellicin B war äquipotent für die cisplatin-sensitive ($pIC_{50} = 6,39 \pm 0,06$) und -resistente ($pIC_{50} = 6,40 \pm 0,10$) Zelllinie. Embellicin A war nahezu äquipotent für die sensitive ($pIC_{50} = 5,76 \pm 0,04$) und resistente ($pIC_{50} = 5,61 \pm 0,05$) Zelllinie. Cisplatin an A2780: $pIC_{50} = 5,95 \pm 0,03$; Cisplatin an A2780CisR: $pIC_{50} = 4,96 \pm 0,02$). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven nach 72 Stunden Inkubationszeit im MTT Assay an A2780 und A2780CisR zeigten, dass Embellicin A nicht die gleiche Zytotoxizität wie Embellicin B besitzt (Abbildung 51A und B). Die IC_{50} von Embellicin B lag sowohl in A2780 als auch in A2780CisR Zellen bei 0,4 μ M (Tabelle 24). Dagegen lag die IC_{50} von Embellicin A in A2780 bei 1,74 μ M und in A2780CisR bei 2,45 μ M (Tabelle 24). Embellicin A war für die sensitive Zelllinie ähnlich toxisch wie Cisplatin, jedoch sind die pIC_{50} -Werte signifikant verschieden (* $p < 0,05$). Die IC_{50} von Cisplatin betrug 1,12 μ M in A2780. In A2780CisR lag der IC_{50} für Cisplatin bei 11,0 μ M (Tabelle 24). Die Toxizität von Embellicin A und Embellicin B ist unabhängig von der bestehenden Cisplatinresistenz in A2780CisR. Embellicin A ist durch die nah aneinander liegenden IC_{50} -Werte fast äquipotent für das Zellpaar, wogegen Embellicin B äquipotent für das Zellpaar ist.

Tabelle 24: IC_{50} -Werte von Cisplatin, Embellicin A und Embellicin B an A2780 und A2780CisR. Die Werte sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

	IC_{50} [μ M]	
	A2780	A2780CisR
Cisplatin	1,12	11,0
Embellicin A	1,74	2,45
Embellicin B	0,41	0,40

A



B

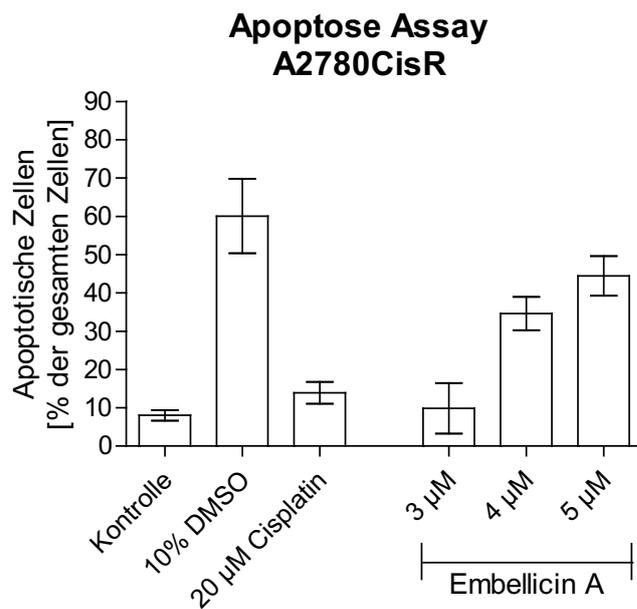


Abbildung 52: Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen (sub-G₁) in A2780 (A) und A2780CisR (B) nach der Behandlung mit Embellicin A für 24 Stunden. Embellicin A induzierte mit der doppelten IC₅₀ (4 µM, gemessen nach 72 Stunden) Apoptose in beiden Zelllinien. Die Fragmentierung der DNA durch 20 µM Cisplatin wurde nur in A2780 und nicht in A2780CisR bestimmt. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert ± Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Die Zellen von A2780 und A2780CisR wurden 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Embellicin A behandelt. Anschließend wurden die Zellkerne mit Propidiumiodid angefärbt und die DNA-Fragmentierung (späte Phase der Apoptose) im Durchflusszytometer analysiert. Embellicin A induzierte in der ungefähr doppelten IC_{50} (gemessen an A2780 Zellen im MTT Assay; $4 \mu\text{M}$) nach 24 Stunden Inkubationszeit Apoptose in A2780 und A2780CisR Zellen (Abbildung 52). Dabei wurde die Fragmentierung der DNA in 28% der A2780 Zellen und in 35% der A2780CisR Zellen beobachtet. Die doppelte IC_{50} von Embellicin A gemessen an A2780CisR ($5 \mu\text{M}$) induzierte 47% Apoptose in A2780 und 44% in A2780CisR Zellen. Im Gegensatz dazu induzierten $20 \mu\text{M}$ Cisplatin (10 bis 20-fache IC_{50} an A2780 gemessen im MTT Assay nach 72 Stunden) nur in A2780 Zellen Apoptose (49%). In A2780CisR wurde die DNA nach 24 Stunden Cisplatin noch nicht fragmentiert. Embellicin A induziert ähnlich wie Embellicin B Apoptose in A2780 und A2780CisR, unabhängig vom Resistenzstatus der Zelllinie (Abbildung 46, Abbildung 52).

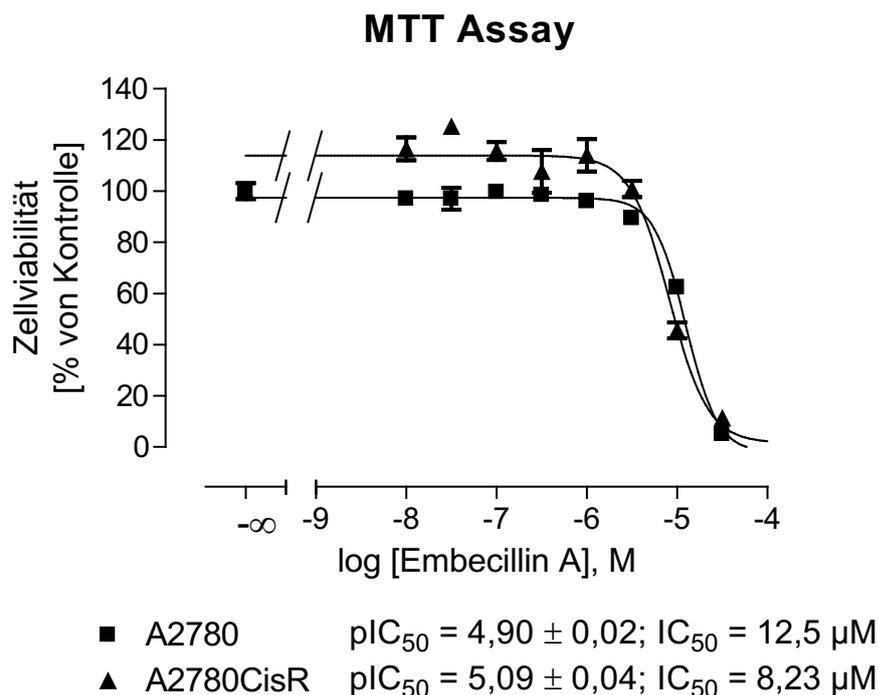
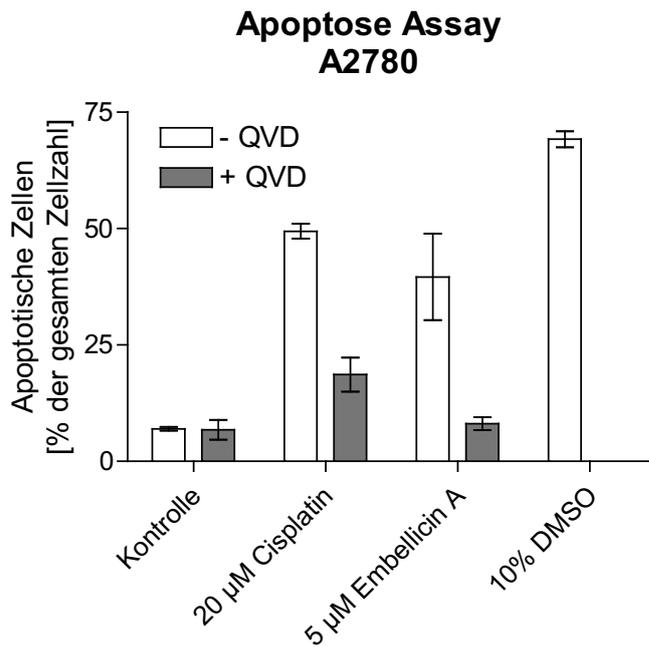


Abbildung 53: Konzentrations-Effekt-Kurve von Embellicin A nach 24 Stunden an A2780 und A2780CisR. Die gezeigten Daten sind aus einem typischen Experiment mit Triplikaten.

Im MTT Assay wurde Embellicin A 24 Stunden an A2780 und A2780CisR gemessen. Das Ergebnis aus dem MTT Assay zeigt, dass Embellicin B bereits nach 24 Stunden ähnlich potent für A2780 und A2780CisR ist (Abbildung 45). Embellicin B war nach 24 Stunden ebenfalls ähnlich toxisch für A2780 und A2780CisR, jedoch war der geringe Unterschied signifikant (Abbildung 53). Die Cisplatinresistenz in A2780CisR wird durch Embellicin A und Embellicin B umgangen. Die Kurve von Embellicin A ist sowohl für A2780 als auch für A2780CisR relativ steil. Eine geringfügige Erhöhung der Konzentration bewirkt bereits ein hohes Zellsterben. Dies wird ebenfalls im Apoptose Assay deutlich (Abbildung 52). Daher wurde für weitere Experimente Embellicin A mit 5 μ M in Anlehnung an den Apoptose Assay verwendet.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Embellicin A-induzierte Apoptose caspaseabhängig ist. Dafür wurden die Zelllinien A2780 und A2780CisR im Apoptose Assay zunächst 1 Stunde mit oder ohne 20 μ M QVD vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden mit 5 μ M Embellicin A inkubiert. Nach der Isolation der Zellkerne wurde der Gehalt an sub-G₁ bestimmt (Abbildung 54). Als Kontrolle wurde die ungefähre IC₅₀ von Cisplatin verwendet, welche an A2780 nach 24 Stunden im MTT Assay ermittelt wurde (Abbildung 38). Embellicin A induzierte 40% Apoptose in der sensitiven A2780 Zelllinie. Die Präinkubation mit QVD reduzierte die DNA-Fragmentierung auf das Niveau der Kontrolle (Abbildung 54A). Cisplatin induzierte in 49% der A2780 Zellen die Fragmentierung der DNA, was durch die Präinkubation mit QVD auf 19% reduziert wurde. In der resistenten A2780CisR Zelllinie wurden 37% der Zellen nach der Behandlung mit Embellicin A apoptotisch. Der Einsatz von QVD führte zu einer vollständigen Inhibition der DNA-Fragmentierung (Abbildung 54B). Cisplatin induzierte in A2780CisR geringfügig Apoptose (14%). Die Präinkubation mit QVD verringerte den Anteil an sub-G₁-Zellen beinahe auf das Kontroll-Niveau. Dies zeigt, dass der Apoptoseweg durch Embellicin A ähnlich wie durch Cisplatin in beiden Zelllinien über die Caspase-Kaskade induziert wird.

A



B

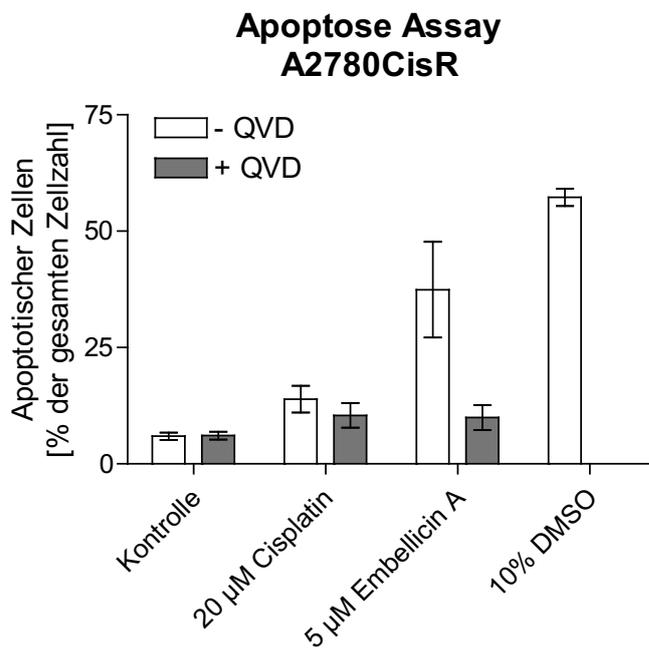
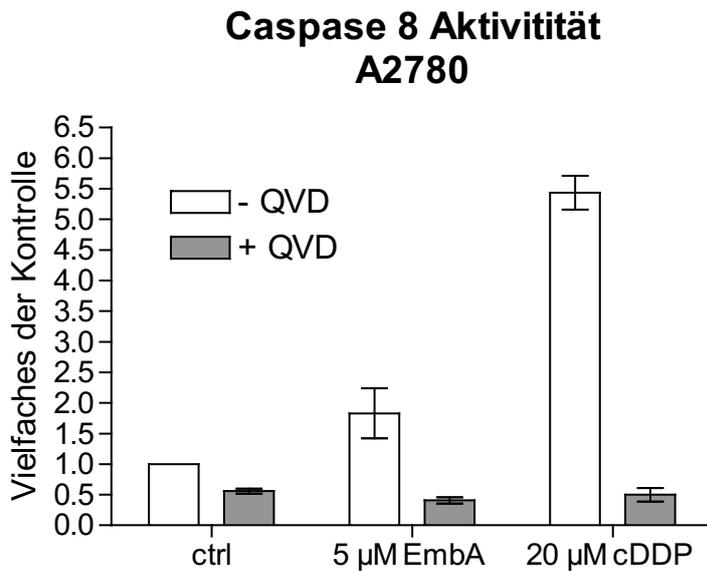


Abbildung 54: Bestimmung der caspaseabhängigen Apoptose (über sub-G₁) in A2780 (A) und A2780CisR (B) Zellen. Die Zellen wurden zunächst 1 Stunde mit oder ohne 20 µM QVD vorbehandelt und anschließend mit 5 µM Embellicin A 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle für die Induktion der DNA Fragmentierung wurden DMSO und 20 µM Cisplatin eingesetzt. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert ± Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Als nächstes wurde ermittelt, welche Caspase durch Embellicin A aktiviert wird. Dafür wurden beide Zelllinien im Caspase Assay 24 Stunden mit 5 μM Embellicin A behandelt. Als Kontrolle zur Induktion der Caspaseaktivität wurde Cisplatin in der ungefähren IC_{50} , die nach 24 Stunden bestimmt wurde, für die jeweilige Zelllinie eingesetzt (20 μM für die A2780 und 50 μM für die A2780CisR Zelllinie, Abbildung 38). Um die Aktivität der Caspasen zu inhibieren, wurden die Zellen mit 20 μM QVD eine Stunde vorbehandelt. In A2780 wurden durch Cisplatin die Aktivitäten sowohl von Caspase 8 als auch von Caspase 9 um das 5-fache im Vergleich zu den unbehandelten Proben erhöht. Embellicin A induzierte ebenfalls eine gleichmäßige Aktivierung der beiden Enzyme. Die Aktivität der Caspase 8 wurde um den Faktor 1,8 und die der Caspase 9 um den Faktor 1,7 in A2780 erhöht. Die Vorbehandlung mit QVD inhibierte die Aktivität der beiden Caspasen in allen Proben vollständig (Abbildung 55). Dies zeigte, dass Embellicin A ähnlich wie Cisplatin in der sensitiven Zelllinie sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptose Weg reguliert. In der cisplatinresistenten Zelllinie wurden durch Cisplatin beide Caspasen aktiviert. Die Aktivität von Caspase 8 wurde um das 3-fache und von Caspase 9 um den Faktor 4,7 erhöht. Embellicin A induzierte in A2780CisR ebenfalls beide Kaskaden. Die Messung der Biolumineszenz zeigte, dass Caspase 8 wie in der sensitiven Zelllinie um den Faktor 1,8 aktiviert wurde. Die Aktivität von Caspase 9 wurde um den Faktor 2,3 gesteigert. Die Vorbehandlung mit QVD inhibierte ebenfalls beide Caspasen in A2780CisR Zellen (Abbildung 56). Beide Apoptosewege werden durch Embellicin A in den Zelllinien A2780 und A2780CisR induziert.

