

Identifizierung differentiell aktivierter regulatorischer Netzwerke im therapieresistenten Ovarialkarzinom

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Johanna Naskou
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Januar 2019

aus dem Forschungslabor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am
Universitätsklinikum Düsseldorf der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Hans Neubauer
2. Prof. Dr. Constantin Czekelius

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2019

meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden im Manuskript „*ATM promotes therapy resistance of serous ovarian cancers to Carboplatin and Paclitaxel combinational treatment in the absence of EZH2*“ (Naskou et al.) zur Veröffentlichung eingereicht.

1 Zusammenfassung (deutsch)

Die Mechanismen der intrinsischen Resistenz seröser Ovarialkarzinome gegenüber der Standardbehandlung mit Carboplatin und Paclitaxel sind derzeit nicht vollständig verstanden. Um aktivierte Proteinnetzwerke in resistenten Tumoren zu identifizieren, wurden zunächst 17 primäre seröse Ovarialkarzinome, die anhand ihres krankheitsfreien Überlebens nach einer Standardbehandlung als therapiesensitiv oder -resistent klassifiziert wurden, mit der DigiWest-Methode hinsichtlich differentiell exprimierter und phosphorylierter Proteine untersucht. Es wurden in sensitiven Tumorproben überwiegend erhöhte Mengen von Proteinen vorgefunden, die Mitose und Zellproliferation fördern und zu den typischen Eigenschaften einer Tumorzelle gehören. Eines der am stärksten exprimierten Proteine in sensitiven Tumoren war die Histon-Methyltransferase EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*). Ein Protein, welches mit EZH2 interagiert und in der Zellzyklus-Kontrolle wirkt, ist ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*). Eine Überlebensanalyse von 616 Ovarialkarzinom-Patientinnen, die mit Carboplatin und Paclitaxel behandelt wurden, bestätigte ein verbessertes progressionsfreies Überleben bei einer hohen EZH2-Expression im Tumor. In Patientinnen mit einer niedrigen EZH2-Expression im Tumor führt ein hoher ATM-Gehalt zu einem signifikant schlechteren Überleben verglichen mit denen, die einen niedrigen ATM-Gehalt aufweisen. Ein Proximity Ligation Assay bestätigte weiterhin einen Zusammenhang zwischen einer vermehrten Co-Lokalisation von ATM und EZH2 und einem verbesserten krankheitsfreien Überleben in Tumoren von Ovarialkarzinom-Patientinnen. Um diese Beobachtungen zu verifizieren, wurden In-vitro-Untersuchungen an verschiedenen Ovarialkarzinom-Zelllinien durchgeführt. Dabei steigerte die Reduktion von EZH2 in der sensitiven Zelllinie A2780 die Resistenz gegenüber einer Einzel- sowie Kombinationstherapie mit Carboplatin und Paclitaxel. Wurden EZH2 und ATM gleichzeitig supprimiert, hatte dies keine Auswirkung auf die Resistenz der Zellen, was auf einen regulatorischen und inhibierenden Einfluss von EZH2 auf ATM hindeutet. In einem weiteren Proteinscreening konnte in EZH2-supprimierten Zellen ein Rückgang an Mitose-fördernden Proteinen beobachtet werden, sowie eine Zunahme von Proteinen, die Zellzykluskontrollpunkte beeinflussen. In einem reziproken Ansatz führte die Überexpression von EZH2 in SKOV3-Zellen zu einem erhöhten Ansprechen auf eine Kombinationsbehandlung.

Zusammenfassend konnte durch die Analyse der Tumorproben von Ovarialkarzinom-Patientinnen mit einem unterschiedlich klinischen Verlauf ein noch nicht bekannter regulatorischer Einfluss von EZH2 auf ATM identifiziert werden. Durch die Abwesenheit von EZH2 wird via ATM die Zellzyklusprogression gehemmt, was resistenten Ovarialkarzinom-Zellen dazu verhilft, der Wirkung von Carboplatin und Paclitaxel temporär zu entgehen.

2 Zusammenfassung (englisch)

The mechanisms of intrinsic resistance of serous ovarian cancers to standard treatment with carboplatin and paclitaxel are poorly understood. Seventeen primary serous ovarian cancers classified as sensitive or resistant according to the disease-free survival of the patients after standard treatment were tested with a protein screening method called DigiWest in order to identify activated protein signaling pathways. Increased amounts of proteins having a mitosis-promoting and pro-proliferative functions were found in sensitive patient samples, depicting typical features of a cancer cell. Furthermore, the histone-methyltransferase EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*) was identified as one of the most highly expressed proteins in tumors of sensitive patients. ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) is an interaction partner of EZH2 and involved in cell cycle control mechanisms. A survival analysis of 616 patients treated with Carboplatin and paclitaxel confirmed, that a high EZH2 expression in tumors is associated with improved progression-free survival of patients. Interestingly, a high level of ATM in tumors resulted in a significantly decreased survival of patients compared to the ones having low ATM levels and a low EZH2 expression in tumors. A proximity ligation assay further confirmed a colocalization of EZH2 and ATM in tumors with an improved disease-free survival of patients. To verify these observations, *in vitro* studies were performed on various ovarian carcinoma cell lines. A reduction of EZH2 in A2780 cells promoted resistance to single and combination therapy with carboplatin and paclitaxel. The reduction of EZH2 together with ATM did not affect the resistance behavior of the cells, indicating a regulatory and inhibitory effect of EZH2 on ATM. In another protein screening of EZH2-suppressed cells, a decrease in mitotic-promoting proteins as well as an increase in cell cycle checkpoint-inducing factors was observed. Overexpression of EZH2 in SKOV3 cells further increased the response to combinational treatment in a reciprocal approach.

In summary, the analysis of tumor samples from ovarian cancer patients with a different clinical course has identified an until now unknown regulatory effect of EZH2 on ATM. The absence of EZH2 causes an inhibition of cell cycle progression via ATM, thus enabling ovarian cancer cells to temporarily evade combinational treatment with carboplatin and paclitaxel.

3 Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung (deutsch)	I
2	Zusammenfassung (englisch)	III
3	Inhaltsverzeichnis	1
4	Abkürzungsverzeichnis	VII
5	Tabellenverzeichnis	X
6	Abbildungsverzeichnis	XII
7	Einleitung	1
7.1	Die Karzinogenese	1
7.1.1	Der Zellzyklus	2
7.2	Das Ovarialkarzinom	4
7.2.1	Pathogenese und Subklassifizierung	4
7.2.2	Subgruppen und Stadienbestimmung	6
7.2.3	Risikofaktoren und Prädispositionsfaktoren	7
7.2.4	Epidemiologie und Inzidenzraten	8
7.3	Therapie des Ovarialkarzinoms	9
7.3.1	Erstlinientherapie	10
7.3.2	Rezidivtherapie	10
7.4	Wirkungsweise der chemotherapeutischen Agenzien	12
7.4.1	Carboplatin	12
7.4.2	Paclitaxel	14
7.4.3	Synthetische Letalität	15
7.5	Vorarbeiten	17
7.6	Ziel der Studie	18
8	Material und Methoden	19
8.1	Material	19
8.1.1	Patientenkollektive	19
8.1.2	Antikörper und Farbstoffe	21
8.1.3	Zelllinien und Kultivierungsmedien	23
8.1.4	Oligonukleotide	24
8.1.5	Vektoren	25

8.1.6	Enzyme	25
8.1.7	Verwendete Kits.....	26
8.1.8	Puffer, Lösungen und Standards.....	27
8.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	29
8.1.10	Chemikalien	30
8.1.11	Geräte	31
8.1.12	Software	32
8.2	Methoden.....	33
8.2.1	DigiWest Proteinarray-Analyse.....	33
8.2.2	DNA-Sequenzierung.....	35
8.2.3	In-silico-Analyse von mRNA-Expressionsdatensätzen	40
8.2.4	Gen-Ontologie-Analyse	40
8.2.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	41
8.2.6	Immunhistochemische Färbung	41
8.2.7	Proximity Ligation Assay	44
8.2.8	Kultivierung von Zelllinienzellen	47
8.2.9	Western Blot.....	48
8.2.10	RNA-Interferenz von EZH2 und ATM	49
8.2.11	ATP-Chemosensitivitätstest.....	49
8.2.12	EZH2-Plasmid Klonierung und Konstruktion eines Leervektors.....	50
9	Ergebnisse.....	54
9.1	Erstellung eines Proteinprofils klinisch dokumentierter therapiesensitiver und -resistenter Ovarialkarzinome.....	54
9.1.1	Proteinarray-Untersuchung mittels DigiWest-Technologie.....	54
9.1.2	DNA-Sequenzierung von Genen mit zentralen regulatorischen Funktionen	59
9.1.3	Abgleich des ATM-Proteinexpressionsprofils.....	62
9.2	Validierung von Kandidatenproteinen in unabhängigen Patientenkohorten	65
9.2.1	Evaluierung der differentiellen Proteinexpression anhand öffentlich zugänglicher Expressionsdatensätze.....	65
9.2.2	Färbung von Tumorgewebe – Tissue Microarray	70
9.3	Funktionelle Charakterisierung der Kandidatenproteine in Zelllinien	78
9.3.1	Bestimmung der Resistenzstatus.....	78
9.3.2	Korrelationsanalysen der Expression identifizierter Proteine zum ermittelten Resistenzverhalten	80
9.3.3	Reduktion der endogenen Proteinexpression von EZH2 und ATM in A2780 mittels RNA-Interferenz	83

9.3.4	Überexpression von exogenem EZH2 in der Zelllinie SKOV3	90
9.3.5	Co-Lokalisation von EZH2 und ATM in A2780 nach Exposition gegenüber den chemotherapeutischen Agenzien	93
10	Diskussion	95
	Studienlage zur Therapieresistenz im Ovarialkarzinom	95
	Proteinarray-Untersuchung mittels DigiWest-Technologie	97
	DNA-Sequenzierung von Genen mit zentralen regulatorischen Funktionen	103
	Abgleich des ATM-Proteinexpressionsprofils.....	107
	Evaluierung der differentiellen Proteinexpression anhand öffentlich zugänglicher Expressionsdatensätze.....	109
	Immunmarkierung von primärem Tumormaterial	111
	Funktionelle Charakterisierung der Kandidatenproteine in Ovarialkarzinom-Zelllinien	115
	Reduktion und Überexpression der Proteinexpression von EZH2 und ATM in Ovarialkarzinom- Zelllinien.....	118
	Schlussfolgerung	120
	Ausblick.....	121
11	Literaturverzeichnis	123
12	Anhang.....	140
13	Danksagung.....	149
14	Eidesstattliche Versicherung.....	151

4 Abkürzungsverzeichnis

*	Signifikanzwert $p \leq 0,05$
**	Signifikanzwert $p \leq 0,01$
***	Signifikanzwert $p \leq 0,001$
%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Adenin
ABC-Transporter	<i>ABC-Transporter Superfamily</i>
ANOVA	Analysis of Variance, Varianzanalyse
ARID1A	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 1A</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia And Rad3 Related Protein</i>
AUC	<i>area under the curve</i> , Fläche unter der Kurve
Aurora B	<i>Aurora Kinase B</i>
bp	Basenpaare
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer Susceptibility Protein Type 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer Susceptibility Protein Type 2</i>
C	Cytosin
C-Raf	<i>Raf-1 proto-oncogene</i>
c.	Position in der codierenden DNA eines Gens
CA125	<i>Cancer-Antigen 125</i>
CAS	Chemical Abstracts Service
CP	Carboplatin
CPTX	Carboplatin und Paclitaxel
CTNNB1	<i>Catenin beta-1</i>
Cy5	Cyanin 5
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>ERBB2</i>	<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2, HER-2/Neu</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EZH2	<i>Enhancer of Zeste Homolog 2</i>
FDA	U. S. Food and Drug Administration

FFPE	<i>formalin-fixed paraffin-embedded, Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet</i>
FITC	Fluorescein
g	Gramm
G	Guanin
G418	Geneticin
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
GO	Gen-Ontologie
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HRP	<i>horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Ki-67	Proliferationsmarker <i>Protein Ki-67</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
l	Liter
m	Meter
M	mol/l
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mol	Mol
mRNA	messenger RNA
n	Nano
n. s.	nicht signifikant
NGS	Next Generation Sequencing
NM_	Referenzsequenz Protein-codierendes Transkript
nt	Nukleotide
p	phosphoryliertes
p-Wert	Signifikanzwert
p.	Position in der Aminosäuresequenz eines Proteins
PARP1	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLA	Proximity Ligation Assay
PLK1	<i>Polo-Like Kinase 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTM	Pavlidis Template Matching
PVDF	Polyvinylidenfluorid

Q-Q	Quantil-Quantil
qPCR	quantitative PCR
Rb	<i>Retinoblastoma-Associated Protein</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
S	Serin (vor einer Aminosäuresequenz-Position)
SDS	Natriumlaurylsulfat/Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Ser	Serin
T	Threonin (vor einer Aminosäuresequenz-Position)
T	Thymin (vor einer Basensequenz-Position)
T3	Tag 3
T6	Tag 6
Thr	Threonin
TP53/p53	<i>Tumor Protein P53</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TX	Paclitaxel
U	Enzymeinheit
UFK	Universitätsfrauenklinik
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
μ	Mikro

5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 7.1 Ovarialkarzinom-Subtypen und ihre genetischen Profile.	7
Tabelle 8.1 Zusammenfassung der klinischen Parameter der in der Studie erfassten Patientinnen.....	20
Tabelle 8.2 Verwendete Primärantikörper in der Studie.	21
Tabelle 8.3 Verwendete Sekundärantikörper in der Studie.	22
Tabelle 8.4 Verwendete Proteine und Farbstoffe in der Studie.	22
Tabelle 8.5 Verwendete Zelllinien in der Studie.	23
Tabelle 8.6 Verwendete Zellkulturmedien in der Studie.....	23
Tabelle 8.7 Verwendete siRNA in der Studie.	24
Tabelle 8.8 Verwendete Primer in der Studie.....	24
Tabelle 8.9 Verwendete Vektoren in der Studie.....	25
Tabelle 8.10 Verwendete Enzyme in der Studie.....	25
Tabelle 8.11 Verwendete Kits in der Studie.	26
Tabelle 8.12 Verwendete Puffer, Lösungen und Standards in der Studie.....	27
Tabelle 8.13 Verwendete Verbrauchsmaterialien in der Studie.....	29
Tabelle 8.14 Verwendete Chemikalien in der Studie.....	30
Tabelle 8.15 Verwendete Geräte in der Studie.	31
Tabelle 8.16 Verwendete Software in der Studie.	32
Tabelle 8.17 PCR-Programm der BRAF V600 Amplifizierung.	35
Tabelle 8.18 Liste der analysierbaren Gene aus dem Multigen-Sequenzierpanel Agilent TruRisk.	37
Tabelle 8.19 PCR-Programm für die Amplifizierung der Adapter-markierten DNA-Bibliothek.	37
Tabelle 8.20 Berechnung des immunreaktiven Scores.	43
Tabelle 9.1 Statistische Auswertung der DigiWest-Messwerte von 17 Patientenproben.	56
Tabelle 9.2 DNA-Sequenzierung des Lokus V600 im BRAF-Gen.	59
Tabelle 9.3 Allelfrequenzen der beobachteten Varianten in den Genen ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PALB2, RAD51C, RAD51D und TP53	60

Tabelle 9.4 PTM-Analyse der DigiWest-Messwerte.	63
Tabelle 9.5 Ausgabetabelle der Gen-Ontologie-Analyse.	67
Tabelle 12.1 Funktion einiger Proteine in resistenten Ovarialkarzinomen aus der DigiWest-Analyse mit Verweisen zu Studien in Ovarialkarzinomen.	147

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 7.1 Eigenschaften von Tumorzellen.....	1
Abbildung 7.2 Zellzyklus und Zellzykluskontrollpunkte in der Zelle.....	4
Abbildung 7.3 Entstehung der verschiedenen Formen epithelialer Ovarialkarzinome.	5
Abbildung 7.4 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014.....	8
Abbildung 7.5 Strukturformel von Carboplatin.	13
Abbildung 7.6 Strukturformel von Paclitaxel.....	14
Abbildung 7.7 Schema zum Prinzip der synthetischen Letalität.....	15
Abbildung 8.1 Workflow der DigiWest-Technologie.....	33
Abbildung 8.2 Bildliche Darstellung einer BRAF V600E Mutation anhand eines Chromatogramms.....	35
Abbildung 8.3 Färbekontrollen der Immunhistochemiefärbung.	44
Abbildung 8.4 Prinzip des Proximity Ligation Assay. (121).....	44
Abbildung 8.5 Auswertung der PLA-Signale in Gewebeproben.	45
Abbildung 8.6 Statistische Auswertung der Negativkontrollen der PLA-Färbung in einem Gewebe.	46
Abbildung 8.7 Auswertung der PLA-Analyse in A2780-Zellen nach Behandlung mit CPTX.....	47
Abbildung 8.8 Vektorkarte des EZH2-Plasmids.	51
Abbildung 8.9 Links: Restriktionsverdau des EZH2-Plasmid mithilfe des BamHI-Restriktionsenzym.	52
Abbildung 8.10 Diagnostischer Verdau (BamHI) des EZH2-Plasmids und der Leervektor-Klone.....	52
Abbildung 9.1 Messdatenpunkte (Rohwerte) der DigiWest-Analyse von 17 Tumorproben mit 279 Proteinen.	55
Abbildung 9.2 Q-Q-Diagramm exemplarisch für die Patientenprobe S118.	55
Abbildung 9.3 Heatmap der DigiWest-Analyse von Proteinlysaten aus 17 Ovarialkarzinomen.	58
Abbildung 9.4 Heatmap der PTM-Analyse mit anschließendem hierarchischen Clustering.	64

Abbildung 9.5 Überlebenszeitanalyse von Datensätzen der RNA-Expressionsanalysen aus Ovarialkarzinom-Patientinnen.....	66
Abbildung 9.6 Überlebenszeitanalyse von Datensätzen der RNA-Expressionsanalysen aus Ovarialkarzinom-Patientinnen abhängig von der ATM-Expression.....	69
Abbildung 9.7 Überlebenszeitanalyse von Datensätzen der RNA-Expressionsanalysen aus Ovarialkarzinom-Patientinnen abhängig von der EZH2- und ATM-Expression.....	70
Abbildung 9.8 EZH2-Färbung und Auswertung des Scorings.....	71
Abbildung 9.10 Überlebenszeitanalyse (krankheitsfreies Überleben) von Ovarialkarzinom-Patientinnen anhand des IRS der EZH2-Färbung.....	72
Abbildung 9.11 Immunhistochemische Färbung auf TMA-Schnitten.....	73
Abbildung 9.12 Berechnung des Zusammenhangs zwischen einer EZH2-Färbung und ATM oder pRb.....	74
Abbildung 9.13 Exemplarische PLA-Markierung in Ovarialkarzinomgewebe einer Patientin.	75
Abbildung 9.14 Auswertung der in situ PLA-Analyse.....	75
Abbildung 9.15 Überlebenszeitanalyse von Ovarialkarzinom-Patientinnen anhand der Co-Lokalisation von pATM und EZH2.....	76
Abbildung 9.16 Korrelationsanalyse der gemessenen PLA-Signale einer Patientenprobe verglichen zur EZH2- oder ATM-Färbung.....	77
Abbildung 9.17 Relatives Resistenzverhalten der getesteten acht Ovarialkarzinom-Zelllinien nach einer Behandlung	78
Abbildung 9.18 Korrelationsanalyse der Resistenzen einer Monobehandlung mit Carboplatin (CP) oder Paclitaxel (TX) verglichen mit einer Kombinationsbehandlung beider Agenzien.	79
Abbildung 9.19 Exemplarischer Western Blot mit Lysaten von unbehandelten Zellen.....	80
Abbildung 9.20 Exemplarischer Western Blot mit Lysaten von unbehandelten Zellen.....	80
Abbildung 9.21 Korrelationsanalysen der Resistenzen verschiedener Ovarialkarzinom-Zelllinien.....	81
Abbildung 9.22 ATM/EZH2-Verhältnis in Zelllinien einem hohem (EZH2 ^{hoch}) und niedrigem (EZH2 ^{niedrig}) EZH2-Gehalt.....	82
Abbildung 9.23 Western Blot und Immundetektion von EZH2, ATM und GAPDH in unbehandelten A2780 Zelllinien.....	83
Abbildung 9.24 Quantifizierung der Western Blot-Analyse nach siRNA-Inkubation gegen EZH2, ATM sowie ATM und EZH2.....	84

Abbildung 9.25 CPTX-Behandlung von A2780-Zellen nach EZH2- und ATM-Knockdown..	85
Abbildung 9.26 CP-Behandlung von A2780-Zellen nach EZH2- und ATM-Knockdown.....	86
Abbildung 9.27 TX-Behandlung von A2780-Zellen nach EZH2- und ATM-Knockdown.....	86
Abbildung 9.28 Heatmap der DigiWest-Analyse von A2780-Proteinlysaten mit 30 Analyten.	88
Abbildung 9.29 Heatmap der DigiWest-Analyse von A2780-Proteinlysaten mit 63 Analyten und anschließendem hierarchischen Clustering der Analyten.....	89
Abbildung 9.30 Western Blot und EZH2-Proteinquantifizierung transfizierter SKOV3- Zelllinienzellen.	90
Abbildung 9.31 CPTX-Behandlung von SKOV3-Zellen mit einer EZH2-Überexpression.	91
Abbildung 9.32 CP-Behandlung von SKOV3-Zellen mit einer EZH2-Überexpression.	92
Abbildung 9.33 TX-Behandlung von SKOV3-Zellen mit einer EZH2-Überexpression.	92
Abbildung 9.34 Exemplarische PLA-Markierung in A2780-Zellen nach unterschiedlichen Behandlungen.	93
Abbildung 9.35 Auswertung der PLA-Analyse in A2780-Zellen nach Behandlung mit CPTX, CP und TX.....	94
Abbildung 10.1 Schematische Darstellung der potentiellen Wirkungsweise einer Kombinationsbehandlung mit Carboplatin und Paclitaxel.....	121
Abbildung 12.1 Vektorkarte des Leervektors PCMVHA EVC.	145
Abbildung 12.2 Korrelationsanalysen der Resistenzen verschiedener Ovarialkarzinom- Zelllinien.	146

7 Einleitung

7.1 Die Karzinogenese

Die Karzinogenese ist ein Prozess in einem Zellverbund, in dem sich einzelne Zellen dem Kontrollmechanismus des geordneten Wachstums entziehen und diese Eigenschaft durch Zellteilung an ihre Tochterzellen weitergeben. Man spricht hierbei von malignen Tumorzellen. Hanahan und Weinberg fassten typische Eigenschaften von Tumoren zusammen (1).

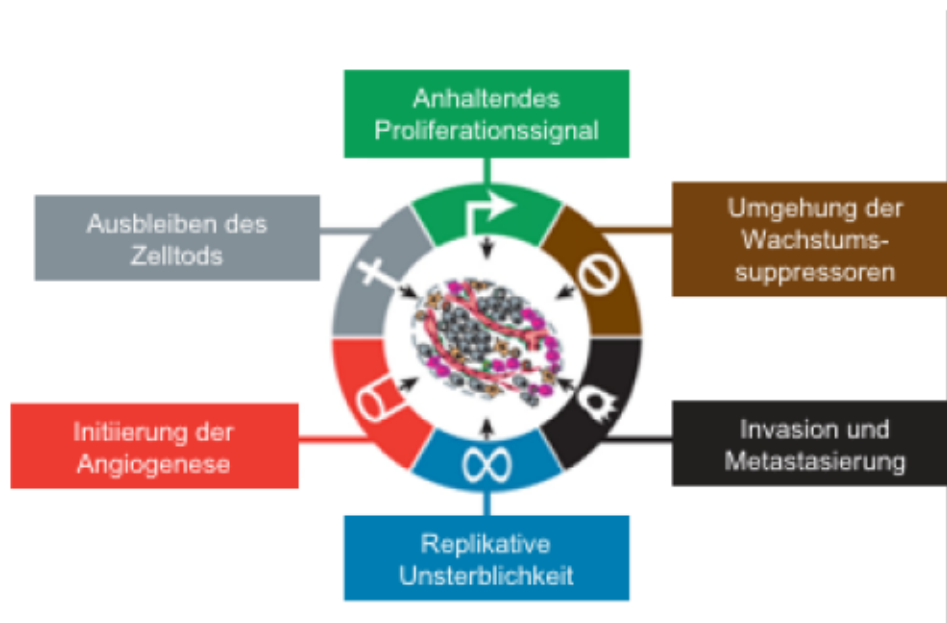


Abbildung 7.1 Eigenschaften von Tumorzellen. Adaptiert nach (1).

Zusätzlich zur verstärkten Proliferation sind Tumorzellen in der Lage, sich Wachstums-Suppressoren und dem programmierten Zelltod zu entziehen. Eine ungehinderte Replikation begünstigt weiterhin die Immortalität von Tumorzellen. Die Induktion der Angiogenese zur Nährstoffversorgung, sowie die Initiierung von Invasion und Metastasierung sind weitere typische Eigenschaften eines Tumors (1).

Die Zellproliferation wird durch unterschiedliche Proteine reguliert, die in einem Tumor durch Mutationen ihrer codierenden Gene einen Funktionsverlust erleiden oder nicht mehr gebildet werden. Mutationen in einigen Genen können jedoch auch eine übermäßige

Einleitung

Aktivierung des Proteins zur Folge haben, was zu einem unkontrollierten Wachstum führt. Diese Gene werden Proto-Onkogene genannt. Gene, die Proteine codieren, die das Zellwachstum begrenzen und die physiologische Funktion der Zelle überwachen, werden Tumorsuppressorgene genannt. Nach der bisher akzeptierten Theorie von Knudson (2) braucht eine Zelle für den Funktionsverlust regulatorischer Proteine zwei Mutationsereignisse für je ein Allel eines codierenden Gens. Eine heterozygote Vererbung einer Mutation über die Keimbahn kann ein erster Schritt zu aberranten Zellen sein. Hierbei wird die Funktion des Proteins nur noch durch das intakte Allel aufrechterhalten. Durch akquirierte Mutationen im zweiten, bisher intakten Allel können Proteine anschließend vollkommen inaktiviert werden. Akquirierte Mutationen werden durch exogene Mitogene in der Umwelt induziert, wobei der Alterungsprozess solche Ereignisse zusätzlich fördert. Hierbei spricht man von einer somatischen Mutation. Ein Funktionsverlust eines Proteins kann auch durch zwei aufeinanderfolgende somatische Mutationen in einem Gen entstehen. (3, 4)

7.1.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist eine Folge von Abläufen, welche für die Teilung und Vermehrung der Zelle unabdingbar sind. Der Prozess besteht aus vier unterschiedlichen Abschnitten, die aus Zellwachstum, Replikation der DNA, der Zuteilung der Chromosomen auf Tochterzellen und der Zelldivision bestehen. Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) leiten den Zellzyklus streng orchestriert durch jeden Abschnitt. Der Zellzyklus besteht aus zwei Teilen: der Mitose- und der Interphase. Die Interphase besteht aus der G1-, der Synthese- und der G2-Phase. In der G1-Phase werden fehlende Bestandteile für die Synthese-Phase hergestellt wie dNTPs und Replikationsenzyme. In der Synthese-Phase wird DNA dupliziert, die im weiteren Verlauf in der Mitose über mehrere Schritte auf zwei Tochterzellen aufgeteilt wird. Die G2-Phase dient dazu, zellteilungsspezifische Proteine zu synthetisieren, die für die Separation der Tochterzellen benötigt werden. In der Mitose-Phase wird schließlich die räumliche Aufteilung der duplizierten Chromosomen durch den Spindelapparat durchgeführt. Jeder dieser Schritte ist entscheidend für die weitere einwandfreie Funktionalität der Zellen, daher sind aufgrund

Einleitung

exogener Faktoren oder der Fehleranfälligkeit einiger enzymatischer Prozesse, Kontrollmechanismen unerlässlich. Die Kontrollmechanismen während des Zellzyklus werden „Kontrollpunkte“ oder *checkpoints* genannt und finden nach der Beendigung eines Intervalls statt. Zunächst passiert eine Zelle aufgrund extrazellulärer Stimuli den Restriktionspunkt, wodurch eine Kaskade der Zellzyklusprogression in Gang gesetzt wird. Es existieren zwei *checkpoints*, in denen die Unversehrtheit der DNA überprüft wird. Sie finden in der G1- und der G2-Phase statt. Wenn während des Verlaufs der G1-Phase DNA-Schäden beispielsweise aufgrund exogener Faktoren auftreten, wird die Zelle im G1-Checkpoint durch drei Zellzyklusproteine kontrolliert: Rb (*Retinoblastoma-Associated Protein*), p107 und p103. Nach der Veranlassung des Zellzyklusarrests durch die drei Proteine, lagern sich an DNA-Schäden die Proteine ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) und ATR (*Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein*) an um weitere Proteine zu rekrutieren, die den DNA-Schaden, je nachdem welcher Art, beheben.

Das Protein p53 (*Tumor Protein P53*) spielt in der Arretierung des Zellzyklus eine besondere Rolle. Es gewährleistet durch Regulation anderer Proteine, sowie durch die Funktion als Transkriptionsfaktor multipler Gene, dass die Zelle so lange im Zellzyklus arretiert wird, bis die Schäden behoben wurden. Kann dies nicht geschehen, leitet es die fehlerhafte Zelle in die Apoptose.

Schreitet der Zellzyklus jedoch weiter fort, muss der nächste Checkpoint in der G2-Phase passiert werden. Hierbei wird überprüft, ob bei der DNA-Replikation DNA-Schäden verursacht wurden. Konnten Schäden erkannt werden, durchläuft die Zelle weitere DNA-Reparaturmechanismen, ähnlich wie bereits in der G1-Phase.

Den dritten Checkpoint muss die proliferierende Zelle während der Mitose durchlaufen. Hierbei wird überprüft, ob die Chromosomen, die jeweils für eine Tochterzelle vorgesehen sind, vollständig sind und zu gleichen Teilen auf beide Zellen verteilt werden. Aurora B (*Aurora Kinase B*) und PLK1 (*Polo-Like Kinase 1*) sind einige der Proteine, die in diesem Komplex agieren. (4-6)

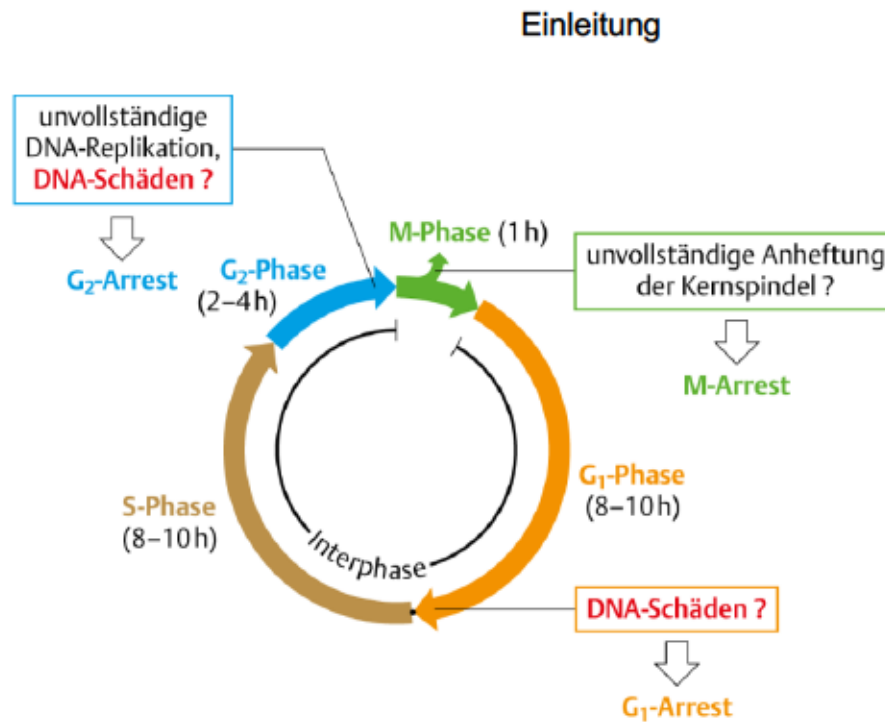


Abbildung 7.2 Zellzyklus und Zellzykluskontrollpunkte in der Zelle. Nach (7, 8).

Eine Fehlfunktion oder ein Ausbleiben dieser Kontrollproteine, insbesondere des Proteins p53, welches durch das Gen *TP53* codiert wird, gehören zu den typischen Eigenschaften eines Tumors (9).