A



B

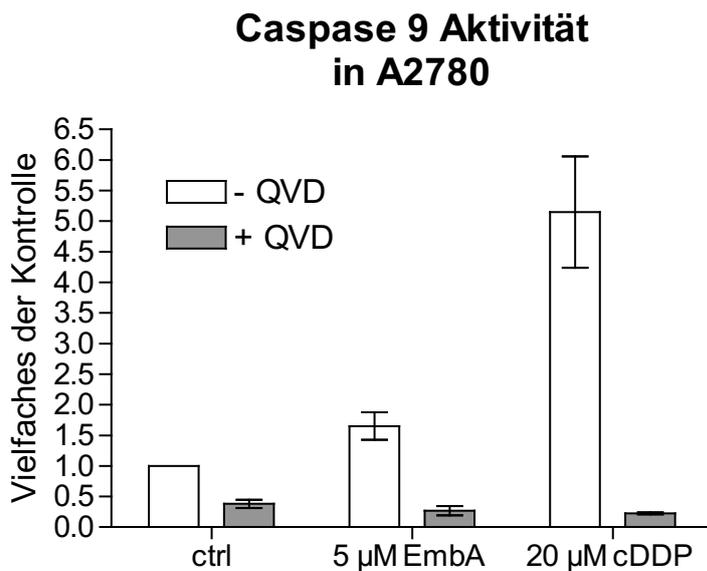
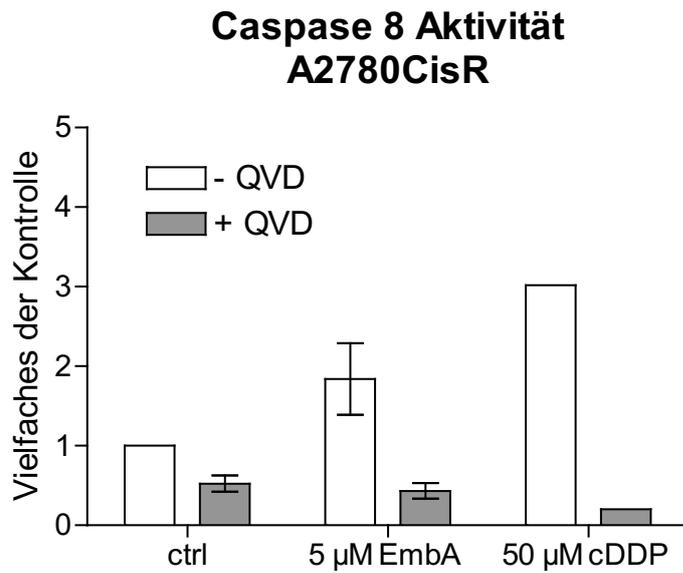


Abbildung 55: Aktivitätsmessung von Caspase 8 (A) und Caspase 9 (B) in A2780 Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 5 µM Embellicin A (EmbA) oder 20 µM Cisplatin (cDDP) behandelt. Die Enzym-Aktivität wurde 1 Stunde nach Substratzugabe gemessen. Die Aktivität der Caspasen wurde durch 20 µM QVD inhibiert. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

A



B

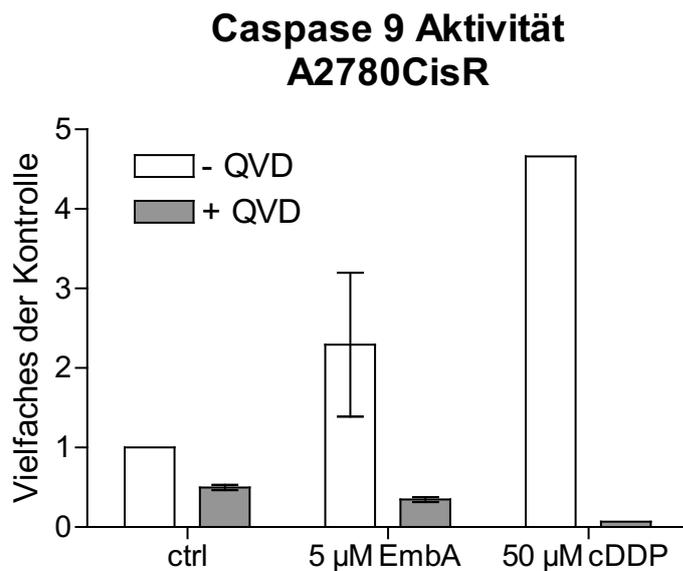


Abbildung 56: Aktivitätsmessung von Caspase 8 (A) und Caspase 9 (B) in A2780CisR Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 5 µM Embellicin A (EmbA) oder 50 µM Cisplatin (cDDP) behandelt. Die Enzym-Aktivität wurde 1 Stunde nach Substratzugabe gemessen. Die Aktivität der Caspasen wurde durch 20 µM QVD inhibiert. Die gezeigten Daten sind der Mittelwert \pm Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Konzentration 50 µM von Cisplatin wurde einmal vermessen.

7 Diskussion

7.1 Inhibition der Resistenzentwicklung von Cisplatin durch Ellagsäure und Resveratrol

Jährlich erkranken weltweit Patientinnen an Ovarialkarzinomen, welche über 4% aller Krebserkrankungen ausmachen. Ungefähr $\frac{2}{3}$ der Patientinnen in den USA erliegt der Krankheit [2]. Derzeit stehen operative Eingriffe gefolgt von platin/taxanhaltiger Chemotherapie als Behandlungsmöglichkeit zur Verfügung. In vielen Fällen jedoch erleiden die Patientinnen einen Rückfall und die Krebszellen haben eine „multidrug“ Resistenz entwickelt [2] [239] [240]. Es wird nach Modulatoren gesucht, die dabei helfen, die Bildung von Ovarialkarzinomen zu verhindern oder Chemoresistenz aufzuheben [170] [187] [241]. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen mit Ellagsäure oder Resveratrol ergaben, dass diese Naturstoffe effektiv gegen die Bildung von malignen Zellen sind und bei der Behandlung von Krebszellen unterstützen [170] [242].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dynamik der Entwicklung der Cisplatinresistenz an der epithelialen Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780 mit permanenter Anwesenheit der Naturstoffe Resveratrol bzw. Ellagsäure über 26 Wochen untersucht. Die Durchführung erfolgte ähnlich wie die Cisplatin-Behandlung in der Klinik intermittierend. Die Zellen wurden wöchentlich mit Cisplatin behandelt [22] [53]. Die 48-stündige Präinkubation von Resveratrol oder Ellagsäure erhöhte die Zytotoxizität von Cisplatin um den Faktor 3,1 bzw. 2,4 an A2780 (Tabelle 16). Ein ähnliches Ergebnis zeigten Nessa et al. mit Resveratrol an A2780 Zellen [195]. Die kurzzeitige Präinkubation von 2 Stunden mit Resveratrol erhöhte die Zytotoxizität von Cisplatin in A2780 Zellen um den Faktor 3,6 und in den cisplatinresistenten A2780^{cisR} Zellen um den Faktor 2,5 [195]. Im Gegensatz zu den Effekten an der sensitiven A2780 hatte in dieser Arbeit die 48-stündige Präinkubation von Resveratrol oder Ellagsäure vor der Zugabe von Cisplatin an A2780CisR keinen signifikanten sensitivierenden Effekt (Tabelle 16). Dies deutet darauf hin, dass eine Behandlung mit Resveratrol bzw. Ellagsäure eine voll ausgebildete Cisplatinresistenz in A2780CisR nicht revertieren kann. Nach der dauerhaften 6-monatigen Behandlung mit Ellagsäure oder Resveratrol von A2780CisR wurde ebenfalls

keine Revertierung der Cisplatinresistenz beobachtet, wie in A2780CisR+Ellag bzw. A2780CisR+Resv zu sehen ist (Tabelle 16). Obwohl Resveratrol und Ellagsäure die Proliferation in A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag im Vergleich zu A2780CisR signifikant reduzierten (Abbildung 24A), blieb die Cisplatinresistenz erhalten. Diese Zelllinien (A2780CisR+Ellag bzw. A2780CisR+Resv) zeigten allerdings verglichen mit A2780CisR ein signifikant reduziertes Migrationspotential (Abbildung 24B), das mit der reduzierten Proliferationsrate oder mit der reduzierten Aktivierung der EGF-Rezeptoren (Abbildung 28) zusammenhängen kann. Ein signifikant verringertes Migrationspotential wurde auch in A2780Resv und A2780Ellag beobachtet (Abbildung 24B), obwohl diese Zelllinien eine leicht höhere Proliferationsrate als ihre Ausgangszelllinie A2780 aufwiesen (Abbildung 24A). Ferry-Dumazet et al. beschreiben, dass Resveratrol die Proliferation in normalen und in Leukämiezellen inhibiert [192]. Dieser Effekt wurde ebenfalls für Ellagsäure in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 und der kolorektalen Karzinom-Zelllinie Caco-2 beschrieben [243]. Eine reduzierte Proliferation und Migration der Krebszellen könnte für den Patienten von Vorteil sein. Die Hemmung dieser Krebseigenschaften könnte dem Patienten mehr Zeit einräumen, um die Krankheit erfolgreich zu behandeln. Wenn die Migration inhibiert wird, kann das Risiko zur Metastasierung der Krebszellen gesenkt sein [244].

Die Hyperaktivierung proliferationsfördernder Rezeptoren steht in Verbindung mit Cisplatinresistenz oder einer regelmäßigen Cisplatinbehandlung. Diese Rezeptoren können ein Target zur Behandlung von Krebszellen sein. Dazu gehören die Rezeptoren der EGFR-Familie (EGFR, ErbB2, ErbB3) sowie der IGF-Rezeptor als auch die Kinasen ERK1/2 [22] [133] [245] [92] [246] [67] [247]. Krebszellen, die den VEGFR überexprimieren, werden mit einer Kombination aus platinhaltigen Zytostatika, wie Cisplatin, und Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Sunitinib, behandelt [248]. In dieser Arbeit wurde die Hyperaktivierung von ERK1/2 (Abbildung 27) und von den Rezeptoren EGFR, ErbB2 und ErbB3 (Abbildung 28) in den resistenten A2780CisR im Vergleich zu den sensitiven A2780 Zellen beobachtet. ERK1/2 ist für die Migration von Krebszellen, beispielsweise von Blasenkrebszellen (5637), verantwortlich [89] [247]. Die Behandlung mit Ellagsäure und Resveratrol führte zur Inhibition der Phosphorylierung sowohl von ERK1/2 als auch von ErbB2 und ErbB3 in den resistenten Zellen (A2780CisR+Ellag und A2780CisR+Resv) und in den regelmäßig mit Cisplatin behandelten Zelllinien A2780Resv und A2780Ellag. Die Naturstoffe könnten

entweder als Liganden für die EGF-Rezeptoren interagieren oder indirekt den Signalweg inhibieren.

Die Inaktivierung von ErbB3 führt in verschiedenen Zelllinien zur Apoptose [134]. Darunter zählt auch das Zellpaar A2780S (cisplatin sensitiv) und A2780/CP70R (cisplatin resistent) [133]. Die alleinige Inaktivierung der EGF-Rezeptoren und von ERK1/2 reicht allerdings nicht aus, um die Cisplatinresistenz in A2780CisR zu revertieren. Dies zeigen die Zelllinien A2780CisR+Resv und A2780CisR+Ellag, in denen nach der permanenten Anwesenheit von Ellagsäure oder Resveratrol die Phosphorylierung von ERK1/2, ErbB2 und ErbB3 reduziert wurde (Abbildung 27, Abbildung 28), die aber immer noch cisplatin resistent wie A2780CisR sind (Tabelle 16). In einer Kooperationsarbeit mit Niels Eckstein wurde gezeigt, dass der IGF-1R in A2780CisR stärker phosphoryliert vorliegt als in A2780 [22] und dies maßgeblich zur Cisplatinresistenz beiträgt. Dies zeigt, dass mehrere Faktoren die Cisplatinresistenz in dieser Zelllinie verursachen.

Die Zelllinien A2780Resv und A2780Ellag reagieren ähnlich auf Cisplatin wie die sensitive Zelllinie A2780 (Tabelle 16). Nach der Behandlung mit der gleichen Konzentration an Cisplatin (10 μ M, 24 Stunden) verharren ähnlich viele Zellen von A2780Resv und A2780Ellag in der S-Phase wie von A2780. Dagegen arretieren in der A2780CisR Zelllinie weniger Zellen in der S-Phase (Abbildung 26). Nach 48 Stunden Cisplatin (10 μ M) waren in A2780Resv und A2780Ellag ähnlich viele Zellen apoptotisch wie in A2780 (Abbildung 25). Allerdings war die Verteilung der Zellen in Früh- und Spätapoptose unterschiedlich. Nach der oben genannten Inkubationszeit waren die meisten apoptotischen Zellen von A2780 im frühen Stadium der Apoptose. Dagegen befand sich ungefähr die Hälfte der apoptotischen Zellen von A2780Resv bzw. A2780Ellag bereits in der späten Phase der Apoptose. Dies zeigt, dass die IC_{50} von Cisplatin in den Zellen von A2780Ellag und A2780Resv nicht nur ähnlich ist wie in den Zellen von A2780, sondern dass die Zellen von A2780Resv und A2780Ellag schneller die Phasen der Apoptose durchlaufen als ihre Ausgangszelllinie. Das schnellere Sterben der Zellen könnte das Risiko mindern, dass in den Krebszellen Mutationen auftreten oder sich Signalwege ändern, die die Entwicklung von Resistenz begünstigen. Die permanente Anwesenheit von Ellagsäure oder Resveratrol während den regelmäßigen Cisplatinbehandlungen von A2780 über 26 Wochen inhibierte die Entwicklung der Cisplatinresistenz (Shiftfaktor: 1,2 und 1,1; Tabelle 16), die sich in Abwesenheit der Naturstoffe wie bei A2780CisR mit einem Resistenzfaktor von 6,2 ausgebildet hätte (Abbildung 23B, Tabelle 16).

Die kurzzeitige Behandlung von A2780 Zellen mit Ellagsäure oder Resveratrol hatte unterschiedliche Effekte auf den intrazellulären Gehalt von ROS (Abbildung 22). Während Ellagsäure den Spiegel von ROS nach Induktion mit Wasserstoffperoxid oder Cisplatin herabsetzt, fördert die alleinige Zugabe von Resveratrol oder in Kombination mit Wasserstoffperoxid bzw. Cisplatin die Bildung von ROS. Die dauerhafte Kultivierung der Zellen mit den Naturstoffen führte in beiden Fällen zu einem signifikanten Rückgang des basalen Spiegels an ROS (Abbildung 23C). Im Falle von A2780Resv wurde die Bildung von ROS beinahe komplett inhibiert. Weder Wasserstoffperoxid noch Cisplatin konnten in A2780Resv ROS induzieren. Ähnlich verhielt es sich in A2780Ellag. Der basale Level von ROS in A2780Ellag war zwar höher als in A2780Resv, jedoch niedriger als in A2780 (Abbildung 23C). Glutathion kann mit Cisplatin reagieren und das Zytostatikum unwirksam machen, bevor dieses seinen Bestimmungsort erreicht hat [67]. Der niedrige Gehalt von ROS in A2780Resv und A2780Ellag könnte aus einer erhöhten Synthese von Glutathion resultieren. *In vivo* Studien ergaben, dass Alkohol den Gehalt an Glutathion senkt [167]. Der zusätzliche Applikation von Ellagsäure steigerte den Gehalt von Glutathion wieder [167]. Die permanente Anwesenheit von Resveratrol oder Ellagsäure könnte daher ein dauerhaft gesteigertes Level an Glutathion verursachen. Die Chemosensitivität in A2780 Zellen ist nicht unmittelbar mit der Steigerung von ROS nach der Cisplatinbehandlung verbunden. Schließlich haben die Zelllinien A2780Ellag und A2780Resv einen ähnlichen cisplatin sensitiven Phänotyp wie A2780, jedoch einen signifikant niedrigeren basalen ROS-Spiegel als A2780.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die permanente Anwesenheit von Resveratrol oder Ellagsäure in nicht-toxischen Konzentrationen die Entwicklung der Cisplatinresistenz in der Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780 inhibiert. Jedoch können diese Naturstoffe eine voll ausgebildete Resistenz, wie sie in A2780CisR vorliegt, nicht revertieren, obwohl die Zellproliferation und Migration reduziert wurde.

7.2 Überwindung der Cisplatinresistenz durch Inhibition der Glykolyse

Für den Energiebedarf ist die Glykolyse eine wichtige Komponente in den Karzinomen. Um den hohen Energiebedarf zu decken, kann die Aufnahme von Glucose im Vergleich zu gesunden Zellen erhöht sein [249]. In der Glykolyse wird die Glucose über mehrere Schritte zu Pyruvat umgewandelt. Dabei spielt PGK1 eine wichtige Rolle. Das Enzym katalysiert die Umwandlung von 1,3-Diphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat unter Bildung von einem Molekül ATP [97] [250] [251]. Das Endprodukt der Glykolyse, das Pyruvat, wird entweder zu Laktat oder zu Acetyl-CoA umgewandelt. Das Acetyl-CoA wird in der Atmungskette zur weiteren Energiegewinnung unter Sauerstoffverbrauch weiter verwendet. In Krebszellen wird ein signifikanter Teil des gebildeten Pyruvats zu Laktat reduziert, wenn die Atmungskette geschädigt ist. Dieses Phänomen beschreibt der Warburg Effekt [252] [253]. Eine erhöhte Glykolyseaktivität kann mit der Bildung von resistenten Phänotypen korrelieren [254]. Unter Verbrauch von ATP transferieren ATP-Transporter z.B. auch Zytostatika aus einer Krebszelle heraus [255] [256].

Verschiedene Zelllinien entwickeln eine „multidrug“ Resistenz, die auf der Überexpression von PGK1 beruht. Darunter zählen die Ovarialkarzinomzelllinien SW626 und IGROV1, die humane osteogene Sarcomazelllinie U-2OS und die humane Magenadenokarzinomzelllinie MKN45 [102] [117] [257]. Eine veränderte PGK1-Expression wurde in Astrozytomen nach Strahlentherapie beobachtet [258]. In strahlenresistenten Astrozytomen wurde die PGK1 Expression im Vergleich zu den sensitiven Zellen hochreguliert [258]. Eine hypoxische Umgebung verursacht eine erhöhte Aufnahme von Glucose und eine verstärkte Aktivität von glykolytischen Enzymen [259]. HIF-1 α fördert die Expression von PGK1 [259]. Neben der Energiegewinnung durch die Glykolyse reguliert PGK1 ebenfalls verschiedene Signalwege. Eine erhöhte Expression von PGK1 korreliert mit der Reduktion des VEGF und der Interleukine 6 und 8 [106]. Die Daten des Kaplan-Meier-Plots zeigen, dass es einen signifikanten Unterschied in der Überlebenserwartung in Abhängigkeit vom Expressionslevel von PGK1 in Mammakarzinomen gibt (Abbildung 29) [232]. In den Brustkrebssubtypen Luminal A, Luminal B und TNBC sinkt die Wahrscheinlichkeit, länger mit der Krankheit zu leben, wenn PGK1 überexprimiert wird (Abbildung 29, Tabelle 17). Patientinnen mit TNBC haben zudem ein erhöhtes Risiko, dass die Krankheit erneut auftritt, wenn PGK1 überexprimiert wird („relapse-free survival“ HR = 1,84 (1,41 – 2,4); logrank P = 5,5 • 10⁻⁶)

[232]. PGK1 könnte deshalb ein potentielles Target für verschiedene Zelltypen sein, auch für chemo- oder strahlenresistente Krebsarten.

In der cisplatinresistenten TNBC-Zelllinie MDA-MB-231CisR wurde eine verstärkte Proteinexpression von PGK1 im Vergleich zu deren Ausgangszelllinie MDA-MB-231 beobachtet (Abbildung 30). Dies wurde auf Transkriptionsebene durch qPCR Analyse bestätigt (Abbildung 34). In der Luminal A-Zelllinie T-47DCisR war die Expression von PGK1 verglichen zur Ausgangszelllinie T-47D nur moderat erhöht. Die Expression von PGK1 wurde durch den Einsatz von shRNA herunter reguliert und der daraus resultierende Effekt näher untersucht. Beide Zellpaare wurden nach der Transfektion von shRNA sensitiver gegenüber Cisplatin (Tabelle 18). Die Hemmung der Proliferation von Krebszellen eines Magenkarzinoms wurde nach der Reduzierung der PGK1-Expression in verschiedenen Veröffentlichungen bereits beschrieben [104] [105] [257]. In chemoresistenten Ovarialkarzinom-Zelllinien konnte eine Erhöhung der Zytotoxizität von Cisplatin nach der Transfektion von siRNA, die gegen PGK1 gerichtet ist, beobachtet werden [117]. Zudem reduziert transfizierte shRNA das invasive und disseminierte Verhalten von Magenadenokarzinomzellen mit Stammzell-Eigenschaften *in vitro* und das Zellwachstum *in vivo* [257]. Neben der direkten Inhibition der PGK1-Expression durch shRNA wurde die Inhibition der Glykolyse durch den Einsatz von 3-BrPy untersucht (Abbildung 32, Tabelle 19, Tabelle 20). 3-BrPy inhibiert die Hexokinase, welche am Anfang der Glykolyse agiert, und vermindert so die ATP-Produktion [114]. Eine 48-stündige Präinkubation von 3-BrPy führte ebenfalls wie der shRNA Knock-down von PGK1 zur Sensitivierung der MDA-MB-231 Zelllinie und der resistenten MDA-MB-231CisR Zelllinie gegenüber Cisplatin (Tabelle 20). Eine kurzzeitige Inkubation (6 Stunden) der Zellen mit 7,5 mM 3-BrPy reduzierte den Gehalt an ATP beinahe vollständig (Abbildung 37). Jedoch war es möglich, die Zellen über einen längeren Zeitraum (5 Tage) im MTT Assay mit dieser Konzentration von 3-BrPy zu behandeln, ohne ein vollständiges Zellsterben zu beobachten (Abbildung 35). Es scheint in den Zellen bei der 5-tägigen Behandlung mit 3-BrPy eine Gegenregulation zu geben, die die ATP-Produktion sicherstellt. Eventuell könnte die Aktivität der Atmungskette hochreguliert werden oder die β -Oxidation gesteigert werden. Die β -Oxidation liefert Acetyl-CoA, das in der Atmungskette verbraucht werden kann [260]. PGK1 scheint eine wichtige Rolle in den Triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien zu spielen. Obwohl nach der Transfektion der shRNA die Expression von PGK1 reduziert und die Cisplatinsensitivität gesteigert wurde, wurde in den

MDA-MB-231 Zellen kein geringerer ATP-Gehalt im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bestimmt (Abbildung 37). Da PGK1 nach der transienten Transfektion nicht vollständig inhibiert wurde, sondern nur herunter reguliert wurde, ist eine Restaktivität vorhanden. Neben PGK1 produziert in der Glykolyse ein weiteres Enzym ATP, die Pyruvatkinase [97]. Das Enzym katalysiert den Abbau von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat unter Bildung von ATP [97]. Eine Hyperaktivierung der Pyruvatkinase könnte in dem Fall eventuell das nötige ATP produzieren. Die Steigerung der Aktivität der Atmungskette könnte ebenfalls eine Möglichkeit sein.

Die Zellen der MDA-MB-231 und MDA-MB-231CisR Zelllinie benötigen einen hohen Glucosegehalt (4,5 g/l) in ihrem Wachstumsmedium. Um die Aufnahme von Glucose zu reduzieren und somit die Aktivität der Glykolyse zu verringern, wurden die Zellen in Nährmedium mit einem geringen Glucosegehalt (1 g/l) kultiviert. Statt der erwarteten Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit war eine höhere Cisplatinkonzentration nötig, um die Zellviabilität zu senken (Tabelle 21). Die Zellproliferation wurde durch das modifizierte Medium herabgesetzt (Abbildung 36). Da die Wirksamkeit von Cisplatin stärker gegenüber schnell proliferierenden Zellen ist, wurde die Wirkung von Cisplatin vermutlich durch das stark verlangsamte Zellwachstum vermindert. Durch das modifizierte Medium wurden die Zellen aber sensibler gegenüber Metformin (Tabelle 21, Abbildung 36). Metformin inhibiert den Komplex I in der Atmungskette und verhindert den Elektronentransport [121]. Aus der Glykolyse wird wegen des verminderten Glucosegehalts im Medium weniger Pyruvat und somit weniger Acetyl-CoA für die Atmungskette zur Verfügung gestellt. Die geringere Aktivität der Atmungskette könnte nun effektiver durch Metformin inhibiert werden.

Die mRNA- und Proteinexpression von PGK1 wurde nach der transienten Transfektion der shRNA in T-47D und T-47DCisR Zellen nicht signifikant gesenkt (Abbildung 33, Abbildung 34). Die Präinkubation der Zellen mit 3-BrPy führte zu keiner Sensitivierung der Zellen gegenüber Cisplatin (Abbildung 35). Das basale Expressionslevel von PGK1 war in den T-47DCisR Zelllinie wesentlich geringer als in der MDA-MB-231CisR Zelllinie. Die signifikante Erhöhung der Sensitivität der Zellen für Cisplatin nach der transienten Transfektion steht wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der PGK1-Expression, sondern eher mit dem bei der transienten Transfektion verursachten unspezifischen zellulären Stress. Diese Zelllinien exprimieren den ER. Daher würden Patientinnen mit ER+ Karzinomen eine Therapie erhalten, die einen ER-Inhibitor mit einbezieht.

Das Enzym PGK1 kann ein wichtiges Zielprotein sein, um die Chemoresistenz in verschiedenen Karzinomzellen zu behandeln. Die Inhibition der Überexpression von PGK1 reduziert die Zellproliferation und erhöht die Sensitivität der Zellen gegenüber Zytostatika laut Literatur in verschiedenen Magen- und Ovarialkarzinomen [102] [117] [257]. In der Literatur wird beschrieben, dass Patientinnen eine kürzere Überlebenschance haben, wenn im Mammakarzinom PGK1 überexprimiert wird [261]. Zudem wird die Überexpression von PGK1 mit der Chemoresistenz von Paclitaxel in jeglichen Mammakarzinomtypen in Zusammenhang gebracht [261]. Eine verminderte PGK1 Expression erhöht die Überlebenschance der Patientinnen und unterstützt die Paclitaxel-Therapie [261]. Die Suppression von PGK1 erhöhte die Sensitivität der Zellen der in dieser Arbeit verwendeten TNBC-Zelllinien gegenüber Cisplatin. Insbesondere in Karzinomen, wie den Triple-negativen Mammakarzinomen, die für endokrine Therapien keine Angriffsfläche bieten, könnte PGK1 ein interessantes Target sein.

7.3 Induktion von Apoptose an cisplatinsensitiven und –resistenten Zellpaaren durch Phomoxanthon A, Embellicin A und Embellicin B

Die Bildung von Resistenzen in Krebszellen erschwert die Anwendung möglicher Therapien und hat schlechte Folgen für den Patienten. Neue Therapieansätze sind notwendig, um Resistenzen überwinden zu können und um Nebenwirkungen, die die Lebensqualität des Patienten verschlechtern, zu minimieren. Neben synthetisch hergestellten Substanzen können auch Naturstoffe, die wichtige Zielproteine in den Krebszellen angreifen, effektiv eingesetzt werden [198]. Verschiedene Naturstoffe werden bereits *in vitro* an verschiedenen Krebszelllinien untersucht [262] [263].

Metabolite aus endophytischen Fungi zeigen großes Potenzial für verschiedene Felder der Medizin. So können sie neben antibiotischen Effekten auch toxische Wirkung auf Krebszellen haben [213] [152]. Das Tetrahydroxanthenon-Dimer Phomoxanthon A wurde aus dem endophytischen Fungus *Phomopsis longicolla* isoliert. An verschiedenen Karzinomzelllinien zeigte der Naturstoff eine hohe Zytotoxizität [153]. Bei der Untersuchung der Substanz an den Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und T-47D, der Zungenkarzinom-Zelllinie Cal27, der Ösophaguskarzinom-Zelllinie Kyse510 und ihren cisplatinresistenten Subklonen

(CisR) zeigte Phomoxanthon A eine äquipotente Toxizität innerhalb der Zellpaare (Tabelle 22). Phomoxanthon A umgeht somit die Cisplatinresistenz der genannten Zelllinien. An A2780CisR ist Phomoxanthon A ebenfalls potenter als Cisplatin. Allerdings ist die Toxizität von Phomoxanthon A innerhalb des Zellpaares A2780 und A2780CisR um den Faktor 2 verschieden. Die Zellen aller Krebszelllinien reagierten sensitiver auf den Naturstoff als auf Cisplatin. An der gutartigen Zelllinie HEK293 waren die pIC_{50} -Werte von Phomoxanthon A und Cisplatin identisch. Demnach ist bei Phomoxanthon A ein gewisser Selektivitätsvorteil zwischen gut- und bösartigen Zelltypen gegeben. Während die IC_{50} von Cisplatin in A2780 Zellen nach 6 Stunden Doppelstrangbrüche verursacht, bleibt die DNA durch die IC_{50} von Phomoxanthon A in dieser Zeit unbeschadet (Abbildung 41). In A2780 Zellen liegt der Tumorsuppressor p53 als Wildtyp vor. In der cisplatinresistenten Zelllinie A2780/CP70 wird der Wildtyp gebildet, jedoch ist das Protein, wahrscheinlich durch eine fehlerhafte Konformation, funktionslos [26]. Der Status von p53 in der hier verwendeten A2780CisR ist unklar. Das Protein könnte nach den regelmäßigen Cisplatinbehandlungen [22] ähnlich wie in der Literatur [26] funktionslos sein. Durch die Schädigung der DNA durch Cisplatin wird p53 aktiviert und somit die Apoptose eingeleitet, was in A2780CisR erst in höheren Konzentrationen erfolgt. Der Apoptose Proteom Profiler zeigt, dass in der unbehandelten A2780CisR p53 an S392 um 36% weniger stark phosphoryliert ist als in der unbehandelten A2780 (Abbildung 42). Während Cisplatin erst in hohen Konzentrationen (20 μ M) in A2780 nach einigen Stunden Apoptose auslöst, kann bereits mit niedrigen Konzentrationen (5 μ M) von Phomoxanthon A in A2780 und A2780CisR Apoptose beobachtet werden (Abbildung 40A). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass der Naturstoff die Induktion von Apoptose anders reguliert als Cisplatin. Cisplatin hat unterschiedliche Effekte auf den Zellzyklus [67]. Einige der Zellen arretieren nach der Behandlung mit Cisplatin in der S-Phase, wogegen andere Zellen in der G_2/M -Phase arretieren [67]. In HeLa Zellen, in denen Chk1 (Checkpoint Kinase-1) aktiviert ist, induziert Cisplatin den Zellzyklusarrest in der S-Phase. Dagegen arretieren HeLa Zellen, in denen Chk1 fehlt, in der G_2/M -Phase [68]. Durch Phomoxanthon A arretieren die A2780 und A2780CisR Zellen bereits in der G_1 -Phase (Abbildung 39). In dieser Phase interagieren die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 mit verschiedenen Cyclinen und ergänzen Zytoplasma und Organellen zur Vorbereitung der DNA-Synthese [66] [264] [265]. Der CDK2-Cyclin E-Komplex ist essentiell für den Übergang von der G_1 - in die S-Phase. Die Komplexbildung wird durch die Aktivierung des Ras/ERK-Signalweges gefördert.

Das aktivierte ERK reguliert neben der Komplexierung von CDK4 mit Cyclin D auch die Aktivierung von p27. Das aktivierte p27 bindet an den CDK2-Cyclin E-Komplex, was den Übergang in die nächste Phase fördert [66] [266]. Phomoxanthon A könnte entweder mit dem Ras/ERK-Signalweg interagieren oder direkt die Komplexierung von CDK mit den Cyclinen inhibieren. Da der Zellzyklusarrest von der Zelle nicht revertiert werden kann, leitet die Zelle Apoptose ein. Die Zellen wurden mit dem unspezifischen Caspaseinhibitor QVD behandelt, bevor Phomoxanthon A zugegeben wurde (Abbildung 40A). Die durch Phomoxanthon A induzierte DNA-Fragmentierung wurde durch QVD unterbunden. Dies bedeutet, dass durch Phomoxanthon A Caspasen aktiviert werden, welche die Apoptose induzieren. Entweder ist die Apoptose eine direkte Folge aus dem Zellzyklusarrest oder Phomoxanthon A kann zusätzlich durch einen anderen Weg Apoptose induzieren. Cisplatin induziert in A2780 und A2780CisR die Apoptose über Caspase 8 und Caspase 9, also den extrinsischen und intrinsischen Weg (Abbildung 40B und C). Phomoxanthon A induzierte sowohl die Aktivität der Caspase 8 als auch die der Caspase 9 in der sensitiven A2780 Zelllinie, wobei die Aktivitäten der beiden Enzymen gleich war (Abbildung 40B und C). Somit induziert Phomoxanthon A sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptoseweg. In A2780CisR Zellen werden ebenfalls beide Caspasen durch Phomoxanthon A aktiviert. Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied in den Aktivitäten bestimmt (Abbildung 40B und C).

Der Array mit den apoptoserelevanten Proteinen zeigte, dass in allen Proben eine starke Expression der inaktiven pro-Caspase 3 vorlag (Abbildung 42). In den unbehandelten Zellen wurden schwache Spots bei der aktiven Caspase 3 (cleaved) beobachtet. Diese Spots wurden durch die Behandlung mit Phomoxanthon A intensiver, was einer erhöhten Aktivität der Caspase 3 entspricht. Dies bestätigt, dass Apoptose über die Caspase-Kaskaden eingeleitet wurde. Die Zellen befanden sich demnach im späteren Stadium der Apoptose, als der Apoptose Proteom Profiler durchgeführt wurde. In A2780 und A2780CisR wurden durch die Behandlung mit Phomoxanthon A die pro-apoptotischen Faktoren Bax und p53 moderat hochreguliert (Abbildung 42). Die Phosphorylierung von p53 an S392 ist in der behandelten Zelllinie etwas ausgeprägter. Die Positionen S15 und S46 wurden nicht beeinflusst. Die pro-apoptotischen Faktoren Cytochrom c und FADD in den behandelten A2780 waren zum Zeitpunkt der Messung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle weniger vorhanden (Abbildung 42). Cytochrom c war fast vollständig abgebaut. In Kleinhirn-Körnerzellen und

humanen HL-60 Zellen wird Cytochrom c im Laufe des Apoptosevorgangs wieder abgebaut [267] [268]. Dies scheint in A2780 Zellen auch der Fall zu sein. Die Zellen haben nach der Behandlung mit Phomoxanthon A den intrinsischen Weg eingeleitet und befanden sich zum Zeitpunkt der Messung in der durchführenden Phase der Apoptose, wobei Cytochrom c abgebaut wird. Der vergleichsweise geringere Verbrauch von FADD ist ein Indiz, dass ebenfalls der extrinsische Weg aktiviert wurde, was das Ergebnis des Caspase Assays bestätigt. In A2780CisR wurde kein Cytochrom c abgebaut, jedoch war der Gehalt an FADD in den behandelten Zellen geringer als in der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 42). In der unbehandelten A2780CisR ist der Todesrezeptor Fas/TNFRSF6/CD95 stärker exprimiert als in der unbehandelten A2780. Die Behandlung mit Phomoxanthon A führt zu keiner Hochregulierung von Fas/TNFRSF6/CD95 in A2780. Ebenso wurde dieser Rezeptor in A2780CisR nach der Behandlung mit Phomoxanthon A nicht hochreguliert, sondern geringfügig abgebaut. In A2780CisR wurde hauptsächlich der extrinsische Apoptoseweg induziert. Der intrinsische Weg wurde eventuell verzögert aktiviert. Der Caspase Assay zeigt, dass Phomoxanthon A in beiden Zelllinien Caspase 8 und Caspase 9 aktiviert (Abbildung 40), also den extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweg. Die reduzierte Expression des proapoptischen Proteins HTRA2/Omi in A2780 und A2780CisR nach der Behandlung mit Phomoxanthon A scheint zunächst paradox (Abbildung 42), da die aktive Form zelleigene Apoptoseinhibitoren zersetzt [269]. Betrachtet man jedoch die Expressionsrate der Apoptoseinhibitoren in A2780 und A2780CisR nach der Behandlung mit Phomoxanthon A, erkennt man, dass im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle cIAP-1 fast vollständig und XIAP moderat herunter reguliert ist (Abbildung 42). Der cIAP-1 hemmt das Apoptose Protein-1, wodurch das Zellüberleben gesichert wird. Zudem reguliert das Protein die ubiquitinabhängige Aktivierung von NF- κ B und die Inhibition von Caspase 3 [270] [271]. XIAP gehört wie cIAP-1 zur Familie der IAPs. Das Protein bindet direkt an die Caspasen 3, 7 und 9 und inhibiert somit den Apoptoseweg [271]. HTRA2/Omi ist für die Inaktivierung der zelleigenen Apoptoseinhibitoren verantwortlich und wurde in dem Zusammenhang möglicherweise abgebaut. Das Protein Claspin wurde in beiden Zelllinien nach der Behandlung mit Phomoxanthon A herunter reguliert (Abbildung 42). Claspin reguliert den Zellzyklus in der Transition von der S- zur G₂/M-Phase. Beim Replikationsstress interagiert das Protein mit verschiedenen Faktoren, sodass der Zyklus arretiert und die geschädigte DNA repariert werden kann [234] [235]. Phomoxanthon A bewirkt einen G₁-Phasenarrest. Somit

wurde die Transition in die S-Phase gehemmt und Claspin wurde vielleicht deswegen nicht aktiviert. In den behandelten Zellen wurde die Expression der Chaperone HSP60 und HSP70 herunter reguliert (Abbildung 42). Beide Proteine sind verantwortlich für die Faltung verschiedener Proteine [272] [273]. Mutationen der Proteine können zu fehlerhaften Faltungen führen, die Ursachen für Krankheiten sind. Eine erhöhte Apoptose-Rate korreliert mit einer Verringerung der HSP60 und HSP70 Expression [272] [273]. Survivin inhibiert die Apoptose und wird überwiegend in Karzinomen exprimiert [274]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Phomoxanthon A die Aktivierung verschiedener pro-apoptotischer Faktoren und die Inhibition anti-apoptotischer Faktoren und dadurch den extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweg induziert.