7.2 Das Ovarialkarzinom

7.2.1 Pathogenese und Subklassifizierung

Eierstöcke oder Ovarien gehören zu den primären Geschlechtsorganen und dienen der Fortpflanzung. Sie bestehen aus unterschiedlichen Geweben (Epithel, Keimzellen, Stroma und Keimstranggewebe) und produzieren Eizellen und weibliche Geschlechtshormone wie Östrogen und Progesteron. Ovarialkarzinome bestehen in 90% der Fälle aus entarteten Epithelzellen (10). Die Entwicklung des Ovarialkarzinoms ist bisher nicht ganz verstanden, es werden jedoch mehrere Möglichkeiten der Tumorentstehung angenommen (11).

Über vermehrte Zyklen der Ovulation wird das Oberflächenepithel der Ovarien wiederholt zertrennt und wieder repariert. Die Epithelzellen werden dazu angeregt zu proliferieren, was

Einleitung

wiederum die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Gen-Mutation erhöht. Hinzu kommt, dass nach der Ovulation Epithelzellen im umliegenden Bindegewebe eingeschlossen werden, die zu Inklusionszysten führen können. Wenn das passiert, sind Epithelzellen einem einzigartigen proinflammatorischen Mikromilieu ausgesetzt, das DNA-Schäden und somit auch die Krebsentstehung fördern kann. (12, 13)

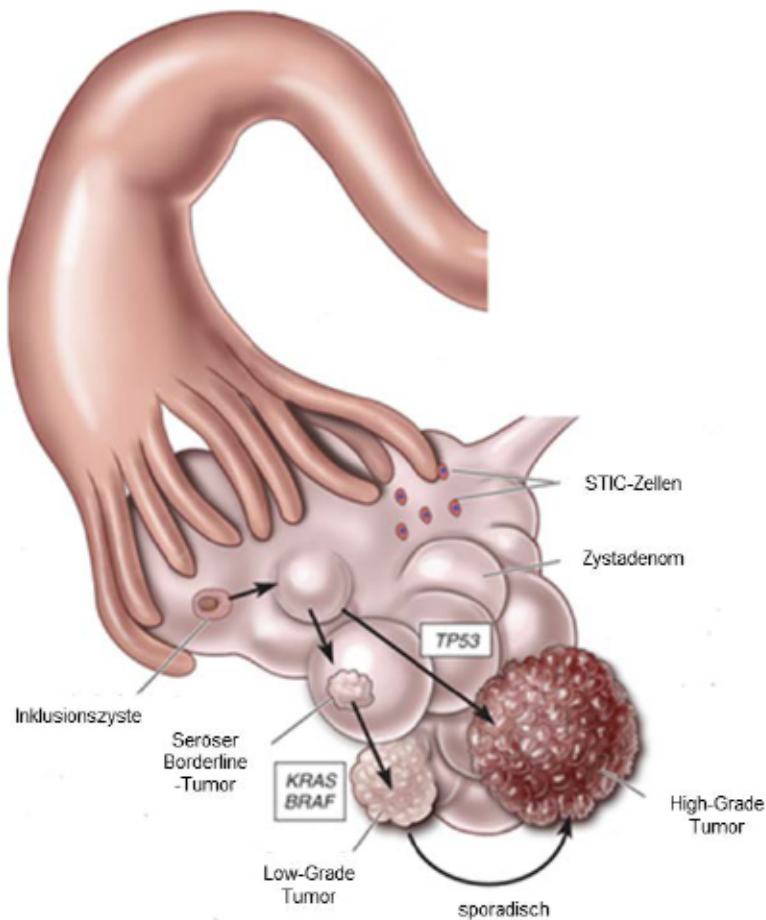


Abbildung 7.3 Entstehung der verschiedenen Formen epithelialer Ovarialkarzinome. Adaptiert nach (14).

Eine weitere Möglichkeit der Entstehung seröser Tumoren resultiert aus Veränderungen der Tube (15). Es können sich in den Fimbrienenden Vorläuferläsionen bilden, wodurch die sogenannten STIC-Zellen (*Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma*, STIC) freigesetzt werden und sich im Ovar am Ort der Ovulationsstelle implantieren können (16, 17).

7.2.2 Subgruppen und Stadienbestimmung

Shih und Kurman (18, 19) teilten das Ovarialkarzinom, basierend auf genetischen und histologischen Eigenschaften, in zwei Gruppen auf. Seröse *low-grade* Karzinome, endometroide, klarzellige und muzinöse Karzinome gehören der heterogenen Gruppe des Typs I an. Sie entstehen vermutlich von Vorläufer-Läsionen und haben ein langsames Wachstum. Tumoren vom Typ II umfassen *high-grade* Karzinome, die überwiegend im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden und Mutationen im *TP53*-Gen aufweisen. Seröse *high-grade* Tumoren haben einen hohen Ki-67-Index und gelten als hoch proliferativ (20, 21).

Prat et al. (22) schlugen eine Einteilung in fünf Subgruppen vor: den serösen *high-grade* (*high-grade serous carcinoma* (HGSC)) und *low-grade* Karzinomen (*low-grade serous carcinoma* (LGSC)), den endometrioiden (*endometrioid carcinoma* (EC)), den klarzelligen (*clear cell carcinoma* (CCC)) und den muzinösen Karzinomen (*mucinous carcinoma* (MC)).

Jede der einzelnen Subgruppen hat unterschiedliche molekulare Merkmale, durch welche die verschiedenen Ursprünge der Karzinogenese, die Art der Ausbreitung und das Ansprechen auf eine Therapie, definiert werden.

In der Pathologie wird die morphologische Bewertung vorerst als alleinige Methode zur Subtypbestimmung angewendet. Hierzu haben sich im klinischen Alltag zwei Arten der Stadienbestimmung etabliert. Primär wird ein von der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) vorgeschlagenes System zur Definierung gynäkologischer, maligner Tumoren des Ovars (Stand: 2014) verwendet (23, 24). Es teilt die Progression eines Tumors in fünf Stadien von 0 bis IV ein, hauptsächlich im Hinblick auf die Ausbreitung innerhalb des Bauchraums oder der Metastasierung. Die Einteilung der Subgruppen erfolgt ähnlich der oben beschriebenen, LGSC und HGSC werden jedoch als eine Gruppe zusammengefasst und durch das *Grading* differenziert. Zudem gibt es eine weitere Subgruppe, die aus Übergangstumoren bzw. Brenner-Tumor besteht. Die Klassifizierung der WHO richtet sich ebenfalls nach dieser Einteilung (Stand: 2014) (25, 26).

Einleitung

Die zweite Form der Einteilung wird als TNM-Klassifizierung (nach *Union internationale contre le cancer*, UICC) bezeichnet. Sie entspricht in detaillierter Form der FIGO-Klassifizierung (Stand: 2016) (27). Mit der Abkürzung T wird jedoch die Tumorgroße beschrieben, N ob und welche Lymphknoten befallen sind und M gibt den Grad der Metastasierung an.

Zusätzlich zur morphologischen Untersuchung des Tumormaterials kann ein genetisches Mutationsprofil hilfreich sein, um die Subgruppeneinteilung von Ovarialkarzinomen zu bestätigen. Hierbei werden besonders *TP53*- und *BRCA*-Mutationen zur Charakterisierung hinzugezogen (28).

Tabelle 7.1 Ovarialkarzinom-Subtypen und ihre genetischen Profile. Nach (28)

Subtyp	Genetisches Mutationsprofil
HGSC	<i>TP53</i> , <i>BRCA1/2</i> , Aneuploidie
LGSC	<i>BRAF</i> und <i>KRAS</i>
EC	<i>ARID1A</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>PTEN</i> , Mikrosatelliteninstabilität
CCC	<i>ARID1A</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>PTEN</i> , <i>KRAS</i>
MC	<i>KRAS</i> , <i>ERBB2</i>

7.2.3 Risikofaktoren und Prädispositionsfaktoren

Es gibt einige Faktoren, welche die Entwicklung des Ovarialkarzinoms begünstigen. So fördert eine hohe Anzahl an Eisprüngen, die eine Frau im Laufe ihres Lebens hatte, die Tumorentstehung. Hierfür scheinen hormonelle Faktoren verantwortlich zu sein, sowie die Beanspruchung der Regenerationsfähigkeit des Epithels (29, 30). Die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva (31) sowie häufige Schwangerschaften (32) gehen aufgrund der „Ruhigstellung“ der Ovarien mit einem verringerten Risiko einher. Außerdem wird durch Übergewicht oder einem erhöhten Body-Mass-Index das Entstehen von Ovarialkarzinomen gefördert (33). Diskutiert wird auch, ob die Körpergröße eine Rolle spielt. Als anthropometrischer Faktor wurde sie mit einem erhöhten Risiko der Ovarialkarzinomentstehung assoziiert (34). Fünf bis zehn Prozent der Erkrankten

Einleitung

entwickelten ein Ovarialkarzinom aufgrund einer genetischen Prädisposition. Durch die Detektion vererbbarer, pathogener Keimbahnmutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* (*Breast Cancer Susceptibility Protein Type 1* und 2) kann ein erhöhtes Risiko an einem familiären Mamma- oder Ovarialkarzinom zu erkranken mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden (35-37). *BRCA1*- und *BRCA2*-Proteine werden in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA während der homologen Rekombination benötigt (38).

7.2.4 Epidemiologie und Inzidenzraten

Das Ovarialkarzinom ist weltweit die tödlichste Malignität unter den gynäkologischen Tumoren (39) und steht an 7. Stelle der am häufigsten diagnostizierten Karzinomen bei Frauen (40). Zahlen des Robert Koch-Instituts zur Epidemiologie in Deutschland beschreiben, dass das Ovarialkarzinom 3,2% aller bösartigen Neubildungen bei Frauen und 5,3% aller Krebssterbefälle ausmacht. 2014 gab es 7250 Neuerkrankungen in Deutschland (41).

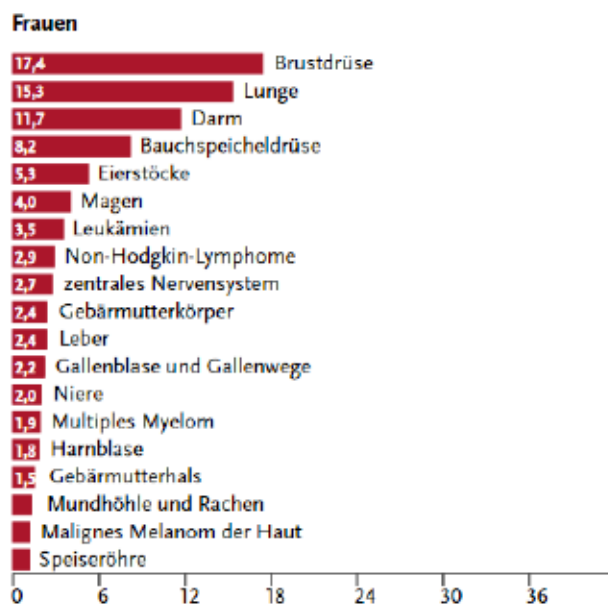


Abbildung 7.4 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014. Aufteilung aus einer Gesamtheit von 101 641 Todesfällen. (41)

Einleitung

Im Durchschnitt erkrankt etwa eine von 71 Frauen im Laufe ihres Lebens an Eierstockkrebs. Das mittlere Erkrankungsalter (Median) liegt bei 70 Jahren, mit 17% sind jedoch Frauen im Alter von 60-65 bei der Diagnosestellung am häufigsten betroffen (42).

Aufgrund eines fehlenden Screenings mit hoher Sensitivität und Spezifität wird die Diagnose häufig erst in späten Stadien gestellt (60% im Stadium T3). Symptome treten oftmals erst nach einer Metastasierung der Krankheit auf. Entsprechend niedrig ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate von 40%, wobei die Mortalitätsrate im europäischen Umland verhältnismäßig gleich ist (43).

7.3 Therapie des Ovarialkarzinoms

Grundlegend wird das Ovarialkarzinom adjuvant behandelt. Das bedeutet, dass nach einer möglichst vollständigen Resektion des Tumors und einer postoperativen Pause von circa einem Monat eine systemische Therapie mit einem Zytostatikum begonnen wird. Diese Form der Therapie dient dazu, noch nicht nachweisbare Tumorreste oder Mikrometastasen zu erfassen und an ihrer Ausbreitung zu hindern. Die vollständige Resektion des Tumors ist in der Therapie ein ausschlaggebender Faktor, der Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patientin hat (44, 45). Vor allem bei Patientinnen, bei denen die Erkrankungen früh detektiert wird, ist die makroskopische Tumorentfernung ausschlaggebend für ein krankheitsfreies Überleben (46). In jedem Tumorstadium wird jedoch adjuvant behandelt (47, 48). Die neoadjuvante Therapie bringt bei der Behandlung der Ovarialkarzinome keine Vorteile (49), sie kann jedoch bei schlecht zu operierenden Tumoren genutzt werden, um die im Anschluss stattfindende Resektion für den Chirurgen zu erleichtern (50, 51). In Deutschland wird das Vorgehen bei einer Erkrankung nach aktuellem Stand durch die *Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe* (DGGG) in der S3-Leitlinie vorgegeben (52), welches in dieser Arbeit nachfolgend kurz beschrieben wird.

7.3.1 Erstlinientherapie

Die Therapie des Ovarialkarzinom richtet sich zunächst nach etablierten Prognosefaktoren, die für die Akzeptanz der Therapie ausschlaggebend sind. Das Tumorstadium, der postoperative Tumorrest, das Alter, der Allgemeinzustand der Patientin, der histologische Typ sowie das Tumorgrading entscheiden über die weitere Vorgehensweise bei der leitliniengerechten Therapie.

Das frühe Ovarialkarzinom, welches sich auf das kleine Becken begrenzt, wird oftmals zufällig entdeckt. Die Gabe einer adjuvanten Chemotherapie wird bei einem sehr frühen Stadium (IA) entweder ausgelassen oder es wird eine platinhaltige Monotherapie angewandt. Da das Ovarialkarzinom oftmals aber erst in späten Stadien der Erkrankung diagnostiziert wird, wird in den überwiegenden Fällen eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Paclitaxel angewandt. Für Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovariakarzinom (IIb-IV) impliziert die Erstlinientherapie eine operative Tumoresektion und eine anschließende Gabe einer systemischen Primärtherapie (52). Die Erstlinientherapie für Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (IIb-IV) besteht aus Carboplatin AUC 5 und Paclitaxel 175 mg/m², welche über drei Stunden intravenös für insgesamt sechs Zyklen alle drei Wochen verabreicht werden (53-55). Zusätzlich kann bei einem fortgeschrittenen Tumorstadium (IIIB-IV) der Angiogenesehemmer Bevacizumab verabreicht werden (56, 57).

7.3.2 Rezidivtherapie

Die Rezidivpopulationen definieren sich hauptsächlich über das Ansprechen auf eine platinhaltige Primärtherapie. Das Platin-sensitive Ovarialkarzinom spricht primär auf eine platinhaltige Erstlinientherapie an und zeigt ein Rezidiv frühestens sechs Monate nach Abschluss der Chemotherapie. Darunter fällt ebenfalls das partiell Platin-sensitive Ovarialkarzinomrezidiv, welches auch primär auf eine platinhaltige Erstlinientherapie

Einleitung

anspricht, aber ein Rezidiv zwischen sechs und zwölf Monaten nach Abschluss der platinhaltigen Chemotherapie aufweist (52).

Zeigt sich ein Rezidiv innerhalb der ersten sechs Monate nach Abschluss der initialen platinhaltigen Chemotherapie, wird das Ovarialkarzinom als Platin-resistent bezeichnet. Darin enthalten ist die Subgruppe der Platin-refraktären Ovarialkarzinom-Rezidive. Hierbei spricht die Erkrankung nicht auf eine platinhaltige Chemotherapie an oder weist innerhalb von vier Wochen nach Ende der Therapie einen Progress auf (52).

Die operative Rezidivchirurgie, mit dem Ziel der Komplettresektion, spricht nach momentaner Datenlage für einen klinischen Nutzen. Patientinnen mit einem resistenten Ovarialkarzinomrezidiv bekommen systemisch eine wöchentliche Monotherapie entweder mit pegyliertem liposomalem Doxorubicin, Topotecan, Paclitaxel oder Gemcitabin. Die ersten drei Agenzien können hierbei optional mit Bevacizumab kombiniert werden. Ein Platin-sensitives Rezidiv wird mit einer Kombinationstherapie aus Carboplatin mit entweder Gemcitabin (optional mit Bevacizumab), mit pegyliertem liposomalem Doxorubicin oder mit Paclitaxel behandelt. Als Sonderfall werden Rezidive des serösen *high-grade* Ovarialkarzinoms mit deletären *BRCA1/2*-Mutationen betrachtet. Hierbei wird eine Erhaltungstherapie mit einem PARP-Inhibitor (z. B. Olaparib) nach Ansprechen auf eine platinhaltige Therapie empfohlen. Neuste Erkenntnisse zeigen, dass auch Patientinnen ohne *BRCA1/2*-Mutationen nach einer platinhaltigen Therapie von einer Therapie mit Olaparib profitieren (58-60).

Es gibt keinen biochemischen Parameter, der als zuverlässiger Indikator für einen Zusammenhang zwischen Nachweis und der Prädiktion oder Prognose gilt. Der alleinige Anstieg des Tumormarkers (z.B. CA125) im Blut einer asymptomatischen Patientin ohne weitere Anzeichen für eine Tumorprogression ist keine Indikation für die Durchführung einer Rezidivtherapie (61). Weiterhin sind keine Prädispositionsfaktoren bekannt, die Aufschluss über eine Therapieresistenz im Ovarialkarzinom geben können.

7.4 Wirkungsweise der chemotherapeutischen Agenzien

Die Therapie des Ovarialkarzinoms impliziert überwiegend eine adjuvante Behandlung mit der Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel (62). Die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der beiden Agenzien zielen auf die breite Masse der Tumorzellen ab und hindern diese an ihrem Überleben und ihrer Vermehrung. Ein limitierender Faktor ist hierbei das Auftreten von Nebenwirkungen, welche auch die Kombination mit weiteren Agenzien erschweren (63). Die folgenden Abschnitte geben eine kurze Übersicht über die chemische und biologische Wirkungsweise von Carboplatin und Paclitaxel.

7.4.1 Carboplatin

Die inhibierende Wirkung platinhaltiger Substanzen auf die Zellteilung und Zellproliferation ist seit über 50 Jahren bekannt (64, 65). Ähnlich wie Cisplatin ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, CAS-Nummer 15663-27-1), bildet Carboplatin ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$, CAS-Nummer 41575-94-4) DNA-Addukte, welche die DNA-Replikation und -Transkription inhibieren und zur Einleitung der Apoptose führen (66, 67). Der Mechanismus der beiden Agenzien beruht auf dem gleichen Prinzip, DNA-Schäden zu induzieren, jedoch wird aufgrund der unterschiedlichen Kinetik der beiden Agenzien eine größere Menge an Carboplatin benötigt um den gleichen Anzahl an DNA-Schäden zu bewirken (68). In der Behandlung des Ovarialkarzinoms wird Carboplatin dennoch einer Behandlung mit Cisplatin vorgezogen, da es eine bessere Verträglichkeit in Patienten aufweist ohne dabei die Wirksamkeit einer Platinbehandlung einzuschränken (69, 70). DNA-Addukte, die durch Platinbehandlung auftreten, lassen sich mit monoklonalen Antikörpern detektieren (71).

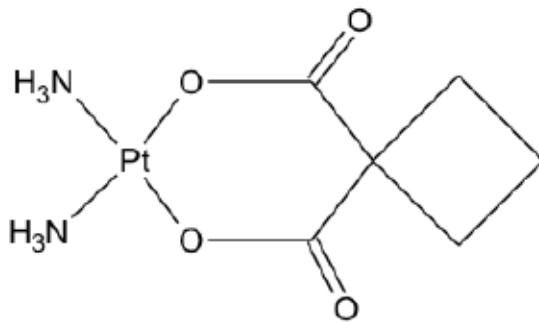


Abbildung 7.5 Strukturformel von Carboplatin. (72)

Eine Behandlung mit Carboplatin ist bei Ovarialkarzinomen, Keimzelltumoren, kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen sowie bei Kopf-Hals-Tumoren indiziert (73). Die Dosierung von Carboplatin wird durch die Calvert-Formel berechnet, die anhand der Kreatinin-Clearance und somit der Nierenfunktionalität, die Konzentration der Dosis bestimmt (74, 75).

Nicht nur Tumorzellen werden durch eine Carboplatin-Behandlung beschädigt. Zellen in schnell wachsenden Geweben wie der muzinösen Membran des Mundes, des Rachens und des Magen-Darm-Traktes werden angegriffen, was zur gastrointestinalen Toxizität führt. Weitere Nebenwirkung belaufen sich auf das Knochenmark, wodurch die Anzahl der roten und weißen Blutzellen reduziert wird. Haarfollikel bestehen ebenfalls aus schnell proliferierenden Zellen, weswegen es bei einer Chemotherapie zum Verlust des Deckhaares (Alopecia) sowie der Haarzellen der Hörschnecke, was neben weiterer Faktoren, zu Hörschäden führt (Ototoxizität) (76). Weitere Schädigungen können in den Nieren (77) und der Leber (78) auftreten.

Eine reduzierte Akkumulation von Platin an der DNA, sowie eine Blockierung der Apoptose-Induktion wurden als Kernmechanismen einer Resistenz identifiziert (79), die jedoch nicht prädiktiv genutzt werden können. Aktivierte Signalkaskaden der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K) werden im Allgemeinen bei einer Resistenz gegen eine platinhaltige Therapie beobachtet (80).

7.4.2 Paclitaxel

Paclitaxel (oder auch *Taxol*®, CAS-Nummer 33069-62-4) ist eine Substanz, die ursprünglich aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) gewonnen wurde und in der Anwendung als Zytostatikum erstmals 1971 in Erscheinung trat (81). Die Wirkstoffisolierung aus der pazifischen Eibe ergab nur eine geringe Ausbeute, weswegen es heutzutage halbsynthetisch aus der europäischen Eibe (*Taxus baccata*) gewonnen wird (82).

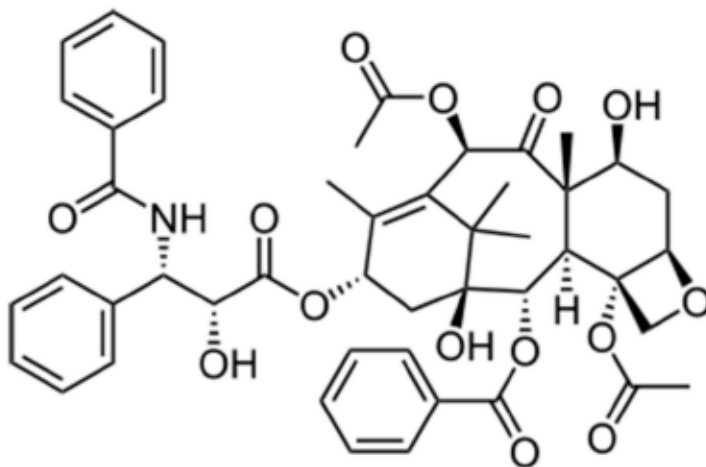


Abbildung 7.6 Strukturformel von Paclitaxel.

In der Zelle stabilisiert es die Mikrotubuli während der Mitose, indem es an die innenliegende β -Untereinheit von Tubulin bindet. Die Zellteilung wird dadurch gehemmt (84, 85). In hohen Konzentrationen lässt es den Anteil an polymerisiertem Tubulin ansteigen und führt zu einem mitotischen Arrest. Durch niedrige Konzentrationen wird aufgrund der aberranten Mitose die Apoptose eingeleitet (86, 87), welche durch das C-Raf-Protein vermittelt wird (88).

In der Behandlung des Ovarialkarzinoms wird es seit den 1990er Jahren in Betracht gezogen (89, 90). Es wird seit der FDA-Zulassung in 1995 zur Behandlung von Tumoren verwendet (91). Seine Eigenschaft wird genutzt, um die meist hoch proliferative Tumorzellen an der Ausbreitung zu hindern (92-94). Nebenwirkungen einer Behandlung können sich als periphere Neuropathien oder Verminderung der neutrophilen Granulozyten im Blut (Neutropenie) äußern (91).

Einleitung

Durch Untersuchungen mit Taxol wurde eine allgemeine Art der Resistenz entdeckt, die sogenannte *Multiple Drug Resistance* (95). Das durch das MDR1-Gen codierte P-Glykoprotein, welches zu der Gruppe der ABC-Transportern gehört, fördert das Hinausschleusen körperfremder Stoffe wie z.B. Arzneimittel. Diese gelangen wiederum nur erschwert in die Zelle und können somit nicht wirken (96). Chromosomale Veränderungen und Aneuploidie werden ebenfalls mit einer Paclitaxel-Resistenz in Verbindung gebracht (97). Beispielsweise ist eine chromosomale Instabilität in Tumoren mit einer Resistenz gegenüber Paclitaxel, jedoch auch mit einer Sensitivität gegenüber Carboplatin assoziiert (98). Darüber hinaus wurden bei einem Verlust des p53-Proteins Veränderungen in der Komposition und Dynamik der Mikrotubuli beobachtet, die schließlich zu einer Resistenz gegen Paclitaxel führen (99).

7.4.3 Synthetische Letalität

Unter dem Prinzip der synthetischen Letalität fällt ein aktueller, anwendungsorientierter Ansatz, indem durch eine Inaktivierung zweier Zielgene die Letalität einer Zelle induziert wird. Die einzelne Inaktivierung der Gene hat jedoch keinen Einfluss auf das Überleben.

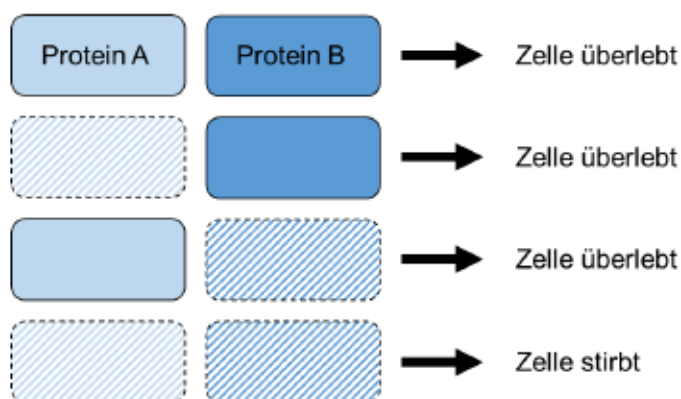


Abbildung 7.7 Schema zum Prinzip der synthetischen Letalität. Adaptiert nach (100).

In der Wirkstoffentwicklung können umfassende Untersuchungen mithilfe der RNA-Interferenz zweier Gene durchgeführt werden, um die Wirksamkeit einer Therapie mit einzelnen Agenzien oder einer Kombination zu testen (101, 102). Für die Behandlung einer

Einleitung

Tumorerkrankung ist es anschließend nötig im Tumor zunächst die Präsenz oder Funktionalität einer der beiden Kandidatenproteine nachzuweisen. Wenn Funktionsverluste beispielsweise durch eine Mutation oder durch eine niedrige Expression eines Gens nachgewiesen werden, kann anschließend das noch vorhandene Protein zielgerichtet durch ein Therapeutikum inhibiert werden, um eine synthetische Letalität im Tumor zu induzieren (103).

Ein herausragendes Beispiel für eine Anwendung der synthetischen Letalität ist die Anwendung von PARP-Inhibitoren im BRCA-mutierten Ovarialkarzinom. Hierbei wird der Tumor zunächst auf genetischer Ebene untersucht. Wird eine Funktionsverlustmutation in einem der *BRCA*-Gene beobachtet, kann PARP1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1), ein Protein welches in der DNA-Reparatur und für die genomische Stabilität benötigt wird, pharmakologisch inhibiert werden. Da im Tumor aufgrund der fehlenden BRCA-Proteine eine DNA-Reparatur durch die homologe Rekombination nicht oder nur begrenzt möglich ist, werden Teile dieser Funktion durch das PARP-Protein kompensiert. Durch die pharmakologische Inaktivierung von PARP wiederum werden mehr DNA-Schäden angehäuft, wodurch es letztlich zur Apoptose der Tumorzelle kommt (100).

Eine Reihe weiterer Inhibitoren, die auf DNA-Reparaturproteine oder deren Vermittler abzielen, werden für weitere Anwendungen der synthetischen Letalität in mehreren Tumorentitäten untersucht. So werden bereits die Proteine DNA-PK, ATM, ATR, APE1, POLQ in Studien zur Antitumorthérapie in Betracht gezogen (104).

Epigenetische Faktoren treten ebenfalls immer mehr in den Fokus als Zielstruktur für die Induktion der synthetischen Letalität (105). Beispiele hierfür sind die Inhibierung des BRD4-Proteins zusammen mit PARP-Inhibitoren, die zum Ausfall der homologen Rekombination führt (106). Weiterhin führt die Verwendung von EZH2-Inhibitoren in SMARCB1-defizienten, rhabdoiden Tumoren (107) oder ARID1A-defizienten, klarzelligen Ovarialkarzinomen (108, 109) zu hervorragenden Ergebnissen in der Tumorbekämpfung.

7.5 Vorarbeiten

Vorarbeiten im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit, angefertigt am Institut für Medizinische Genetik in Kooperation mit dem Forschungsinstitut der Universitätsfrauenklinik Tübingen, zeigten in einem Microarrayansatz signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen zwölf sensitiven und zwölf resistenten Tumoren von Ovarialkarzinom-Patientinnen. 55 Gene wurden hierbei identifiziert, die differentiell exprimiert wurden. Netzwerkanalysen der auffälligen Gene in der Gruppe der Resistenten deuteten auf Signalnetzwerke unter anderem um *EGFR*, *TP53*, *CTNNB1*, *HOXB7*, sowie einiger Kollagene hin (*COL3A1*, *COL1A2*). Eine eindeutige Aufteilung der zwei Gruppen in zwei Cluster war jedoch nicht möglich. Die anschließend durchgeführte Signalwegs-Analyse ordnete jedoch den identifizierten Proteinen Zellfunktionen zu wie beispielsweise der Signalweiterleitung, dem Zellwachstum und der Proliferation, dem Zellzyklus, der Apoptose sowie der DNA-Replikation und -Reparatur.

Hierbei muss bedacht werden, dass Genexpressionsdaten oftmals keine Rückschlüsse auf Proteinmodifikationen zulassen, die wiederum für Signalweiterleitungsprozesse von essentieller Bedeutung sind. Da der Erkenntnisgewinn der analysierten Daten nicht für das Erstellen einer spezifischen Genexpressionssignatur im resistenten Ovarialkarzinom ausgereicht hat, sollten weitere Untersuchungen auf Proteinebene fortgeführt werden. 17 der 24 untersuchten Tumoren wurden in dieser Studie daher in einer Kohorte zusammengefasst und einer Proteinarray-Untersuchung unterzogen.

7.6 Ziel der Studie

Ziel der Studie war es, Proteinnetzwerke im therapieresistenten Ovarialkarzinom zu identifizieren, welche die Grundvoraussetzungen eines Tumors zur Resistenzentwicklung aufzeigen, um vorhersagen zu können, ob eine Erstlinientherapie mit Carboplatin und Paclitaxel wirksam das Tumorwachstum hemmt.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten zur initialen Charakterisierung klinisch dokumentierter resistenter Ovarialkarzinome von Patientinnen, deren Behandlung Carboplatin und Paclitaxel enthielt, 17 Tumorproben herangezogen werden, in denen anhand der DigiWest-Methode, 279 Proteine und Proteinmodifikationen untersucht wurden. Die Erstellung eines Proteinprofils diente dazu, Analyten zu identifizieren, um sie Signalweiterleitungsprozessen zuzuordnen, welche differentiell in resistenten Ovarialkarzinomen aktiviert sind. Dies soll zum einen dabei helfen, prospektiv die Wirksamkeit einer Standardtherapie vorhersagen zu können und zum anderen weitere Optionen zur Inhibierung von Prozessen in potentiell resistenten Tumorzellen aufzuzeigen. Weiterhin sollten Kandidatenproteine identifiziert werden, die eine Schlüsselfunktion in der Vermittlung der Resistenz einnehmen, um zielgerichtete Therapiemöglichkeiten in Betracht ziehen zu können. Neben einer funktionellen Charakterisierung der Proteine *in vitro*, sollte die prognostische oder prädiktive Relevanz von Kandidatenproteinen in unabhängigen Patientenkohorten mit 34 und 616 Patienten untersucht werden.

Es sollten grundlegende intrinsische Mechanismen in schwer therapierbaren Ovarialkarzinompatientinnen konstatiert werden, welche die Möglichkeit einer Modifizierung von Signalwegen unterstreichen oder eine zielgerichtete Inhibierung von Kandidatenproteinen nach gründlicher Charakterisierung der Tumorproben ermöglichen können.

8 Material und Methoden

8.1 Material

8.1.1 Patientenkollektive

Alle Patientenproben wurden unter Beachtung der nach Aufklärung erfolgten Einverständniserklärung der Patienten und nach Genehmigung durch die medizinische Ethik-Kommission der Eberhard Karls Universität Tübingen (04/2007; 266/1998; 397/2006) und der Charité Berlin (EK207/2003) verwendet. Es wurden nur anonymisierte Patientendaten in Einklang mit den vorherrschenden Datenschutzbestimmungen verwendet.

Kollektiv für das Proteinscreening und die DNA-Sequenzierung

17 seröse Tumoren von Ovarialkarzinom-Patientinnen wurden mittels eines DigiWest-Screenings und DNA-Sequenzierung untersucht. Alle Patientinnen wurden mit einer Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel im Rahmen einer Erstlinientherapie adjuvant behandelt. Die Patientinnen wurden in „sensitiv“ und „resistent“ unterteilt, abhängig von ihrem krankheitsfreien Überleben innerhalb der ersten zwölf Monate nach chirurgischer Resektion des Tumors. Dies impliziert Ereignisse wie ein Rezidiv, eine Metastase oder das Versterben der Patientin. Als Ausgangsmaterial für den Proteinarray diente kryokonserviertes Gewebe der Tumoren. Zwei der kryokonservierten Tumoren wurden hierfür vollständig aufgebraucht, sodass für die DNA-Sequenzierung ein weiteres Gewebestück der Tumoren verwendet wurde, welches jedoch in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet war (FFPE). Der Tumoranteil betrug in jeder Probe mindestens 60%.

8.1.1.2 Kollektiv für die immunhistochemische Färbung und den Proximity Ligation Assay

34 seröse Tumoren von Ovarialkarzinom-Patientinnen wurden mittels Immunhistochemie und Proximity Ligation Assay untersucht. Alle Patientinnen wurden mit einer Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel im Rahmen einer Erstlinientherapie adjuvant behandelt. Zusätzlich wurden Überlebenszeitanalysen anhand des absoluten krankheitsfreien Überlebens durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die Immunmarkierungen diente FFPE-Gewebe der Tumoren.

Tabelle 8.1 Zusammenfassung der klinischen Parameter der in der Studie erfassten Patientinnen.

		PROTEIN- UND DNA-ANALYSE		FÄRBUNG	
		Anzahl	Prozent [%]	Anzahl	Prozent [%]
Anzahl Patientinnen		17	100	34	100
FIGO-Stadium	I	0	0	2	6
	II	6	35	0	0
	III	9	53	32	91
	IV	0	0	1	3
	n/a	2	12	0	0
Grading	I	0	0	0	0
	II	6	35	6	18
	III	11	65	28	82
Alter bei Diagnose	≤ 60 Jahre	10	59	16	47
	> 60 Jahre	7	41	18	53
	> 75 Jahre	0	0	0	0
Krankheitsfreies Überleben	≤ 12 Monate	8	47	12	35
	> 12 Monate	9	53	22	65

8.1.2 Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 8.2 Verwendete Primärantikörper in der Studie.

Antigen	Spezies	Klonalität	Artikel-nummer	Hersteller	Einsatz
ATM	Kaninchen	monoklonal (Klon y170)	ab32420	Abcam plc, Cambridge, UK	IHC 1:100 WB 1:2500
Phospho-ATM (Ser1981)	Maus	monoklonal (Klon 10h11.e12)	ab36810		WB 1:1000 PLA: 1:500
Cyclin B1	Kaninchen	monoklonal (Klon Y106)	Ab32053	Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, USA	WB 1:3000
EZH2	Kaninchen	monoklonal (Klon D2C9 XP)	5246		IHC 1:50 WB 1:1000 PLA 1:150
P44/42 MAP Kinase; ERK1/2	Maus	monoklonal (Klon l34f12)	4696		WB 1:2000
Phospho-p44/42 MAP Kinase; ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	monoklonal (Klon D13.14.4E)	4370		WB 1:2000 IHC 1:400
Rb	Maus	monoklonal (Klon 4H1)	9309		WB 1:2000
Phospho-Rb (Ser807/811)	Kaninchen	monoklonal (Klon D20b12)	8516		WB 1:1000
GAPDH	Ziege	polyklonal	PLA0302	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt	WB 1:1000
GAPDH (I-19)	Ziege	polyklonal	Sc-48166	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA	WB 1:1000
Isotypkontrolle IgG Kaninchen XP	Kaninchen	monoklonal (Klon DA1E)	3900	Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, USA	Konzentration: 2,5 mg/ml entsprechend eingesetzt
Isotypkontrolle IgG 1 Maus	Maus	monoklonal (Klon DAKGO1)	X0931	Dako, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA	Konzentration: 0,1 mg/ml entsprechend eingesetzt

Material und Methoden

Tabelle 8.3 Verwendete Sekundärantikörper in der Studie.

Antigen	Konjugat	Spezies	Klonalität	Artikel-nummer	Hersteller	Einsatz
Maus IgG	AF488	Esel	polyklonal	A-21202	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	WB 1:1000
Ziege IgG	AF546	Esel		A-11056		WB 1:1000
Kaninchen IgG	AF647	Esel		A-31573		WB 1:1000
Ziege IgG	AF647	Esel		A-21447		WB 1:1000
Kaninchen IgG	AF546	Esel		A-10040	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA	WB 1:1000
Maus IgG	HRP	Esel		sc-2096		WB 1:1000
Kaninchen IgG	HRP	Esel		sc-2313		WB 1:1000
Ziege IgG	HRP	Esel		sc-2020		WB 1:1000
Polyvalent IgG (Maus, Kaninchen, Ziege)	Biotin	Meerschweinchen		ABN999	ScyTek Laboratories Inc., Logan, UT, USA	un-verdünnt

Tabelle 8.4 Verwendete Proteine und Farbstoffe in der Studie.

Bezeichnung	Name	Ziel-struktur	Konjugat	Verwendung	Hersteller	Einsatz
Avidin		Biotin	HRP	Bindung von Biotin	ScyTek Laboratories Inc., Logan, UT, USA	un-verdünnt
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	HRP	-	Chromogen & Substrat	Abl999 Ack999	un-verdünnt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	DNA	-	Fluoreszenzfarbstoff	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt D9542	2,5µg/ml
GelRed 10 000x	ET-27	DNA	-	Fluoreszenzfarbstoff	Biotium Inc., Fremont, CA, USA 41003	1x

8.1.3 Zelllinien und Kultivierungsmedien

Tabelle 8.5 Verwendete Zelllinien in der Studie.

Bezeichnung	Ursprung	Artikelnummer	Quelle	Zusammensetzung Medium
A2780	Ovarialkarzinom	-	NMI Reutlingen	RPMI 1640 + 10% fetales Kälberserum
A2780cis	Ovarialkarzinom	-	NMI Reutlingen	RPMI 1640 + 10% fetales Kälberserum
Caov-3	Ovarialkarzinom	HTB 75	ATCC/ LGC Standards GmbH, Wesel	DMEM + 10% fetales Kälberserum
IGROV-1	Ovarialkarzinom	-	UFK Düsseldorf	RPMI 1640 + 10% fetales Kälberserum
OVCAR-3	Ovarialkarzinom	-	UFK Düsseldorf	RPMI 1640 + 20% fetales Kälberserum + 0,01 mg/ml Insulin
SKOV-3	Ovarialkarzinom	-	UFK Düsseldorf	McCoy's 5a + 10% fetales Kälberserum
PEO1	Aszites	# 10032308-1v1	Merck KGaA, Darmstadt	RPMI 1640 + 10% fetales Kälberserum
PEO4	Aszites	# 10032309-1v1	Merck KGaA, Darmstadt	RPMI 1640 + 10% fetales Kälberserum

Tabelle 8.6 Verwendete Zellkulturmedien in der Studie.

	Artikelbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
RPMI 1640	RPMI 1640 Medium	#21875034	Gibco Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
MCCOY'S 5A	McCoy's 5A (Modified) Medium	#26600023	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose	#41965039	
Fetales Kälberserum	Fetal Bovine Serum	#10270106	
PBS	Dulbecco's phosphate- buffered saline (DPBS), no calcium, no magnesium	#14190094	
Trypsin-EDTA	Trypsin-EDTA (0.5%), (10x), no phenol red	#15400054	
Insulin	Insulin solution human	#I9278-5ML	Merck KGaA, Darmstadt

8.1.4 Oligonukleotide

Tabelle 8.7 Verwendete siRNA in der Studie.

siRNA	Angewendete Konzentration	Ziel-Transkripte	Artikel-nummer	Hersteller
Flexitube gene solution gs2146 for EZH2	5 nM	Nm_001203247 Nm_001203248 Nm_001203249 Nm_004456 Nm_152998	1027416	Qiagen, Hilden
Flexitube gene solution gs472 for ATM	5 nM	Nm_000051 Nm_138292 Nm_138293	1027416	
Negative control siRNA (5 nmol)	5 nM	-	1022076	

Tabelle 8.8 Verwendete Primer in der Studie.

	Primer	Sequenz (5'→ 3')	Strang
Plasmid	CMV_1	CAATGGGAGTTTGTGTTTGGC	Codierend
	CMV_2	GACCAGGGTGTAGTTGTTTC	Codogen
	EZH2_1	GAAACAACACTACACCCTGGTC	Codierend
	EZH2_2	TCTATCCCCGTGTACTTTCC	Codogen
	EZH2_3	ATTCTTGGTCTCCCCTACAG	Codierend
	EZH2_4	CGTTTTGGTGGGGTCTTTAT	Codogen
	EZH2_5	GGAAGAACACAGAAACAGCT	Codierend
	EZH2_6	CGGTTTGACACTCTGAAC	Codogen
	EZH2_7	ATCAACCCTGTGATCATCCA	Codierend
	EZH2_8	CAGTGGTATTGTGAGCCAG	Codogen
	pCAG-Fwd	GCAACGTGCTGGTTATTGTG	Codierend
	M13/pUC Rev	AGCGGATAACAATTTACACAGG	Codogen
BRAF V600	BRAFV600E Fwd	TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA	Codierend
	BRAFV600E Rev	TCCACTGATTAAATTTTGGCC	Codogen

8.1.5 Vektoren

Tabelle 8.9 Verwendete Vektoren in der Studie.

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
pCMVHA hEZH2	24230	Addgene, Cambridge, USA
pCMVHA EVC	-	Kloniert aus pCMVHA hEZH2

8.1.6 Enzyme

Tabelle 8.10 Verwendete Enzyme in der Studie.

Verwendung	Artikelbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Restriktions- endonuklease	BamHI (2500 Units, 10U/μl)	10567604001	Roche, Merck KGaA, Darmstadt
DNA- Polymerase	AmpliTaq Gold DNA Polymerase with Buffer I	N8080244	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
DNA-Ligase	T4 DNA Ligase Quick Ligation Kit	M2200	New England Biolabs, Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, USA

Material und Methoden

8.1.7 Verwendete Kits

Tabelle 8.11 Verwendete Kits in der Studie.

Verwendung	Artikelbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Library Quantifizierung	Agilent DNA 1000 Kit	5067-1504	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
Finale Library	Agilent High	067-4626	
Quantifizierung	Sensitivity DNA Kit		
DNA-Quantifizierung	Quant-iT™ dsDNA Assay Kit, broad range	Q33130	
TruRisk-Multigenpanel	SureSelect QXT, Agilent	Custom	
DNA-Isolierung aus FFPE- Gewebe	GeneRead DNA FFPE Kit	180134	Qiagen, Hilden
Qualitätskontrolle für DNA aus FFPE-Gewebe	QIAseq DNA QuantiMIZE	333414	
Library Quantifizierung	QIAseq Library Quant	333314	
QIAseq	Assay Kit		
Gen-Panel für die Sequenzierung	Human Breast Cancer Panel	DHS-001Z-12	
Indices für die Libraryherstellung	QIAseq 12-Index I (48)	333714	
Plasmidisolierung Mini	QIAprep Spin Miniprep Kit (50),	27104,	
DNA-Extraktion aus Gel	QIAquick Gel Extraction Kit	28704	
DNA-Isolierung aus kryokonserviertem Gewebe	QIAamp DNA Mini Kit	51304	
Proteinquantifizierung in Lysaten	Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
PLA in Zelllinien	PLA DuoLink in situ Orange Starter Kit Mouse/Rabbit	DUO92102-1KT	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
PLA in Geweben	PLA DuoLink in situ Detection Reagents FarRed	DUO92013- 30RXN	
Plasmidisolierung Maxi	NucleoBond® Xtra Maxi Plus EF	740426.10	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
DNA-Ligation	Quick Ligation Kit	M2200S	New England Biolabs, Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, USA
ATP-Chemosensitivitätstest	ATP Bioluminescence Assay Kit HSII	11699709001	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt

8.1.8 Puffer, Lösungen und Standards

Tabelle 8.12 Verwendete Puffer, Lösungen und Standards in der Studie.

Verwendung	Bezeichnung und Hersteller	Zusammensetzung
Lysepuffer Zellen	RIPA buffer (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer)	150 mM NaCl 0,1% Triton X-100 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS (Natriumlaurylsulfat) 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0
Ladepuffer WB	4x Laemmli Sample Buffer 161-0747, Bio-Rad	277,8 mM TRIS-HCl 44,4% Glycerol 4,4% LDS 0,02% Bromphenolblau 200 mM DTT pH 6,8
Laufpuffer SDS-PAGE	TRIS-Glycine/SDS	25 mM TRIS Base 190 mM Glycin 0,1% w/v SDS pH 8,3
Transferpuffer WB	TRIS-Glycin nach Towbin	25mM TRIS Base 192mM Glycin 20% Methanol pH 8,3
Waschpuffer 1	TBS-T	20mM TRIS Base 150mM NaCl 0,1% Tween20 pH 7,6
Waschpuffer 2	TBS	20mM TRIS Base 150mM NaCl pH 7,6
Blockierlösung WB		20mM TRIS Base 150mM NaCl 0,1% Tween 20 pH 7,6 5% (w/v) entfettetes Milchpulver
Proteinstandard WB farbig	Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standard, 1610373, Bio-Rad	
Proteinstandard WB ungefärbt	Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Strep-tagged recombinant, 1610363, Bio-Rad	
Färbelösung Eosin	-	0,25% Eosin 0,5% Essigsäure

Material und Methoden

		80% Ethanol
Antikörper-Verdünnungslösung IHC	Dako REAL Antibody Diluent S202230-2, Dako, Agilent Technologies	
Puffer Zur Antigendemaskierung IHC	Citratpuffer	10 mM Trinatriumcitrat Dihydrat pH 6,0
Puffer Zur Antigendemaskierung IHC	TRIS-EDTA Puffer	10 mM TRIS Base 1 mM EDTA 0,05% Tween 20 pH 8.0
Permeabilisierungspuffer IHC	TBSTX	0,025% Triton-X 1xTBS
Blockierlösung IHC		5% normal goat serum 1% BSA TBSTX
Kultiviermedium für Bakterien	LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl Optional: 100 µg/ml Ampicillin
Medium für Bakterien-Kulturplatten	LB-Agar	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 15 g/l Agar 100 µg/ml Ampicillin
Gelelektrophorese Plasmid	0,8% Agarosegel	8 g/l Agarose 1xTBE 0,01% GelRed
DNA Elektrophorese Puffer	1x TAE	40 mM TRIS Base 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,5
Ladepuffer DNA	TriTrack DNA Loading Dye (6X), R116, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	10 mM TRIS-HCl 0,03% Bromphenolblau 0,03% Xylencyanol FF 0,15% Orange G 60% Glycerol 60 mM EDTA pH 7.6
DNA-Leiter	SmartLadder, MW-1700-10, Eurogentec	
DNA-Leiter	GeneRuler 1 kb DNA Ladder, SM0313, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	
Transfektionsreagenz Plasmid	FuGENE 6, E2691, Promega GmbH	

Material und Methoden

Transfektionsreagenz siRNA	HiPerFect Transfection Reagent, 301704, Qiagen, Hilden
Antibiotikumselektion von transfizierten Zellen	Genitacin Selective Antibiotic (G418 Sulfate), 50 mg/ml, 10131035, Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

8.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8.13 Verwendete Verbrauchsmaterialien in der Studie.

Verwendung	Artikelbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
SDS-PAGE Gel	Any kD Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gels, 10 well, 30 µl	4568123	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Western Blot Membran	Immun-Blot® Low Fluorescence PVDF/Filter Paper Sets	1620261	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
8-Well Zellkulturkammer	x-well Zellkulturkammer, 8 Well auf Glas-Objektträger, ablösbar, steril	94.6170.802	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Beads zur DNA-Aufreinigung	AMPure XP	A63881	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Material und Methoden

8.1.10 Chemikalien

Tabelle 8.14 Verwendete Chemikalien in der Studie.

Verwendung	Artikelbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
HRP-Reagenz	Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents	RPN2106	GE Healthcare Bio-Sciences, Marlborough, MA, USA
Protease-Inhibitor	cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail	5892791001	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Phosphatase-Inhibitor	PhosSTOP™	4906845001	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Trypton	BD Bacto™ Peptone	211677	Becton, Dickinson and Company
Hefe-Extrakt	BD Bacto™ Yeast Extract	212750	Becton, Dickinson and Company
Carboplatin	Carboplatin Hospira 10 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung		PFIZER PHARMA PFE GmbH, Berlin
Paclitaxel	NeoTaxan® 6 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung		Hexal AG, Holzkirchen
Fixierlösung	4%ige Formaldehydlösung, gepuffert, pH 6,9	100496500	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Wasserstoffperoxid 30%	107209	Merck KGaA, Darmstadt
Triton	Triton® X-100		
Alkohol	Ethanol 99,5% denatured with 1% MEK	85033360	VWR, Avantor LLC, Radnor, PA, USA
Hämatoxylin	Mayer's Hämalaunlösung	109249	Merck KGaA, Darmstadt
1% Eosin Y	Eosin 1% alkoholisch	11503	MORPHISTO GmbH, Frankfurt am Main
Xylol	Xylol (Isomerengemisch) ≥ 98%	28973363	VWR, Avantor LLC, Radnor, PA, USA
Eindeckmittel	Eukitt® mounting medium	SAFF03989	

8.1.11 Geräte

Tabelle 8.15 Verwendete Geräte in der Studie.

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Western Blot und Gel-Dokumentationssystem	ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Netzgerät	PowerPac 300	
SDS-PAGE Kammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell	
Tank-Blot-System	Mini Trans-Blot® cell	
Horizontales Gelelektrophorese-System	Horizon 11.14	Gibco Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Kryostat	CM1950	Leica Microsystems, Wetzlar
Rotationsmikrotom	RM2255	Leica Microsystems, Wetzlar
Wasserbad mit Steckplatte	22721	MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster
Schnellkochtopf 6l	18/10	steinbach, real GmbH, Düsseldorf
Elektrische Kochplatte	KP180	Alaska, real GmbH, Düsseldorf
Thermoschüttler	Thriller	Peqlab, VWR Life Science, Darmstadt
Schüttel-Gerät	ST 5	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH, Staufien
Biologische Sicherheitswerkbank	Mars Safety Class 2	ScanLaf
Inverses Mikroskop	Leica DM IRB	Leica Microsystems, Wetzlar
Inkubator	Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Schüttelwasserbad	1083	GFL, Burgwedel
Schüttel-Inkubator	3033	GFL, Burgwedel
Universalzentrifuge	Heraeus Megafuge16R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA.
Mikrozentrifuge	5430 R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Anthos Reader HTII	anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld
Biolumineszenz-Plattenlesegerät	Hybrid Capture System, Digene	Qiagen, Hilden
Sequenziergerät	MiSeq	Illumina Inc., San Diego, Ca, USA
Kapillar-Elektrophorese System	Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA

Material und Methoden

RT-PCR Plattform	Light Cycler 480 II	Roche, Merck KGaA, Darmstadt
Thermocycler	peqSTAR 2x Gradient	Peqlab, VWR Life Science, Darmstadt
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

8.1.12 Software

Tabelle 8.16 Verwendete Software in der Studie.

Bezeichnung	Version	Literatur
Microsoft Word	2016, MSO 32-Bit	
Microsoft Excel	2016, MSO 32-Bit	
ImageJ	1.50e Java version 1.6.0_24 (64-bit)	(110)
Prism 5 Für Windows	Version 5.03, 2009	
Image Lab	Version 6.0.0 build 25 Standard edition, 2017 BioRad Laboratories, Inc.	
Biomedical Genomics Workbench 4.1.1	API 10.1.1 Java version 1.8.0_112 QIAGEN Aarhus A/S	(111)
Serial Cloner	Version 2.6.1	
Multi Experiment Viewer (Mev)	Version 4.9.0 Windows 10 Java version 1.8.0_171	http://www.tm4.org (112)
Zen 2.3 (Blue Edition)	Version 2.3.69.1000 Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011	
SPSS	Version 25.0.0.1 (64-bit) IBM Corporation	

8.2 Methoden

8.2.1 DigiWest Proteinarray-Analyse

Proben kryokonservierter Primärtumore wurden mit einem Kryostat-Mikrotom mit einer Schnittdicke von 10µm geschnitten. Die Anzahl der Schnitte richtete sich nach der Größe der Schnittoberfläche und wurde für jede Probe einzeln berechnet. Benötigt wurden mindestens 13 mm³ an Tumormaterial pro Probe. Die Schnitte wurden lysiert und an das NMI Reutlingen für die weitere Analyse gesendet. Dort wurde das Gesamtprotein per SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 8.1 A) und auf eine Membran transferiert (B). Anschließend wurden die Proteine in unterschiedliche Molekulargewichtsgrößen unterteilt (C, D) und auf Beads mit einer spezifischen Farbkennzeichnung zu Identifikationszwecken immobilisiert (E). Eine Teilprobe der gepoolten Beads (F) mit Proteinen unterschiedlicher Molekulargewichtsgrößen einer Tumorprobe konnte daraufhin mit einem der 279 verschiedenen Antikörpern zur Immunmarkierung inkubiert (G) und anschließend in einem Durchflusszytometer untersucht werden (H). Das spezifische Signal eines Proteins konnte somit quantifiziert werden (I) (113).

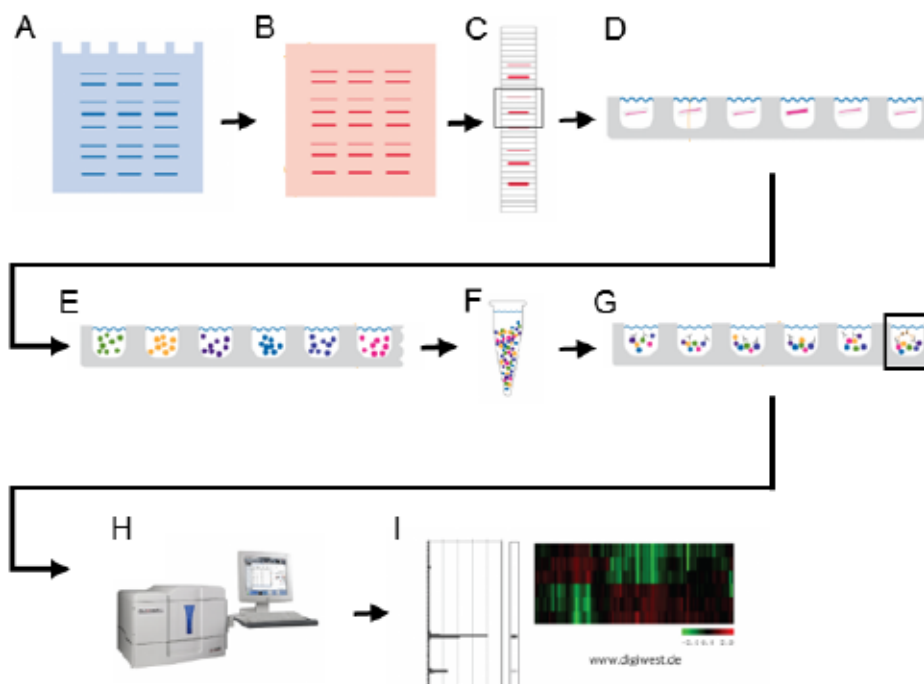


Abbildung 8.1 Workflow der DigiWest-Technologie. Adaptiert nach (114)

Material und Methoden

Für die Interpretation der Daten wurden zunächst die Messwerte auf ihre Verteilung mithilfe des D'Agostino-Pearson-Tests überprüft. Es konnte keine Normalverteilung der Daten festgestellt werden, woraufhin die Rohwerte logarithmiert wurden. In einer anschließenden Überprüfung wurde jedoch ebenfalls keine Normalverteilung erreicht. Folglich wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen „sensitiv“ und „resistent“ mit einem nicht-parametrischen Test (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) mittels MEV-Software ermittelt.

Aus der Summe der Ränge einzelner Analyten (W) und dem Prüfwert W^* wird ermittelt, ob die Messgrößen in resistenten Proben im Vergleich zu den sensitiven höher (+) oder niedriger (-) ausfallen. Ein Signifikanzwert unter 0,05 lehnt die Nullhypothese ab und bestärkt die Aussage, dass der berechnete Prüfwert W^* außerhalb des Intervalls des kritischen Werts liegt. Je größer der Abstand zum kritischen Wert (W^*) ist, desto niedriger ist auch der p-Wert.

Anhand dieser berechneten Werte wurde im Anschluss eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Sie dient dazu Objekte oder, in diesem Fall, Proteine zu gruppieren die in ihrem Profil eine Ähnlichkeit aufweisen. Dafür wird der Korrelationskoeffizient nach Pearson berücksichtigt. Die angewandte Average-Linkage-Methode nutzt den durchschnittlichen Abstand zweier Punkte aus verschiedenen Clustern, um eine Verbindung darzustellen. In der Heatmap sind alle Proteine und Proteinmodifikationen (Analyten) aufgelistet, die eine signifikante Veränderung zeigten. Die Beziehung zueinander oder eines Analyten zu einer Gruppe wird durch die Verästelung des Kladogramms verdeutlicht. Die Patienten wurden ebenfalls hierarchisch geclustert. Die Farbzuordnung ist visualisiert auf einer relativen Skala von -3 bis 3 der quantifizierten Analyten. Die Werte wurden pro Protein (pro Reihe) normalisiert.

Eine weitere Methode zur Analyse der Proteindaten, ist die *Palvidis Template Matching* (PTM) Methode. Hierbei wird ein Expressionsprofil eines Analyten aller Proben als Vorlage verwendet, um Ähnlichkeiten zu anderen Analyten zu bestimmen. Die Methode basiert auf einer Pearson-Korrelations-Analyse der Vorlage und der anderen Analyten des Datensatzes.

Allgemein bekannte biologische Funktionen der signifikanten Proteine wurden der GeneCards®-Datenbank entnommen (www.genecards.com).

8.2.2 DNA-Sequenzierung

8.2.2.1 BRAF V600E

Der Nachweis einer BRAF V600E (NM_004333.4 c.1799T>A) Mutation erfolgte nach einem bestehenden Protokoll (115). DNA wurde aus Tumorpoben mithilfe des QIAamp DNA Mini Kits isoliert und quantifiziert. Anschließend erfolgte eine Amplifizierung der Zielsequenz im BRAF-Gen durch eine PCR. Das finale Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Die PCR-Reaktionslösung bestand aus 2,5 mmol/l MgCl₂, 0,2 mmol/l dNTPs, 0,2 µmol/l Primern und 1.5 U Taq-Polymerase.

Tabelle 8.17 PCR-Programm der BRAF V600 Amplifizierung.

Segment-Nr.	Vorgang	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1	Denaturierung	95°C	15 s	1
2	Denaturierung	95°C	45 s	
3	Annealing	56°C	75 s	49
4	Elongation	72°C	45 s	
5	Elongation	72°C	15 s	1
6	Halten	4°C	∞	

Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 242 bp. Die Nukleotide des codierenden Strangs an Position 129 bis 149 und der entsprechenden Stelle des codogenen Strangs wurden am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf nach Sanger sequenziert. Anschließend wurden die Sequenzen an 139. Stelle des codierenden Strangs auf eine Substitution von T zu A überprüft.

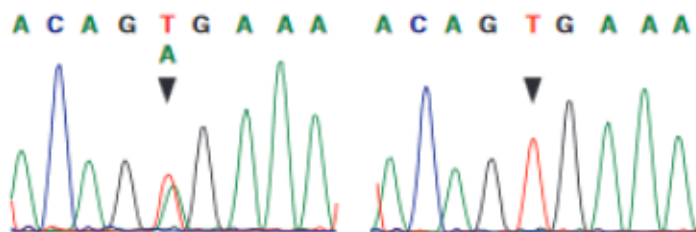


Abbildung 8.2 Bildliche Darstellung einer BRAF V600E Mutation anhand eines Chromatogramms. Links: Mutation mit Substitution von T zu A; rechts: wildtypische Sequenz BRAF. (116)

8.2.2.2 Multiplex Next Generation Sequencing

Das erste Patientenkollektiv wurde zusätzlich zur DigiWest-Proteinanalyse, auf DNA-Ebene untersucht. Es wurde hauptsächlich nach Mutationen in DNA-Reparaturgenen gesucht, sowie nach Veränderungen des *TP53*-Tumorsuppressorgens.

Eine Funktionsverlustmutation (*Loss of Function Mutation*) in diesen Genen kann Veränderungen grundlegender Signalwege in der Zelle bewirken, die schließlich eine Tumorbildung begünstigen oder die Tumorprogression fördern kann.

Es wurden nur Mutationen in Betracht gezogen, die entweder durch Änderung einer Base zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz der Proteine führen (*missense mutation*), oder nach einer Deletion oder Insertion eine Leserasterverschiebung (*frameshift mutation*) zur Folge haben, was einen vorzeitigen Abbruch des Proteins bewirkt. Hinzu kommen Mutationen in 3' oder 5' untranslatierten Bereichen (UTR), die in der Literatur bekannt dafür sind einen Einfluss auf das korrekt translatierte Protein zu haben. Mutationen in Spleiß-Donoren oder Akzeptoren wurden ebenfalls durch den Vergleich mit der Literatur identifiziert. Veränderungen in diesen Bereichen können ebenfalls zu einem Funktionsverlust des Proteins führen.

Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D* und *TP53* wurden ab einer Allelfrequenz von 18% interpretiert.

8.2.2.2.1 Agilent TruRisk Panel

Ein Großteil der Tumorproben (15 von 17) des ersten Patientenkollektivs wurden mit dem individuell angefertigten TruRisk Panel der Firma Agilent analysiert. Das Panel umfasst die codierenden Bereiche der Gene, die in der molekulargenetischen Diagnostik bei Tumorprädispositions-Erkrankungen relevante, erbliche Risiken erfassen. Die zugrundeliegende Methode beruht auf dem Prinzip der Sonden-basierten Einfangmethode von Zielsequenzen.

Material und Methoden

Tabelle 8.18 Liste der analysierbaren Gene aus dem Multigen-Sequenzierpanel Agilent TruRisk.

Genes		
ATM	ERCC2	MYCT1
BRCA1	FAM17A	PIK3CA
BRCA2	FANCA	PMS2
CDH1	FANCL	PPM1D
CHEK2	FANCM	PTEN
NBN	GPRC5A	RAD50
PALB2	MAP3K1	RINT1
RAD51C	MLH1	SMARCA4
RAD51D	MRE11A	STK11
TP53	MSH2	XRCC2
BARD1	MSH6	
BRIP1	MUTYH	

Die DNA-Isolierung aus kryokonserviertem Material wurde entsprechend der Arbeitsanleitung mithilfe des QIAamp DNA Mini Kits durchgeführt (Protokollversion 3, 2012, Qiagen). Je Probe wurde 20 mg Gewebe verwendet. Für die Herstellung der DNA-Bibliotheken wurden 50 ng DNA benötigt.

Der Arbeitsablauf zur Bibliotheken-Herstellung erfolgte wie in der Arbeitsanleitung für die „SureSelectQXT Target Enrichment“-Technologie beschrieben (Protokollversion D1, 2016, Agilent Technologies). Ein Optimierungsschritt wurde im PCR-Cycler-Programm für die Amplifizierung der adaptermarkierten DNA-Bibliothek vorgenommen. Hierbei wurde die Anzahl an Zyklen im dritten Segment von 8 auf 9 erhöht.

Tabelle 8.19 PCR-Programm für die Amplifizierung der Adapter-markierten DNA-Bibliothek.