In niedrigen Konzentrationen (halbe IC_{50} , Tabelle 22) hatte Phomoxanthon A keinen Effekt auf den intrazellulären Spiegel von ROS (Abbildung 43). Der Spiegel von ROS wurde weder gesenkt noch die Bildung von ROS gefördert. Phomoxanthon A besitzt mehrere Phenole in seiner Struktur (Abbildung 9). Ellagsäure und Resveratrol haben ebenfalls mehrere Phenole (Abbildung 5, Abbildung 7) und beeinflussen den Spiegel an ROS in A2780 und A2780CisR (Abbildung 22). Eventuell nimmt Phomoxanthon A generell keinen Einfluss auf den intrazellulären ROS-Gehalt von A2780 und A2780CisR.

Erste Experimente haben gezeigt, dass Phomoxanthon A die freie intrazelluläre Calcium-Konzentration in der A2780 und A2780CisR Zelllinie erhöhen kann (Abbildung 44). Die Ausschüttung von freien Calcium-Ionen ins Cytosol kann verschiedene Auswirkungen auf die Zellen haben [275]. Physiologische Veränderungen, wie Zellproliferation und –migration aber auch Zelltod, können die Folge sein [276] [277]. Veränderungen der Konzentration von intrazellulären Calcium-Ionen regulieren die Entwicklung der M-Phase [278]. Eine Steigerung des Gehalts kann den Austritt der Zellen aus der Metaphase unterstützen, so dass die Zellen proliferieren können [278]. Eine langsame, anhaltende Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels fördert die Proliferation, wohingegen eine kurzfristige, starke Steigerung des Spiegels Apoptose induziert [276] [277].

Das Alkaloid Embellicin B wurde aus dem endophytischen Fungus *Embellisia eureka* isoliert [152]. Die Substanz stammt aus einer Familie von Antibiotika, den Pyrrocidinen [212]. Embellicin B ist an den untersuchten Zelllinien potenter als Cisplatin und sogar äquipotent bei den cisplatinsensitiven und –resistenten Zellpaaren (

Tabelle 23). Wie Phomoxanthon A induziert Embellicin B G_1 -Phasenarrest (Abbildung 39, Abbildung 47). Daher interagiert Embellicin B wahrscheinlich mit dem Ras/ERK-Signalweg, welcher die Komplexbildung der Cycline mit CDK reguliert [66] [265]. Die Inhibition der Komplexbildung von Cyclin mit CDK verhindert die Bildung von Zytoplasma und Zellorganellen. Außerdem wird die Transition von der G_1 -Phase in die S-Phase inhibiert. Die Behandlung mit Embellicin B führt zu einer zeitnahen (24 Stunden) Induktion von Apoptose (Abbildung 46). Daher besteht die Möglichkeit, dass neben dem Zellzyklusarrest andere apoptoseinduzierende Faktoren aktiviert werden. In A2780 und A2780CisR induzierte Embellicin B kein ROS (Abbildung 48). Außerdem wurde der basale Spiegel von ROS durch Embellicin B nicht gesenkt. Demnach scheint diese Substanz keinen Einfluss auf die ROS-Produktion zu haben. Da die Substanz nicht lagerstabil war (Abbildung 49, Abbildung 50) und später nicht mehr zugänglich war, konnten keine weiteren Experimente durchgeführt werden, um den Wirkmechanismus aufzuklären.

Die weiteren Experimente wurden mit dem verwandten Embellicin A durchgeführt, was ebenfalls aus dem endophytischen Fungus *Embellisia eureka* extrahiert wurde. Embellicin A kann durch intramolekulare Dehydratation aus Embellicin B gebildet werden [152]. Die Substanz ist um den Faktor 3 bis 5 weniger zytotoxisch als Embellicin B in A2780 bzw. A2780CisR Zellen (Abbildung 51). Die Hydroxyl-Substituenten des Pyrrolidon-Rings beeinflussen somit die Zytotoxizität der Metabolite. Die Doppelbindung im Pyrrolidon-Ring von Embellicin A kann als Michael-Akzeptor dienen [152], wodurch sich die Substanz kovalent an das Target binden könnte. Da Embellicin B eine höhere Toxizität als Embellicin A besitzt, sind die Hydroxyl-Gruppen am Pyrrolidon-Ring in Embellicin B wahrscheinlich essentiell für eine bessere Affinität der Substanz zum Target. Die Experimente zur Bestimmung der Caspase-Induktion zeigten, dass Embellicin A die Caspase-Kaskade aktiviert (Abbildung 55, Abbildung 52, Abbildung 56, Abbildung 54). Die DNA-Fragmentierung wurde durch den Naturstoff in den Zelllinien A2780 und A2780CisR induziert und die Vorbehandlung mit QVD verhinderte diese vollständig (Abbildung 54). Die Messung der Aktivitäten von Caspase 8 und Caspase 9 wiesen auf die Aktivierung beider Apoptosewege, des extrinsischen und des intrinsischen, in beiden Zelllinien hin (Abbildung 55, Abbildung 56). Die Ursache für die hohe und fast äquipotente Toxizität von Embellicin A gegenüber cisplatinempfindlichen und cisplatinresistenten Zelllinien ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Ergebnisse zeigen,

dass der Zellzyklus in der G₁-Phase arretiert und die Apoptose über die Caspasen 8 und 9 induziert wird.

Insgesamt scheinen die getesteten Naturstoffe Phomoxanthon A, Embellicin A und Embellicin B gegenüber Krebszelllinien, unabhängig von deren Sensitivität für Cisplatin, eine hohe Zytotoxizität aufzuweisen. In den Krebszelllinien waren die Naturstoffe potenter als Cisplatin. Dabei war Phomoxanthon A an HEK293-Zellen nicht toxischer als Cisplatin (Tabelle 22). Dagegen war Embellicin B ähnlich toxisch an HEK293 wie an A2780 (Tabelle 23). Damit ergibt sich ein gewisser Selektivitätsvorteil von Phomoxanthon A für maligne Zellen gegenüber nativen, gutartigen Zellen. Dies ist mit Embellicin B nicht gegeben. Das instabile Embellicin B wandelt sich in Embellicin A um, wodurch sich die Zytotoxizität um den Faktor 5 verringert (Tabelle 24). Das relativ stabile Phomoxanthon A könnte eine Leitstruktur für neue potentielle Zytostatika sein.

Literaturverzeichnis

- [1] R. Siegel, D. Naishadham und A. Jemal, „Cancer Statistics, 2013,“ *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Bd. 63, pp. 11-30, 2013.
- [2] R. Siegel, J. Ma, Z. Zou und A. Jemal, „Cancer Statistics 2014,“ *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Bd. 64, pp. 9-29, 2014.
- [3] P. Nygren und R. Larsson, „Overview of the clinical efficacy of investigational drugs,“ *Journal of Internal Medicine*, Bd. 253, pp. 46-75, 2003.
- [4] C. P. Leamon, C. D. Lovejoy und B. Nguyen, „Patient selection and targeted treatment in the management of platinum-resistant ovarian cancer,“ *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, Bd. 6, pp. 113-125, 2003.
- [5] H.-P. Lu und C. C. Chao, „Cancer Cells Acquire Resistance to Anticancer Drugs: An Update,“ *Biomedical Journal*, Bd. 35, pp. 464-472, 2012.
- [6] G. Housman, S. Byler, S. Heerboth, K. Lapinska, M. Longacre, N. Snyder und S. Sarkar, „Drug Resistance in Cancer: An Overview,“ *Cancers*, Bd. 6, pp. 1769-1792, 2014.
- [7] A. H. Schinkel und J. W. Jonker, „Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview,“ *Advanced Drug Delivery Reviews*, Bd. 55, pp. 3-29, 2003.
- [8] D. J. L. Wang und S. A. Hurvitz, „Recent advances in the development of anti-HER2 antibodies and antibody-drug conjugates,“ *Annals of Translational Medicine*, Bd. 2, Nr. 12, p. 14, 2014.
- [9] F. Mungenast und T. Thalhammer, „Estrogen Biosynthesis and Action in Ovarian Cancer,“ *frontiers in Endocrinology*, Bd. 5, Nr. 192, p. 12, 2014.
- [10] M. A. Socinski, „Update on taxanes in the first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer,“ *Current Oncology*, Bd. 21, Nr. 5, pp. e691-703, 2014.
- [11] Y.-H. Bae, J.-M. Shin, H.-J. Park, H.-O. Jang, M.-K. Bae und S.-K. Bae, „Gain-of-function mutant p53-R280K mediates survival of breast cancer cells,“ *Genes & Genomics*, Bd. 36, Nr. 2, pp. 171-178, 2014.
- [12] D. J. Junk, L. Vrba, G. S. Watts, M. M. Oshiro, J. D. Martinez und B. W. Futscher, „Different Mutant/Wild-Type p53 Combinations Cause a Spectrum of Increased Invasive Potential in Nonmalignant Immortalized Human Mammary Epithelial Cells,“ *Neoplasia*, Bd. 10, Nr. 5, pp. 450-461, 2008.
- [13] A. N. Shajahan-Haq, M. S. Cheema und R. Clarke, „Application of Metabolomics in Drug Resistant Breast Cancer Research,“ *Metabolites*, Bd. 5, pp. 100-118, 2015.

- [14] R. Siegel, E. Ward, O. Brawley und A. Jemal, „Cancer statistics, 2011: The Impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities on Premature Cancer Deaths,“ *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Bd. 61, Nr. 4, pp. 212-236, 2011.
- [15] M. Koshiyama, N. Matsumura und I. Konishi, „Recent Concepts of Ovarian Carcinogenesis: Type I and Type II,“ *BioMed Research International*, Bd. 2014, p. 11, 2014.
- [16] G. Landskron, M. De la Fuente, P. Thuwajit, C. Thuwajit und M. A. Hermoso, „Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment,“ *Journal of Immunology Research*, Bd. 2014, p. 19, 2014.
- [17] S. A. Cannistra, „Cancer of the Ovary,“ *The New England Journal of Medicine*, Bd. 351, pp. 2519-2529, 2004.
- [18] M. Gebhardt, D. Lüftner, S. Mahner, J. Pfisterer und U. Wagner, „Eierstockkrebs, ein Ratgeber für Patientinnen,“ "Leitlinienprogramm Onkologie" der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V., der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Krebshilfe e. V., Berlin, 2014.
- [19] G. W. Prager, E.-M. Lackner, M.-T. Krauth, M. Unseld, M. Poettler, S. Laffer, S. Cerny-Reiterer, W. Lamm, G. V. Kornek, B. R. Binder, C. C. Zielinski und P. Valent, „Targeting of VEGF-dependent transendothelial migration of cancer cells by bevacizumab,“ *Molecular Oncology*, Bd. 4, pp. 150-160, 2010.
- [20] V. Jekerle, M. U. Kassack, R. M. Reilly, M. Wiese und M. Piquette-Miller, „Functional comparison of single- and double-stranded *mdr1* antisense oligodeoxynucleotides in human ovarian cancer cell lines,“ *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*, Bd. 8, Nr. 3, pp. 516-527, 2005.
- [21] J. Zisowsky, S. Koegel, S. Leyers, K. Devarakonda, M. U. Kassack, M. Osmak und U. Jaehde, „Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells,“ *Biochemical Pharmacology*, Bd. 73, Nr. 2, pp. 298-307, 2007.
- [22] N. Eckstein, K. Servan, B. Hildebrandt und al, „Hyperactivation of the Insulin-like Growth Factor Receptor I Signaling Pathway Is an Essential Event for Cisplatin Resistance of Ovarian Cancer Cells,“ *Chem. Rev.*, Nr. 69, p. 2996, 2009.
- [23] R. Brown, C. Clugston, P. Burns, A. Edlin, P. Vasey, B. Vojtesek und S. B. Kaye, „Increased accumulation of p53 protein in cisplatin-resistant ovarian cell lines,“ *International Journal of Cancer*, Nr. 55, pp. 678-684, 1993.
- [24] B. C. Behrens, T. C. Hamilton, H. Masuda, K. R. Grotzinger, J. Whang-Peng, K. G. Louie, T. Knutsen, W. M. McKoy, R. C. Young und R. F. Ozols, „Characterization of a cis-Diamminedichloroplatinum(II)-resistant Human Ovarian Cancer Cell Line and Its Use in Evaluation of Platinum Analogues,“ *Cancer Research*, Bd. 47, pp. 414-418, 1987.
- [25] D. A. Anthony, A. J. McIlwrath, W. M. Gallagher, A. R. M. Edlin und R. Brown, „Microsatellite Instability, Apoptosis, and Loss of p53 Function in Drug-resistant Tumor Cells,“ *Cancer Research*,

- Bd. 56, pp. 1374-1381, 1996.
- [26] N. A. Jones, J. Turner, A. J. McIlwrath, R. Brown und C. Dive, „Cisplatin- and Paclitaxel-Induced Apoptosis of Ovarian Carcinoma Cells and the Relationship between Bax and Bak Up-Regulation and the Functional Status of p53,“ *Molecular Pharmacology*, Bd. 53, pp. 819-826, 1998.
- [27] B. dos Anjos Pultz, F. A. C. da Luz, P. R. de Faria, A. P. L. Oliveira, R. A. de Araújo und M. J. B. Silva, „Far Beyond the Usual Biomarkers in Breast Cancer: A Review,“ *Journal of Cancer*, Bd. 5, Nr. 7, pp. 559-571, 2014.
- [28] P. Boyle, „Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations,“ *Annals of Oncology*, Bd. 23, pp. vi7-12, 2012.
- [29] W. D. Foulkes, I. E. Smith und J. S. Reis-Filho, „Triple-Negative Breast Cancer,“ *The New England Journal of Medicine*, Bd. 363, pp. 1938-1948, 2010.
- [30] B. S. Yadav, S. C. Sharma, P. Chanana und S. Jhamb, „Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer,“ *World Journal of Clinical Oncology*, Bd. 5, Nr. 2, pp. 125-133, 2014.
- [31] N. Berrada, S. Delaloge und F. André, „Treatment of triple-negative metastatic breast cancer: toward individualized targeted treatments or chemosensitization?,“ *Annals of Oncology*, Bd. 21, Nr. 7, pp. vii30-vii35, 2010.
- [32] S. K. Pal und J. Mortimer, „Triple-negative breast cancer: Novel therapies and new directions,“ *Maturitas*, Bd. 63, pp. 269-274, 2009.
- [33] I. Cetin und M. Topcul, „Triple Negative Breast Cancer,“ *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Bd. 15, Nr. 6, pp. 2427-2431, 2014.
- [34] S. L. Davis, S. G. Eckhardt, J. J. Tentler und J. R. Diamond, „Triple-negative breast cancer: bridging the gap from cancer genomics to predictive biomarkers,“ *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, Bd. 6, Nr. 3, pp. 88-100, 2014.
- [35] S. A. O’Tool, J. M. Beith, E. K. A. Millar, R. West, A. McLean, A. Cazet, A. Swarbrick und S. R. Oakes, „Therapeutic targets in triple negative breast cancer,“ *Journal of Clinical Pathology*, Bd. 66, pp. 530-542, 2013.
- [36] B. Shashni, K. Sharma, R. Singh, K. R. Sakharkar, S. K. Dhillon, Y. Nagasaki und M. K. Sakharkar, „Coffee component hydroxyl hydroquinone (HHQ) as a putative ligand for PPAR gamma and implications in breast cancer,“ *BMC Genomics*, Bd. 14, p. 16, 2013.
- [37] R. Kreienberg, U.-S. Albert, M. Follmann, I. Kopp, T. Kühn, A. Wöckel und T. Zemmler, „Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms,“ "Leitlinienprogramm Onkologie" der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V., der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Krebshilfe e. V., Berlin, 2012.

- [38] H. Joensuu und J. Gligorov, „Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers,“ *Annals of Oncology*, Bd. 23, Nr. Supplement 6, pp. vi40-vi45, 2012.
- [39] B. D. Lehmann, J. A. Bauer, X. Chen, M. E. Sanders, A. B. Chakravarthy, Y. Shyr und J. A. Pietersen, „Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical modes for selection of targeted therapies,“ *The Journal of Clinical Investigation*, Bd. 121, Nr. 7, pp. 2750-2767, 2011.
- [40] T. J. Pogash, K. El-Bayoumy, S. Amin, K. Gowda, R. López de Cicco, M. Barton, Y. Su, I. H. Russo, J. A. Himmelberger, M. Slifker, A. Manni und J. Russo, „Oxidized derivative of docosahexaenoic acid preferentially inhibit cell proliferation in triple negative over luminal breast cancer cells,“ *In Vitro Cellular & Development Biology - Animal*, Bd. 51, Nr. 2, pp. 121-127, 2015.
- [41] S. Chekhun, N. Bezdenezhnykh, J. Shvets und N. Lukianova, „Expression of biomarkers related to cell adhesion, metastasis and invasion of breast cancer cell lines of different molecular subtype,“ *Experimantel Oncology*, Bd. 35, Nr. 3, pp. 174- 179, 2013.
- [42] R. Cailleau, R. Young, M. Olivé und J. W. J. Reeves, „Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions,“ *Journal of the National Cancer Institute*, Bd. 53, Nr. 3, pp. 661-674, 1974.
- [43] J. T. Price, T. Tiganis, A. Agarwal, D. Djakiew und E. W. Thompson, „Epidermal Growth Factor Promotes MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration through a Phosphatidylinositol 3'-Kinase and Phospholipase C-dependent Mechanism,“ *Cancer Research*, Bd. 59, pp. 5475-5478, 1999.
- [44] I. Keydar, L. Chen, S. Karby, F. R. Weiss, J. Delarea, M. Radu, S. Chaitcik und H. J. Brenner, „Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin,“ *European Journal of Cancer*, Bd. 15, Nr. 5, pp. 659-670, 1979.
- [45] H. B. Salvesen, I. Stefansson, M. B. Kalvenes, S. Das und L. A. Akslen, „Loss of PTEN Expression Is Associated with Metastatic Disease in Patients with Endometrial Carcinoma,“ *Cancer*, Bd. 94, Nr. 8, pp. 2185-2191, 2002.
- [46] K. L. Napier, M. Scheerer und S. Misra, „Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities,“ *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, Bd. 6, Nr. 5, pp. 112-120, 2014.
- [47] J. P. Islamian, M. Mohammadi und B. Baradaran, „Inhibition of human esophageal squamous cell carcinomas by targeted silencing of tumor enhancer genes: an overview,“ *Cancer Biology & Medicine*, Bd. 11, Nr. 2, pp. 78-85, 2014.
- [48] Y. Shimada, M. Imamura, T. Wagata, N. Yamaguchi und T. Tobe, „Characterization of 21 Newly Established Esophageal Cancer Cell Lines,“ *Cancer*, Bd. 69, Nr. 2, pp. 277-284, 1992.
- [49] E. M. Gosepath, Cisplatin-Resistenz von Tumorzellen: Identifizierung neuer Kandidatengene und Evaluierung der Rolle von DKK1, Bonn: Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2007.