Segment-Nr.	Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
1		68°C	2 min	1
2	Denaturierung	98°C	2 min	1
3	Denaturierung	98°C	30 s	9
	Annealing	57°C	30 s	
	Elongation	72°C	1 min	
4	Elongation	72°C	5 min	1
5	Halten	4°C	∞	1

In der Probenvorbereitung wurde die genomische DNA durch eine Fragment- und Adaptermarkierung getaggt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der Adapter-

Material und Methoden

markierten DNA-Bibliothek mit AMPure XP Beads. Schließlich wurde die Adapter-markierte DNA-Bibliothek amplifiziert und erneut mit AMPure XP Beads aufgereinigt. Die Qualität und Quantität der DNA wurden in einer Analyse mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer und einem DNA 1000 Assay überprüft. Die DNA-Proben wurden nach Hybridisierung an eine spezifische Bibliothek zum Einfangen der Zielgen-Sequenzen unter Verwendung von Beads, die mit Streptavidin beschichtet waren, erfasst.

Schließlich folgten die Indexierung und Probenverarbeitung für die Multiplex-Sequenzierung. Hierzu wurden die erfassten Bibliotheken amplifiziert um Indices hinzuzufügen. Nach Aufreinigung der sondierten DNA-Bibliothek mit AMPure XP Beads konnte die DNA-Menge und DNA-Qualität der Bibliothek bewertet werden. Diese Analyse wurde mittels Agilent 2100 Bioanalyzer und dem High Sensitivity DNA-Chip durchgeführt. In einem finalen Schritt wurden die Proben für die Multiplex-Sequenzierung zusammengeführt (4 µl/Probe, 5 nM). Schließlich wurde der Sequenzierlauf mit einer Beladung von insgesamt 17,5 pM mit 2 x 151 bp Paired-End-Reads auf dem Illumina MiSeq durchgeführt.

Nach dem Trimmen der Adapter aus den Lesevorgängen wurden die mit dem TruRisk Panel analysierten Proben durch Unterstützung der Firma *SophiaGenetics* ausgewertet. Die Ausgabedatei zu jeder Probe beinhaltete die Allelfrequenzen der Varianten.

8.2.2.2.2 QIAseq DNA Panel

Das Material des frischen, kryokonservierten Gewebes von zwei Proben des ersten Patientenkollektivs wurde für die vorangegangene Proteinanalyse aufgebraucht. Als Ersatz diente FFPE-Tumorgewebe der zwei Patientinnen, welches mit einem Panel analysiert wurde, das eine Sequenzierung von Gewebe mit dieser Art der Gewebekonservierung zulässt (QIAseq Human Breast Cancer Panel).

Material und Methoden

Das QIAseq Targeted DNA Panel integriert molekulare Barcodes (oder molekulare „Tags“) in einem einzigen genspezifischen, Primer-basierten Anreicherungsprozess und ermöglicht so den Variantennachweis in genomischen Zielregionen.

Es wurden zwei Schnitte mit einer Schnittdicke von 10 µm von jeder Tumorprobe verwendet. Nach der erfolgreichen DNA-Isolation (GeneRead DNA FFPE) sowie der Qualitätskontrolle mit Quantifizierung der DNA-Menge (QIAseq DNA QuantiMIZE), wurden 100ng DNA für die Library-Herstellung eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Zuerst wurden in einer einzigen, kontrollierten Multi-Enzym-Reaktion fragmentiert wurden. Außerdem wurden die Enden repariert und Adenosine an das Ende hinzugefügt. Die präparierten DNA-Fragmente wurden anschließend an ihren 5'-Enden mit einem für die Sequenzierungsplattform spezifischen Adapter ligiert, der einen für jedes Fragment einzigartigen Sequenz-Barcode (molekularer „Tag“) und einen spezifischen Probenindex für jede Probe enthält. Die ligierten DNA-Moleküle durchlaufen mehrere Zyklen der Target-Anreicherungs-PCR, wobei ein Gen-spezifischer Primer an eine Genregion und ein universeller Vorwärtsprimer an eine Adaptersequenz bindet. Diese Reaktion stellt sicher, dass Zielregionen von Interesse und molekulare Barcodes ausreichend angereichert sind, um in der endgültigen Bibliothek dargestellt zu werden. Eine universelle PCR wurde schließlich durchgeführt, um die Bibliothek zu amplifizieren und plattformspezifische Adaptersequenzen hinzuzufügen, wodurch die Bibliothek vervollständigt wird.

Die Quantifizierung der Library erfolgte auf einem DNA-Chip (High Sensitivity DNA-Chip) sowie mittels eines qPCR-basierten Kits (QIAseq Library Quant Assay Kit). In einem finalen Schritt wurden die Proben für die Multiplex-Sequenzierung zusammengeführt. Schließlich wurde der Sequenzierlauf mit einer Beladung von insgesamt 17,5 pM mit 2 x 151 bp Paired-End-Reads auf dem Illumina MiSeq durchgeführt.

Für die Bestimmung der Varianten wurde die Software QIAseq Biomedical Workbench verwendet. Als Schwellenwert einer Mutationsvariante wurde eine Allelfrequenz von 18% gewählt. Varianten mit einer niedrigeren Allelfrequenz wurden nicht abgebildet.

Material und Methoden

Es wurden die Tumorsuppressorgene *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D* und *TP53* ausgewertet.

8.2.3 In-silico-Analyse von mRNA-Expressionsdatensätzen

Die Überlebensanalysen wurden anhand öffentlich verfügbarer Datensätze von mRNA-Expressionen verschiedener Gene in Tumoren, sowie mit Daten des progressionsfreien Überlebens der Patientinnen, durchgeführt. Voraussetzung war eine seröse Histologie der Tumoren, sowie eine Platin- und Taxol-basierte Chemotherapie der Patientinnen. Basierend auf Daten des Kaplan-Meier-Plotters (www.kmplot.com, (117)) konnten Kohorten durch den Logrank-Test verglichen werden. Die verwendeten Datensätze GSE14764, GSE26193, GSE30161, GSE32062, GSE63885, GSE9891 und TCGA umfassten 616 Patientinnen. Die Grenze für den Beobachtungszeitraum wurde auf fünf Jahre festgelegt und Patientinnen ohne Ereignis in diesem Zeitraum wurden zensiert.

8.2.4 Gen-Ontologie-Analyse

Die Gen-Ontologie-Analyse wurde mit Genen der Proteine aus der DigiWest-Analyse durchgeführt. Hierbei wurden validierte Kandidaten aus vorangegangenen Analysen, deren differentielle Expression einen Einfluss auf das progressionsfreie Überleben der Patienten hat, in eine Gen-Ontologie-Datenbank (<http://www.geneontology.org/>) eingespeist. Der Algorithmus berechnet anhand des exakten Fisher-Tests eine Zugehörigkeit der Kandidaten zu einem funktionalen, biologischen Netzwerk.

8.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung diente dazu, den Tumorgehalt einer Gewebeprobe zu bestimmen. Hämatoxylin oder Hämalan, färbt basophile Strukturen, wodurch die in den Zellkernen enthaltene DNA und die Ribosomen im rauen endoplasmatischen Retikulum blau markiert werden. Die Gegenfärbung mit Eosin färbt alle acidophilen Strukturen, wie das Cytoplasma, rot. Eine Anhäufung von heterogenen Zellkernen lassen auf Tumorzellen schließen, wodurch letztendlich im Gewebe zwischen Tumorzellen und Stromazellen unterschieden werden kann. (118)

Für die Färbung wurde kryokonserviertes Tumorgewebe in Wasser (3 x 2 min H₂O) inkubiert. FFPE-Gewebe muss hingegen nach der Entparaffinierung (2 x 2 min Xylol) in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70%, 2 x H₂O; je 2 min) rehydriert werden. Die Zellkerne wurden anschließend für 2 min in Hämatoxylin gefärbt und 15 min mit lauwarmen Leitungswasser gespült. Die Proben wurden für 30 sec in destilliertem Wasser und in 95 prozentigen Alkohol getaucht, und schließlich in Eosin-Färbelösung für 1 min inkubiert. Daraufhin erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 95%, 2 x 100%, je 2 min) und in Xylol (2 x 2 min). Schließlich wurden die Gewebeproben mit Eindeckmittel und Deckgläschen bedeckt.

8.2.6 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung erfolgte über eine Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern gegen ein Protein. Dieser Antikörper wird in einem weiteren Schritt wiederum von einem Sekundärantikörper erkannt. Dieser Sekundärantikörper besitzt ein Enzymkonjugat, welches nach Zugabe eines Substrats einen Farbumschlag bewirkt. Dieser Farbumschlag dient dazu, das Gewebe zu charakterisieren indem Färbung hinsichtlich der Quantität (Anteil an gefärbten Tumorzellen), der Intensität und der intratumoralen Lokalisation beurteilt wird.

Material und Methoden

Im ersten Validierungskollektiv wurden anhand von Tissue Microarrays (TMA) 34 Proben von serösen Ovarialkarzinomen mit Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Geweben (FFPE) auf Objektträgern immunhistochemisch gefärbt (119, 120). Zu jeder Tumorprobe gehören jeweils zwei Gewebeproben mit Durchmessern von 1.0-1.5 mm, die Schnittdicke betrug 4 µm. Das Kollektiv umfasst 22 Patientinnen die als sensitiv, und 12 die als therapieresistent klassifiziert werden.

Das FFPE-Gewebe wurde zunächst entparaffiniert (2 x 2 min Xylol) und in einer absteigenden Alkoholreihe (99,5%, 95%, 70%, 2 x H₂O; je 2 min) rehydriert. Die Antigendemaskierung wurde mit der Schnellkochtopfmethode durchgeführt. Hierfür wurden die Gewebeschnitte für 15 min in Puffer aufgekocht. Für eine Immunmarkierung von EZH2, pRb und pERK1/2 wurde Citratpuffer verwendet, für die ATM-Färbung wurden die Proben in TRIS-EDTA-Puffer aufgekocht. Endogene Peroxidasen wurden anschließend in 3-prozentiger Wasserstoffperoxidlösung deaktiviert. Eine unspezifische Bindung der Antikörper wurde mit zweimaligem Waschen in Blockierlösung für jeweils 5 min vermieden. Die Inkubation der Primärantikörper, verdünnt in einer Antikörper-Verdünnungslösung, erfolgte bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde erneut zweimal für 5 min mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Die Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem Waschen (2 x 5 min) in Permeabilisierungspuffer wurden die Proben mit HRP-gekoppeltem Avidin für 15 min inkubiert. Das Avidin bindet an Biotin, was in einer HRP-Enzymaktivität spezifisch an den gebundenen Antikörpern resultiert. Schließlich wurden die Proben dreimal für 5 min in 1xTBS gewaschen. Die DAB-Färbelösung wurde durch das Mischen des Chromogens mit dem Substrat in einem Verhältnis von 1:50 vorbereitet. DAB dient als Wasserstoffdonor für das HRP-Enzym in Gegenwart von H₂O₂, was im DAB-Substrat enthalten ist. Die Oxidation bewirkt eine Polymerisierung der DAB-Moleküle, welche als brauner Niederschlag im Gewebe sichtbar wird. Nach zehnminütiger Inkubationszeit wurde mit Leitungswasser gespült. Die Zellkerne wurden für eine Gegenfärbung anschließend für 1 min in Hämatoxylin gefärbt und 15 min mit lauwarmen Leitungswasser gespült. Daraufhin erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 2 x 96%, 2 x 99%, je 2 min) und in Xylol (2 x 5 min). Schließlich wurden die Gewebeproben mit Eindeckmittel und Deckgläschen bedeckt.

Material und Methoden

Der Farbumschlag des DAB diente dazu, das Gewebe zu charakterisieren indem die Färbung hinsichtlich der Quantität (Anteil an gefärbten Tumorzellen), der Intensität und der intratumoralen Lokalisation beurteilt wird. Eine vergleichbare Einheit ist hierbei der immunoreaktive Score (IRS, nach Remmele und Stegner (121)). Er berücksichtigt die Färbeintensität sowie den Anteil an positiven Zellen auf einer Bewertungsskala von 1 bis 12. Diese Bewertung wurde von einer Fachärztin für Pathologie in einer doppelblinden Studie durchgeführt. Die beiden Werte werden schließlich gemittelt und statistisch ausgewertet.

Tabelle 8.20 Berechnung des immunreaktiven Scores. (121)

A Anteil an positiven Zellen [%]		B Intensität der Färbung	IRS Score Multiplikation von A und B
0 keine positiven Zellen	x	0 keine Farbreaktion	0-1 negativ
1 <10% positive Zellen		1 geringe Farbreaktion	2-3 gering
2 10-50% positive Zellen		2 moderate Farbreaktion	4-8 moderat
3 51-80% positive Zellen		3 intensive Farbreaktion	9-12 stark positiv
4 >80% positive Zellen			

Die in sensitiv und resistent unterteilten Proben wurden als separate Gruppen betrachtet und anschließend mithilfe des ungepaarten t-Tests verglichen, da die Messwerte normalverteilt waren (D'Agostino-Pearson-Test, n.s.) mit ähnlicher Varianz (F-Test, n.s.). Die EZH2-Färbung hat aufgrund der Nutzung einer älteren Charge des Substrats eine gelbliche Färbung. Für jede Färbung wurde Kontrollgewebe mit einem Standard-Färbeprotokoll mitbearbeitet. Ebenso wurden Färbekontrollen mit Isotyp-Antikörpern und ohne Erstantikörper durchgeführt.

Material und Methoden

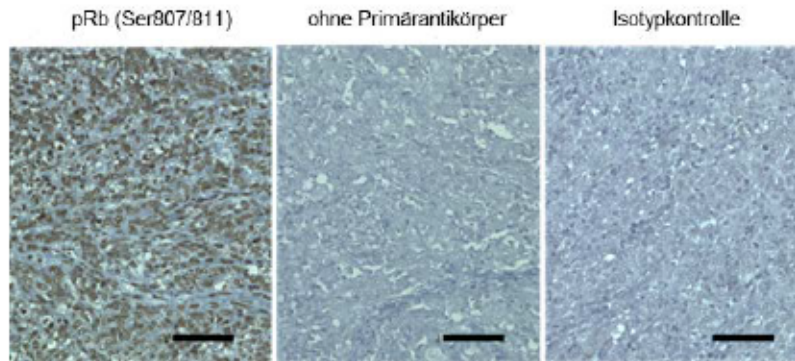


Abbildung 8.3 Färbekontrollen der Immunhistochemiefärbung. Links: normale Färbung mit Primär- und Sekundärantikörpern. Mitte: Färbeprotokoll ohne Primärantikörper. Rechts: Färbeprotokoll mit Isotyp-Kontrollantikörpern.

8.2.7 Proximity Ligation Assay

Der Proximity Ligation Assay dient dazu eine räumliche Protein-Protein-Annäherung zu visualisieren und innerhalb einer Zelle nachzuweisen. Hierbei werden die zwei Zielproteine zunächst mit Antikörpern immunmarkiert (Abbildung 8.4, (a)), die mit konjugierten DNA-Oligomeren versehen sind, und aus unterschiedlichen Spezies gewonnen werden. Befinden sich die markierten Proteine in unmittelbarer Nähe (<16 nm), werden die Oligomere ligiert (b), und es kann durch eine PCR-Reaktion eine DNA-Sequenz amplifiziert werden (c). Fluoreszenzmarkierte Sonden binden an das PCR-Produkt (d), die schließlich durch Fluoreszenzmikroskopie erfasst werden können (122).

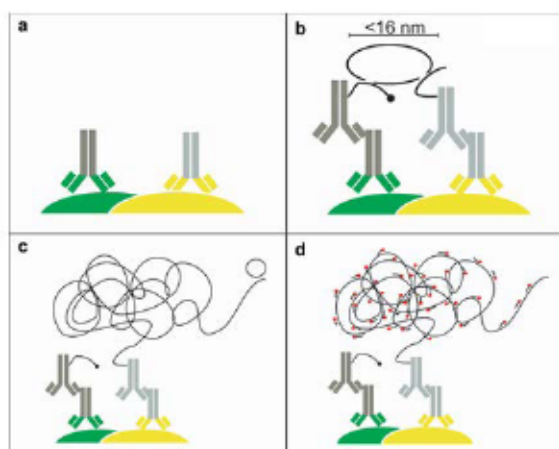


Abbildung 8.4 Prinzip des Proximity Ligation Assay. (121)

Material und Methoden

Für die Fluoreszenzmarkierung der Co-Lokalisation der Proteine von EZH2 und pATM wurden die Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten TMA-Gewebe zunächst entparaffiniert (in Xylol, 2x10min) und in einer absteigenden Alkoholreihe (99,5%, 95%, 70% Ethanol, H₂O) rehydriert. Die Antigendemaskierung erfolgte nach der HIER-Methode (*Heat-Induced Epitope Retrieval*). Dafür wurden die Schnitte in Citratpuffer für 15 min aufgekocht. Nach dem Abkühlen konnte das Protokoll der PLA-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Hierbei wurde der EZH2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:150, sowie der pATM-Antikörper 1:500 eingesetzt.

Die Proben werden für die Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Fluoreszenzsignale im Cy5-Filter wurden innerhalb einer festgelegten Fläche gezählt (Abbildung 8.5). Zudem wurde der Tumoranteil innerhalb dieser Fläche bestimmt und gegengerechnet, sodass die resultierenden Werte immer einem Tumorgehalt von 100% entsprechen.

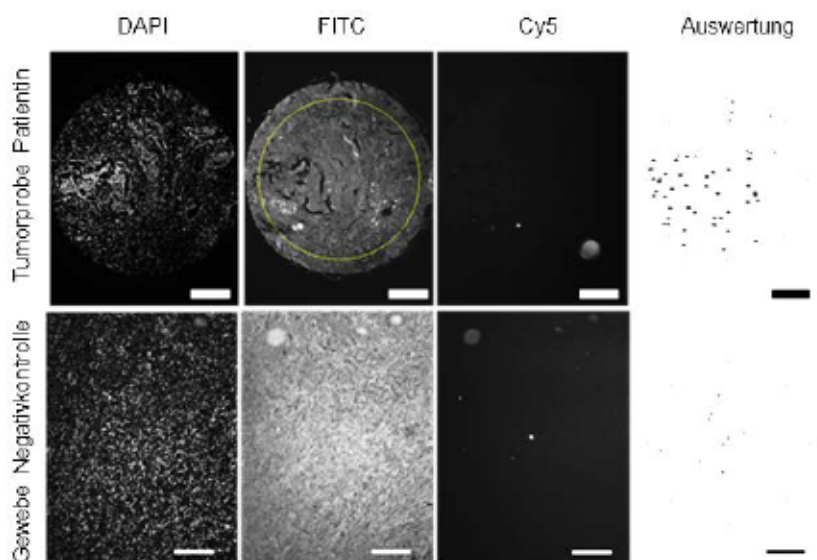


Abbildung 8.5 Auswertung der PLA-Signale in Gewebeproben.

Die berechneten Werte beider Proben einer Patientin wurden anschließend gemittelt und statistisch ausgewertet. Insgesamt wurden mit dieser Methode 34 Patientenproben untersucht.

Material und Methoden

Als Negativkontrolle diente je ein Ansatz mit Antikörper-Isotypen anstatt der beiden spezifischen Antikörper (Abbildung 8.6).

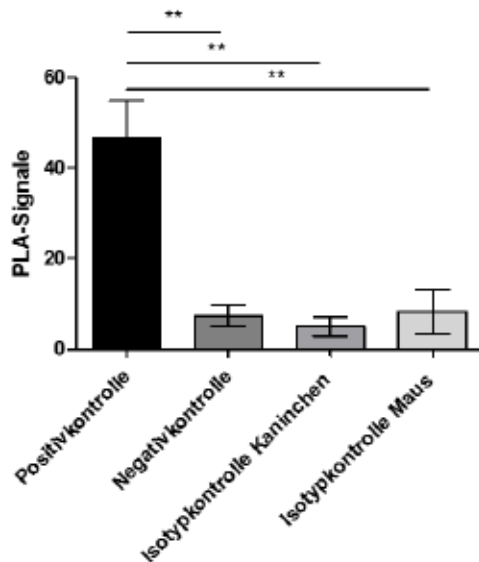


Abbildung 8.6 Statistische Auswertung der Negativkontrollen der PLA-Färbung in einem Gewebe. Positivkontrolle: Originalprotokoll des PLA; Negativkontrolle: PLA-Protokoll ohne Primärantikörper; Isotypkontrolle Maus/Kaninchen: Maus- oder Kaninchen-Antikörper wurden gegen unspezifische Isotyp-Antikörper der gleichen Spezies ausgetauscht. Einfache Varianzanalyse; Dunnett-Test.

Es wurden zwei Methoden zur Auswertung verwendet. Zunächst wurden die Werte der Patientenprobe gegeneinander verglichen. Dadurch, dass die Werte nicht normalverteilt waren, wurden 22 sensitive gegen 12 resistente Tumoren in einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen. Darüber hinaus wurden die gemittelten Messwerte für eine Überlebensanalyse am unteren Quartil dichotomisiert und mithilfe des Logrank-Tests verglichen. Die Information zum krankheitsfreien Überleben der Patienten wurde hierfür verwendet.

Für den Nachweis der Co-Lokalisation von EZH2 und pATM in Zelllinien wurden diese zunächst in Zellkulturkammern kultiviert und bei ca. 60% Konfluenz mit 4%iger Formaldehydlösung für 15 min fixiert. Es folgte eine Inkubation mit Permeabilisierungslösung für 10 min. Anschließend wurde das PLA-Protokoll nach Herstellerangaben durchgeführt.

Material und Methoden

In Zelllinienzellen wurden zunächst die Anzahl der Zellkerne, und dann die Anzahl der PLA-Signale pro Bildausschnitt gezählt. Für den Vergleich wurde die Anzahl der Signale pro Zellkern berechnet und in einer einfachen Varianzanalyse (*One-way ANOVA*), sowie *post hoc* mit einem Dunnett-Test zur unbehandelten Kontrolle verglichen. Als technische Kontrollen dienten CPTX behandelte Zellen jeweils ohne einen der beiden Antikörper, jedoch mit Isotyp-Antikörpern der gleichen Spezies (Abbildung 8.7).

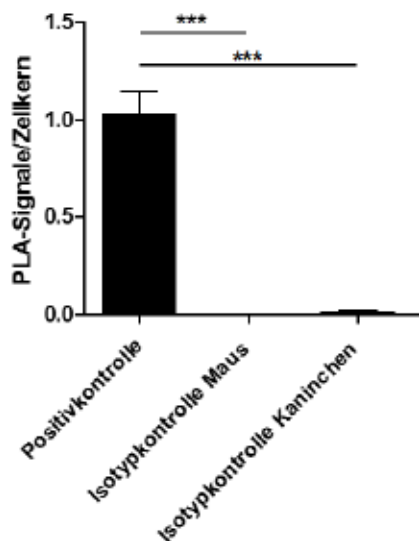


Abbildung 8.7 Auswertung der PLA-Analyse in A2780-Zellen nach Behandlung mit CPTX. Gemessen wurden die PLA-Signale von pATM und EZH2 oder entsprechender Isotyp-Kontrollfärbung. Die Quantifizierung der Signale erfolgte pro Zellkern. Einfache Varianzanalyse; Dunnett-Test.

8.2.8 Kultivierung von Zelllinienzellen

Die Zelllinie A2780 wurde aus Tumorgewebe einer nicht behandelten Ovarialkarzinom-Patientin isoliert. A2780cis ist ein Abkömmling der parentalen Zelllinie A2780, die aufgrund einer chronischen Exposition gegenüber steigenden Konzentrationen von Cisplatin als platinresistent gilt. Caov3 wurden aus einem serösen Adenokarzinom isoliert, IGROV1 aus einem endometrioidem Ovarialkarzinom. Ovar-3 resultiert ebenfalls aus einem serösen Adenokarzinom, wurde allerdings aus Aszitesflüssigkeit isoliert, ebenso wie PEO1. PEO4 entstammt der gleichen Patientin wie PEO1, allerdings erhielt die Patientin in der

Material und Methoden

Zwischenzeit Cisplatin, 5-Fluoruracil und Chlorambucil. SKOV-3 wurde ebenfalls aus Aszitesflüssigkeit einer Patientin mit primären Adenokarzinom gewonnen.

Ein Mediumwechsel der Zellen erfolgte alle 2-3 Tage. Bei einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen enzymatisch abgelöst und in neue Flaschen in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 verteilt. Zur Ablösung der adhärennten Zellen wurde 1x Trypsin-EDTA verwendet, welches nach der Zentrifugation und Pelletierung der Zellen abgenommen wurde. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen.

8.2.9 Western Blot

Gesamtzelllysate wurden unter Verwendung von RIPA-Puffer hergestellt, welcher Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Roche) enthielt. Nach der Pelletierung der Zellrückstände konnte die Proteinkonzentration des Überstands durch eine BCA-Proteinbestimmung (Pierce) ermittelt werden. Gleiche Proteinmengen (jeweils 15 µg) wurden mit Laemmli-Ladepuffer gemischt, für fünf Minuten bei 95°C aufgekocht und unter reduzierenden (DTT) und denaturierenden (SDS) Bedingungen auf vorgefertigte Gele (TGX Stain-Free, BioRad) aufgetragen (3). Anschließend wurden die Proteine ihrer Größe nach bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt (Auflösung 250 kDa-10 kDa). Die aufgetrennten Proteine im Gel wurden mittels Tank-Blotting über Nacht bei 30 V und 4°C auf eine PVDF-Membran übertragen, die zuvor mit Methanol aktiviert wurde. Nach einer visuellen Bestätigung des Proteintransfers (TGX-Visualisierung, BioRad) wurden unspezifische Bindungsstellen der Antikörper mithilfe einer Blockierlösung abgesättigt. Schließlich erfolgte die Detektion bestimmter Proteine mit Antigen-spezifischen Primär-, und nachfolgend mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern. Hierbei wurde das Maus-Immunglobulin durch das Fluorophor AF488 visualisiert, Kaninchen-Antikörper durch AF647 und Ziegen-Antikörper mit AF546. Die Abbildung der Membranen wurden in den geeigneten Kanälen mithilfe des ChemiDoc Imaging Systems (BioRad) aufgenommen. Die Quantifizierung der Signale wurde mithilfe der Software ImageJ durch eine densitometrische Auswertung durchgeführt. Die Werte der

Material und Methoden

Zieleproteine wurden anhand der Werte der Ladekontrolle (GAPDH) sowie zueinander normiert.

Ob ein signifikanter Zusammenhang von Proteinmenge und Resistenzverhalten der einzelnen Zelllinien besteht, wurde mithilfe der Spearman Rangkorrelation berechnet, denn die Messwerte waren zum Teil nicht normalverteilt. Hierfür wurden die gemessenen, zu GAPDH normierten Werte mit den IC_{50} -Werten der einzelnen Behandlungen verglichen.

8.2.10 RNA-Interferenz von EZH2 und ATM

Die RNA-Interferenz eines Gens dient dazu, die Proteinbiosynthese dieses Gens auf molekularer Ebene zu unterbinden, um letztendlich eine spezifische Reduktion eines Proteins in der Zelle herbeizuführen. Dieser *Knockdown* von EZH2 und ATM wurde mit verschiedenen siRNAs für EZH2, ATM oder für beide Proteine gleichzeitig durchgeführt. Die Transfektion wurde mit HiPerFect Transfektionsreagenz gemäß den Herstellerrichtlinien durchgeführt. Proteinlysate-Proben zur Überprüfung der Knockdown-Effizienz wurden zunächst an Tag 3 kurz vor der erneuten Zugabe von siRNAs und dem Beginn des Chemosensitivitätstests, und schließlich an Tag 6 nach der Endpunktmessung gesammelt. Kontroll-siRNAs ohne Zielsequenz im menschlichen Genom wurden als Negativkontrolle verwendet.

Anhand der Endpunktmessung wurden Werte von EZH2- und/oder ATM-supprimierten Zellen jeder Konzentration mit den Werten der mit Kontroll-siRNA inkubierten Zellen verglichen. Hierfür wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) mit einem Bonferroni-Test durchgeführt.

8.2.11 ATP-Chemosensitivitätstest

Um Versuche durchzuführen, die dem Resistenzverhalten der Zellen in den Tumoren entsprechen, wurde zunächst der Resistenzstatus jeder Zelllinie bestimmt. Hierfür wurden die

Material und Methoden

Zellen kultiviert und in mehreren ($n=3$) Replikaten ausgesät. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit absteigenden Konzentrationen einer sukzessiven Verdünnungsreihe von Carboplatin (CP), Paclitaxel (TX) oder der Kombination (CPTX) behandelt. Die absolute Menge sowie das Verhältnis der beiden Agenzien (2,65:1) entsprach einer Studie zur Konzentrationsbestimmung im Blut behandelter Patientinnen (123).

Nach drei Tagen Inkubation wurde die Zellviabilität mittels eines ATP-Chemosensitivitätstests (HS II, Roche) anhand von Lumineszenz gemessen. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben umgesetzt. Je mehr Zellen überleben, desto höher ist die ATP-Konzentration und entsprechend das emittierte Licht. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Anhand der Wachstumskurven wurde schließlich der IC_{50} -Wert (mittlere inhibitorische Konzentration, *half maximal inhibitory concentration*) berechnet. Er dient zum interzellulären Vergleich des Grades der Resistenz der verschiedenen Zelllinien.

Bei jeder Behandlung (CP, TX und CPTX) wurden je drei Messwerte der mit siRNA behandelten Zellen (siEZH2, siATM oder siEZH2+ATM) mit Dreifachmessungen der siNK-Zellen in jedem Verdünnungsschritt verglichen. Hierfür wurde eine zweifache Varianzanalyse (*Two-Way ANOVA*) mit anschließendem Bonferroni Post-hoc-Test durchgeführt.

8.2.12 EZH2-Plasmid Klonierung und Konstruktion eines Leervektors

In einem reziproken Ansatz zur EZH2-Suppression wurde ein transientes EZH2-Expressionsmodell in SKOV3-Zelllinien mit einem basal niedrigen EZH2-Gehalt angestrebt.

Hierfür wurde ein Expressionsplasmid käuflich erworben (pCMVHA hEZH2, (124)). Das Plasmid enthält, neben der EZH2-cDNA unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promoters, ein Neomycin-Resistenzgen welches die Selektion der Zellen ermöglicht, die das Plasmid aufgenommen haben.

Material und Methoden

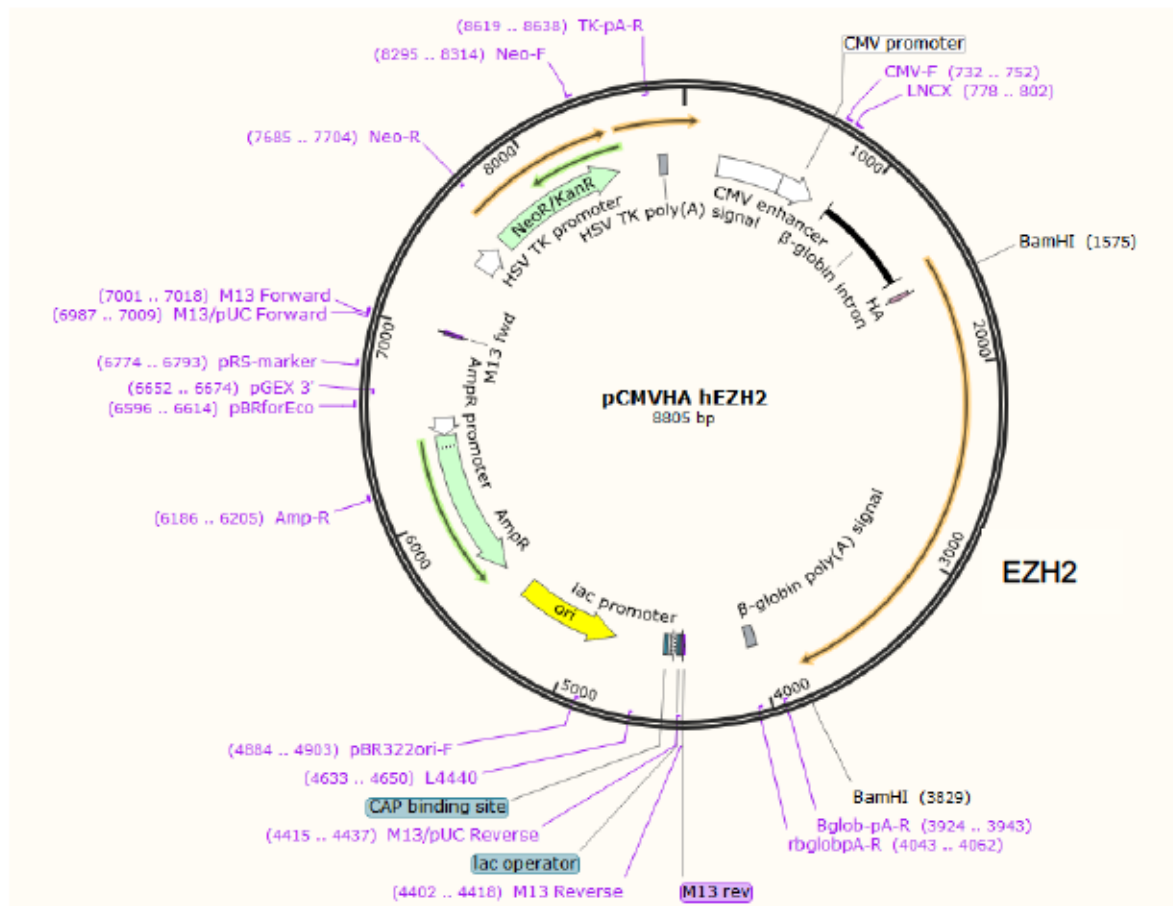


Abbildung 8.8 Vektorkarte des EZH2-Plasmids.