- [50] C. Rivera und B. Venegas, „Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review),“ *Oncology Letters*, Bd. 8, pp. 7-11, 2014.
- [51] K.-D. Wolff, F. Bootz, J. Beck, K. Bikowski, P. Böhme, W. Budach, A. Burkhardt, H. Danker, W. Eberhardt, K. Engers, R. Fietkau, B. Frerich, T. Gauler, G. Germann, N. Gittler-Hebestreit, K. Grötz, R. Horch, S. Ihrler, U. Keilholz, M. Lell, A. Lübbe, W. Mantey, R. Nusser-Müller-Busch, H. Pistner, K. Paradies, T. Reichert, S. Reinert, H. Schliephake, M. Schmitter, S. Singer, M. Westhofen, S. Wirz und M. Wittlinger, „Mundhöhlenkarzinom "Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms",“ "Leitlinienprogramm Onkologie" der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V., der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Krebshilfe e. V., Berlin, 2012.
- [52] J. Gioanni, J.-L. Fischel, J.-C. Lambert, F. Demard, C. Mazeau, E. Zanghellini, F. Ettore, P. Formento, P. Chauvel, C.-M. Lalanne und A. Courdi, „Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment,“ *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, Bd. 24, Nr. 9, pp. 1445-1455, 1988.
- [53] E. M. Gosepath, N. Eckstein, A. Hamacher, K. Servan, G. von Jonquieres, H. Lage, B. Györffy, H. D. Royer und M. U. Kassack, „Acquired cisplatin resistance in the head–neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1,“ *International Journal of Cancer*, Bd. 123, pp. 2013-2019, 2008.
- [54] A. Perez, D. M. Neskey, J. Wen, L. Pereira, E. P. Reategui, W. J. Goodwin, K. L. Carraway und E. J. Franzmann, „CD44 interacts with EGFR and Promotes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Initiation and Progression,“ *Oral Oncology*, Bd. 49, Nr. 4, pp. 306-313, 2013.
- [55] A. C. Nichols, J. Yoo, D. A. Palma, K. Fung, J. H. Franklin, J. Koropatnick, J. S. Mymryk, N. N. Batada und J. W. Barrett, „Frequent Mutations in *TP53* and *CDKN24* Found by Next-Generation Sequencing of Head and Neck Cancer Cell Lines,“ *Archives of Otolaryngology - Head & Neck Surgery*, Bd. 138, Nr. 8, pp. 732-739, 2012.
- [56] P. Kaatsch, C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, J. Cernaj, A. Ernst, J. Folkerts, J. Hansmann, K. Kranzhöfer, E. Kriehoff-Henning, B. Kunz, A. Penzkofer, K. Treml, K. Wittenberg, N. Baras, B. Barnes, J. Bertz, N. Buttman-Schweiger, S. Dahm, M. Franke, J. Haberland, K. Kraywinkel, A. Wienecke und U. Wolf, „Darm - C18-21,“ in *s Krebs in Deutschland 2009/2010*, Berlin, Robert-Koch Institut und die Gesellschaft der epidermologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2013, pp. 36-39.
- [57] W. H. de Vos tot Nederveen Cappel, H. J. Meulenbeld, J. H. Kleibeuker, F. M. Nagengast, F. H. Menko, G. Griffioen, A. Cats, H. Morreau, H. Gelderblom und H. F. A. Vasen, „Survival after adjuvant 5-FU treatment for stage III colon cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer,“ *International Journal of Cancer*, Bd. 109, pp. 468-471, 2004.
- [58] M. G. Brattain, M. E. Marks, J. McCombs, W. Finely und D. E. Brattain, „Characterization of human colon carcinoma cell lines isolated from a single primary tumour,“ *British Journal of Cancer*, Bd.

- 47, Nr. 3, pp. 373-381, 1983.
- [59] C. D. Heinen, D. Richardson, R. White und J. Groden, „Microsatellite Instability in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines That Have Full-Length Adenomatous polyposis Coli Protein,“ *Cancer Research*, Bd. 55, pp. 4797-4799, 1995.
- [60] N. P. Bhattacharyya, A. Skandalis, A. Ganesh, J. Groden und M. Meuth, „Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines,“ *PNAS*, Bd. 91, Nr. 14, pp. 6319-6323, 1994.
- [61] W.-D. Yu, Y.-F. Peng, H.-D. Pan, L. Wang, K. Li und J. Gu, „Phosphatidylinositol 3-kinase CB association with preoperative radiotherapy response in rectal adenocarcinoma,“ *World Journal of Gastroenterology*, Bd. 20, Nr. 43, pp. 16258-16267, 2014.
- [62] R. Veldman, F. El Rassi, S. Holloway, A. Langston und H. J. Khoury, „Advances in Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Chronic Myeloid Leukemia,“ *Discovery Medicine*, Bd. 16, Nr. 88, pp. 179-186, 2013.
- [63] E. Trela, S. Glowacki und J. Blasiak, „Therapy of Chronic Myeloid Leukemia: Twilight of the Imatinib Era?,“ *ISRN Oncology*, Bd. 2014, p. 9, 2014.
- [64] H. P. Koeffler und D. W. Golde, „Human Myeloid Leukemia Cell Lines: A Review,“ *Blood*, Bd. 56, Nr. 3, pp. 344-350, 1980.
- [65] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russel und R. Nairn, „Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5,“ *Journal of General Virology*, Bd. 36, Nr. 1, pp. 59-74, 1977.
- [66] K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele und Z. N. Berneman, „The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer,“ *Cell Proliferation*, Bd. 36, pp. 131-149, 2003.
- [67] Z. H. Siddik, „Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance,“ *Oncogene*, Bd. 22, pp. 7265-7279, 2003.
- [68] J. M. Wagner und L. M. Karnitz, „Cisplatin-Induced DNA Damage Activates Replication Checkpoint Signaling Components that Differentially Affect Tumor Cell Survival,“ *Molecular Pharmacology*, Bd. 76, pp. 208-214, 2009.
- [69] N. Zaffaroni, R. Silvestrini, L. Orlandi, A. Bearzatto, D. Gornati und R. Villa, „Induction of apoptosis by taxol and cisplatin and effect on cell cycle-related proteins in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells,“ *British Journal of Cancer*, Bd. 77, Nr. 9, pp. 1378-1385, 1998.
- [70] A. Eastman, „The Mechanism of Action of Cisplatin: From Adducts to Apoptosis,“ in *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Zürich, Verlag Helvetica Chimica Acta, 2006, pp. 111-134.
- [71] P. Jordan und M. Carmo-Fonseca, „Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity,“ *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, Bd. 57, pp. 1229-1235, 2000.

- [72] H. Zou, Y. Li, X. Liu und X. Wang, „An APAF-1·Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9,“ *The Journal of Biological Chemistry*, Bd. 274, Nr. 17, pp. 11549-11556, 1999.
- [73] M. O. Hengartner, „The biochemistry of apoptosis,“ *Nature*, Bd. 407, pp. 770-776, 2000.
- [74] H. Hug, „Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz,“ *Biologie unserer Zeit*, Bd. 30, Nr. 3, pp. 128-135, 2000.
- [75] S. Grimm, „Die Apoptose: Programmierter Zelltod,“ *Chemie in unserer Zeit*, Bd. 37, Nr. 3, pp. 172-178, 2003.
- [76] H. K. Ooi und L. Ma, „Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway,“ *BMC Systems Biology*, Bd. 7, p. 64, 2013.
- [77] K. H. Khan, M. Blanco-Codesido und L. R. Molife, „Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway,“ *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2014.
- [78] P. Hensley, M. Mishra und N. Kyprianou, „Targeting caspases in cancer therapeutics,“ *Biological Chemistry*, Bd. 394, Nr. 7, pp. 831-843, 2013.
- [79] M. Singh, P. Chaudhry, F. Fabi und E. Asselin, „Cisplatin-induced caspase activation mediates PTEN cleavage in ovarian cancer cells: a potential mechanism of chemoresistance,“ *BMC Cancer*, Bd. 13, Nr. 233, p. 9, 2013.
- [80] E. W. Duiker, A. Meijer, A. R. M. van der Bilt, G. J. Meersma, N. Kooi, A. G. J. van der Zee, E. G. de Vries und S. de Jong, „Drug-induced caspase 8 upregulation sensitises cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells to rhTRAIL-induced apoptosis,“ *British Journal of Cancer*, Bd. 104, pp. 1278-1287, 2011.
- [81] H. Niedner, R. Christen, X. Lin, A. Kondo und S. B. Howell, „Identification of Genes That Mediate Sensitivity to Cisplatin,“ *Molecular Pharmacology*, Bd. 60, pp. 1153-1160, 2001.
- [82] A. Brozovic, G. Fritz, M. Christmann, J. Zisowsky, U. Jaehde, M. Osmak und B. Kaina, „Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and FAS-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance,“ *International Journal of Cancer*, Bd. 112, pp. 974-985, 2004.
- [83] U. Felderhoff-Müser, *Die Bedeutung apoptotischer Signaltransduktionsmechanismen in klinischen und experimentellen Schädigungsmodellen des unreifen Gehirns*, Berlin: Humboldt Universität, 2003.
- [84] D. J. Stewart, „Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin,“ *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Bd. 63, pp. 12-31, 2007.
- [85] S. Eberle, *Untersuchungen zur Rolle des humanen Kupfertransporters 2 bei Tumorresistenzen gegen Platinkomplexe*, Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität, 2011.

- [86] G. Ciarimboli, „Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Effects and Side Effects,“ *Scientifica*, Bd. 2012, p. 18, 2012.
- [87] L. Galluzzi, I. Vitale, J. Michels, C. Brenner, G. Szabadkai, A. Harel-Bellan, M. Castedo und G. Kroemer, „Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future,“ *Cell Death and Disease*, Bd. 5, p. e1257, 2014.
- [88] K. L. Jin, J.-Y. Park, E. J. Noh, K. L. Hoe, J. H. Lee, J.-H. Kim und J.-H. Nam, „The effect of combined treatment with cisplatin and histone deacetylase inhibitors on HeLa cells,“ *Journal of Gynecologic Oncology*, Bd. 21, Nr. 4, pp. 262-268, 2010.
- [89] G. Monami, E. M. Gonzalez, M. Hellman, L. G. Gomella, R. Baffa, R. V. Iozzo und A. Morrione, „Proepithelin Promotes Migration and Invasion of 5637 Bladder Cancer Cells through the Activation of ERK1/2 and the Formation of a Paxillin/FAK/ERK Complex,“ *Cancer Research*, Nr. 66, pp. 7103-7110, 2006.
- [90] D. L. Clement, S. Mally, C. Stock, M. Lethan, P. Satir, A. Schwab, S. F. Pedersen und S. T. Christensen, „PDGFR α signaling in the primary cilium regulates NHE1-dependent fibroblast migration via coordinated differential activity of MEK1/2-ERK1/2-p90^{RSK} and AKT signaling pathways,“ *Journal of Cell Science*, 2012.
- [91] J. K. Rho, Y. J. Choi, Y. R. Choi, S. Y. Kim, S. J. Choi, C.-M. Choi, I. I. Na und J. C. Lee, „The Effect of Acquired Cisplatin Resistance on Sensitivity to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR Mutant Lung Cancer Cells,“ *Oncology Research*, Bd. 19, Nr. 10-11, pp. 471-478, 2011.
- [92] A. Ahsan, S. M. Hiniker, S. G. Ramanand, S. Nyati, A. Hegde, A. Helman, R. Menawat, M. S. Bhojani, T. S. Lawrence und M. K. Nyati, „Role of EGFR degradation in cisplatin-induced cytotoxicity in head and neck cancer,“ *Cancer Research*, Bd. 70, Nr. 7, pp. 2862-2869, 2010.
- [93] G. G. Gomez, J. Wykosky, C. Zanca, F. B. Furnari und W. K. Cavenee, „Therapeutic resistance in cancer: microRNA regulation of EGFR signaling networks,“ *Cancer Biology and Medicine*, Bd. 10, pp. 192-205, 2013.
- [94] D. Wang und S. J. Lippard, „Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs,“ *Nature Reviews*, Bd. 4, pp. 307-320, 2005.
- [95] S. Akiyama, Z. S. Chen, T. Sumizawa und T. Furukawa, „Resistance to cisplatin,“ *Anti-Cancer Drug Design*, Bd. 14, Nr. 2, pp. 143-151, 1999.
- [96] M. Dashty, „A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism,“ *Clinical Biochemistry*, Bd. 46, pp. 1339-1352, 2013.
- [97] H. Pelicano, D. S. Martin, R.-H. Xu und P. Huang, „Glycolysis inhibition for anticancer treatment,“ *Oncogene*, Bd. 25, pp. 4633-4646, 2006.
- [98] M. Jang, S. S. Kim und J. Lee, „Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets,“

- Experimental & Molecular Medicine*, Bd. 45, p. e45, 2013.
- [99] A. J. Levine und A. M. Puzio-Kuter, „The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes,“ *Science*, Bd. 330, pp. 1340-1344, 2010.
- [100] O. Warburg, „On the Origin of Cancer Cells,“ *Science*, Bd. 123, Nr. 3191, pp. 309-314, 1956.
- [101] X. Chen, Y. Qian und S. Wu, „The Warburg effect: Evolving interpretations of an established concept,“ *Free Radical Biology and Medicine*, Bd. 79, pp. 253-263, 2015.
- [102] Z. Duan, D. E. Lamendola, R. Z. Yuzuf, R. T. Penson, F. I. Preffer und M. V. Seiden, „Overexpression of Human Phosphoglycerate Kinase 1 (PGK1) Induces a Multidrug Resistance Phenotype,“ *Anticancer Research*, Nr. 22, p. 1933, 2002.
- [103] H. Yan, K. Yang, H. Xiao, Y.-J. Zou, W.-B. Zhang und H.-Y. Liu, „Over-Expression of Cofilin-1 and Phosphoglycerate Kinase 1 in Astrocytomas Involved in Pathogenesis of Radioresistance,“ *CNS Neuroscience & Therapeutics*, Bd. 18, pp. 729-736, 2012.
- [104] D. Zieker, I. Königsrainer, I. Tritschler, M. Löffler, S. Beckert, F. Traub, K. Nieselt, S. Bühler, M. Weller, M. Gaedcke, R. S. Taichman, H. Northoff, B. L. D. M. Brücher und A. Königsrainer, „Phosphoglycerate kinase 1 a promoting enzyme for peritoneal dissemination in gastric cancer,“ *International Journal of Cancer*, Bd. 126, pp. 1513-1520, 2010.
- [105] D. Zieker, I. Königsrainer, F. Traub, K. Nieselt, B. Knapp, C. Schillinger, C. Stirnkrob, F. Fend, H. Northoff, S. Kupka, B. L. D. M. Brücher und A. Königsrainer, „PGK1 a Potential Marker for Peritoneal Dissemination in Gastric Cancer,“ *Cellular Physiology and Biochemistry*, Bd. 21, pp. 429-436, 2008.
- [106] J. Wang, J. Wang, J. Dai, Y. Jung, C.-L. Wei, Y. Wang, A. M. Havens, P. J. Hogg, E. T. Keller, K. J. Pienta, J. E. Nor, C.-Y. Wang und R. S. Taichman, „A Glycolytic Mechanism Regulating an Angiogenic Switch in Prostate Cancer,“ *Cancer Research*, Bd. 67, pp. 149-159, 2007.
- [107] A. J. Lay, X.-M. Jiang, O. Kisker, E. Flynn, A. Underwood, R. Condron und P. J. Hogg, „Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase,“ *Nature*, Bd. 408, pp. 869-873, 2000.
- [108] D. Zieker, I. Königsrainer, J. Weinreich, S. Beckert, J. Glatzle, K. Nieselt, S. Bühler, M. Löffler, J. Gaedcke, H. Northoff, J. G. Mannheim, S. Wiehr, C. von Weyhern, B. L. D. M. Brücher und A. Königsrainer, „Phosphoglycerate Kinase 1 Promoting Tumor Progression and Metastasis in Gastric Cancer - Detected in a Tumor Mouse Model Using Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging,“ *Cellular Physiology and Biochemistry*, Bd. 26, pp. 147-154, 2010.
- [109] R.-h. Xu, H. Pelicano, Y. Zhou, J. S. Carew, L. Feng, K. N. Bhalle, M. J. Keating und P. Huang, „Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia,“ *Cancer Research*, Bd. 65, pp. 613-621, 2005.