Zur Authentifizierung des Plasmids wurde es zunächst mit einer Maxipräparation vervielfältigt, und mithilfe von ausgesuchten Sequenzier-Oligonukleotiden beidseitig nach Sanger (BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) sequenziert und authentifiziert.

Für einen validen Vergleich wurde eine Leervektorkontrolle generiert, indem die EZH2-cDNA durch flankierende Restriktionsschnittstellen mithilfe des spezifischen Restriktionsenzym BamHI herausgeschnitten wurde. Dafür wurde 1 µg des Plasmids, und 10 U des Restriktionsenzym benötigt, welche für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden. BamHI hat zwei Schnittstellen innerhalb des Plasmids: an Position 1575 zu Beginn der EZH2 cDNA und am Ende der Sequenz an Position 3829. Der Restriktionsansatz enthielt zwei Fragmente – Das Rückgrat (6551 bp) sowie die EZH2-cDNA (2254 bp). Nach einer Gel-Elektrophorese in einem 0,9%igen Agarosegel wurde die Bande, die das Rückgrat enthielt, aus dem Gel herausgeschnitten.

Material und Methoden

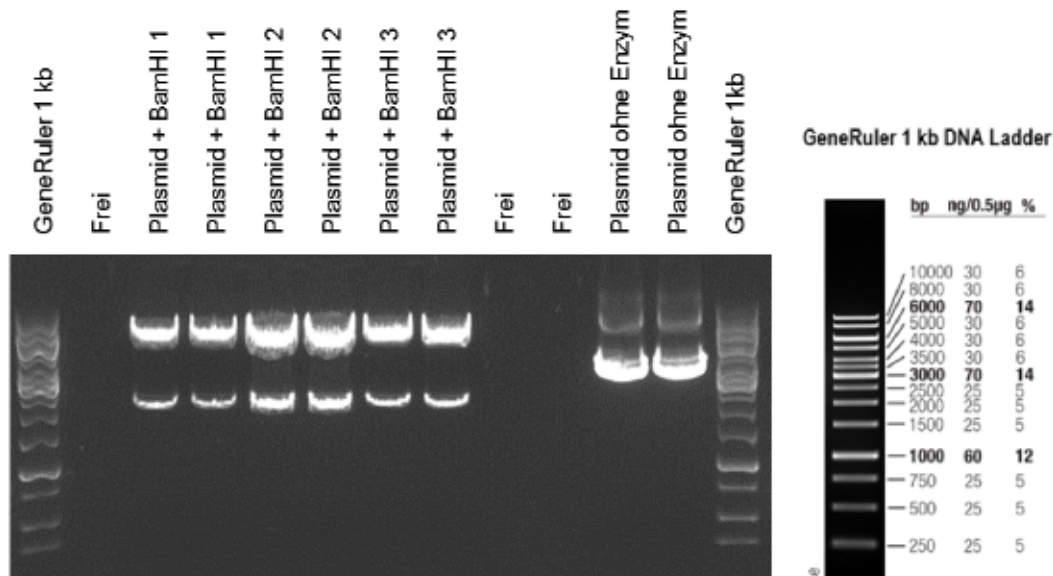


Abbildung 8.9 Links: Restriktionsverdau des EZH2-Plasmid mithilfe des BamHI-Restriktionsenzym. Die obere Bande zeigt den Vektor ohne das EZH2-Fragment. 100ng DNA/Tasche. Rechts: Bandenhöhe GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Die enthaltene DNA wurde mithilfe des DNA-Extraktions-Kits eluiert. Anschließend wurde das eluierte Fragment durch die Anwendung eines Ligase-Kits zirkularisiert, und schließlich nach der Vervielfältigung mit Mini-Präparationen durch einen diagnostischen Verdau überprüft. Drei Ansätze mit der bestätigten Größe des Rückgrat-Fragments wurden für die Transfektion in der Zelllinie durch eine Maxi-Präparation vervielfältigt, und mittels Sanger-Sequenzierung authentifiziert.

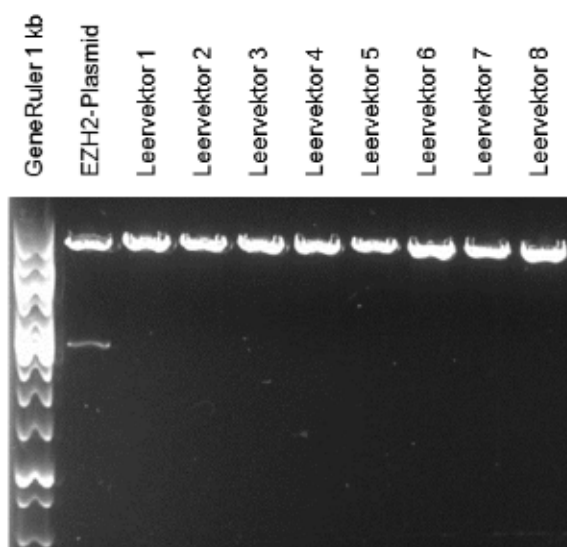


Abbildung 8.10 Diagnostischer Verdau (BamHI) des EZH2-Plasmids und der Leervektor-Klone.

Material und Methoden

Die Plasmid-Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben mithilfe des Transfektionsreagens FUGENE 6. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Nach zwei Tagen im normalen Kulturmedium wurde mit der Selektion der Zellen begonnen.

Für die Selektion mit dem Antibiotikum G-418 (Geneticin, ein Neomycin-Analogon) wurden zunächst in einem Vorversuch untransfizierte Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen behandelt. Nach einer Inkubationsdauer von sieben Tagen wurde die Viabilität gemessen. Die Selektion der mit dem Plasmid transfizierten Zellen erfolgte mit einer Konzentration von 1000 µg/ml. Es war die Verdünnungsstufe, welche über 90% der inkubierten Zellen im Vorversuch nicht überlebt haben. Nach einer Behandlungsdauer der transfizierten Zellen von zehn Tagen wurde die Konzentration des Antibiotikums auf 500 µg/ml reduziert.

Die Zellen wurden für Chemosensitivitätstests wie in Kapitel 8.2.11 beschrieben verwendet. Von den verbliebenen Zellen wurden Proteinlysate hergestellt, um den Proteingehalt von EZH2 in den Zellen zu ermitteln. Die Behandlung mit Carboplatin und Paclitaxel erfolgte zusätzlich zur G418-Behandlung, um einen Selektionsdruck weitestgehend beizubehalten und sicherzustellen, dass die jeweiligen Zellen das Plasmid nicht ausschleusen. Nach einer Behandlungsdauer von drei Tagen wurde die Endpunktmessung des ATP-Gehalts durchgeführt.

Drei Messwerte der EZH2-überexprimierenden Zellen wurden mit Dreifachmessungen der Leervektor-transfizierten Zellen in jedem Verdünnungsschritt verglichen. Hierfür wurde eine zweifache Varianzanalyse (*Two-Way ANOVA*) mit anschließendem Bonferroni Post-hoc-Test durchgeführt.

9 Ergebnisse

9.1 Erstellung eines Proteinprofils klinisch dokumentierter therapiesensitiver und -resistenter Ovarialkarzinome

Die Untersuchung von primärem Patientenmaterial sollte zu Beginn der vorliegenden Arbeit dazu dienen, um Unterschiede in Proteinprofilen zwischen adjuvant behandelten, therapieresistenten und -sensitiven Ovarialkarzinomen zu beschreiben. Hierfür wurden Tumore von 17 Patientinnen untersucht. Die Patientinnen wurden wie in 8.1.1.1 beschrieben in „resistent“ und „sensitiv“ unterteilt. Die Gruppe der resistenten umfasste acht, die der sensitiven neun Patientinnen. Zunächst wurde mithilfe der DigiWest-Technologie der Gehalt an Proteinen und Proteinmodifikationen in den Tumorproben quantifiziert. Anschließend wurden die Daten statistisch ausgewertet, um Unterschiede innerhalb des stratifizierten Kollektivs zu identifizieren. Um eine Verbindung zu genetischen Aberrationen zu bekommen, wurden in diesen Patientenkollektiven ebenfalls Techniken zur Mutationsdetektion verwendet: Sanger-Sequenzierung sowie Next Generation Sequencing.

9.1.1 Proteinarray-Untersuchung mittels DigiWest-Technologie

Die DigiWest-Technologie ermöglicht es, aus kryokonserviertem, primärem Tumormaterial sowohl die Protein-Gesamtmenge als auch Proteinmodifikationen zu quantifizieren, wodurch anschließend eine statistische Auswertung durchgeführt werden kann, um Subgruppen miteinander zu vergleichen. Durch Immunmarkierung mit 279 verschiedenen Antikörpern konnte ein umfassendes Proteinprofil der 17 Tumorproben generiert werden.

Ergebnisse

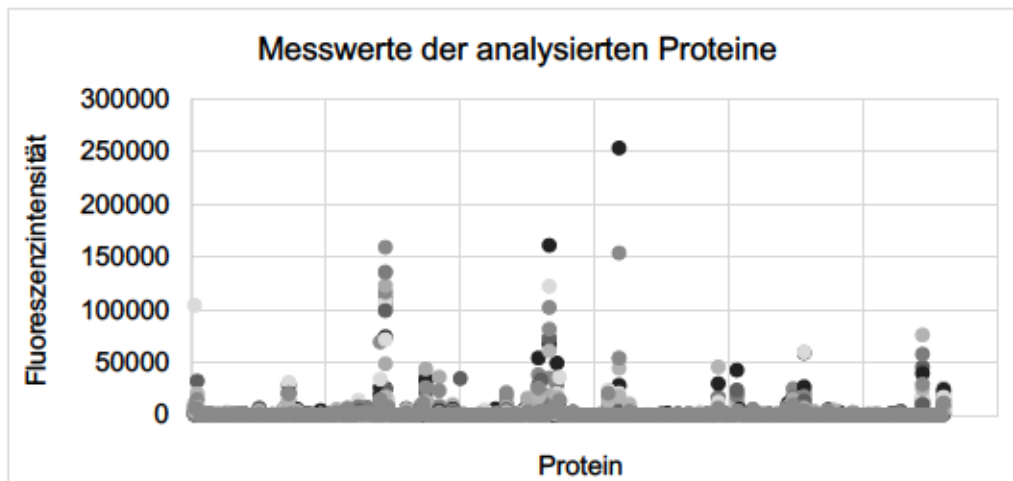


Abbildung 9.1 Messdatenpunkte (Rohwerte) der DigiWest-Analyse von 17 Tumorproben mit 279 Proteinen. 4760 Datenpunkte.

Die Betrachtung der Rohdaten (Abbildung 9.1) ergab bei einer Auftragung in einem Q-Q-Diagramm eine rechtsschiefe Datenverteilung (Abbildung 9.2, A). Um eine annähernde Normalverteilung für weitere Berechnungen zu erreichen, wurden die Daten logarithmiert (Abbildung 9.2, B).

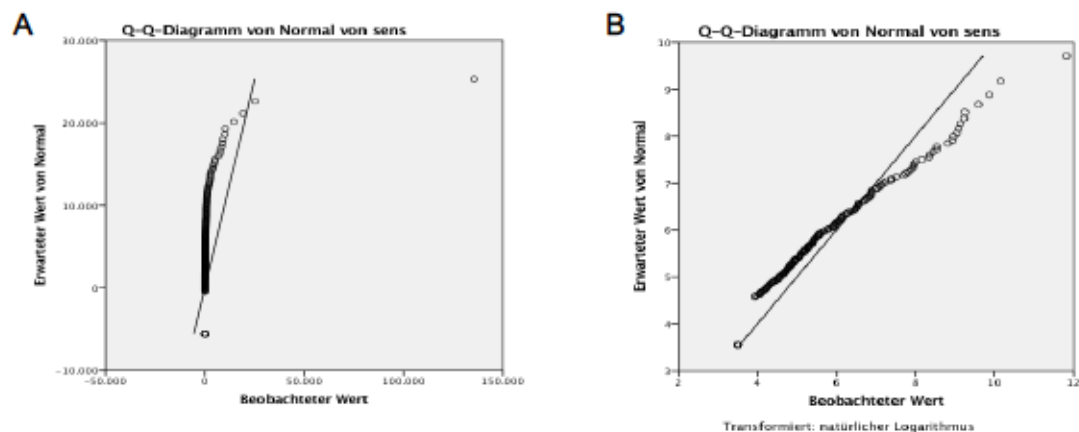


Abbildung 9.2 Q-Q-Diagramm exemplarisch für die Patientenprobe S118. Aufgetragen wurden der erwartete Wert der Normalverteilung (y-Achse), sowie der gemessene Wert der Analyse (X-Achse). $n_{\text{Messwerte}} = 279$.

Der Test auf Normalverteilung der transformierten Daten führte nicht zum Erfolg, weswegen der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet wurde. Er vergleicht parameterfrei über

Ergebnisse

Rangzuordnungen die Expression und die Modifikationen der jeweiligen Proteine. Als statistisch signifikant wurde der Vergleich mit einem Wert von $p \leq 0,05$ gewertet (Tabelle 9.1).

Tabelle 9.1 Statistische Auswertung der DigiWest-Messwerte von 17 Patientenproben. 30 Proteine und Proteinmodifikationen wurden als signifikant unterschiedlich in den Tumorproben identifiziert. Das Mengenprofil in der ersten Spalte zeigt auf der linken Seite die als klinisch resistent stratifizierte Proben, und rechts die als sensitiv. $n_{\text{Patienten}}=17$; $n_{\text{Analyten}}=279$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; W = Rangsummen; W = Prüfwert; $p \leq 0,05$.*

	MENGEN- PROFIL	ANALYT	W	W*	P-WERT
●		Rb pS807/811	40	-3.098244	0.0019467
		Cyclin B1	42	-2.886751	0.0038924
		EZH2	42	-2.886751	0.0038924
●		S6 pS235/236	102	2.8867514	0.0038924
		TCF4	48	-2.702224	0.0068877
●		MEK1/2 pS217/221	100	2.6976092	0.0069839
		BMI1	44	-2.694301	0.0070536
		CTGF	45	-2.59967	0.0093314
●		JNK/SAPK1/2/3 pY185/223	98	2.5330865	0.0113063
●		Acetyl-CoA Carboxylase 1 pS79	46	-2.503386	0.0123011
		SUZ12	46.5	-2.456751	0.01402
●		PARP dID214	48	-2.439977	0.0146882
●		RSK1 (P90RSK) pT573	97	2.405626	0.0161448
		TOP2A	48	-2.392972	0.0167125
		PLK1	47.5	-2.372093	0.0176876
●		PAK-4/5/6 pS474/602/560	48	-2.315082	0.0206084
		14-3-3 Epsilon	48	-2.309401	0.0209213
		EE2	48	-2.309401	0.0209213
		MCM2	49	-2.213176	0.0268855
		ADAMTS1	49.5	-2.179806	0.0292719
		Aurora Kinase B (AIM1)	50	-2.122159	0.0338244
●		ERK1/2 pT202/pY204	94	2.116951	0.034264
		PKN1	52	-2.083812	0.0371773
●		PKC Theta pT538	56	-2.068636	0.0385803
		Cyclin A	51	-2.045955	0.0407609
●		STAT1 pY701	92	2.0347066	0.0418804
		CBP	54	-2.026668	0.0426964
		RICTOR	51	-2.025697	0.0427958
		Cytokeratin 19	51	-2.020726	0.0433081
		PAK-4	51	-2.020726	0.0433081

30 von 279 Proteinen und Proteinmodifikationen wurden als differentiell zwischen den beiden Gruppen identifiziert.

Ergebnisse

In Tabelle 9.1 ist in der ersten Spalte das Expressionsniveau der Analyten in den beiden Gruppen skizziert. Es wurden deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen resistent und sensitiv sichtbar. Linksseitig sind die resistenten, rechts die sensitiven Tumorproben abgebildet. Zehn der 30 Analyten unterscheiden sich im Phosphorylierungsstatus (grüner Punkt), ein Protein resultiert aus einer proteolytischen Spaltung (schwarzer Punkt, cleaved PARP Asp214). Die restlichen 19 Analyten entsprechen dem Gesamtprotein in den Tumorproben. Nur PAK4 ist sowohl als Gesamtprotein als auch in seiner phosphorylierten Form differentiell repräsentiert.

Die niedrigsten p-Werte und somit deutlichsten Ergebnisse erreichen phospho-Rb (Ser807/811) ($p=0,0020$), Ezh2, Cyclin B1 (jeweils $p=0,0039$). Diese drei Proteine sind in den sensitiven Tumoren erhöht vorhanden, ebenso wie TCF4 ($W^*=-2,702$, $p=0,0069$). Phosphoryliertes S6 und phosphoryliertes MEK1/2 lag hingegen in den sensitiven Tumoren reduziert vor ($W^*=2,887$, $p=0,0069$; $W^*=2,698$, $p=0,0070$).

Die signifikant differentiell repräsentierten Proteine wurden anhand ihres Expressionsmusters (Tabelle 9.1) im Anschluss einem hierarchischen Clustering unterzogen und in einer Heatmap visualisiert, um Zusammenhänge der Analyten zu identifizieren. Ebenso wurden die Patientinnen anhand ähnlicher Proteinprofile zusammengefasst mit dem Ziel, eine optimale Auftrennung in zwei Gruppen zu erreichen (Abbildung 9.3). Die Patienten wurden ebenfalls hierarchisch geclustert.

Die auf den Follow-Up-Daten basierende Stratifizierung in „sensitiv“ und „resistent“ ist in der Auftrennung wiederzuerkennen (Abbildung 9.3).

Ergebnisse

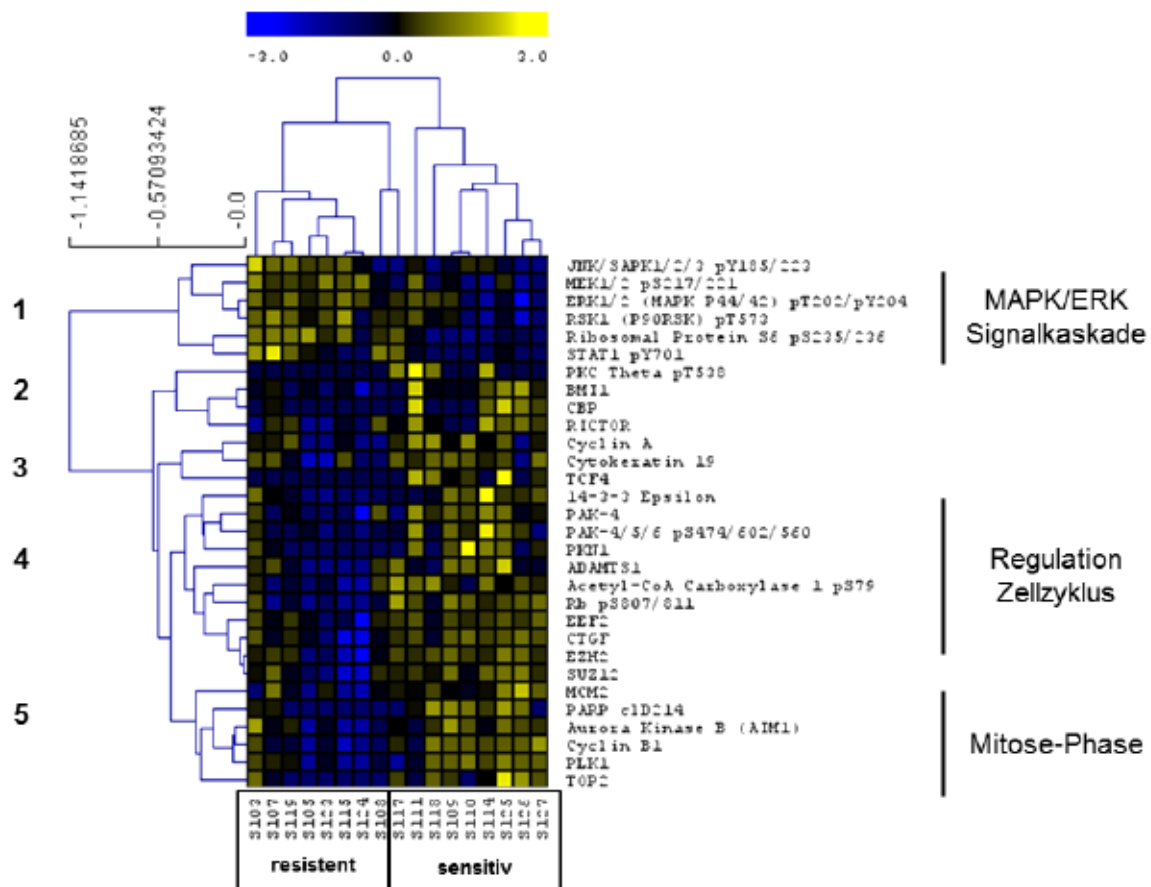


Abbildung 9.3 Heatmap der DigiWest-Analyse von Proteinlysaten aus 17 Ovarialkarzinomen. Aufgelistet sind 30 statistisch signifikant differenzielle Analyten mit anschließendem hierarchischem Clustering der Patienten und der Analyten. Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; $p \leq 0,05$; $n_{\text{Patienten}}=17$; $n_{\text{Analyten}}=279$; Hierarchische Clusteranalyse; Cluster wurden von 1 bis 5 beschriftet; Die quantifizierte Proteinmenge wurde pro Reihe normiert.

Die Analyse ergab eine Einteilung der Analyten in fünf Cluster (Abbildung 9.3, links). Zellteilungsfördernde (Cyclin A, Cyclin B1, PLK1, Aurora B, 14-3-3, Topo2 α , PAKs), pro-proliferative (pRb, Rictor, CTGF), pro-replikative (MCM2), sowie mit Apoptose assoziierte Proteine (cIPARP, PKN1) und Strukturproteine (Cytokeratin 19, ADAMTS1) waren in den sensitiven Tumoren deutlich erhöht. Epigenetische Regulatoren (BMI2, CBP, EZH2, SUZ12, TCF4) wurden ebenfalls in den sensitiven Patientinnen erhöht vorgefunden. Die resistenten Proben wiesen hingegen eine unverkennbare Aktivierung des MAPK-ERK-Signalweges (MEK1/2, ERK1/2, p90RSK, S6; Cluster 1) auf.

9.1.2 DNA-Sequenzierung von Genen mit zentralen regulatorischen Funktionen

Die unterschiedlichen Proteinprofile sensibler und resistenter Ovarialkarzinome deuten auf eine grundlegende Störung wichtiger Kontrollproteine des Zellzyklus hin. Daher wurden genetische Analysen durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollten, ob Veränderungen in der DNA-Sequenz bestimmter Schlüsselproteine die Ursache für das veränderte Proteinprofil sein könnten.

9.1.2.1 Sanger-Sequenzierung B-Raf V600E

In der Onkologie ist die B-Raf aktivierende Mutation an Position V600E bekannt. Das dadurch konstitutiv hyperaktivierte Protein phosphoryliert MEK1/2 und induziert somit den MAPK/ERK-Signalweg. Die erhöhte MEK1/2/ERK1/2 Aktivierung in resistenten Tumoren ließ vermuten, dass diese Mutation auch im Ovarialkarzinom eine Rolle spielen könnte. Es wurde DNA von acht Proben isoliert und anschließend mittels PCR und Sanger-Sequenzierung in diesem Locus überprüft.

Tabelle 9.2 DNA-Sequenzierung des Locus V600 im BRAF-Gen. wt= wildtypische Sequenz; n=8.

	Resistent								Sensitiv								
Patientenprobe	S103	S107	S119	S105	S123	S115	S124	S108	S117	S111	S118	S109	S110	S125	S114	S126	S127
Ergebnis Sequenzierung	wt		wt		wt			wt	wt		wt		wt			wt	

Alle acht untersuchten Proben besaßen keine Veränderungen im BRAF-Gen (Tabelle 9.2). Es wurden ausschließlich wildtypische Sequenzen nachgewiesen. Eine aktivierende BRAF-Mutation in V600 ist somit voraussichtlich nicht der Grund für die erhöhte MEK1/2 Aktivierung.

9.1.2.2 Panel-Sequenzierung von Tumorsuppressorgenen

Ebenso wurden die Tumorsuppressorgene *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D* und *TP53* durch eine DNA-Panel-Sequenzierung untersucht.

Tabelle 9.3 Allelfrequenzen der beobachteten Varianten in den Genen *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D* und *TP53* 17 Tumormen (S1XX). Die Reihenfolge der Patienten ID wurde aus Abbildung 9.3 übernommen. ExAC = Populationfrequenz; k.A. keine Angaben; # = schädigend.

Gen	RefSeq	Variant	Amplification	ExAC	S103	S107	S119	S106	S123	S115	S124	S108	S117	S111	S118	S109	S110	S125	S114	S126	S127
ATM	NM_000051.3	c.115A>G	p.Thr39Ala	0.00003	0	0	0	0	0	0	0	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATM	NM_000051.3	c.2321G>A	p.Gly774Asp	k.A.	0	0	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATM	NM_000051.3	c.2478A>C	p.Ile828Leu	0.00005	0	0	0	0	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATM	NM_000051.3	c.2572T>C	p.Phe858Leu	0.00915	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53
ATM	NM_000051.3	c.3161C>G	p.Pro1054Arg	0.01692	0	0	0	0	87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33
ATM	NM_000051.3	c.5557G>A	p.Asp1853Asn	0.11014	0	80	0	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATM	NM_000051.3	c.5558A>T	p.Asp1853Val	0.00519	0	0	0	0	0	79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATM	NM_000051.3	c.5645G>A	p.Arg1882Gln	0.00001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	78
ATM	NM_000051.3	c.5948G>A	p.Ser1983Asn	k.A.	0	0	0	0	0	0	0	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA1	NM_007294.3	c.1067A>G	p.Gln366Arg	0.04407	0	0	0	0	0	84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA1	NM_007294.3	c.1127delA	p.Asn376Ilefs*18 #	k.A.	0	0	0	69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA1	NM_007294.3	c.1951delA	p.Lys654Serfs*47 #	0.00001	0	0	86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA1	NM_007294.3	c.1981dupA	p.Tyr655Valfs*18 #	k.A.	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA1	NM_007294.3	c.2077G>A	p.Asp683Asn	0.05682	0	0	0	0	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA1	NM_007294.3	c.2612C>T	p.Pro871Leu	0.41005	0	81	0	30	100	0	95	0	0	0	0	0	86	0	0	0	71
BRCA1	NM_007294.3	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	0.34287	0	80	0	32	100	0	91	0	0	0	0	0	92	0	0	0	66
BRCA1	NM_007294.3	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	0.01317	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA1	NM_007294.3	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	0.34901	0	78	0	33	100	0	89	0	0	0	0	0	94	100	0	0	100
BRCA1	NM_007294.3	c.4031_4049del	p.Asp1344Alafs*16 #	k.A.	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA1	NM_007294.3	c.4837A>G	p.Ser1613Gly	0.34957	0	82	0	27	100	0	92	0	0	0	0	0	92	96	0	0	68
BRCA1	NM_007294.3	c.4956G>A	p.Met1652Ile	0.01762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92	0	0	0	0
BRCA1	NM_007294.3	c.4689C>G	p.Tyr1563*	k.A.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84	0	0	0	0	0
BRCA1	NM_007294.3	c.5510G>A	p.Thr1837*	k.A.	0	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA2	NM_000059.3	c.865A>C	p.Asn289His	0.05178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95	0	0	0	0	0	0	39
BRCA2	NM_000059.3	c.1114A>C	p.Asn372His	0.27793	100	77	0	43	0	0	0	0	49	0	0	0	0	0	0	0	56
BRCA2	NM_000059.3	c.5744C>T	p.Thr1915Met	0.0179	0	0	0	48	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0
BRCA2	NM_000059.3	c.2971A>G	p.Asn691Asp	0.05341	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95	0	0	0	0	0	0	33
BRCA2	NM_000059.3	c.8149G>T	p.Ala2717Ser	0.00116	0	0	92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA2	NM_000059.3	c.8775G>C	p.Gln2925His	k.A.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	71	0	0	0	0
BRCA2	NM_000059.3	c.9978A>T	p.Lys3326*	0.00702	65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Ergebnisse

Gen	RefSeq	Variante	Aminosäure	ExAC	S103	S107	S119	S105	S123	S115	S124	S108	S117	S111	S118	S109	S110	S125	S114	S126	S127
BRIP1	NM_032043.2	c.2755T>C	p.Ser919Pro	0.5972	100	99	100	0	31	0	81	72	100	100	89	100	0	0	0	77	0
PALB2	NM_024675.3	c.1676A>G	p.Gln559Arg	0.1176	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	93	0	42	0	0	0
PALB2	NM_024675.3	c.1010T>C	p.Leu337Ser	0.01427	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41	0	0
PALB2	NM_024675.3	c.2014G>C	p.Glu672Gln	0.02239	0	0	0	0	0	0	0	35	0	0	0	94	0	0	0	0	0
PALB2	NM_024675.3	c.2993G>A	p.Gly998Glu	0.01579	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83	0	0	0	0	0
RAD51C	NM_058246.2	c.376G>A	p.Ala126Thr	0.00353	0	84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RAD51D	NM_002878.3	c.494G>A	p.Arg165Gln	0.15934	0	0	0	0	0	0	24	0	81	0	0	0	0	0	0	0	0
TP53	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	0.659	100	0	100	100	100	100	0	27	100	0	91	99	0	0	100	21	94
TP53	NM_000546.5	c.321C>G	p.Tyr107*	#	k. A.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	86	0	0	0	0
TP53	NM_000546.5	c.480G>C	p.Met160Ile	k. A.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0
TP53	NM_000546.5	c.481G>T	p.Ala161Ser	#	k. A.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49	0
TP53	NM_000546.5	c.536A>G	p.His179Arg	#	k. A.	0	0	0	0	69	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0
TP53	NM_000546.5	c.524G>A	p.Arg175His	#	0.00001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84	0	0	0	0	0
TP53	NM_000546.5	c.401T>G	p.Phe134Cys	#	0.00001	0	0	0	0	0	0	0	0	93	0	0	0	0	0	0	0
TP53	NM_000546.5	c.629dupA	p.Asn210Lysfs*6	#	k. A.	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TP53	NM_000546.5	c.594T>C	p.Ile195Thr	#	k. A.	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TP53	NM_000546.5	c.731G>T	p.Gly244Val	#	k. A.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	58
TP53	NM_000546.5	c.833C>T	p.Phe278Leu	#	k. A.	93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TP53	NM_000546.5	c.844C>T	p.Arg282Tyr	#	0.00002	0	0	78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TP53	NM_000546.5	c.818G>A	p.Arg273His	#	0.00003	0	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	82	0	0
TP53	NM_000546.5	c.983+1G>A	p.?	#	k. A.	0	0	0	0	0	0	0	39	0	0	0	0	0	0	0	0
TP53	NM_000546.5	c.994-1G>A	p.?	#	k. A.	0	0	0	0	0	0	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TP53	NM_000546.5	c.997delC	p.Arg333Valfs*12	#	k. A.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83	0	0	0	0
Tumorenteil im Gewebe [%]					80	90	100	85	100	60	100	80	100	90	100	100	100	100	80	65	60

In 16 von 17 Proben (94%) konnten TP53-Mutationen nachgewiesen werden, die einen Funktionsverlust des Proteins verursachen (markiert als „schädigend“, #). BRCA1 und BRCA2-Mutationen konnten ebenfalls detektiert werden, jedoch nicht vermehrt in einer der

Ergebnisse

beiden Patientengruppen. *ATM*-Varianten sind hingegen in sieben von acht (88%) resistenten Tumoren nachweisbar, wohingegen nur zwei von neun (22%) der sensitiven Tumoren eine entsprechende Variante aufwiesen. Keine der identifizierten *ATM*-Varianten führt zu einem vorzeitigen Stopcodon oder zu anderen Ereignissen, die in einem verkürzten Protein resultieren (p.Thr39Ala, p.Gly774Asp, p.Ile826Leu, p.Phe858Leu, p.Pro1054Arg, p.Asp1853Asn, p.Asp1853Val, p.Arg1882Gln, p.Ser1983Asn).

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass sich *BRCA1*-, *BRCA2*- und *TP53*-Mutationen über beide Gruppen verteilen. Dagegen häufen sich Varianten im *ATM*-Gen in resistenten Ovarialkarzinom-Proben.

9.1.3 Abgleich des *ATM*-Proteinexpressionsprofils

Die Patientinnen in der Heatmap der Genvarianten wurden in der gleichen Reihenfolge aufgelistet, wie sie anhand der DigiWest-Ergebnisse (siehe 9.1.1) unterschieden werden konnten. Auffällig ist, dass Abweichungen, also ein resistenter Tumor ohne (S103) und zwei sensitive Tumoren mit *ATM*-Varianten (S126, S127), in den Randbereichen der Heatmap liegen. Im Proteinscreening wurden diese Proben zwar den jeweiligen Gruppen „resistent“ und „sensitiv“ aufgrund ihrer klinischen Daten zugeordnet, passen jedoch nicht übereinstimmend zu den Proteinprofilen der anderen Proben.

Folglich wurde ein *Pavlidis Template Matching* (PTM) der DigiWest-Daten durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen der Expression von *ATM* und anderen Proteinen herzustellen (Tabelle 9.4). Das *ATM*-Proteinprofil aller Patientinnen dient hierbei als Vorlage, um weitere Proteine zu identifizieren die ähnlich reguliert vorliegen. Als Grenzwert des Signifikanzniveaus wurde $p \leq 0,05$ gewählt. Die statistisch signifikanten Analyten wurden anschließend hierarchisch geclustert (Abbildung 9.4). Die Reihenfolge der Patientinnen entspricht der in Abbildung 9.3.

Ergebnisse

Tabelle 9.4 PTM-Analyse der DigiWest-Messwerte. Das Mengenprofil in der ersten Spalte zeigt auf der linken Seite die als klinisch resistent stratifizierte Proben, und rechts die als sensitiv. $n_{\text{Patienten}}=17$; $n_{\text{Analyten}}=279$, ATM diene als Vergleichsprofil; $p \leq 0,05$.

Mengen-Profil	Analyt	r-Wert	p-Wert
	ATM	1	0
	EVI1	0.75890076	4.12E-04
	ADAM12	0.7260247	9.68E-04
	CDK2 pT160	0.7222527	0.00105913
	DUSP9 (MKP4)	0.7131608	0.00130948
	EIF4E pS209	0.6859381	0.00236539
	SUZ12	0.67588055	0.00289885
	ER Alpha	0.6513871	0.0046163
	EZH2	0.64795256	0.004912
	ADAMTS1	0.63994825	0.00566076
	DNA Polymerase Beta	0.63094777	0.00660983
	53BP1	0.6298034	0.00673914
	Aurora Kinase B	0.62551314	0.00724214
	STAT1 pY701	0.60778785	0.00964874
	CTGF	0.5982746	0.01118087
	Histone H3 pS10	0.58884805	0.01288354
	Histone H3 K4me1	0.57165587	0.01651191
	Caspase 9	0.56416047	0.01832517
	Connexin 32	0.56249297	0.01874897
	Jagged 1	0.5584082	0.01981955
	STAT3 acK685	0.5552807	0.02067103
	HSP 70	0.55377	0.0210924
	Histone H3 K27me3	0.5502435	0.02210209
	CDK2	0.5488093	0.02252331
	14-3-3 Zeta/Delta	0.54385656	0.02402607
	4E-BP1 pT37/46	0.5433936	0.02417041
	Histone H3 K18ac	0.5431862	0.0242353
	Notch 3	0.5421031	0.02457633
	MAPK15	0.5418615	0.02465292
	Junction Plakoglobin	0.5352658	0.02681584
	Glucose-6-Phosphatase Alpha	0.5271005	0.0296932
	CHEK2 pT68	0.52636796	0.0299625
	STAT3 pS727	0.5245608	0.03063487
	RSK4 pS235	0.5177245	0.03328377
	Tubulin acetylated	0.5146319	0.03453811
	E-Cadherin	0.5119069	0.03567302
	FGF-1	0.49596587	0.04289196
	RAD50	0.4959536	0.04289792
	GADD45B	0.49375826	0.04397278
	Raptor	0.4848072	0.04856702
	CDK5	0.48294318	0.04956746

Ergebnisse

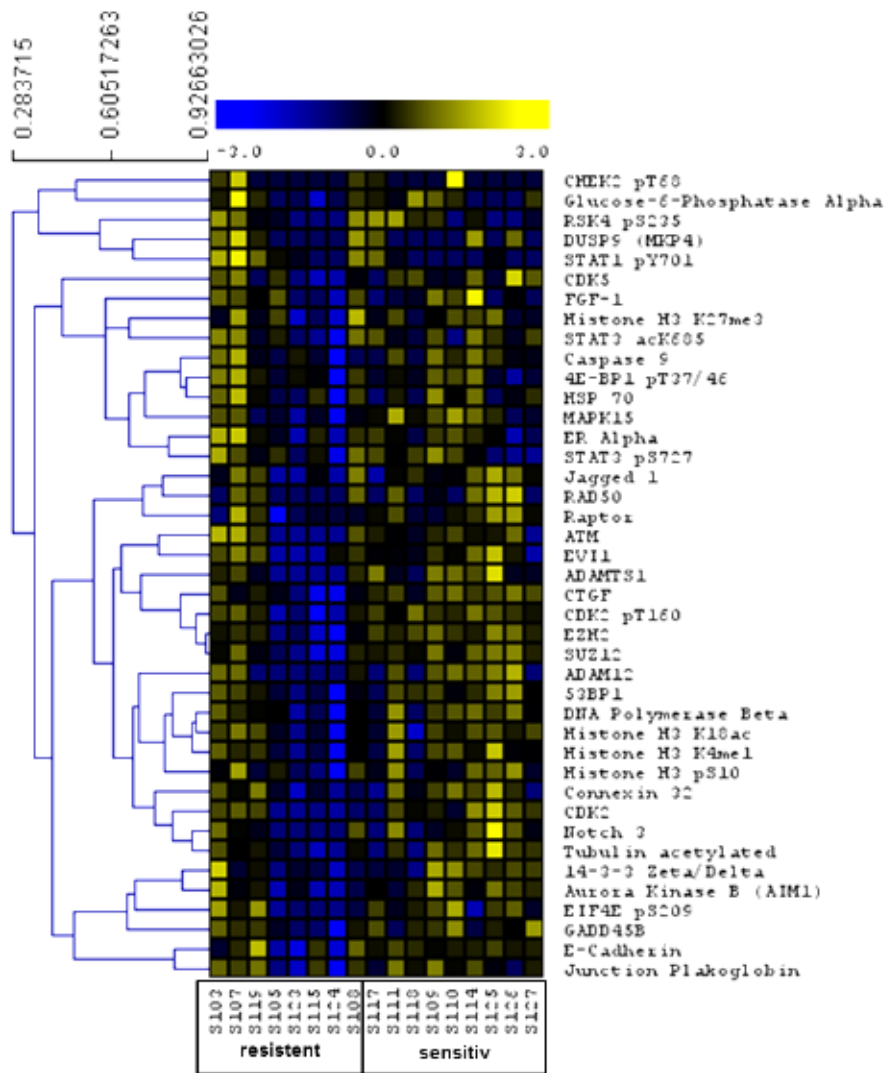


Abbildung 9.4 Heatmap der PTM-Analyse mit anschließendem hierarchischen Clustering. Gezeigt werden die statistisch signifikanten, ähnlich wie ATM regulierte Analyten. PTM; $p \leq 0,05$; $n_{\text{Patienten}}=17$; $n_{\text{Analyten}}=41$; Hierarchische Clusteranalyse; Die quantifizierte Proteinmenge wurde pro Reihe normalisiert.

Die PTM-Analyse ergab 41 Proteine bzw. Proteinmodifikationen, die in ihrer Expression dem ATM-Proteinprofil ähneln. Das ATM-Protein selbst ist nicht im Vergleich zwischen der resistenten und sensitiven Gruppe differentiell exprimiert (Tabelle 9.1). Jedoch finden sich in dieser Analyse gehäuft Proteine wie SUZ12, EZH2, ADAMTS1, Aurora B, pSTAT1 und CTGF, deren Gehalt sich bereits im Vergleich zwischen den beiden Gruppen resistent und sensitiv signifikant unterschied (Tabelle 9.1). Hinzu kommen Proteine, die in der Signalweiterleitung von ATM nachgeschaltet sind (CDK2, CHK2) sowie Proteine, die eine strukturelle Veränderung der Zelle hervorrufen können (Connexin 32, ADAM12, g-Catenin, acetyliertes Tubulin, E-Cadherin). Ebenso wurden epigenetische Modifikationen (H3pS10, H3K4me, H3K27me3, H3K18ac) vorgefunden.

9.2 Validierung von Kandidatenproteinen in unabhängigen Patientenkohorten

Um die Ergebnisse in 9.1.1 zu validieren, wurden zwei unabhängige Proben-Kohorten herangezogen. Voraussetzung für die Aufnahme der Patientenproben in die Kohorten war verfügbares Tumormaterial oder mRNA-Messwerte, entsprechende Informationen über die Art der Therapie (Vorgabe: Platin- und Taxol-haltig) und die Dokumentation des krankheitsfreien oder progressionsfreien Überlebens der Patientinnen.

9.2.1 Evaluierung der differentiellen Proteinexpression anhand öffentlich zugänglicher Expressionsdatensätze

Um die Ergebnisse aus 9.1.1 in einer unabhängigen Kohorte zu validieren, wurden öffentlich zugängliche RNA-Expressionsdaten herangezogen. Es wurden die RNA-Expressionswerte aller Gene untersucht, die in Abbildung 9.1.1 der DigiWest-Analyse statistisch signifikant unterschiedlich in den beiden Gruppen „sensitiv“ und „resistent“, exprimiert wurden. Proteinmodifikationen werden in den RNA-Datensätzen nicht erfasst und können somit nicht beachtet werden.

Die Expressionsdaten wurden in hoch exprimierend und niedrig exprimierend unterteilt. Anschließend wurden die Patienteninformationen in der Datenbank dazu genutzt, um anhand des progressionsfreien Überlebens darzustellen ob eine hohe oder niedrige Expression einer RNA und vermutlich auch des Proteins zu einem verbesserten Überleben führt. Die Daten wurden anhand einer Überlebenszeitanalyse mithilfe der Logrank-Regression ausgewertet. Es wurden Tumoren von Ovarialkarzinomen serösen Ursprungs und aller Stadien in die Analyse aufgenommen. Eine Therapie der Patientinnen mit Platin und Taxol war Voraussetzung. Somit wurden die RNA-Expressionswerte der Gene *BMI1*, *CBP*, *RICTOR*, *CCNA1*, *KRT19*, *TCF4*, *YWHAE*, *PAK4*, *PKN1*, *ADAMTS1*, *EEF2*, *CTGF*, *EZH2*, *SUZ12*, *MCM2*, *AURKB*, *CCNB1*, *PLK1* und *TOP2A* analysiert. Die Proteine dieser Gene sind vorwiegend in den sensitiven Tumoren erhöht im Vergleich zu den therapieresistenten Tumoren.

Ergebnisse

Die differentielle Expression von vier dieser Gene hatte einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben der Patientinnen (Abbildung 9.5).

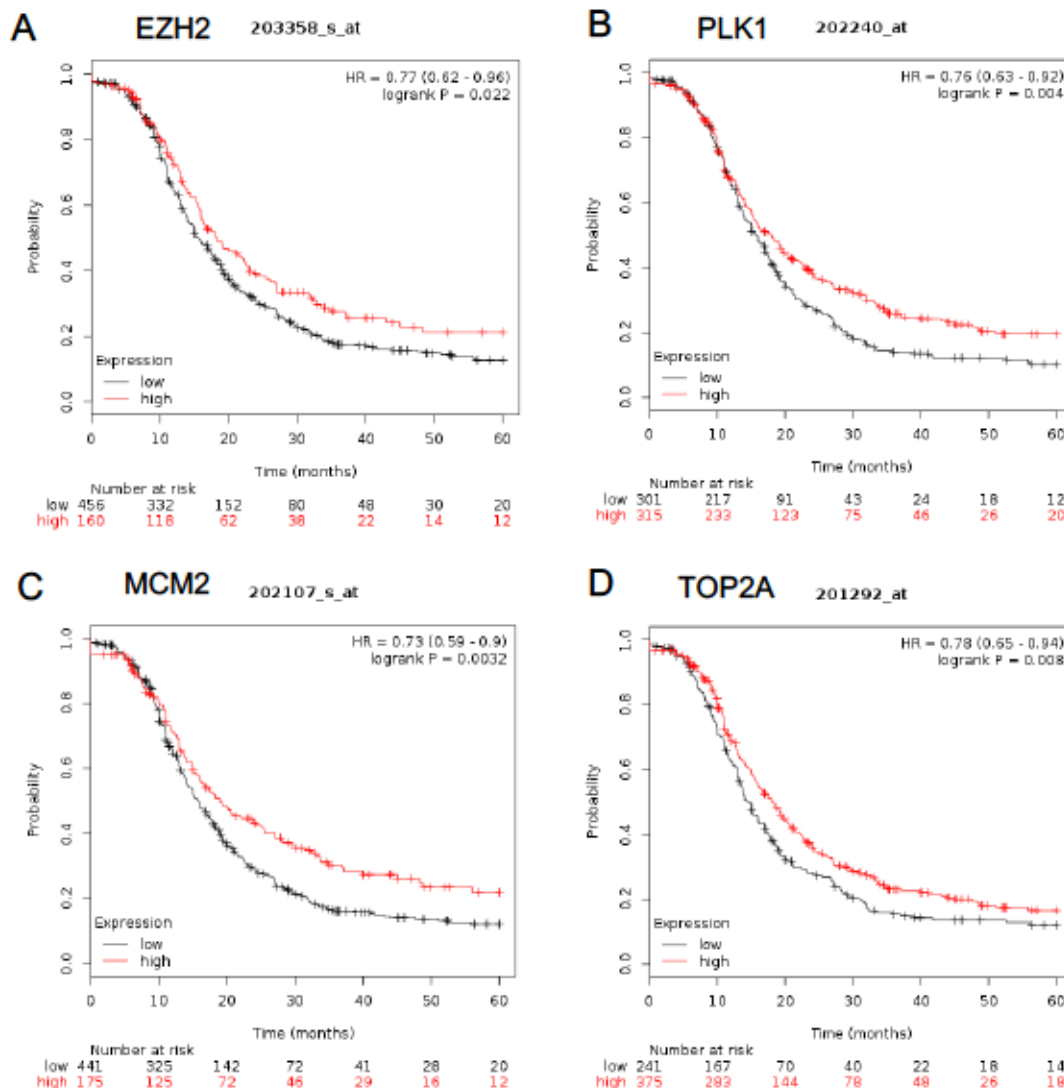


Abbildung 9.5 Überlebenszeitanalyse von Datensätzen der RNA-Expressionsanalysen aus Ovarialkarzinom-Patientinnen. Die Patientinnen wurden in hoch (rot) und niedrig (schwarz) exprimierend unterteilt. Logrank, progressionsfreies Überleben über 5 Jahre; Patientinnen wurden nach der Überschreitung des Beobachtungszeitraumes zensiert; HR= Hazard Ratio; n=616. A: EZH2, Expressionsbereich 10-2936, Cutoff 902; B: PLK1, Expressionsbereich 4-1314, Cutoff 233; C: MCM2, Expressionsbereich 9-7136, Cutoff 2214; D: TOP2A, Expressionsbereich 5-6785, Cutoff 770.

Mit diesen validierten Genen wurde anschließend eine Gen-Ontologie-Analyse mithilfe des Online-Tools „PANTHER“ durchgeführt. Sie dient dazu, die differentiell exprimierten Gene Gruppen zuzuordnen, die bestimmte biologische Funktionen in einer Zelle übernehmen.

Ergebnisse

MCM2 wird auch als MCM7 beschrieben. Somit ergeben sich fünf Gene für die nachfolgende Analyse.

Tabelle 9.5 Ausgabetabelle der Gen-Ontologie-Analyse. Die Gene EZH2, PLK1, MCM2/MCM7 und TOP2A wurden analysiert.

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (Released 20171205)

Annotation Version and Release Date: GO Ontology database Released 2018

Analyzed List: upload_1 (Homo sapiens)

Reference List: Homo sapiens (all genes in database)

Test Type: FISHER

GO biological process complete	Homo sapiens - REFLIST (21042)	upload_1 (5)	upload_1 (expected)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (raw P-value)	upload_1 (FDR)
cell cycle (GO:0007049)	1365	5	0.32	15.42	1.16E-06	3.62E-03
chromosome organization (GO:0051276)	1080	5	0.26	19.48	3.61E-07	1.88E-03
cell cycle process (GO:0022402)	1018	5	0.24	20.67	2.69E-07	4.19E-03
mitotic cell cycle process (GO:1903047)	630	4	0.15	26.72	3.98E-06	7.76E-03
DNA metabolic process (GO:0006259)	796	4	0.19	21.15	1.00E-05	1.42E-02
mitotic cell cycle (GO:0000278)	709	4	0.17	23.74	6.36E-06	1.10E-02
negative regulation of chromosome organization (GO:2001251)	119	3	0.03	> 100	1.88E-06	4.90E-03
mitotic cell cycle phase transition (GO:0044772)	267	3	0.06	47.29	2.05E-05	2.46E-02
cell cycle phase transition (GO:0044770)	275	3	0.07	45.91	2.24E-05	2.49E-02
regulation of chromosome organization (GO:0033044)	324	3	0.08	38.97	3.63E-05	3.33E-02
DNA conformation change (GO:0071103)	260	3	0.06	48.56	1.89E-05	2.46E-02
negative regulation of organelle organization (GO:0010639)	349	3	0.08	36.18	4.52E-05	3.92E-02
negative regulation of mitotic cell cycle (GO:0045930)	297	3	0.07	42.51	2.81E-05	2.92E-02
DNA replication initiation (GO:0006270)	37	2	0.01	> 100	3.33E-05	3.25E-02
DNA unwinding involved in DNA replication (GO:0006268)	8	2	0	> 100	2.03E-06	4.52E-03

Ergebnisse

protein localization to chromatin (GO:0071168)	19	2	0	> 100	9.46E-06	1.48E-02
negative regulation of DNA duplex unwinding (GO:1905463)	2	2	0	> 100	2.71E-07	2.11E-03
regulation of DNA duplex unwinding (GO:1905462)	3	2	0	> 100	4.51E-07	1.76E-03

Das Verfahren erfolgt browserbasiert und wird als Tabelle ausgegeben. Die erste Spalte beschreibt den biologischen Prozess, welchem die Gene zugeordnet werden mit entsprechender GO-Identifikationsnummer. Die zweite Zeile gibt die Anzahl an Genen an, die im Referenzgenom (REFLIST (21042), *Homo sapiens*) mit dem Prozess assoziiert werden. Spalte drei zeigt an, wie viele der gesuchten Gene mit diesem Prozess in Verbindung gebracht werden. In Spalte vier wurde die erwartete Anzahl an übereinstimmenden Genen anhand der Anzahl der Eingabe berechnet, Spalte fünf beschreibt die Anreicherung indem die eingegebene Anzahl an Genen durch die erwartete Anzahl geteilt wird. Ein Wert über 1 entspricht einer Überrepräsentation, was auch durch das Pluszeichen in Spalte 6 verdeutlicht wird. Der p-Wert des exakten Fisher-Tests wird in Spalte acht angegeben. Mit FDR (*false discovery rate*) wird angegeben, ob multiple Testprobleme ausgeschlossen werden können (Tabelle 9.5).

Ergebnisse der durchgeführten Analyse zeigen eine deutliche Assoziation der signifikanten Proteine aus den Überlebensanalysen mit Prozessen der Zellzyklus-Regulation und des mitotischen Phasenübergangs. Die Untergruppen implizieren insbesondere DNA-Konformationsänderungen und die Chromosomenorganisation (Bindung der Proteine an das Chromatin, Entwinden der DNA).

Die vorangegangenen Analysen zeigten einen Zusammenhang zwischen den erhöht vorgefundenen Proteinen in sensitiven Tumoren und ATM. Daher wurde die mRNA-Expression von ATM ebenfalls mithilfe einer Überlebenszeitanalyse überprüft. Der Vergleich zwischen hoch und niedrig exprimierenden Proben wies keinen signifikanten Unterschied auf (Abbildung 9.6).

Ergebnisse

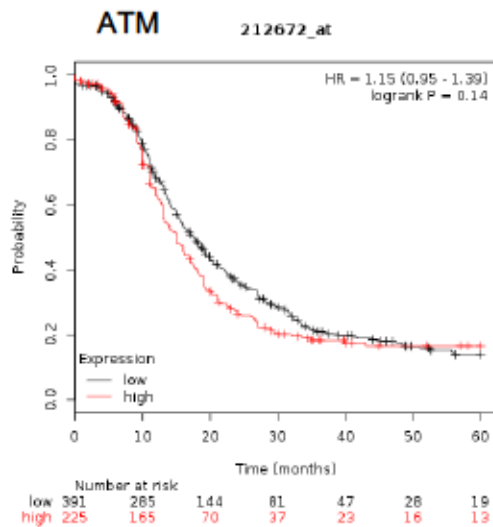


Abbildung 9.6 Überlebenszeitanalyse von Datensätzen der RNA-Expressionsanalysen aus Ovarialkarzinom-Patientinnen abhängig von der ATM-Expression. Die Patientinnen wurden in hoch (rot) und niedrig (schwarz) exprimierend unterteilt. Logrank, progressionsfreies Überleben über 5-Jahre; Patientinnen wurden nach der Überschreitung des Beobachtungszeitraumes zensiert; HR= Hazard Ratio; n=616; Expressionsbereich 9-1772, Cutoff 566.

Im weiteren Verlauf wurde mithilfe der extrahierten Daten eine weitere Überlebenszeitanalyse durchgeführt, in der EZH2 hoch und niedrig exprimierende Proben ebenfalls hinsichtlich ihres ATM-Gehalts verglichen wurden. Dies ergab vier Gruppen, die paarweise miteinander verglichen wurden. Aufgrund des multiplen Vergleichs wurde nach der Logrank-Analyse eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Abgebildet wurden nur die Vergleiche in Tumoren mit einer niedrigen und mit einer hohen EZH2-Expression (Abbildung 9.7).

Ergebnisse

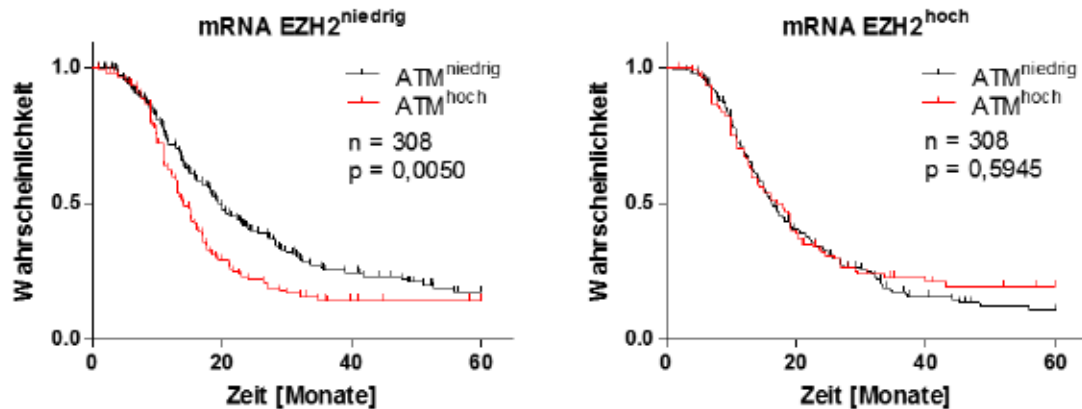


Abbildung 9.7 Überlebenszeitanalyse von Datensätzen der RNA-Expressionsanalysen aus Ovarialkarzinom-Patientinnen abhängig von der EZH2- und ATM-Expression. Die Patientinnen wurden in EZH2 hoch (rechts) und niedrig (links) und ATM hoch (rot) und niedrig (schwarz) exprimierend unterteilt. Logrank, progressionsfreies Überleben über 5-Jahre; Dichotomisiert am Median; Patientinnen wurden nach der Überschreitung des Beobachtungszeitraumes zensiert; HR= Hazard Ratio; n=616.

Die Analyse wies einen deutlich signifikanten Unterschied zwischen den ATM^{hoch} und ATM^{niedrig} exprimierenden Proben auf, wenn EZH2^{niedrig} exprimiert ist. EZH2^{niedrig} / ATM^{niedrig} exprimierende Tumoren konnten mit einem längeren progressionsfreien Überleben der Ovarialkarzinom-Patientinnen in Verbindung gebracht werden (EZH2^{niedrig}/ATM^{niedrig}: 19,98 Monate gegen EZH2^{niedrig}/ATM^{hoch}: 14,03 Monate, HR: 0,66, 95%CI: 0,50-0,88). Die weiteren Vergleiche der unterschiedlichen Paarungen zeigten keinen signifikanten Unterschied.

In diesem Validierungskollektiv konnte ein Zusammenhang zwischen EZH2 und ATM hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens von Ovarialkarzinom-Patientinnen, die mit Platin und Taxol behandelt wurden, bestätigt werden.

9.2.2 Färbung von Tumorgewebe – Tissue Microarray

9.2.2.1 Immunhistochemische Färbung von Kandidatenproteinen

Das zweite Validierungskollektiv umfasste 34 Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete, seröse Tumorproben von Ovarialkarzinom-Patientinnen. Für den *Tissue Microarray* (TMA) wurden zwei ausgestanzte Gewebezylinder von je einer Tumorprobe eingebettet und

Ergebnisse

Überlebensfunktion übertragen und durch eine Logrank-Analyse verglichen. Es wurden Patienten mit einem hohen IRS gegen Patienten mit einem niedrigen Wert verglichen (Abbildung 9.9).

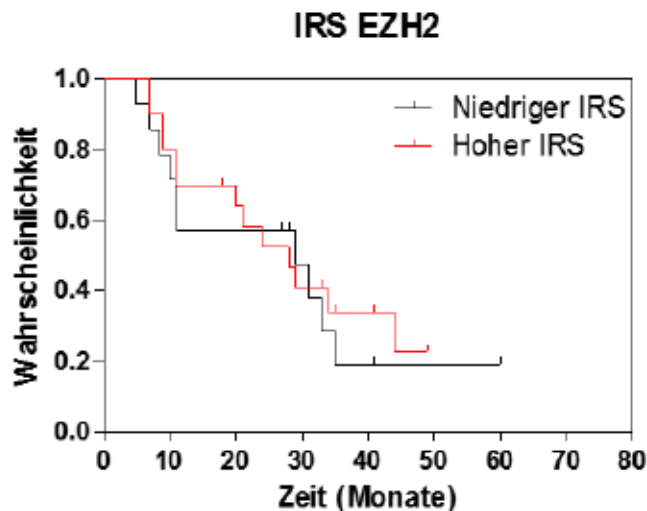


Abbildung 9.9 Überlebenszeitanalyse (krankheitsfreies Überleben) von Ovarialkarzinom-Patientinnen anhand des IRS der EZH2-Färbung. Patientinnen mit hohen (über 3, rot) und niedrigen (unter 3, schwarz) IRS-Werten wurden miteinander verglichen. IRS=Immunreaktiver Score; Mittelwerte aus zwei Gewebeproben einer Patientin; Logrank-Test; Dichotomisiert am unteren Quartil; Patientinnen ohne Ereignis wurden nach der Überschreitung des Beobachtungszeitraums zensiert; $n_{\text{Patienten}}=34$; $n_{\text{Färbungen}}=64$; $p=0,6609$.

Die beiden Gruppen mit hohen ($n=20$, rot) und niedrigen IRS-Werten ($n=14$, schwarz) wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied im progressionsfreien Überleben der Patientinnen auf (Logrank $p=0,6609$). Die Behauptung ein erhöhter EZH2-Gehalt führe zu einem verbesserten progressionsfreien Überleben, konnte in diesem Kollektiv nicht bestätigt werden.

Die Herstellung der TMA-Objektträger erfolgte mit seriellen Schnitten der Gewebezyylinder. Die morphologischen Gegebenheiten ähneln sich daher gut, um die Expression und Lokalisation mehrerer Proteine zu vergleichen. Es wurden der immunhistochemische Nachweis der Proteine ATM, EZH2, phospho-Rb Ser807/811 und phospho-ERK Thr202/Tyr204 miteinander verglichen (Abbildung 9.10).

Ergebnisse

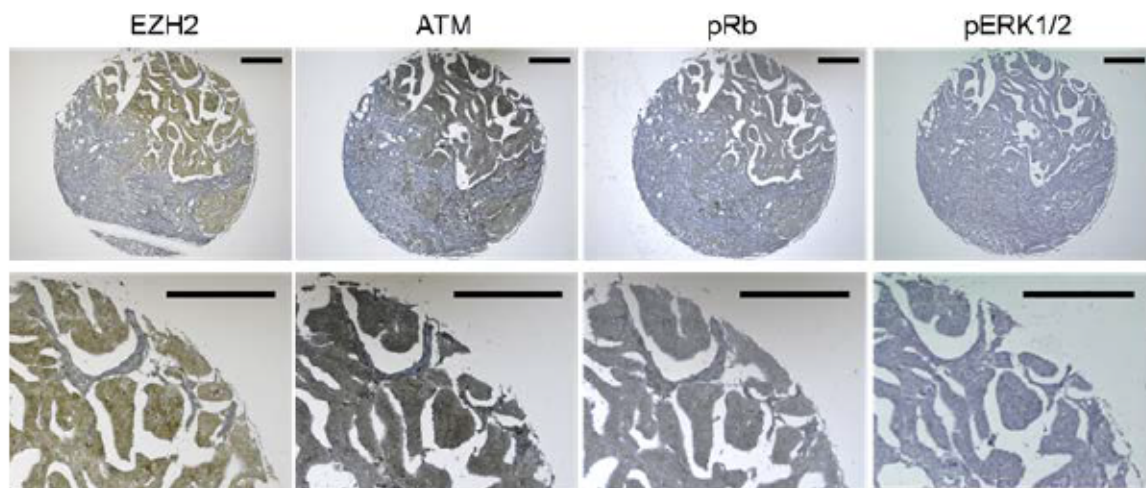


Abbildung 9.10 Immunhistochemische Färbung auf TMA-Schnitten. Exemplarische Färbungen von EZH2, ATM, pRb und pERK1/2 einer Tumorgewebeprobe einer Patientin. Balken = 200µm.

ATM, EZH2 und pRb wiesen das gleiche Färbemuster in jeder der 34 untersuchten Gewebeproben auf. Die Proteine wurden im Zellkern, aber auch im Zytosol der Tumorzellen in den Gewebeproben lokalisiert. Innerhalb des Gewebes konnten deutliche Gradienten in der Färbung von EZH2, ATM und pRb beobachtet werden. Umliegendes Stromagewebe wurde nicht mit angefärbt. Die Heatmap aus Abbildung 9.3 lässt vermuten, dass in Tumoren mit einem niedrigen EZH2-Gehalt phosphoryliertes ERK vermehrt vorliegt. Dies konnte jedoch in den Färbungen nicht bestätigt werden. Es wurde lediglich ein schwaches Färbeprofil von pERK1/2 in den untersuchten Geweben beobachtet.

Vergleicht man jedoch die Bewertung der EZH2-Färbung mit jeweils der ATM- und pRb-Färbung, kann eine signifikante Korrelation von EZH2 zu den beiden anderen Proteinen beobachtet werden (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Ergebnisse

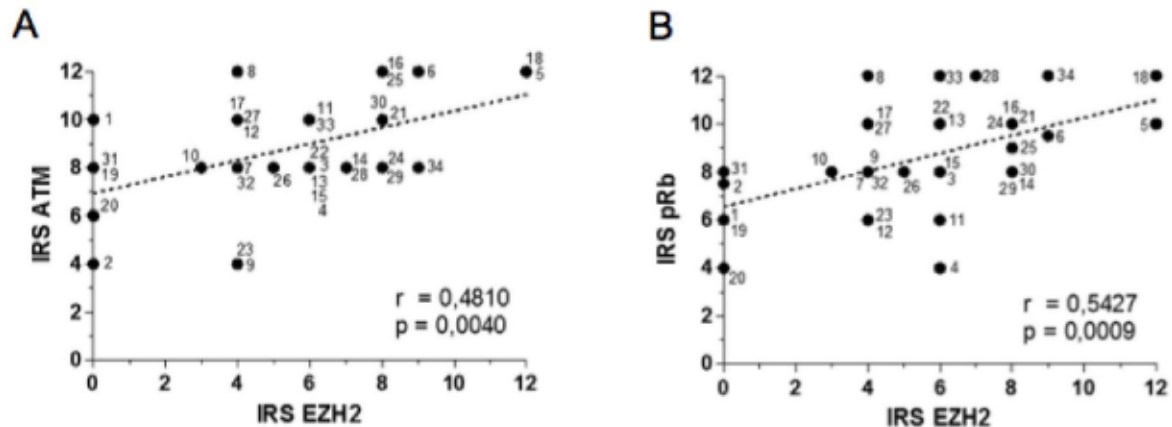


Abbildung 9.11 Berechnung des Zusammenhangs zwischen einer EZH2-Färbung und ATM oder pRb. ATM: links; pRb: rechts. Korrelationsanalyse nach Pearson. Die Patientenproben wurden gemittelt ($n=2$) und von 1 bis 34 durchnummeriert. r = Korrelationskoeffizient.