- [110] J.-F. H. Geschwind, Y. H. Ko, M. S. Torbenson, C. Magee und P. L. Pedersen, „Novel Therapy for Liver Cancer: Direct Intraarterial Injection of a Potent Inhibitor of ATP Production,“ *Cancer Research*, Bd. 62, pp. 3909-3913, 2002.
- [111] S. Matsumoto, K. Saito, H. Yasui, H. D. Morris, J. P. Munasinghe, M. Lizak, H. Merkle, J. H. Ardenkjaer-Larsen, R. Choudhuri, N. Devasahayam, S. Subramanian, A. P. Koretsky, J. B. Mitchell und M. C. Krishna, „EPR Oxygen Imaging and Hyperpolarized ¹³C MRI of Pyruvate Metabolism as Noninvasive Biomarkers of Tumor Treatment Response to a Glycolysis Inhibitor 3-Bromopyruvate,“ *Magnetic Resonance in Medicine*, Bd. 69, pp. 1443-1450, 2013.
- [112] X. Cao, M. Bloomston, T. Zhang, W. L. Frankel, G. Jia, B. Wang, N. C. Hall, R. M. Koch, H. Cheng, M. V. Knoop und D. Sun, „Synergistic Antipancreatic Tumor Effect by Simultaneously Targeting Hypoxic Cancer Cells With HSP90 Inhibitor and Glycolysis Inhibitor,“ *Clinical Cancer Research*, Nr. 14, pp. 1831-1839, 2008.
- [113] X. Cao, G. Jia, T. Zhang, M. Yang, B. Wang, P. A. Wassenaar, H. Cheng, M. V. Knopp und D. Sun, „Non-invasive MRI tumor imaging and synergistic anticancer effect of HSP90 inhibitor and glycolysis inhibitor in RIP1-Tag2 transgenic pancreatic tumor model,“ *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, Bd. 62, pp. 985-944, 2008.
- [114] M. C. Shoshan, „3-bromopyruvate: Targets and outcomes,“ *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Bd. 44, pp. 7-15, 2012.
- [115] B. Viollet, B. Guigas, N. Sanz Garcia, J. Leclerc, M. Foretz und F. Andreelli, „Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview,“ *Clinical Science*, Bd. 122, pp. 253-270, 2012.
- [116] D. D. Rao, J. S. Vorhies, N. Senzer und J. Nemunaitis, „siRNA vs. shRNA: Similarities and differences,“ *Advanced Drug Delivery Reviews*, Bd. 61, pp. 746-759, 2009.
- [117] C. Lepleux, E. Abeilard-Lemoisson, M. Duval, P. Icard und H. Lincet, „siPGK1 Sensitizes Chemoresistant Human Ovarian Cancer Cell Lines to Cisplatin,“ *Anticancer Research*, Bd. 32, pp. 4277-4286, 2012.
- [118] D. C. Gautheron, „Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Respiratory Chain: Review,“ *Journal of Inherited Metabolic Disease*, pp. 57-61, 1984.
- [119] J. Kasznicki, A. Sliwinska und J. Drzewoski, „Metformin in cancer prevention and therapy,“ *Annals of Translational Medicine*, Bd. 2, Nr. 6, p. 57, 2014.
- [120] D. G. Hardie und D. Carling, „The AMP-activated protein kinase - Fuel gauge of the mammalian cell?,“ *European Journal of Biochemistry*, Bd. 246, Nr. 2, pp. 259-273, 2004.
- [121] S.-M. Fendt, E. L. Bell, M. A. Keibler, S. M. Davidson, G. J. Wirth, B. Fiske, J. R. Mayers, M. Schwab, G. Bellinger, A. Csibi, A. Patnaik, M. J. Blouin, L. C. Cantley, L. Guarente, J. Blenis, M. N. Pollak, A. F. Olumi, M. G. Vander Heiden und G. Stephanopoulos, „Metformin Decreases Glucose Oxidation and Increases the Dependency of Prostate Cancer Cells on Reductive Glutamine Metabolism,“

- Cancer Research*, Bd. 73, pp. 4429-4438, 2013.
- [122] B. Bao, A. S. Azmi, S. Ali, F. Zaiem und F. H. Sarkar, „Metformin may function as anti-cancer agent via targeting cancer stem cells: the potential biological significance of tumor-associated miRNAs in breast and pancreatic cancers,“ *Annals of Translational Medicine*, Bd. 2, Nr. 6, p. 59, 2014.
- [123] J. Gong, L. A. Robbins, A. Lugea, R. T. Waldron, C. Y. Jeon und S. J. Pandol, „Diabetes, pancreatic cancer, and metformin therapy,“ *frontiers in Physiology*, Bd. 5, Nr. 426, p. 8, 2014.
- [124] X. Zhang, J. Gureasko, K. Shen, P. A. Cole und J. Kuriyan, „An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor,“ *Cell*, Bd. 125, pp. 1137-1149, 2006.
- [125] N. E. Hynes und H. A. Lane, „ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors,“ *Nature Reviews Cancer*, Bd. 5, pp. 341-354, 2005.
- [126] R. J. Crowder, D. P. Lambardi und M. J. Ellis, „Successful targeting of ErbB2 receptors—is PTEN the key?,“ *Cancer Cell*, Bd. 6, pp. 103-104, 2004.
- [127] Y. Yarden und M. X. Sliwkowski, „Untangling the ErbB Signalling Network,“ *Nature*, Bd. 2, pp. 127-137, 2001.
- [128] R. Bose, S. M. Kavuri, A. C. Searleman, W. Shen, D. Shen, D. C. Koboldt, J. Monsey, N. Goel, A. B. Aronson, S. Li, C. X. Ma, L. Ding, E. R. Mardis und M. J. Ellis, „Activating HER2 Mutations in HER2 Gene Amplification Negative Breast Cancer,“ *Cancer Discovery*, Bd. 3, pp. 224-237, 2013.
- [129] G. D. Lianos, K. Vlachos, O. Zoras, C. Katsios, W. C. Cho und D. H. Roukos, „Potential of antibody–drug conjugates and novel therapeutics in breast cancer management,“ *OncoTargets and Therapy*, Bd. 7, pp. 491-500, 2014.
- [130] M. B. Berger, J. M. Mendrola und M. A. Lemmon, „ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface,“ *FEBS Letters*, Bd. 569, pp. 332-336, 2004.
- [131] S. Meloche und J. Pouyssegur, „The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition,“ *Oncogene*, Nr. 26, pp. 3227-3239, 2007.
- [132] A. Citri, K. B. Skaria und Y. Yarden, „The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3,“ *Experimental Cell Research*, Bd. 284, pp. 54-65, 2003.
- [133] M.-C. Shun, W. Yu, S.-K. Park, B. G. Sanders und K. Kline, „Downregulation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression Contributes to α -TEA's Proapoptotic Effects in Human Ovarian Cancer Cell Lines,“ *Journal of Oncology*, Bd. 2010, p. 11 pages, 2010.
- [134] G. Sithanandam, L. W. Fornwald, J. Fields und L. M. Anderson, „Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human adenocarcinoma cell line A549,“ *Oncogene*, Bd. 24, pp. 1847-1859, 2005.
- [135] W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L.

- Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris und H. Varmus, „EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib,“ *PNAS*, Bd. 101, Nr. 36, pp. 13306-13311, 2014.
- [136] A. Frolov, K. Schuller, C.-W. D. Tzeng, E. E. Cannon, B. C. Ku, J. H. Howard, S. M. Vickers, M. J. Heslin, D. J. Buchsbaum und J. P. Arnoletti, „ErbB3 Expression and Dimerization with EGFR Influence Pancreatic Cancer Cell Sensitivity to Erlotinib,“ *Cancer Biology & Therapy*, Bd. 6, Nr. 4, pp. 548-554, 2007.
- [137] M. D. Gandhi und M. Agulnik, „Targeted treatment of head and neck squamous-cell carcinoma: potential of lapatinib,“ *OncoTargets and Therapies*, Bd. 7, pp. 245-251, 2014.
- [138] T. Holbro, R. R. Beerli, F. Maurer, M. Koziczak, C. F. Barbas III und N. E. Hynes, „The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation,“ *PNAS*, Bd. 100, Nr. 15, pp. 8933-8938, 2003.
- [139] M. Maninova, M. P. Iwanicki und T. Vomastek, „Emerging role for nuclear rotation and orientation in cell migration,“ *Cell Adhesion & Migration*, Bd. 8, Nr. 1, pp. 42-48, 2014.
- [140] S. P. Fortin Ensign, I. T. Mathews, M. H. Symons, M. E. Berens und N. L. Tran, „Implications of Rho GTPase signaling in glioma cell invasion and tumor progression,“ *Frontiers in Oncology*, Bd. 3, Nr. 241, pp. 1-11, 2013.
- [141] G. Pearson, F. Robinson, T. B. Gibson, B.-e. Xu, M. Karandikar, K. Berman und M. H. Cobb, „Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions,“ *Endocrine Reviews*, Nr. 22, pp. 153-183, 2001.
- [142] N. P. Jones, J. Peak, S. Brader, S. A. Eccles und M. Katan, „PLC γ 1 is essential for early events in integrin signalling required for cell motility,“ *Journal of Cell Science*, Nr. 118, pp. 2695-2706, 2005.
- [143] M. Genua, S.-Q. Xu, S. Buraschi, S. C. Peiper, L. G. Gomella, A. Belfiore, R. V. Iozzo und A. Morrione, „Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 (Pyk2) Regulates IGF-I-Induced Cell Motility and Invasion of Urothelial Carcinoma Cells,“ *PLoS ONE*, Nr. 7, p. e40148, 2012.
- [144] C. Alberti, „Taxane- and epothilone-based chemotherapy: from molecule cargo cytoskeletal logistics to management of castration-resistant prostate carcinoma,“ *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, Bd. 17, Nr. 12, pp. 1658-1664, 2013.
- [145] R. Rohrig, Wirkung von Flavonoiden auf den redoxsensitiven Nrf2-Signalweg in Säugerzellen, Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität, 2010.
- [146] E. P. Lansky und R. A. Newman, „Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer,“ *Journal of Ethnopharmacology*, Bd. 109, pp. 177-206, 2007.
- [147] Y. Ding, H. Yao, Y. Yao, L. Y. Fai und Z. Zhang, „Protection of Dietary Polyphenols against Oral

- Cancer," *Nutrients*, Bd. 5, pp. 2173-2191, 2013.
- [148] D. Nambiar, P. Rajamani und R. P. Singh, „Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy," *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, Bd. 728, pp. 139-157, 2011.
- [149] J.-L. Gao und Y.-G. Chen, „Natural Compounds Regulate Glycolysis in Hypoxic Tumor Microenvironment," *BioMed Research International*, Bd. 2015, p. 8, 2015.
- [150] J. J. de Souza, I. J. Curcino Vieira, E. Rodrigues-Filho und R. Braz-Filho, „Terpenoids from Endophytic Fungi," *Molecules*, Bd. 16, pp. 10604-10618, 2011.
- [151] G. A. Lane, M. J. Christensen und C. O. Miles, „Coevolution of Fungal Endophytes with Grasses: The Significance of Secondary Metabolites," in *s Microbial Endophytes*, New York, Marcel Dekker, 2000, pp. 341-388.
- [152] W. Ebrahim, A. H. Aly, V. Wray, A. Mándi, M.-H. Teiten, F. Gaascht, B. Orlikova, M. U. Kassack, W. Lin, M. Diederich, T. Kurtán, A. Debbab und P. Proksch, „Embellicines A and B: Absolute Configuration and NF- κ B Transcriptional Inhibitory Activity," *Journal of Medicinal Chemistry*, Bd. 56, pp. 2991-2999, 2013.
- [153] D. Rösberg, A. Debbab, A. Mándi, V. Vasylyeva, P. Böhler, B. Stork, L. Engelke, A. Hamacher, R. Sawadogo, M. Diederich, V. Wray, W. Lin, M. U. Kassack, C. Janiak, S. Scheu, S. Wesselborg, T. Kurtán, A. H. Aly und P. Proksch, „Pro-Apoptotic and Immunostimulatory Tetrahydroxanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phomopsis longicolla*," *The Journal of Organic Chemistry*, Bd. 78, pp. 12409-12425, 2013.
- [154] N. Ishikura, S. Hayashida und K. Tazaki, „Biosynthesis of Gallic and Ellagic Acids with 14 C-Labeled Compounds in Acer and Rhus Leaves," *The Botanical Magazine, Tokyo*, Bd. 97, pp. 355-367, 1984.
- [155] W. Huang, J. Ni und A. G. L. Borthwick, „Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus SHL 6*," *Process Biochemistry*, Bd. 40, pp. 1245-1249, 2005.
- [156] A. Alam, Y. Takaguchi und S. Tsuboi, „Synthesis of ellagic acid and its 4,4'-di-O-alkyl derivatives from gallic acid," *Journal of the Faculty of Environmental Science and Technology*, Bd. 10, Nr. 1, pp. 111-117, 2005.
- [157] K. Golling, *Phenolische Inhaltsstoffe in Eichel (Früchte von Quercus spp.) sowie im Harn von Schweinen bei Nutzung von Eichel als Futtermittel*, Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover, Zentrum für Lebensmittelwissenschaften, Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik, 2008.
- [158] S. U. Mertens-Talcott und S. S. Percival, „Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells," *Cancer Letters*, Nr. 218, pp. 141-151, 2005.

- [159] J. Jurenka, „Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review,“ *Alternative Medicine Review*, Bd. 13, Nr. 2, pp. 128-144, 2008.
- [160] B. A. Narayanan und G. G. Re, „IGF-II Down Regulation Associated Cell Cycle Arrest in Colon Cancer Cells Exposed to Phenolic Antioxidant Ellagic Acid,“ *Anticancer Research*, Nr. 21, pp. 359-364, 2001.
- [161] M. Falsaperla, G. Morgia, A. Tartarone, R. Ardito und G. Romano, „Support Ellagic Acid Therapy in Patients with Hormone Refractory Prostate Cancer (HRPC) on Standard Chemotherapy Using Vinorelbine and Estramustine Phosphate,“ *European Urology*, Bd. 47, pp. 449-455, 2005.
- [162] T.-M. Li, G.-W. Chen, C.-C. Su, J.-G. Lin, C.-C. Yeh, K.-C. Cheng und J.-G. Chung, „Ellagic Acid Induced p53/p21 Expression, G1 Arrest and Apoptosis in Human Bladder Cancer T24 Cells,“ *Anticancer Research*, Bd. 25, pp. 971-980, 2005.
- [163] Y.-C. Chung, L.-C. Lu, M.-H. Tsai, Y.-J. Chen, Y.-Y. Chen, S.-P. Yao und C.-P. Hsu, „The Inhibitory Effect of Ellagic Acid on Cell Growth of Ovarian Carcinoma Cells,“ *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Bd. 2013, p. 12, 2013.
- [164] A. L. Gartel und S. K. Radhakrishnan, „Lost in Transcription: p21 Repression, Mechanisms, and Consequences,“ *Cancer Research*, Nr. 65, pp. 3980-3985, 2005.
- [165] M. Lacroix, R.-A. Toillon und G. Leclerc, „p53 and breast cancer, an update,“ *Endocrine-Related Cancer*, Nr. 13, pp. 293-325, 2006.
- [166] X. Qiu, H. J. Forman, A. H. Schönthal und E. Cadenas, „Induction of p21 Mediated by Reactive Oxygen Species Formed during the Metabolism of Aziridinylbenzoquinones by HCT116 Cells,“ *The Journal of Biological Chemistry*, Nr. 251, pp. 31915-31921, 1996.
- [167] N. Devipriya, M. Srinivasan, A. R. Sudheer und V. P. Menon, „Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose dependent study,“ *Singapore Medocal Journal*, Bd. 48, Nr. 4, pp. 311-318, 2007.
- [168] H.-C. Ou, W.-J. Lee, S.-D. Lee, C.-Y. Huang, T.-H. Chiu, K.-L. Tsai, W.-C. Hsu und W. H.-H. Sheu, „Ellagic acid protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway,“ *Toxicology and Applied Pharmacology*, Bd. 248, p. 134-143, 2010.
- [169] S. J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.-H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S. K. Dutta und M. Levine, „Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention,“ *Journal of the American College of Nutrition*, Bd. 22, pp. 18-35, 2003.
- [170] B. B. Aggarwal und S. Shishodia, „Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer,“ *Biochemical Pharmacology*, Bd. 71, pp. 1397-1421, 2006.
- [171] I. Fridovich, „The Biology of Oxygen Radicals,“ *Science*, Bd. 201, pp. 875-880, 1978.

- [172] A. Rahal, A. Kumar, V. Singh, B. Yadav, R. Tiwari, S. Chakraborty und K. Dhama, „Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay,“ *BioMed Research International*, Bd. 2014, p. 19, 2014.
- [173] T. Finkel und N. J. Holbrook, „Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing,“ *Nature*, Bd. 408, pp. 239-247, 2000.
- [174] J. P. Kehrer, „The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity,“ *Toxicology*, Bd. 149, pp. 43-50, 2000.
- [175] G. Loo, „Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (Review),“ *Journal of Nutritional Biochemistry*, Nr. 14, pp. 64-73, 2003.
- [176] H. Sies, „Oxidative stress: Oxidants and antioxidants,“ *Experimental Physiology*, Bd. 82, pp. 291-295, 1997.
- [177] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic und M. Mazur, „Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer,“ *Chemico-Biological Interaction*, Bd. 160, pp. 1-40, 2006.
- [178] R. Brigelius-Flohé und M. G. Traber, „Vitamin E: function and metabolism,“ *The FASEB Journal*, Bd. 13, pp. 1145-1155, 1999.
- [179] A. Pompella, A. Visvikis, A. Paolicchi, V. De Tata und A. F. Casini, „The changing faces of glutathione, a cellular protagonist,“ *Biochemical Pharmacology*, Bd. 66, pp. 1499-1503, 2003.
- [180] I. Afanas'ev, „New Nucleophilic Mechanisms of Ros-Dependent Epigenetic Modifications: Comparison of Aging and Cancer,“ *Aging and Disease*, Bd. 5, Nr. 1, pp. 52-62, 2014.
- [181] J. He, Q. Xu, Y. Jing, F. Agani, X. Qian, R. Carpenter, Q. Li, X.-R. Wang, S. S. Peiper, Z. Lu, L.-Z. Liu und B.-H. Jiang, „Reactive oxygen species regulate ERBB2 and ERBB3 expression via miR-199a/125b and DNA methylation,“ *EMBO reports*, Bd. 13, pp. 1116-1122, 2012.
- [182] A. Yaseen, S. Chen, S. Hock, R. Rosato, P. Dent, Y. Dai und S. Grant, „Resveratrol Sensitizes Acute Myelogenous Leukemia Cells to Histone Deacetylase Inhibitors through Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of the Extrinsic Apoptotic Pathway,“ *Molecular Pharmacology*, Bd. 82, pp. 1030-1041, 2012.
- [183] R. Zhang, K. A. Kang, K. C. Kim, S.-Y. Na, W. Y. Chang, G. Y. Kim, H. S. Kim und J. W. Hyun, „Oxidative stress causes epigenetic alteration CDX1 expression in colorectal cancer cells,“ *Gene*, Bd. 524, pp. 214-219, 2013.
- [184] B. Shi und W. Xu, „The development and potential clinical utility of biomarkers for HDAC inhibitors,“ *Drug Discoveries & Therapeutics*, Bd. 7, Nr. 4, pp. 129-136, 2013.
- [185] A. R. Reynolds und N. Kyprianou, „Growth factor signalling in prostatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting,“ *British Journal of Pharmacology*, Bd. 147, pp.

- S144-S152, 2006.
- [186] N. Wang, Z.-Y. Wang, S.-L. Mo, T. Y. Loo, D.-M. Wang, H.-B. Luo, D.-P. Yang, Y.-L. Chen, J.-G. Shen und J.-P. Chen, „Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer,“ *Breast Cancer Research and Treatment*, Bd. 134, p. 943–955, 2012.
- [187] J. K. Kundu und Y.-J. Surh, „Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives,“ *Cancer Letters*, Bd. 269, pp. 243-261, 2008.
- [188] P. Jeandet, B. Delaunois, A. Aziz, D. Donnez, Y. Vasserot, S. Cordelier und E. Courot, „Metabolic Engineering of Yeast and Plants for the Production of the Biologically Active Hydroxystilbene, Resveratrol,“ *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Bd. 2012, p. 14, 2012.
- [189] A. Werries, Validierung von HPLC-Methoden zur Bestimmung von Polyphenolen und Carotinoiden in Möhren, Weizen und Mais unterschiedlicher Herkunft, Witzenhausen: Fachbereich Ökologischer Agrarwissenschaften der Universität Kassel/Witzenhausen, 2007.
- [190] D. Vergara, P. Simeone, D. Toraldo, P. Del Boccio, V. Vergaro, S. Leporatti, D. Pieragostino, A. Tinelli, S. De Domenico, S. Alberti, A. Urbani, M. Salzet, A. Santino und M. Maffia, „Resveratrol downregulates Akt/GSK and ERK signalling pathways in OVCAR-3 ovarian cancer cells,“ *Molecular BioSystems*, Bd. 8, pp. 1078-1087, 2012.
- [191] K. Sloan Stakleff, T. Sloan, D. Blanco, S. Marcanthony, T. D. Booth und A. Bishayee, „Resveratrol Exerts Differential Effects in Vitro and in Vivo against Ovarian Cancer Cells,“ *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Bd. 13, pp. 1333-1340, 2012.
- [192] H. Ferry-Dumazet, O. Garnier, M. Mamani-Matsuda, J. Vercauteren, F. Belloc, C. Billiard, M. Dupouy, D. Thiolat, J. P. Kolb, G. Marit, J. Reiffers und M. D. Mossalayi, „Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells,“ *Carcinogenesis*, Bd. 23, pp. 1327-1333, 2002.
- [193] C. K. Singh, J. George und N. Ahmad, „Resveratrol-based combinatorial strategies for cancer management,“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, Bd. 1290, pp. 113-121, 2013.
- [194] H. Miki, N. Uehara, A. Kimura, T. Sasaki, T. Yuri, K. Yoshizawa und A. Tsubura, „Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells,“ *International Journal of Oncology*, Bd. 40, pp. 1020-1028, 2012.
- [195] M. U. Nessa, P. Baele, C. Chan, J. Q. Yu und F. Huq, „Combinations of Resveratrol, Cisplatin and Oxaliplatin Applied to Human Ovarian Cancer Cells,“ *Anticancer Research*, Nr. 32, p. 53, 2012.
- [196] E. Berra, J. Milanini, D. E. Richard, M. Le Gall, F. Vinals, E. Gothié, D. Roux, G. Padès und J. Pouysségour, „Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia,“ *Biochemical Pharmacology*, Nr. 60, pp. 1171-1178, 2000.

- [197] G. Pagès, J. Milanini, D. E. Richard, E. Berra, E. Gothié, F. Vinals und J. Pouysségur, „Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade,“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, Nr. 902, pp. 187-200, 2000.
- [198] S. L. Tilghman, L. V. Rhodes, M. R. Bratton, P. Carriere, L. C. Preyan, S. M. Boue, T. S. Vasaitis, J. A. McLachlan und M. E. Burow, „Phytoalexins, miRNAs and Breast Cancer: A Review of Phytochemical-mediated miRNA Regulation in Breast Cancer,“ *Journal of Health Care for the Poor and Underserved*, Bd. 24, Nr. 1, pp. 36-46, 2013.
- [199] P.-L. Kuo, L.-C. Chiang und C.-C. Lin, „Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells,“ *Life Science*, Bd. 72, pp. 23-34, 2002.
- [200] A. Tyagi, R. P. Singh, C. Agarwal, S. Siriwardana, R. A. Scalfani und R. Agarwal, „Resveratrol causes Cdc2-tyr15 phosphorylation via ATM/ATR-Chk1/2-Cdc25C pathway as a central mechanism for S phase arrest in human ovarian carcinoma Ovar-3 cells,“ *Carcinogenesis*, Bd. 26, Nr. 11, pp. 1978-1987, 2005.
- [201] C. Lin, D. R. Crawford, S. Lin, J. Hwang, A. Sebuyira, R. Meng, J. E. Westfall, H.-Y. Tang, S. Lin, P.-Y. Yu, P. J. Davis und H.-Y. Lin, „Inducible COX-2-dependent apoptosis in human ovarian cancer cells,“ *Carcinogenesis*, Bd. 32, Nr. 1, pp. 19-26, 2011.
- [202] M. Björklund, J. Roos, V. Gogvadze und M. Shoshan, „Resveratrol induces SIRT1- and energy-stress-independent inhibition of tumor cell regrowth after low-dose platinum treatment,“ *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, Bd. 68, pp. 1459-1467, 2011.
- [203] Y.-C. Liang, S.-H. Tsai, L. Chen, S.-Y. Lin-Shiau und J.-K. Lin, „Resveratrol-induced G₂ arrest through the inhibition of CDK7 and p34^{CDC2} kinases in colon carcinoma HT29 cells,“ *Biochemical Pharmacology*, Bd. 65, pp. 1053-1060, 2003.
- [204] U. G. B. Haider, D. Sorescu, K. K. Griendling, A. M. Vollmar und V. M. Dirsch, „Resveratrol Increases Serine15-Phosphorylated but Transcriptionally Impaired p53 and Induces a Reversible DNA Replication Block in Serum-Activated Vascular Smooth Muscle Cells,“ *Molecular Pharmacology*, Bd. 63, pp. 925-932, 2003.
- [205] I. C. C. Low, Z. X. Chen und S. Pervaiz, „Bcl-2 Modulates Resveratrol-Induced ROS Production by Regulating Mitochondrial Respiration in Tumor Cells,“ *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, Nr. 13, pp. 807-819, 2010.
- [206] K. J. Jeong, K. H. Cho, N. Panupinthu, H. Kim, J. Kang, C. G. Park, G. B. Mills und H. Y. Lee, „EGFR mediates LPA-induced proteolytic enzyme expression and ovarian cancer invasion: Inhibition by resveratrol,“ *Molecular Oncology*, Bd. 7, pp. 121-129, 2013.
- [207] M. Isaka, A. Jaturapat, K. Rukseree, K. Danwisetkanjana, M. Tanticharoen und Y. Thebtaranonth, „Phomoxanthenes A and B, Novel Xanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phomopsis* Species,“ *Journal of Natural Products*, Bd. 64, Nr. 8, pp. 1015-1018, 2001.

- [208] Y. Shiono, T. Sasaki, F. Shibuya, Y. Yasuda, T. Koseki und U. Supratman, „Isolation of a phomoxanthone A derivative, a new metabolite of tetrahydroxanthone, from a *Phomopsis* sp. isolated from the mangrove, *Rhizophora mucronata*,“ *Natural Product Communications*, Bd. 8, Nr. 12, pp. 1735-1737, 2013.
- [209] D. Rösberg, *Neue Naturstoffe endophytischer Pilze aus Mangrovenpflanzen - Strukturaufklärung und Bioaktivität*, Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität, 2013.
- [210] M. Isaka, A. Jaturapat, K. Rukseree, K. Danwisetkanjana, M. Tanticharoen und Y. Thebtaranonth, „Phomoxanthones A and B, Novel Xanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phomopsis* Species,“ *Journal of Natural Products*, Bd. 64, pp. 1015-1018, 2001.
- [211] B. Elsässer, K. Krohn, U. Flörke, N. Root, H.-J. Aust, S. Draeger, B. Schulz, S. Antus und T. Kurtán, „X-ray Structure Determination, Absolute Configuration and Biological Activity of Phomoxanthone A,“ *European Journal of Organic Chemistry*, Bd. 2005, Nr. 21, pp. 4563-4570, 2005.
- [212] H. He, H. Y. Yang, R. Bigelis, E. H. Solum, M. Greenstein und G. T. Carter, „Pyrrocidines A and B, new antibiotics produced by a filamentous fungus,“ *Tetrahedron Letters*, Bd. 43, pp. 1633-1636, 2002.
- [213] D. T. Wicklow und S. M. Poling, „Antimicrobial Activity of Pyrrocidines from *Acremonium zeae* Against Endophytes and Pathogens of Maize,“ *Phytopathology*, Bd. 99, pp. 109-115, 2009.
- [214] X.-W. Li, A. Ear und B. Nay, „Hirsutellones and beyond: figuring out the biological and synthetic logics toward chemical complexity in fungal PKS-NRPS compounds,“ *Natural Products Report*, Bd. 30, pp. 765-782, 2013.
- [215] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe und F. Speleman, „Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes,“ *Genome Biology*, Nr. 3, pp. 0034.1-0034.11, 2002.
- [216] M. Kröger, K. Meyer-Rogge und S. K. Hemschemeier, „ChemgaPedia,“ 2008. [Online]. Available: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/gentechnik/prak_dna_isolierung.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden/reinheit_ns/reinheit_ns.vscml.html. [Zugriff am 29 Oktober 2014].
- [217] B. Schutte, R. Nuydens, H. Geerts und F. Ramaekers, „Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells,“ *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 86, pp. 63-69, 1998.
- [218] C. Riccardi und I. Nicoletti, „Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry,“ *Nature Protocols*, Bd. 1, Nr. 3, pp. 1458-1461, 2006.
- [219] A. Chan, R. Reiter, S. Wiese, G. Fertig und R. Gold, „Plasma membrane phospholipid asymmetry precedes DNA fragmentation in different apoptotic cell models,“ *Histochemistry and Cell Biology*, Bd. 110, Nr. 6, pp. 553-558, 1998.

- [220] A. P. Demchenko, „The Change of Cellular Membranes on Apoptosis: Fluorescence Detection,“ *Experimental Oncology*, Bd. 34, Nr. 3, pp. 263-268, 2012.
- [221] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken und C. Reutelingsperger, „A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V,“ *Journal of Immunological Methods*, Nr. 184, pp. 39-51, 1995.
- [222] K. M. Henkels und J. J. Turchi, „Cisplatin-induced Apoptosis Proceeds by Caspase-3-dependent and -independent Pathways in Cisplatin-resistant and -sensitive Human Ovarian Cancer Cell Lines,“ *Cancer Research*, Nr. 59, pp. 3077-3083, 1999.
- [223] W. O. Carter, P. K. Narayanan und J. P. Robinson, „Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells,“ *Journal of Leukocyte Biology*, Nr. 55, pp. 253-258, 1994.
- [224] M. A. Cotter, J. Thomas, P. Cassidy, K. Robinette, N. Jenkins, R. Scott, S. Leachman, W. E. Samlowski und D. Grossman, „N-acetylcysteine protects melanocytes against oxidative stress/damage and delays onset of UV-induced melanoma in mice,“ *Clin Cancer Res.*, Nr. 13, pp. 5952-5958, 2007.
- [225] H. Zhang, T. Mizumachi, J. Carcel-Trullols, L. Li, A. Naito, H. J. Spencer, P. Spring, B. R. Smoller, A. J. Watson, G. P. Margison, M. Higuchi und C.-Y. Fan, „Targeting Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase (hOGG1) to Mitochondria Enhances Cisplatin Cytotoxicity in Hepatoma Cells,“ *Carcinogenesis Advance Access*, 2007.
- [226] R. S. Arnold, J. Shi, E. Murad, A. M. Whalen, C. Q. Sun, R. Polavarapu, S. Parthasarathy, J. A. Petros und D. J. Lambeth, „Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1,“ *PNAS*, Nr. 98, pp. 5550-5555, 2001.
- [227] C.-C. Liang, A. Y. Park und J.-L. Guan, „In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro,“ *Nature Protocols*, Bd. 2, Nr. 2, pp. 329-333, 2007.
- [228] S. Karamohamed und G. Guidotti, „Bioluminometric Method for Real-Time Detection of ATPase Activity,“ *BioTechniques*, Bd. 31, pp. 420-425, 2001.
- [229] S. P. M. Crouch, R. Kozlowski, K. J. Slater und J. Fletcher, „The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity,“ *Journal of Immunological Methods*, Bd. 160, pp. 81-88, 1993.
- [230] C. Urban, Pharmakologische Charakterisierung und QSAR-basiertes Design neuartiger Liganden des FFAR1 (Freie-Fettsäure-Rezeptor), Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2012.
- [231] M. U. Kassack, B. Höfgen, J. Lehmann, N. Eckstein, J. M. Quillan und W. Sadée, „Functional Screening of G Protein-Coupled Receptors by Measuring Intracellular Calcium with a Fluorescence Microplate Reader,“ *Journal of Biomolecular Screening*, Bd. 7, pp. 233-246, 2002.
- [232] B. Györfy, A. Lanczky, A. C. Eklund, C. Denkert, J. Budczies, Q. Li und Z. Szallasi, „Kaplan-Meier-

- Plotter,“ October 2010. [Online]. Available: www.kmplot.com. [Zugriff am 27 March 2015].
- [233] S. Weikert, *Der Apoptose-Inhibitor Survivin: Ein Tumormarker mit dem Expressionsprofil eines Cancer/Testis-Antigens*, Berlin: Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2007.
- [234] C. C. S. Chini und J. Chen, „Human Claspin Is Required for Replication Checkpoint Control,“ *The Journal of Biological Chemistry*, Bd. 278, Nr. 32, pp. 30057-30062, 2003.
- [235] S.-Y. Lin, G. S. Stewart und S. J. Elledge, „Human Claspin works with BRCA1 to both positively and negatively regulate cell proliferation,“ *PNAS*, Bd. 101, Nr. 17, pp. 6484-6489, 2004.
- [236] S. K. Calderwood, M. A. Stevenson und A. Murshid, „Heat Shock Proteins, Autoimmunity, and Cancer Treatment,“ *Autoimmune Diseases*, Bd. 2012, Nr. ID 486069, p. 10, 2012.
- [237] J. E. Ziello, I. S. Jovin und Y. Huang, „Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia,“ *Yale Journal of Biology and Medicine*, Bd. 80, pp. 51-60, 2007.
- [238] H. P. Glauert, K. Calfee-Mason, D. N. Stemm, J. C. Tharappel und B. T. Spear, „Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: A review,“ *Molecular Nutrition and Food Research*, Bd. 54, pp. 875-896, 2010.
- [239] R. F. Ozols, M. A. Bookman, D. C. Connolly, M. B. Daly, A. K. Godwin, R. J. Schilder, X. Xu und T. C. Hamilton, „Focus on epithelial ovarian cancer,“ *Cancer Cell*, Bd. 5, pp. 19-24, 2004.
- [240] K. Aabo, M. Adams, P. Adnitt, D. Alberts, A. Athanazziou, V. Barley, D. Bell, U. Bianchi, G. Bolis, M. Brady, H. Brodovsky, H. Bruckner, M. Buyse, R. Canetta, V. Chylak, C. Cohen, N. Colombo, P. F. Conte, D. Crowther, J. H. Edmonson, C. Gennatas, E. Gilbey, M. Gore, D. Guthrie, S. B. Kaye, A. H. Laing, F. Landoni, R. C. Leonard, C. Lewis, P. Y. Liu, C. Mangioni, S. Marsoni, H. Meerpohl, G. A. Omura, M. K. B. Parmar, J. Pater, S. Pecorelli, M. Presti, W. Sauerbrei, D. V. Skarios, R. V. Smalley, H. J. Solomon, L. A. Stewart, J. F. G. Sturgeon, M. H. N. Tattersall, J. T. Wharton, W. W. ten Bokkel Huinink, M. Tomirotti, W. Torri, C. Trope, M. M. Turbow, J. B. Vermorken, M. J. Webb, D. W. Wilbur, C. J. Williams, E. Wiltshaw und B. Y. Yeap, „Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials,“ *British Journal of Cancer*, Bd. 78, pp. 1479-1487, 1998.
- [241] H. S. Aiyer, A. M. Warri, D. R. Woode, L. Hilakivi-Clarke und R. Clarke, „Influence of Berry-Polyphenols on Receptor Signaling and Cell-Death Pathways: Implications for Breast Cancer Prevention,“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Bd. 60, Nr. 23, pp. 5693-5708, 2012.
- [242] M. A. Núñez-Sánchez, A. González-Sarrias, M. Romo-Vaquero, R. Garcia-Villalba, M. V. Selma, F. A. Tomás-Barberán, M.-T. Garcia-Conesa und J. C. Espin, „Dietary phenolics against colorectal cancer. From promising preclinical results to poor translation into clinical trials: pitfalls and future needs,“ *Molecular Nutrition & Food Research*, Nr. 10.1002/mnfr.201400866, p. 36, 2015.
- [243] J. N. Losso, R. R. Bansode, A. Trappey II, H. A. Bawadi und R. Truax, „In vitro anti-proliferative