Die Korrelationsanalyse der EZH2- und ATM-Färbung ergab einen statistisch signifikanten Zusammenhang ($r=0,4810$, $p=0,0040$). Der Vergleich zur pRb-Färbung wies ebenso eine Co-Expression zu EZH2 auf ($r=0,5427$, $p=0,0009$).

9.2.2.2 Co-Lokalisation von EZH2 und pATM – Proximity Ligation Assay *in situ*

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression von EZH2 zwischen sensitiven und resistenten Tumoren in den vorangegangenen Analysen gefunden. Allerdings zeigte die Immunmarkierung von ATM und pRb ein vergleichbares Färbemuster innerhalb einer Tumorseite, und eine signifikante Korrelation zu EZH2. Ob ATM und EZH2 in den Ovarialkarzinomen zusammentreffen, und ob sich diese Co-Lokalisation auf das progressionsfreie Überleben auswirkt, wurde mithilfe eines Proximity Ligation Assay *in situ* untersucht (PLA).

Zur primären Detektion der Proteine wurden Antikörper gegen das EZH2-Gesamtprotein aus dem Kaninchen, und Mausantikörper gegen phosphoryliertes ATM (pSer1981) verwendet (Abbildung 9.12). Die Phosphorylierung an Ser1981 gilt als Marker für eine ATM-Aktivität, da

Ergebnisse

es im dephosphorylierten Zustand als Homodimer inaktiv ist (125). Insgesamt wurden mit dieser Methode 34 Patientenproben untersucht.

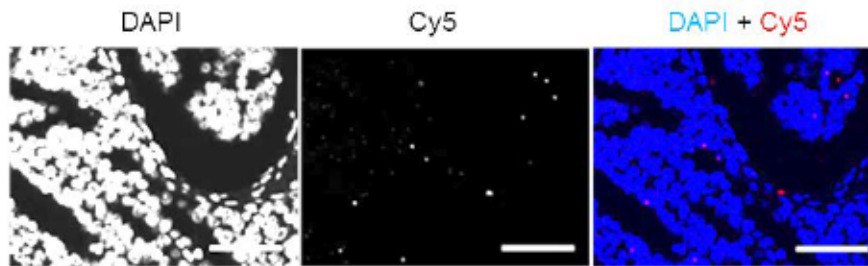


Abbildung 9.12 Exemplarische PLA-Markierung in Ovarialkarzinomgewebe einer Patientin. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau), PLA-Signale von EZH2 und ATM pSer1981 wurden im Cy5-Kanal aufgenommen (rot). Balken = 50µm.

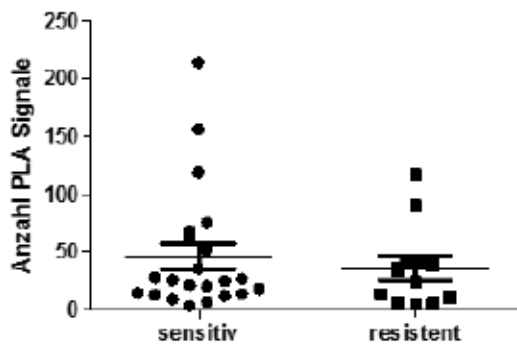


Abbildung 9.13 Auswertung der in situ PLA-Analyse. Von 34 Tumorproben wurden 22 Patientinnen als sensitiv, 12 als resistent anhand ihrer klinischen Daten eingeteilt. Angegeben ist die Anzahl an Signalen der ATM pSer1981 und EZH2 Co-Lokalisation. Ein Punkt entspricht einem Mittelwert aus zwei Gewebeproben einer Patientin. Wilcoxon-Mann-Whitney; $p=0,7927$; Mittelwerte $\pm$ Standardfehler.

Für den Vergleich der Gruppen sensitiv gegen resistent wurde aufgrund der nicht normalverteilten Messungen die Wilcoxon-Mann-Whitney-Teststatistik angewendet (Abbildung 9.13). Der berechnete p-Wert zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,7927$).

Daraufhin wurden die Messwerte der Patientenproben einer Überlebenszeitanalyse (Logrank) unterzogen. Es wurden die Daten von Patientinnen mit einer hohen Signalanzahl mit Daten von Patientinnen mit einer niedrigen Anzahl verglichen. Patienten, deren Beobachtungszeitraum vorzeitig endete, wurden zensiert.

Ergebnisse

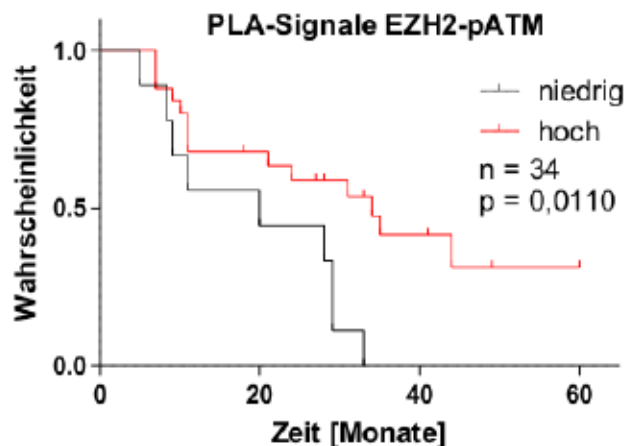


Abbildung 9.14 Überlebenszeitanalyse von Ovarialkarzinom-Patientinnen anhand der Co-Lokalisation von pATM und EZH2. Patientinnen mit einer hohen (über14, rot) und niedrigen (unter14, schwarz) Anzahl an PLA-Signalen wurden miteinander verglichen. Mittelwerte aus zwei Gewebeproben einer Patientin; Logrank; Dichotomisiert am unteren Quartil.; Patientinnen ohne Ereignis wurden nach der Überschreitung des Beobachtungszeitraums zensiert; n=34.

Die Analyse der Proben (Abbildung 9.14) mit einer hohen Anzahl an PLA-Signalen (n=25, rot) im Vergleich zu denen mit einer niedrigen Anzahl an Signalen (n=9, schwarz) zeigte deutlich ($p=0,011$) einen Zusammenhang zwischen einer pATM-EZH2 Co-Lokalisation mit dem progressionsfreien Überleben der Patienten. Der Vergleich in der Überlebensanalyse der IRS-Werte von den gleichen Patientinnen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Weiterhin wurde die Anzahl an PLA-Signalen zu den IRS-Werten der einzelnen Proteine verglichen. Die Korrelation ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen den gemittelten Patientenproben (nummeriert), die eine hohe Anzahl an PLA-Signalen haben verglichen mit den IRS der EZH2-Färbung ($p=0,0016$, Abbildung 9.15, A). Der Vergleich zwischen der ATM-Färbung und der Anzahl an PLA-Signalen zeigte keinen signifikanten Zusammenhang ($p=0,2409$, Abbildung 9.15, B).

Ergebnisse

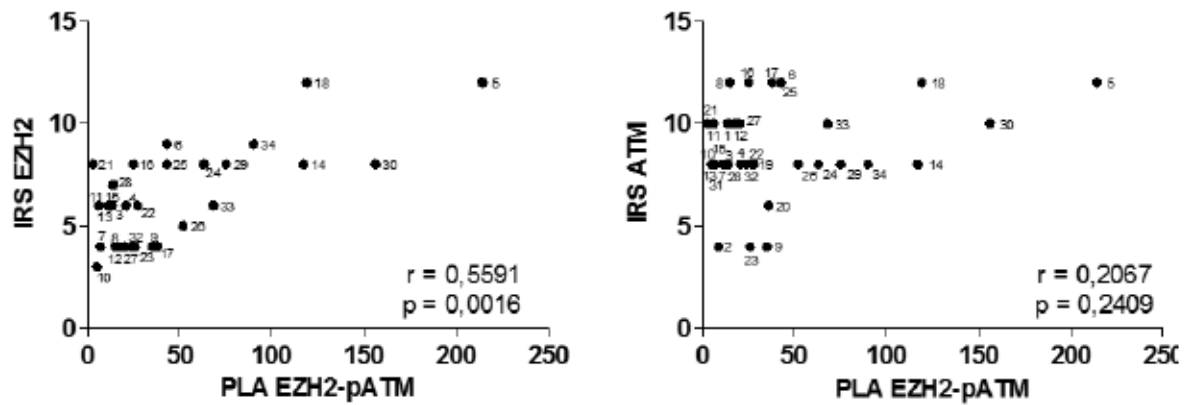


Abbildung 9.15 Korrelationsanalyse der gemessenen PLA-Signale einer Patientenprobe verglichen zur EZH2- oder ATM-Färbung. Korrelationsanalyse nach Spearman. Die Patientenproben wurden gemittelt ($n=2$) und von 1 bis 34 durchnummeriert. r =Rangkorrelationskoeffizient.

9.3 Funktionelle Charakterisierung der Kandidatenproteine in Zelllinien

Für die funktionelle Charakterisierung ausgewählter, signifikant differentiell exprimierter Proteine aus der vorangegangenen Untersuchung in 9.1.1 wurden acht verschiedene Ovarialkarzinom-Zelllinien verwendet: A2780, A2780cis, Caov3, IGROV1, OVCAR3, PEO1, PEO4 und SKOV3. Alle Zelllinien sind epithelialen Ursprungs und wachsen adhärent als Monolayer.

9.3.1 Bestimmung der Resistenzstatus

Um Versuche durchzuführen, die dem Resistenzverhalten der Zellen in den Tumoren entsprechen, wurde zunächst der Resistenzstatus jeder Zelllinie bestimmt. Die Zellen wurden mit absteigenden Konzentrationen von Carboplatin (CP), Paclitaxel (TX) oder der Kombination beider Agenzien (CPTX) behandelt. Nach drei Tagen wurde die Zellviabilität mittels eines ATP-Chemosensitivitätstests gemessen. Die Berechnung des IC_{50} -Werts jeder Zelllinie diente dem interzellulären Vergleich des Grades der Resistenz. Carboplatin und Paclitaxel wurden in unterschiedlichen Molaritäten (2,63:1) appliziert. Die IC_{50} -Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit normalisiert, um das Resistenzverhalten der einzelnen Zelllinien miteinander zu vergleichen (Abbildung 9.16).

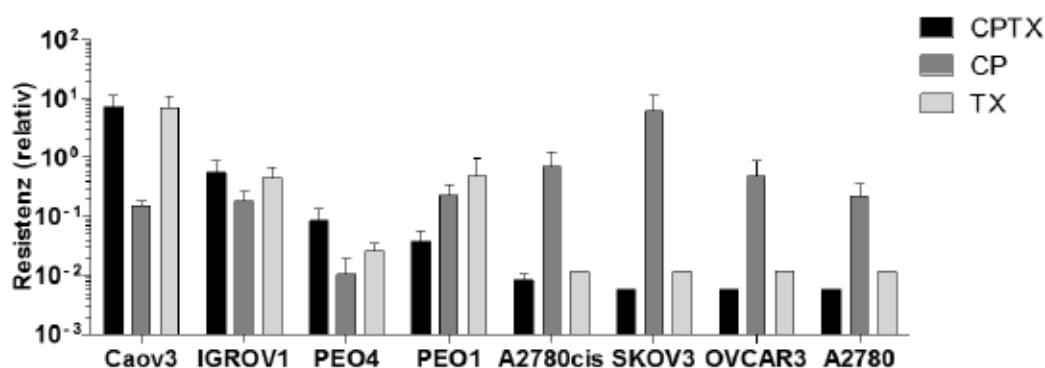


Abbildung 9.16 Relatives Resistenzverhalten der getesteten acht Ovarialkarzinom-Zelllinien nach einer Behandlung mit Carboplatin (CP, hellgrau), Paclitaxel (TX, dunkelgrau) oder der Kombination (CPTX, schwarz). Normalisierter IC_{50} .

Ergebnisse

In Abbildung 9.16 ist zu sehen, dass Zelllinien, die auf eine TX Behandlung sensitiv reagieren auch auf die Kombinationsbehandlung gut ansprechen. Verdeutlicht wird diese Beobachtung in einer Korrelationsanalyse (Abbildung 9.17). Hierbei wurden die IC_{50} -Werte der Behandlung mit einem Einzelagens (CP, A; TX, B) mit denen der Kombinationsbehandlung, gemessen in den Molaritäten der jeweiligen Einzelagenzien, verglichen.

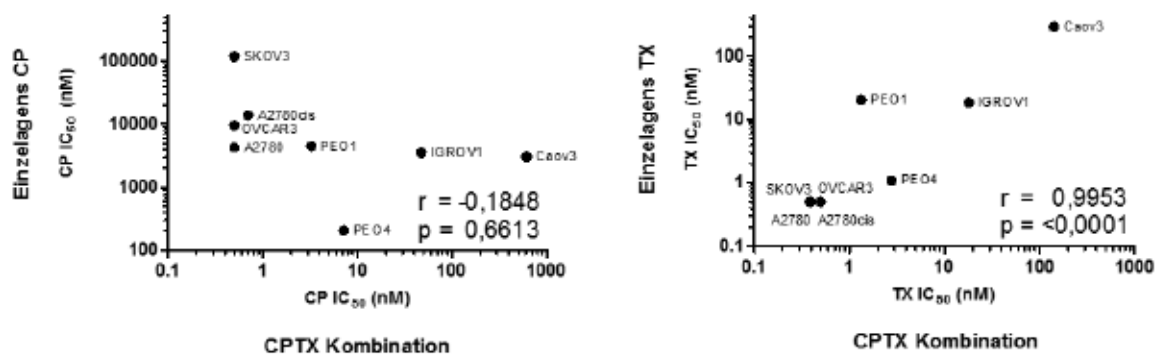


Abbildung 9.17 Korrelationsanalyse der Resistenzen einer Monobehandlung mit Carboplatin (CP) oder Paclitaxel (TX) verglichen mit einer Kombinationsbehandlung beider Agenzien. Die IC_{50} -Werte der Kombinationsbehandlung wurden jeweils für CP (links) und TX (rechts) berechnet. r = Korrelationskoeffizient.

Ein Zusammenhang zwischen einer Einzelbehandlung mit CP und der Kombinationsbehandlung wurde nicht sichtbar ($r=-0,503$; $p=0,2162$). Ein signifikanter Zusammenhang besteht jedoch zwischen einer Resistenz gegenüber TX im Vergleich zur Resistenz gegenüber der Kombinationsbehandlung ($r=0,8494$; $p=0,0107$). Caov3 zeigt hier eine erhöhte Toleranz gefolgt von IGROV1, PEO4 und PEO1. OVCAR3, A2780cis, SKOV3 und A2780, erwiesen sich als sensitiv gegenüber einer Kombinationsbehandlung.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass eine hohe Resistenz in der Kombinationsbehandlung mit CPTX in erster Linie auf eine hohe Toleranz gegenüber Paclitaxel zurückzuführen ist. Caov3 wurde als resistenteste Zelllinie identifiziert. A2780 zeigte die niedrigsten IC_{50} -Werte und gilt somit als sensitiv.

9.3.2 Korrelationsanalysen der Expression identifizierter Proteine zum ermittelten Resistenzverhalten

In den nächsten Versuchen wurde ein Zusammenhang des Protein- oder Proteinmodifikationsgehalts mit einer vorhandenen intrinsischen Resistenz überprüft. Mit Ergebnissen aus der Berechnung der IC_{50} -Werte wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Kultivierte, unbehandelte Zellen wurden anhand von Western Blots (Abbildung 9.18) auf statistisch auffällige Proteine aus 9.1.1 getestet.

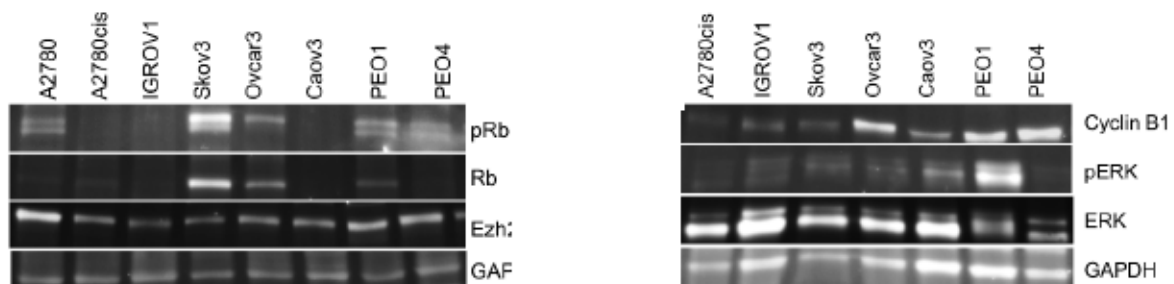


Abbildung 9.18 Exemplarischer Western Blot mit Lysaten von unbehandelten Zellen. A: Immunodetektion von pRb, Rb, EZH2 und GAPDH. B: Immunodetektion von Cyclin B1, pERK1/2, ERK1/2 und GAPDH.

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen dem Proteinprofil aus der DigiWest-Analyse in 9.1.1 und der ATM-Expression, wurde der ATM-Gehalt in den Zelllinien ebenfalls quantifiziert (Abbildung 9.19).

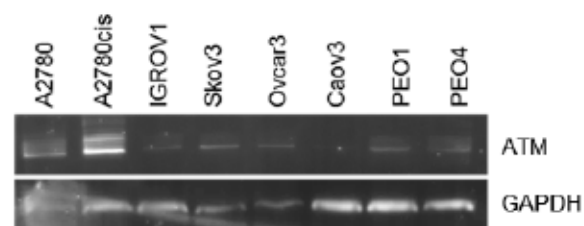


Abbildung 9.19 Exemplarischer Western Blot mit Lysaten von unbehandelten Zellen. Immunodetektion von ATM und GAPDH.

Die Proteinmenge wurde densitometrisch quantifiziert, auf die GAPDH-Ladekontrollmenge, und anschließend noch einmal auf den Wert von IGROV1 (=1) normalisiert. Drei Messungen

Ergebnisse

wurden zusammengefasst und gemittelt. Die Werte wurden anschließend mit den IC₅₀-Werten der Untersuchung aus 9.3.1 korreliert (Spearman-Korrelation).

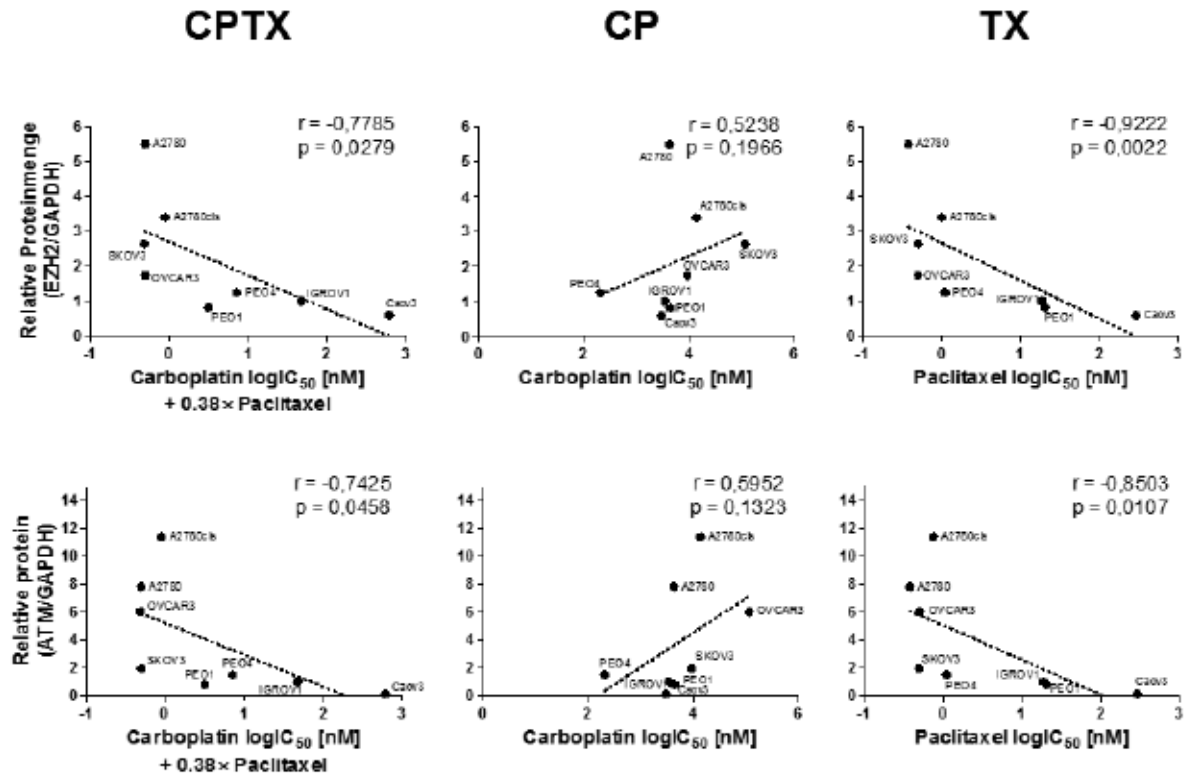


Abbildung 9.20 Korrelationsanalysen der Resistenzen verschiedener Ovarialkarzinom-Zelllinien. Der Gehalt von EZH2 (oben) und ATM (unten) wurde mit den IC₅₀-Werten der unterschiedlichen Behandlungen CPTX (links), CP (Mitte) und TX (rechts) in einer Rangkorrelationsanalyse nach Spearman verglichen. $n=3$.

EZH2 korrelierte negativ ($r = -0,7785$, $p = 0,0279$) mit steigender Resistenz der Zelllinien gegen die Kombinationsbehandlung (Abbildung 9.20, oben links). Die Tendenz entspricht dem Proteingehalt von EZH2 aus der DigiWest-Analyse. Je weniger EZH2 in der Zelllinie exprimiert ist, desto unempfindlicher ist diese auf eine Behandlung mit einer Kombinationstherapie. Die Proteinmenge in den unterschiedlichen Zelllinien zeigte jedoch keinen Zusammenhang mit der Resistenz gegen CP allein (Abbildung 9.20, oben Mitte). Eine Monotherapie mit TX hingegen zeigte eine deutliche negative Korrelation auf ($r = -0,9222$, $p = 0,0022$, Abbildung 9.20, oben rechts).

Ergebnisse

Da ATM in den vorangegangenen Untersuchungen (Abbildung 9.4) ebenso einen Zusammenhang im Hinblick auf das Ansprechen von Patientinnen zeigte, wurde auch in den Zelllinien der ATM-Gehalt gemessen und gegen das Resistenzverhalten der einzelnen Ansätze *in vitro* verglichen. ATM korreliert negativ mit dem Resistenzstatus einer Kombinationstherapie: je weniger ATM-Protein in den Zellen exprimiert ist, desto geringer das Ansprechen gegenüber CPTX ($r = -0,7425$, $p\text{-Wert} = 0,0458$) (Abbildung 9.20, unten links). Ebenfalls deutlich wurde dies im Vergleich mit den nur mit Paclitaxel behandelten Zellen ($r = 0,8503$, $p = 0,0107$) (Abbildung 9.20, unten rechts). Die CP-Behandlung hingegen ließ eine Tendenz zur Korrelation von CP-Resistenz und Protein-expression vermuten, die jedoch nicht statistisch signifikant ist ($r = 0,5952$, $p = 0,1323$) (Abbildung 9.20, unten Mitte).

Die Analysen weiterer Proteine und Proteinmodifikation waren im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen der Proteinmessung und dem Resistenzverhalten unterschiedlicher Behandlungen nicht signifikant (s. Anhang Abbildung 12.2).

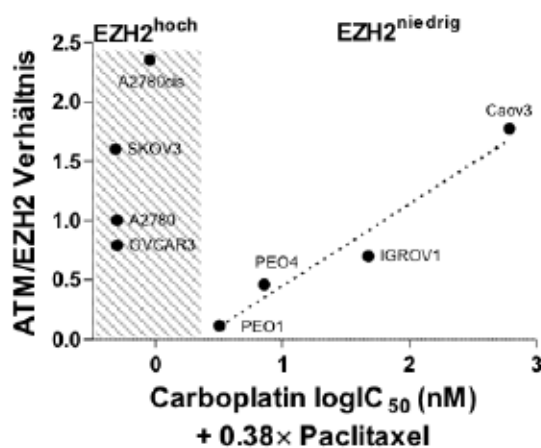


Abbildung 9.21 ATM/EZH2-Verhältnis in Zelllinien einem hohem (EZH2^{hoch}) und niedrigem (EZH2^{niedrig}) EZH2-Gehalt.

Werden die Zelllinien in EZH2^{hoch} und EZH2^{niedrig} exprimierend getrennt und anschließend mit dem ATM/EZH2 Verhältnis verglichen, kann beobachtet werden, dass zwischen diesem Verhältnis und dem Resistenzverhalten zur Kombinationsbehandlung ein linearer Zusammenhang besteht (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.). Dieser Zusammenhang wurde bereits in Kapitel 9.2.1 (Abbildung 9.7) beobachtet.

Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen die ermittelten Ergebnisse, dass sich die Resistenz der Zellen gegenüber einer TX-Behandlung auch in einer Resistenz gegenüber einer Kombinationsbehandlung widerspiegelte. Die Proteine EZH2 und ATM wurden in sensitiven Zelllinien, ähnlich wie in den Patientenproben, erhöht exprimiert. Auf die CP-Resistenz haben die Expressionsniveaus dieser Proteine keinen signifikanten Einfluss. Das Verhältnis von ATM zu EZH2 stieg in den EZH2^{niedrig} exprimierenden Zellen analog zum gemessenen Resistenzstatus.

9.3.3 Reduktion der endogenen Proteinexpression von EZH2 und ATM in A2780 mittels RNA-Interferenz

Zur funktionellen Charakterisierung von EZH2 und ATM *in vitro*, wurde die Expression beider Proteine mithilfe von RNA-Interferenz reduziert (Gen-Knockdown). Hierfür wurde die Zelllinie A2780 ausgewählt, weil sie gegenüber einer Behandlung mit CPTX als sensitiv identifiziert wurde (vgl. 9.3.1); außerdem ist ihr basaler EZH2- und ATM-Proteingehalt im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien hoch (vgl. 9.3.2).

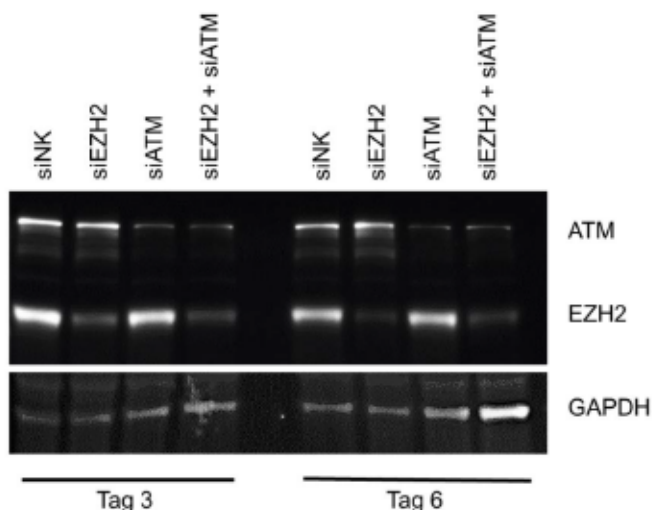


Abbildung 9.22 Western Blot und Immundetektion von EZH2, ATM und GAPDH in unbehandelten A2780 Zelllinien. Der Proteingehalt der Zellen wurde mittels RNA-Interferenz gegen EZH2 (siEZH2), ATM (siATM) und der Kombination (siEZH2+ATM) reduziert. Der Gen-Knockdown wurde über die Dauer von drei Tagen (T3-T6) bestätigt. SiNK: Kontrollzellen inkubiert mit siRNA ohne Zielsequenz im menschlichen Genom, Negativkontrolle.

Ergebnisse

Eine beständige Reduktion von EZH2 (siEZH2), ATM (siATM) oder beider Proteine (siEZH2+siATM) konnte über einen Zeitraum von drei Tagen (T3-T6) durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 9.22).

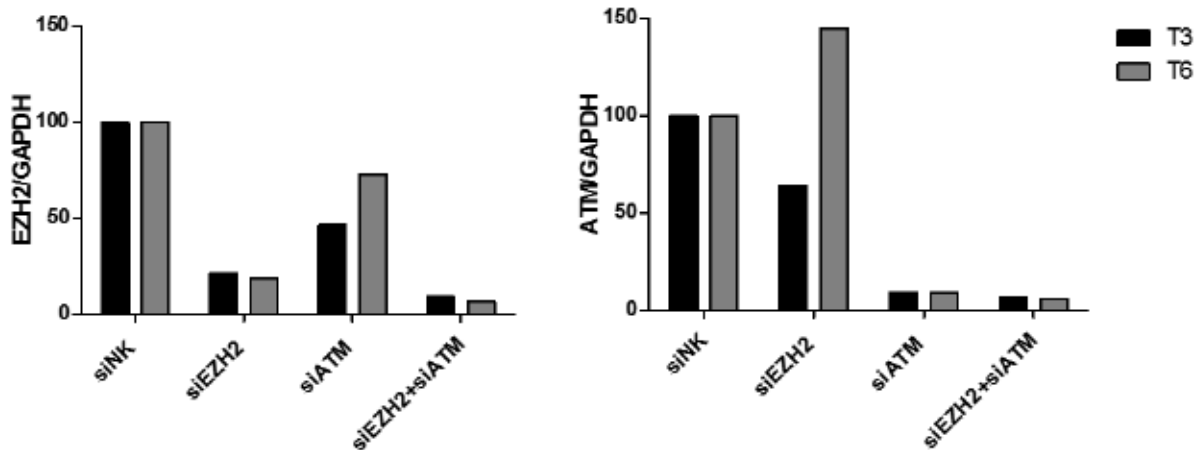


Abbildung 9.23 Quantifizierung der Western Blot-Analyse nach siRNA-Inkubation gegen EZH2, ATM sowie ATM und EZH2. Exemplarisch für Abbildung 9.22. siNK: Kontrollzellen inkubiert mit siRNA ohne Zielsequenz im menschlichen Genom; siEZH2: Inkubation mit siRNA gegen EZH2; siATM: Inkubation mit siRNA gegen ATM; siATM+EZH2: Inkubation mit siRNA gegen ATM und EZH2. T: Zeitraum der Inkubation in Tagen.

Das Expressionsniveau von ATM konnte mittels siATM um ca. 90% reduziert werden. SiEZH2 reduziert den endogenen Gehalt von EZH2 um ca. 80%. Die Kombination der beiden siRNAs bewirkte eine Reduktion von ATM um 94% und von EZH2 um ca. 90% (Abbildung 9.23).

9.3.3.1 Behandlung von A2780-Zellen nach siRNA-vermittelter Reduktion von EZH2 und ATM

Nach erfolgreicher Reduktion der beiden Proteine EZH2 und ATM, folgte die Behandlung mit chemotherapeutischen Agenzien (CPTX, CP und TX) und schließlich der Vergleich zwischen Zellen mit verminderter Expression von EZH2 (siEZH2), ATM (siATM), oder beiden Proteinen (siEZH2+siATM), mit Zellen mit unverändertem EZH2 und ATM-Gehalt (siNK).

Ergebnisse

Die Chemotherapeutika wurden ab Tag 3 bis Tag 6 nach siRNA-Behandlung in einer 7-stufigen Verdünnungsreihe zugegeben und ihr Effekt anhand der Zellviabilität mithilfe des ATP-Chemosensitivitätstests gemessen. Es wurden jeweils drei biologische Replikate mit der gleichen Konzentration behandelt und vermessen. Die Messwerte wurden auf die Werte unbehandelter Zellen normalisiert. Anschließend wurden die Ergebnisse der behandelten Zellen mit reduziertem Proteingehalt gegen Kontrollzellen verglichen.