- activities of ellagic acid," *Journal of Nutritional Biochemistry*, Bd. 15, pp. 672-678, 2004.
- [244] J. J. Bravo-Cordero, L. Hodgson und J. Condeelis, „Directed Cell Invasion and Migration During Metastasis," *Current opinion in cell biology*, Bd. 24, Nr. 2, pp. 277-283, 2012.
- [245] N. Eckstein, K. Servan, L. Girard, D. Cai, G. von Jonquieres, U. Jaehde, M. U. Kassack, A. F. Gazdar, J. D. Minna und H.-D. Royer, „Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Analysis Identifies Amphiregulin as a Key Factor for Cisplatin Resistance of Human Breast Cancer Cells," *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 283, pp. 739-750, 2008.
- [246] N. Gottschalk, R. Kimming, S. Lang, M. Singh und S. Brandau, „Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Antibodies Overcome Resistance of Ovarian Cancer Cells to Targeted Therapy and Natural Cytotoxicity," *International Journal of Molecular Sciences*, Bd. 13, pp. 12000-12016, 2012.
- [247] S. Zhuang und R. G. Schnellmann, „A Death-Promoting Role for Extracellular Signal-Regulated Kinase," *The Journal of Pharmacology*, Bd. 319, Nr. 3, pp. 991-997, 2006.
- [248] A. F. C. Okines, A. R. Reynolds und D. Cunningham, „Targeting Angiogenesis in Esophagogastric Adenocarcinoma," *The Oncologist*, Bd. 16, Nr. 6, pp. 844-858, 2011.
- [249] R. B. Hamanaka und N. S. Chandel, „Targeting glucose metabolism for cancer therapy," *The Journal of Experimental Medicine*, Bd. 209, Nr. 2, pp. 211-215, 2012.
- [250] J. R. McCarrey, M. Kumari, M. J. Aivaliotis, Z. Wang, P. Zhang, F. Marshall und J. L. Vandenberg, „Analysis of the cDNA and Encoded Protein of the Human Testis-Specific *PGK-2* Gene," *Developmental Genetics*, Bd. 19, pp. 321-332, 1996.
- [251] A. M. Michelson, A. F. Markham und S. H. Orkin, „Isolation and DNA sequence of a full-length cDNA clone for human X chromosome-encoded phosphoglycerate kinase," *PNAS*, Bd. 80, pp. 472-476, 1983.
- [252] O. Warburg, „On the Origin of Cancer Cells," *Science*, Bd. 123, pp. 309-314, 1956.
- [253] O. Warburg, F. Wind und E. Negelein, „The Metabolism of Tumors in the Body," *The Journal of General Physiology*, Bd. 8, pp. 519-530, 1927.
- [254] Y. Zhao, E. B. Butler und M. Tan, „Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics," *Cell Death and Disease*, Bd. 4, Nr. e532, p. 10, 2013.
- [255] H. J. Broxterman, H. M. Pinedo, C. M. Kuiper, G. J. Schuurhuis und J. Lankelma, „Glycolysis in P-glycoprotein-overexpressing human tumor cell lines. Effects of resistance-modifying agents," *FEBS Letters*, Bd. 247, pp. 405-410, 1989.
- [256] S. de Jong, M. Holtrop, H. de Vries, E. G. E. de Vries und N. H. Mulder, „Increased sensitivity of an adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell line to mitochondrial inhibitors," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 182, pp. 877-885, 1992.

- [257] D. Zieker, S. Bühler, Z. Üstündag, I. Königsrainer, S. Manncke, K. Bajaeifer, J. Vollmer, F. Fend, H. Northoff, A. Königsrainer und J. Glatzke, „Induction of tumor stem cell differentiation—novel strategy to overcome therapy resistance in gastric cancer,“ *Langenbecks Arch Surg.*, Bd. 398, pp. 603-608, 2013.
- [258] H. Yan, K. Yang, H. Xiao, Y.-J. Zou, W.-B. Zhang und H.-Y. Liu, „Over-Expression of Cofilin-1 and Phosphoglycerate Kinase 1 in Astrocytomas Involved in Pathogenesis of Radioresistance,“ *CNS Neuroscience & Therapeutics*, Bd. 18, pp. 729-736, 2012.
- [259] F. Luo, X. Liu, N. Yan, S. Li, G. Cao, Q. Cheng, Q. Xia und H. Wang, „Hypoxia-inducible transcription factor-1 α promotes hypoxia-induced A549 apoptosis via a mechanism that involves the glycolysis pathway,“ *BioMed Central Cancer*, Bd. 6, p. 26, 2006.
- [260] M. A. Aon, N. Bhatt und S. C. Cortassa, „Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess,“ *Frontiers in Physiology*, Bd. 5, Nr. 282, p. 13, 2014.
- [261] S. Sun, X. Liang, X. Zhang, T. Liu, Q. Shi, Y. Song, Y. Jiang, H. Wu, Y. Jiang, X. Lu und D. Pang, „Phosphoglycerate kinase-1 is a predictor of poor survival and a novel prognostic biomarker of chemoresistance to paclitaxel treatment in breast cancer,“ *British Journal of Cancer*, Bd. 112, pp. 1332-1339, 2015.
- [262] F. Stuhldreier, S. Kassel, L. Schumacher, S. Wesselborg, P. Proksch und G. Fritz, „Pleiotropic effects of spongian alkaloids on mechanisms of cell death, cell cycle progression and DNA damage response (DDR) of acute myeloid leukemia (AML) cells,“ *Cancer Letters*, Bd. 361, pp. 39-48, 2015.
- [263] C. Shi, M.-J. Xu, M. Bayer, Z.-W. Deng, M. H. G. Kubbutat, W. Wätjen, P. Proksch und W.-H. Lin, „Phenolic compounds and their anti-oxidative properties and protein kinase inhibition from the Chinese mangrove plant *Laguncularia racemosa*,“ *Phytochemistry*, Bd. 71, Nr. 4, pp. 435-442, 2010.
- [264] P. Bose, G. L. Simmons und S. Grant, „Cyclin-dependent kinase inhibitor therapy for hematologic malignancies,“ *Expert Opinion on Investigational Drugs*, Bd. 22, Nr. 6, pp. 723-738, 2013.
- [265] K. E. Sheppard und G. A. McArthur, „The Cell-Cycle Regulator CDK4: An Emerging Therapeutic Target in Melanoma,“ *Clinical Cancer Research*, Bd. 19, Nr. 9, pp. 5320-5238, 2013.
- [266] M. G. Wilkinson und J. B. A. Millar, „Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways,“ *The FASEB Journal*, Bd. 14, pp. 2147-2157, 2000.
- [267] A. Bobba, A. Atlante, S. Giannattasio, G. Sgaramella, P. Calissano und E. Marra, „Early release and subsequent caspase-mediated degradation of cytochrome c in apoptotic cerebellar granule cells,“ *FEBS Letters*, Bd. 457, pp. 126-130, 1999.
- [268] R. Jemmerson, B. LaPlante und A. Treeful, „Release of intact, monomeric cytochrome c from apoptotic and necrotic cells,“ *Cell Death and Differentiation*, Bd. 9, pp. 538-548, 2002.

- [269] Q.-H. Yang, R. Church-Hajduk, J. Ren, M. L. Newton und C. Du, „Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis,“ *Genes & Development*, Bd. 17, pp. 1489-1496, 2003.
- [270] S. M. Srinivasula und J. D. Ashwell, „IAPs: What’s in a name?,“ *Molecular Cell*, Bd. 30, Nr. 2, pp. 123-135, 2008.
- [271] M. Gyrd-Hansen und P. Meier, „IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-κB, inflammation and cancer,“ *Nature Reviews Cancer*, Bd. 10, pp. 561-574, 2010.
- [272] U. Sarangi, M. K. Singh, K. V. V. Abhhijnya, L. P. A. Reddy, B. S. Prasad, V. V. Pitke, K. Paithankar und A. S. Sreedhar, „Hsp60 Chaperonin Acts as Barrier to Pharmacologically Induced Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Tumor Cells with Differential Stress Response,“ *Drug Target Insights*, Bd. 7, pp. 35-51, 2013.
- [273] U. Ramp, C. Mahotka, S. Helkaus, T. Shibata, M. O. Grimm, R. Willers und H. E. Grabbert, „Expression of heat shock protein 70 in renal cell carcinoma and its relation to tumor progression and prognosis,“ *Histology and Histopathology*, Bd. 22, pp. 1099-1107, 2007.
- [274] M. Guha und D. C. Altieri, „Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks,“ *Cell Cycle*, Bd. 8, Nr. 17, pp. 2708-10, 2009.
- [275] G. Hajnóczky, E. Davies und M. Madesh, „Calcium signaling and apoptosis,“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 304, pp. 445-454, 2003.
- [276] L. Lipskaia, J.-S. Hulot und A.-M. Lompré, „Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation,“ *European Journal of Physiology*, Bd. 457, Nr. 3, pp. 673-685, 2009.
- [277] C. Giorgi, F. Baldassari, A. Bononi, M. Bonora, E. De Marchi, S. Marchi, S. Missiroli, S. Patergnani, A. Rimessi, J. M. Suski, M. R. Wieckowski und P. Pinton, „Mitochondrial Ca²⁺ and apoptosis,“ *Cell calcium*, Bd. 52, Nr. 1, pp. 36-43, 2012.
- [278] S. L. Yang, Q. Cao, K. C. Zhou, Y. J. Feng und Y. Z. Wang, „Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer,“ *Oncogene*, Bd. 28, pp. 1320-1328, 2009.

Abkürzungen

Tabelle 25: Liste der verwendeten Abkürzungen.

AA	Ascorbinsäure
ABC	ATP-binding cassette
Apaf1	Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary units
BCA	Bicinchoninsäure
3-BrPy	3-Brompyruvat
Ca ²⁺	Calcium-Ionen, zweifach positiv geladen
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDDP	Cisplatin
CDK	Cyclin-dependent Kinase
clAP	Cellular Inhibitor of Apoptose Protein
CisR	Cisplatinresistent
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTR	Copper Transporter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	Dichlorofluorescein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Ellag	Ellagsäure
Em	Emissionswellenlänge
EmbA	Embellicin A
EmbB	Embellicin B
ER	Estrogen Rezeptor
ErbB2	Siehe HER2

ErbB3	Siehe HER3
ErbB4	Siehe HER4
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	et altera (und andere)
Ex	Extinktionswellenlänge
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FADH ₂	reduzierte Form des Flavin-Adenin-Dinukleotids
FBS	Fetal bovine serum (FKS = Fetales Kalbserum)
FSC	Forward scatter
g	Gramm
h	Stunde (hour)
H ₂ DCF-DA	2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDAC	Histon-Deacetylasen
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HER3	Human Epidermal Growth Factor Receptor 3
HER4	Human Epidermal Growth Factor Receptor 4
HIF-1 α	Hypoxie-induzierte Faktor 1 α
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration bei halbmaximaler Wirkung
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
kg	Kilogramm
L	Liter
LC-MS	Liquidchromatography-massspectrometer (Flüssigkeitschromatographier-Massenspektrometer)
M	Molar (mol/L)
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar (μmol/L)
mM	Millimolar (mmol/L)
mL	Milliliter
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
m/z	Masse pro Ladung
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
(NH ₃) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
nm	Nanometer
NP-40	Nonoxinol 40
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OCT	Organic Cation Transporter
OG	Oregon Green® 488 BAPTA-1, AM
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen	Penicillin
PGK1	Phosphoglycerat-Kinase-1
pH	Wasserstoffionen-Exponent
phA	Phomoxanthon A
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositol-3-kinase
pIC ₅₀	Negativer dekadischer Logarithmus von IC ₅₀
PIP ₃	Phosphoinositid-Trisphosphat

PR	Progesteron Rezeptor
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QVD	Q-VD-Oph (unspezifischer Caspase-Inhibitor)
rcf	Relative centrifugal force
Resv	Resveratrol
RLU	Relative luminescence units
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ROS	Reaktive oxidative Spezies
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	Standard-Fehler aus den gemittelten Experimenten
sens	cisplatin sensitiv
SSC	Side scatter
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription-3
Strep	Streptomycin
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNBC	Triple-negatives Mammakarzinom
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	TNF-Rezeptor-assoziiertes Protein
U/mL	Units/Milliliter
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
v/v	Volumenkonzentration

Danksagung

Hiermit möchte ich allen Freunden und Kollegen sowie der Familie danken, die mich während der Zeit der Promotion mit Taten und moralischen Zusprüchen unterstützt haben.

Ich danke Prof. Dr. Matthias U. Kassack, meinem Doktorvater, dass er mir die Möglichkeit zur Promotion gegeben und mir ein interessantes Themengebiet zugeteilt hat. Die gemeinsamen Gespräche gaben stets Anreiz für neue Versuchsdurchführungen.

Mein Dank gilt Dr. Alexandra Hamacher, die mich bei schwierigen und unklaren Problematiken immer unterstützt hat. Besonders ihr Witz und ihre aufmunternden Zusprüche sowie ihr Quell an Ideen haben den Tag nie langweilig werden lassen.

Meiner lieben Freundin und Kollegin Nicole Brockmann danke ich für ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft im Labor. Sie unterstützte mich bei der Durchführung und Auswertung der PCR und zeigte mir die Handhabung für die Bestimmung von intrazellulären Calcium-Ionen. Außerdem konnte durch sie die Bestimmung von Doppelstrangbrüchen durchgeführt werden. Sie hatte immer ein offenes Ohr und half, bei Freizeitaktivitäten oder im gemeinsamen Urlaub mal abzuschalten und die Zeit zu genießen.

Ich danke meinen Kollegen Katharina Gohr, Ana Moita, David Müller und Parichat Surechatchaiyan für die gute Zusammenarbeit. Neben den konstruktiven Gesprächen und ihrer Hilfsbereitschaft waren die abendlichen Treffen zum Nähen von Karnevalskostümen oder Waffelessen immer sehr lustig. Die Mittagspausen am Freitag waren das Highlight der Woche. Meiner Kollegin Magdalene Matyja danke ich für ihre helfenden Hände im Labor und die mütterliche Art, wenn es einem mal schlecht ging. Gemeinsam mit Dr. Alexandra Hamacher zeigte sie mir die richtige Handhabung mit der Zellkultur und den Zytostatika. Kathrin Christoph danke ich für die Unterstützung bei Screening-Experimenten.

Meinen ehemaligen Kollegen Dr. Susanne Eberle, Dr. Christian Urban, Dr. Daniel Eßer und Andreas Nüchter danke ich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis. Sie waren stets

offen für Fragen und erklärten geduldig die Prinzipien bei Experimenten oder administrative Vorgehensweisen.

Ich danke Prof. Dr. Peter Proksch für das Übernehmen des Zweitgutachtens. Außerdem möchte ich ihm für die Bereitstellung verschiedener Substanzen danken, ohne die ein Teil dieser Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Dr. Andreas Marmann und Dr. David Rösberg danke ich für die Unterstützung bei der Klärung von substanzspezifischen Eigenschaften.

Ich danke Tatiana Hennicke für Ihre Unterstützung bei der Bestimmung von Doppelstrangbrüchen. Sie stellte manche Utensilien zur Verfügung und half bei der Handhabung des Fluoreszenzmikroskops.

Mein Dank gilt meinen Freunden Dr. Sanaz Spitzley und Carmen Stomberg, die mich während des Studiums und der Promotionszeit begleitet haben. Die Treffen waren immer voller Lachen. Die föhlichen Treffen waren ein willkommener Ausgleich zu dem Stress während des Studiums und später während der Promotion.

Meinen Schulfreunden Nastasja Axler und Sarah von Ameln danke ich für ihre Freundschaft. Trotz des zeitraubenden Studiums und der folgenden Promotion haben sie mich nicht aufgegeben und an unserer Freundschaft festgehalten. Mit Ratschlägen standen sie mir immer zur Seite.

Ich danke meinen Eltern Evagelia und Uwe Engelke sowie meinem Bruder Christian und seiner Frau Anna Engelke, die immer an mich geglaubt haben und mir Mut zugesprochen haben. Sie waren immer von meinen Erzählungen über meine Projekte fasziniert. Mit ihrer freundlichen, lustigen, lauten Art haben Sie mir Trost gespendet und mich aufgemuntert. Besonders verdanke ich meinen Eltern das Studium, das ich ohne ihre Unterstützung nicht hätte absolvieren können.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Großmutter Hanna Engelke, die immer für mich da gewesen ist. Sie hat mich gelehrt, diszipliniert eine Sache durchzuführen und nie aufzugeben, stark und geduldig zu sein.

Ich danke meinen Schwiegereltern Monika und Johannes Heffels, meinen Schwägerinnen Pia Seefeld und Celine Heffels sowie meinen Schwiegergroßeltern Theresia und Gottfried Sass für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung. Bei den lustigen Familientreffen haben sie immer Interesse an meiner Forschung gezeigt und mich liebevoll in die Familie aufgenommen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Dr. Kai Engelke, der hinsichtlich seines beruflichen und privaten Werdeganges mein Vorbild ist. Er hatte immer Verständnis und Geduld. Sein Glauben an mich, bestärkte mich, an meinem Ziel festzuhalten und nicht aufzugeben. Seine Liebe und Fürsorglichkeit waren Balsam in schwierigen Zeiten. Mit seinem Humor gewann er immer ein Lachen. Meine Liebe ist ihm immer gewiss!

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die meisten Methoden, die zur Anfertigung dieser Arbeit erforderlich waren, wurden von mir ausgeführt.

Die Naturstoffe Phomoxanthon A, Embellicin A und Embellicin B wurden freundlicherweise aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Proksch vom Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie zur Verfügung gestellt. Die Messungen der Naturstoffe am LC-Massenspektrometer wurden von Herrn Dr. Andreas Marmann aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. Peter Proksch durchgeführt.

Die Bestimmung der Doppelstrangbrüche über γ -H2AX wurde von Nicole Brockmann und Tatiana Hennicke im Arbeitskreis Prof. Dr. Gerhard Fritz im Institut für Toxikologie durchgeführt.

Die Dissertation wurde in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 09. Mai 2015

Laura Engelke