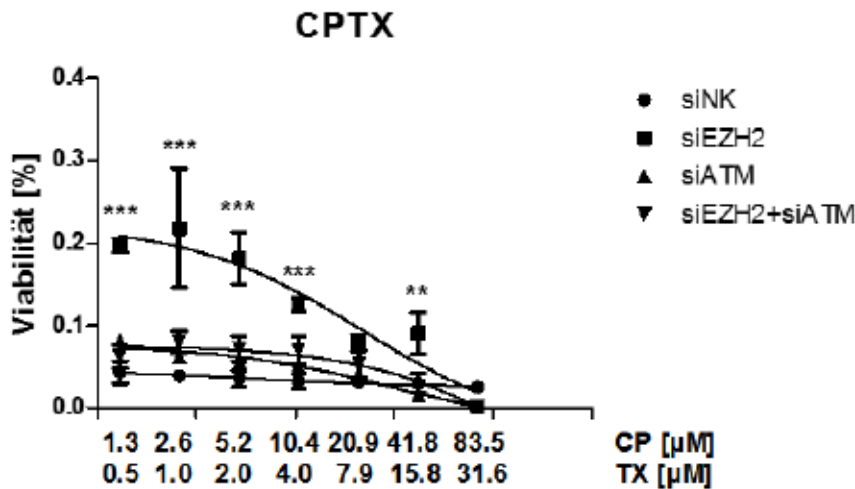


Abbildung 9.24 CPTX-Behandlung von A2780-Zellen nach EZH2- und ATM-Knockdown, sowie beider Proteine. Kontrollzellen (siNK) wurden gegen Zellen mit reduziertem EZH2- und/oder ATM-Gehalt verglichen (siEZH2, siATM, siEZH2+siATM). ATP-Chemosensitivitätstest; n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen; zweifache Varianzanalyse (Two-Way ANOVA) mit Bonferroni Post-hoc-Test. $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$.

In 9.2.1 und 9.2.2 konnte bereits gezeigt werden, dass eine Co-Lokalisation von EZH2 und ATM mit einer Therapiesensitivität assoziiert ist.

Die EZH2-Suppression bewirkte eine erhöhte Zellviabilität in Zellen, die mit CPTX behandelt wurden, verglichen zu den Kontrollzellen ($p \leq 0,001$, Abbildung 9.24). Dagegen haben weder die Reduktion von ATM alleine noch die kombinierte Suppression von EZH2 und ATM einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen während einer CPTX-Behandlung (n.s., Abbildung 9.24).

Ergebnisse

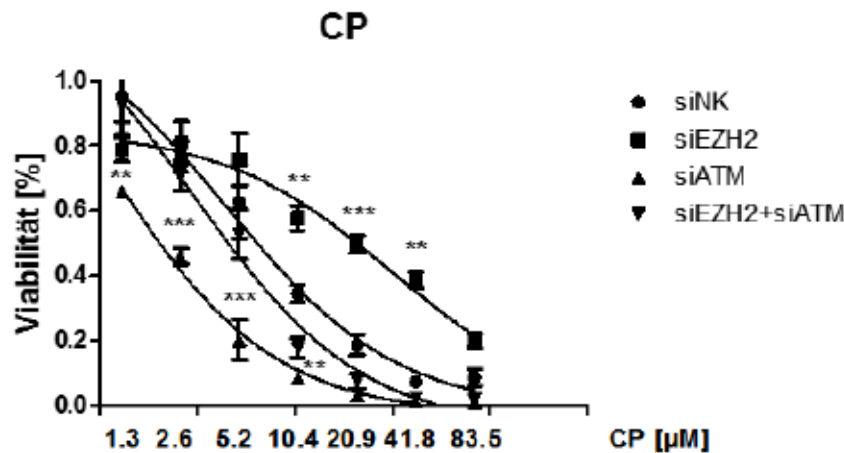


Abbildung 9.25 CP-Behandlung von A2780-Zellen nach EZH2- und ATM-Knockdown, sowie beider Proteine. Kontrollzellen (siNK) wurden gegen Zellen mit reduziertem EZH2- und/oder ATM-Gehalt verglichen (siEZH2, siATM, siEZH2+siATM). ATP-Chemosensitivitätstest; n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen; zweifache Varianzanalyse (Two-Way ANOVA) mit Bonferroni Post-hoc-Test. $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$.

In der CP-Monotherapie haben EZH2-depletierte Zellen erst bei höheren CP-Konzentrationen einen Überlebensvorteil ($p \leq 0,001$, Abbildung 9.25). Die Reduktion von ATM sensibilisierte die Zellen für die CP-Behandlung. Die kombinierte Suppression von EZH2 und ATM wirkte sich neutral aus.

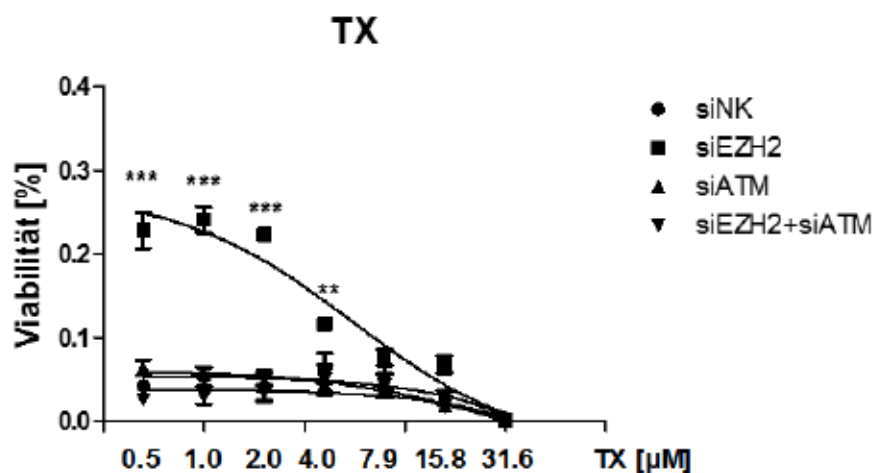


Abbildung 9.26 TX-Behandlung von A2780-Zellen nach EZH2- und ATM-Knockdown, sowie beider Proteine. Kontrollzellen (siNK) wurden gegen Zellen mit reduziertem EZH2- und/oder ATM-Gehalt verglichen (siEZH2, siATM, siEZH2+siATM). ATP-Chemosensitivitätstest; n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen; zweifache Varianzanalyse (Two-Way ANOVA) mit Bonferroni Post-hoc-Test. $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$.

Ergebnisse

In der Monobehandlung mit TX zeigten EZH2-reduzierte Zellen erneut eine erhöhte Resistenz ($p \leq 0,001$, Abbildung 9.26). Ein siRNA-vermittelter Knockdown von ATM oder EZH2 zusammen mit ATM ließ die Zellen nicht resistenter für die Behandlung werden.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass eine alleinige Reduktion von EZH2 die Resistenz gegenüber einer TX- und CP-haltigen Behandlungen sowie der Kombination aus beiden, erhöht. Eine Reduktion von ATM oder auch von ATM und EZH2 zugleich brachte den Zellen keinen Wachstumsvorteil während der Behandlung. Die Daten lassen vermuten, dass zur Vermittlung einer Resistenz mittels einer EZH2-Suppression, ATM nötig ist. Daraus kann geschlossen werden, dass EZH2 eine wichtige inhibierende Rolle in der Signalweiterleitung von ATM spielen könnte.

9.3.3.2 DigiWest-Analyse von A2780-Zellen nach siRNA-vermittelter Reduktion von EZH2 und ATM

Proteinlysate von A2780-Zellen wurden nach erfolgreicher EZH2- und ATM-Reduktion einer DigiWest-Analyse unterzogen. Es wurden Proteine und deren Modifikationen analysiert, die in 9.1.1 als signifikant unterschiedlich quantifiziert worden waren. Der Fokus in dieser Analyse lag insbesondere auf Veränderungen von Proteinmengen oder Proteinmodifikationen, die nur bei einer EZH-Suppression auftreten, da nur dieser Ansatz die Resistenz der Zellen steigern konnte (siehe 9.3.3.1).

Ergebnisse

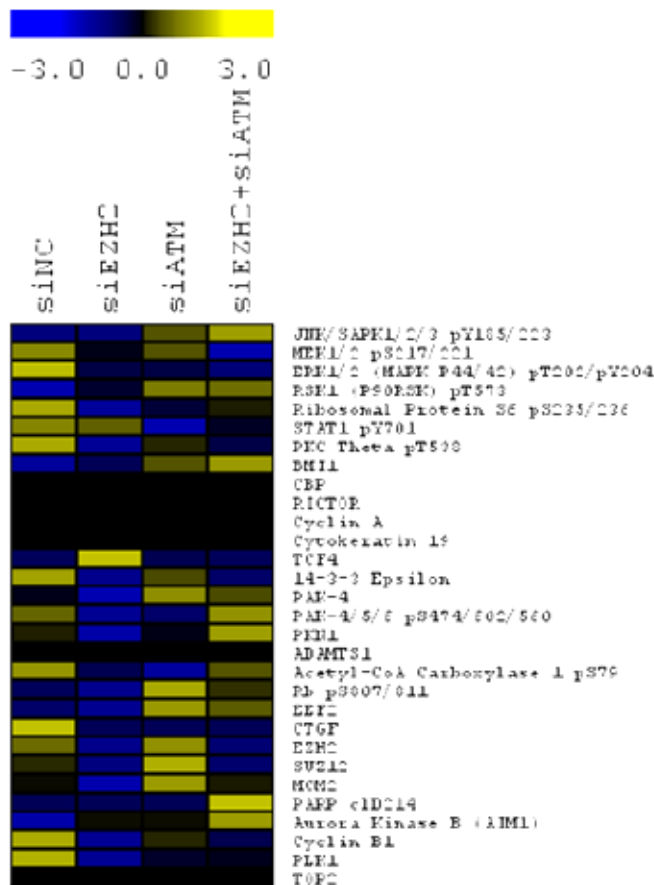


Abbildung 9.27 Heatmap der DigiWest-Analyse von A2780-Proteinlysaten mit 30 Analyten. Die ausgesuchten Proteine und Proteinmodifikation wurden als statistisch signifikant, differentiell reguliert in Tumoren beobachtet. Die Reihenfolge der Analyten entspricht der aus Abbildung 9.3. Die quantifizierte Proteinmenge wurde pro Reihe normalisiert. siEZH2: A2780 mit reduziertem EZH2-Gehalt; siATM: A2780 mit reduziertem ATM-Gehalt; siEZH2+ATM: A2780 mit reduziertem EZH2- und ATM-Gehalt.

Es konnte eine deutliche Abnahme von Zellzyklus/ Mitoseproteinen wie 14-3-3 Epsilon, PAK-4, PKN1, pRb, cPARP, Aurora B Kinase, Cyclin B1 und PLK1 beobachtet werden (Abbildung 9.27, siEZH2, blau).

Um diesen Zusammenhang weiter zu validieren, wurden weitere 63 Proteine und Proteinmodifikationen überprüft, die eine entscheidende Rolle im Zellzyklus besitzen.

Ergebnisse

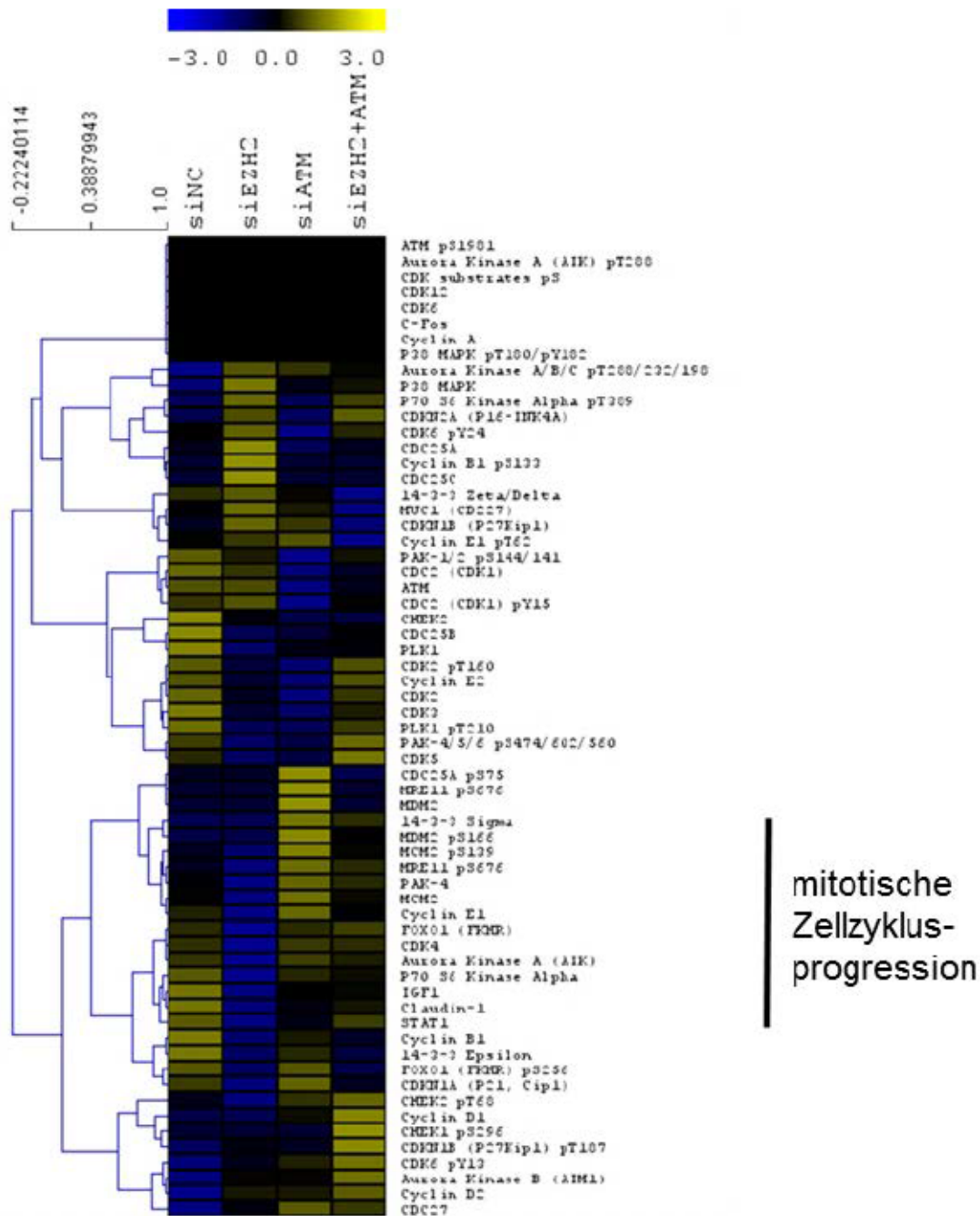


Abbildung 9.28 Heatmap der DigiWest-Analyse von A2780-Proteinlysaten mit 63 Analyten und anschließendem hierarchischen Clustering der Analyten. Hierarchische Clusteranalyse; Die quantifizierte Proteinmenge wurde pro Reihe normalisiert. siEZH2: A2780 mit reduziertem EZH2-Gehalt; siATM: A2780 mit reduziertem ATM-Gehalt; siEZH2+ATM: A2780 mit reduziertem EZH2- und ATM-Gehalt.

Deutliche Unterschiede sind in Proteinen zu beobachten, die in der mitotischen Zellzyklusprogression eine Rolle spielen wie 14-3-3 Sigma, MDM2, MCM2, MRE11, PAK-4,

Ergebnisse

Cyclin E1, FOXO1, CDK4, Aurora Kinase A, P70 S6 Kinase Alpha, IGF1, Claudin-1 und STAT1 (Abbildung 9.28).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Suppression von EZH2 in Zellen mit gleichzeitig hohem ATM-Gehalt zu einem Rückgang von Proteinen führt, die mit der Zellzyklusprogression und Mitose assoziiert sind.

9.3.4 Überexpression von exogenem EZH2 in der Zelllinie SKOV3

Im nächsten Versuch wurde als reziproker Ansatz mithilfe einer endogen niedrig EZH2-exprimierenden Zelllinie SKOV3, ein transientes Gain-of-Function-Modell *in vitro* generiert. Hierfür wurde mittels eines Plasmids EZH2 ektopisch in SKOV3-Zellen exprimiert. Die EZH2-Expression sollte erhöht werden, um die Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit den Agenzien CPTX, CP und TX zu untersuchen.

Für die transiente Transfektion des EZH2-Plasmids (PL) und des Leervektors (LVK) mussten die Zellen unter Selektionsdruck mit dem Antibiotikum G418 kultiviert werden. Durch das Neomycin-Resistenzgen im Plasmid wurde somit sichergestellt, dass die weiteren Versuche nur mit Zellen durchgeführt wurden, die ein Plasmid enthalten. Auch die Behandlung mit CPTX, CP und TX wurde unter Selektionsdruck durchgeführt. Die finale Zellviabilität wurde nach drei Tagen mit einem ATP-Assay gemessen.

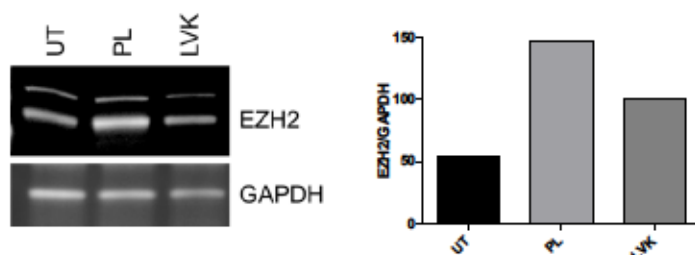


Abbildung 9.29 Western Blot und EZH2-Proteinquantifizierung transfizierter SKOV3-Zelllinienzellen. UT = untransfiziert; PL = mit EZH2-Plasmid transfiziert; LVK = Leervektorkontrolle.

Ergebnisse

Die Transfektion von EZH2 ergab eine Erhöhung des EZH2-Proteingehalts um 47% im Vergleich zur Leervektorkontrolle zu Beginn des Chemosensitivitätstests (Abbildung 9.29). Die Leervektorkontrolle wiederum zeigte eine Erhöhung um 46% im Vergleich zu den untransfizierten Zellen.

Um zu untersuchen ob eine Erhöhung des EZH2-Gehalts ebenfalls zu einer höheren Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit CPTX, CP oder TX führt, wurden ATP-Chemosensitivitätstests mit transient transfizierten SKOV3-Zellen durchgeführt.

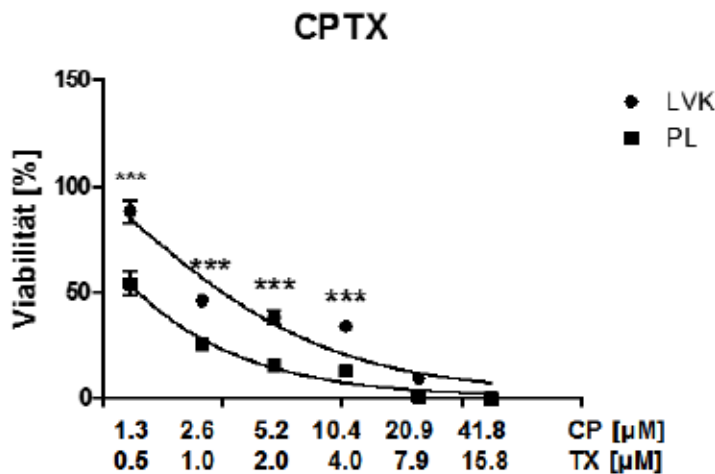


Abbildung 9.30 CPTX-Behandlung von SKOV3-Zellen mit einer EZH2-Überexpression. LVK=Leervektorkontrolle; PL=EZH2-Plasmid. ATP-Chemosensitivitätstest; $n=3$; Mittelwerte mit Standardabweichungen; zweifache Varianzanalyse (Two-Way ANOVA) mit Bonferroni Post-hoc-Test. $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$.

Eine Überexpression von EZH2 in A2780 Zelllinien erhöhte signifikant die Sensibilität für eine CPTX-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 9.30).

Ergebnisse

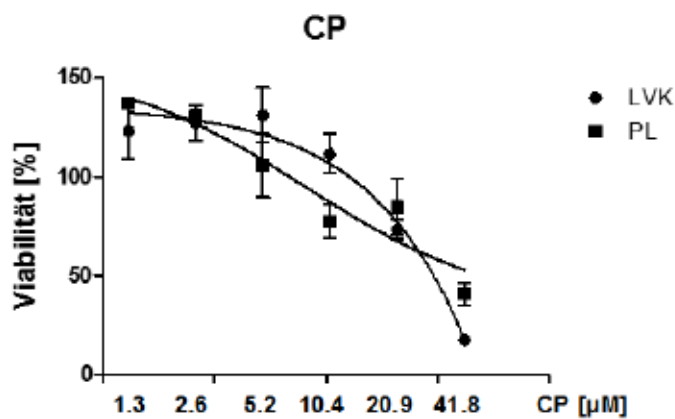


Abbildung 9.31 CP-Behandlung von SKOV3-Zellen mit einer EZH2-Überexpression. LVK=Leervektorkontrolle; PL=EZH2-Plasmid. ATP-Chemosensitivitätstest; $n=3$; Mittelwerte mit Standardabweichungen; zweifache Varianzanalyse (Two-Way ANOVA) mit Bonferroni Post-hoc-Test. $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$.

Eine EZH2-Überexpression hingegen führte nicht zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber einer Monobehandlung mit Carboplatin (Abbildung 9.31).

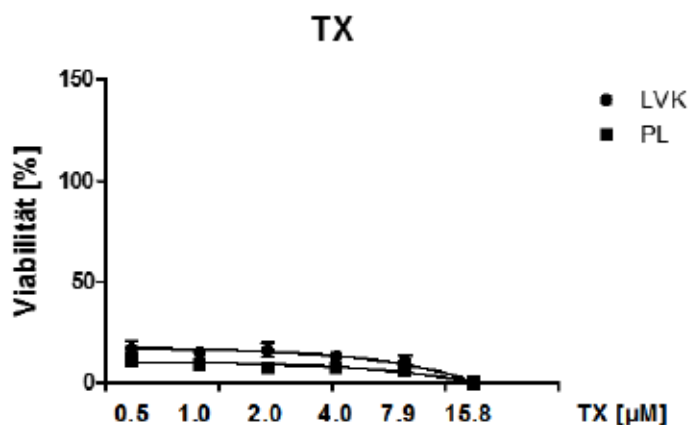


Abbildung 9.32 TX-Behandlung von SKOV3-Zellen mit einer EZH2-Überexpression. LVK=Leervektorkontrolle; PL=EZH2-Plasmid. ATP-Chemosensitivitätstest; $n=3$; Mittelwerte mit Standardabweichungen; zweifache Varianzanalyse (Two-Way ANOVA) mit Bonferroni Post-hoc-Test. $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$.

Ebenso zeigten EZH2-überexprimierende Zellen keine erhöhte Sensibilität, im Gegensatz zu der Kombinationsbehandlung, gegenüber einer TX-Monotherapie (Abbildung 9.32).

Ergebnisse

Insgesamt führt eine Erhöhung des EZH2-Gehalts zu einem verbesserten Ansprechen auf die Behandlung mit einer Kombinationstherapie.

9.3.5 Co-Lokalisation von EZH2 und ATM in A2780 nach Exposition gegenüber den chemotherapeutischen Agenzien

Die Co-Lokalisation der Proteine EZH2 und pATM wurde bereits im Gewebe der 34 Ovarialkarzinom-Patientinnen nachgewiesen – ebenso wie, wenn auch nur vereinzelt, in unbehandelten Zelllinien. Um herauszufinden ob die EZH2-ATM Co-Lokalisation durch CP, TX oder der Kombination in den Zellen induziert wird, wurde die sensitive Zelllinie A2780 auf Kammerobjektträgern kultiviert, und anschließend mit subletalen Konzentrationen behandelt. Eine Co-Lokalisation wurde mithilfe des Proximity Ligation Assay visualisiert. Zur Identifizierung der einzelnen Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt (Abbildung 9.33).

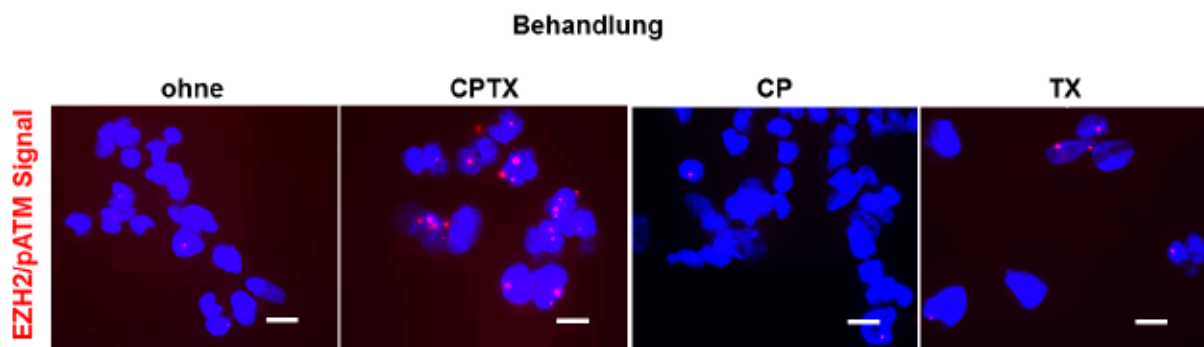


Abbildung 9.33 Exemplarische PLA-Markierung in A2780-Zellen nach unterschiedlichen Behandlungen. CPTX: Kombinationsbehandlung mit Carboplatin und Paclitaxel; CP: Monobehandlung mit Carboplatin; TX: Monobehandlung mit Paclitaxel. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau), die PLA-Signale von EZH2 und pATM Ser1981 wurden im TRITC-Kanal aufgenommen (rot). Balken=20 µm.

Ergebnisse

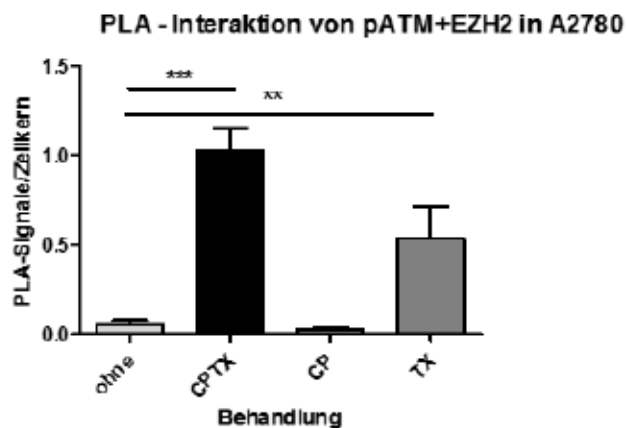


Abbildung 9.34 Auswertung der PLA-Analyse in A2780-Zellen nach Behandlung mit CPTX, CP und TX. Gemessen wurden die PLA-Signale von pATM und EZH2. Die Quantifizierung der Signale erfolgte pro Nukleus. Einfache Varianzanalyse; Dunnett-Test; $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$.

In A2780-Zellen, die sowohl EZH2 als auch ATM hoch exprimieren, war die Anzahl der Fluoreszenzpunkte pro Zellkern mit durchschnittlich 1 in CPTX-behandelten Zellen am höchsten (Abbildung 9.34). In TX-behandelten Zellen lag die durchschnittliche Punktzahl pro Zelle bei 0,5. Jede zweite Zelle zeigte somit eine Co-Lokalisation der beiden Proteine. In Zellen ohne Behandlung und in Zellen, die mit CP behandelt wurden waren kaum Fluoreszenzsignale zu erkennen, die auf eine Annäherung der beiden Proteine hindeuteten (0,05 Signale/Nukleus, 0,03 Signale/Nukleus). Die Negativkontrollen mit unspezifischen Isotyp-Antikörpern zeigten ebenfalls nur vereinzelt Signale (Abbildung 8.7).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass möglicherweise die Interaktion von EZH2 und pATM für die Sensitivität einer Zelle gegenüber einer Behandlung mit CP, TX oder beidem eine Rolle spielen könnte.

10 Diskussion

Die vorliegende Arbeit versucht mithilfe des innovativen DigiWest-Verfahrens, durch analysierte Proteine und deren Modifikationen einen möglichen Mechanismus zu identifizieren, der im Ovarialkarzinom zur Resistenzbildung gegenüber der Standard-Therapie mit Carboplatin und Paclitaxel führt.

Studienlage zur Therapieresistenz im Ovarialkarzinom

Vorangehende Arbeiten auf Genom- und Transkriptomebene, die sich mit der Resistenzentwicklung im Ovarialkarzinom befassten, führten zu keinem nachhaltigen Nutzen der Ergebnisse. Ein Übersichtsartikel aus dem Jahr 2015, in der eine Metaanalyse mit Studien zur Resistenzentwicklung im Ovarialkarzinom durchgeführt wurde, zählte 42 Studien auf, in denen über Gen-Expressionsprofile mögliche prädiktive Gen-Signaturen erstellt werden sollten (126). Bezeichnenderweise wurden nur sehr wenig Gene in mehr als zwei Studien übereinstimmen identifiziert. Weiterhin stellt die Heterogenität des Patientenkollektivs ein Problem dar. Die Behandlung mit Chemotherapeutika war in wenigen Fällen übereinstimmend. Primär wurden Tumoren von Patientinnen untersucht, die eine Platin-basierte Therapie erhielten. So führte die umfassende Sequenzierung resistenter Tumoren zu keinem eindeutigen Ergebnis bezüglich vorhandener Mutationen z.B. in einem Tumorsuppressorgen. In einer australischen Studie wurde Material von 92 Patienten mit primär resistenter oder sensibler Tumorerkrankung sowie erworbener Resistenz (initiales Ansprechen auf die erste Behandlung) untersucht. Es wurde das gesamte Genom analysiert, um sowohl somatische Mutationen im Tumor als auch Keimbahn-Mutationen zu identifizieren, die einen möglichen Einfluss auf den Tumorprogress und das Resistenzverhalten haben (127). Eine Platin-basierte Therapie war Voraussetzung für den Einschluss der Patienten in diese Kohorte, jedoch nicht unbedingt in Verbindung mit Taxol. Das Ansprechen auf eine Therapie wurde, neben dem Ausbleiben von Rezidiven, anhand einer niedrigen CA-125-Konzentration im Blut bestimmt (128). Es konnte keine Verbindung

Diskussion

von mutierten Genen zu Patienten hergestellt werden, die als primär resistent eingestuft wurden. Eine akquirierte Resistenz wurde jedoch mit Genbrüchen der Gene *RB1*, *NF1*, *RAD51B* und *PTEN*, sowie der „Umkehrung“ von *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutationen assoziiert. Weitere Studien identifizierten potentielle Kandidatenproteine wie PBX1, XPAC und ERCC1, die als sensitivitätsfördernd in der Behandlung mit Platin galten (129, 130).

Eine Arbeitsgruppe, die Genexpressionsdaten von Ovarialkarzinom-Patientinnen mit einer Platin- und Taxol-basierten Erstlinientherapie analysierte, nutzte öffentlich zugängliche Daten (TCGA und GSE). Hierbei wurde eine Gensignatur von 97 Genen erstellt, durch welche ein Ansprechen von Ovarialkarzinom-Patientinnen auf die Kombinationsbehandlung prognostiziert werden kann (131). Protein-Signalwegsanalysen deuteten auf eine zentrale Regulation durch die Proteine HIF1 α und TP53 hin.

Auf Proteinebene wurde mithilfe eines Reverse-Phase-Proteinarrays der aktivierte TGF- β Signalweg in Tumorproteinlysaten nach primärer platinhaltiger Chemotherapie identifiziert und mit einem verbesserten Überleben korreliert (132). Als Referenz für die Progression wurde die Proteinkonzentration von CA-125 im Blut gemessen. Weiterhin wurden erhöhte PDGFR-beta und VEGFR-2 Proteinmengen mit einer schlechteren Prognose nach einer Platin-basierten Therapie assoziiert, sowie auch zum Teil eine erhöhte ERK-Aktivierung (133). Die Proteine CASPR3, S100, Claudin 4, und CDC42BPA wurden ebenfalls mithilfe einer Proteinarray-Technologie in Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinom-Zellen erhöht vorgefunden (134).

Auf epigenetischer Ebene wurden Veränderungen in der Methylierung und im Transkriptom bei einer Cisplatin-Resistenz beobachtet, die die Proteine KLF4 und IL-6 betreffen (135). Konkret wurde auch C/EBP β als Initiator einer H3K79 Methylierung und schließlich einer Platin-Resistenz identifiziert (136).

In Studien, die sich mit dem Wirkmechanismus der Taxol-Einzelbehandlung befassten, wiesen Kandidaten keine Ähnlichkeiten mit denen aus den Versuchen mit Platin-basierten Behandlungen auf. In-vitro-Experimente zeigten eine Assoziation mit FAK (*Focal Adhesion Kinase*). Das Protein spielt eine Rolle in der Microtubuli-Dynamik und war in resistenten

Diskussion

Zellen erhöht exprimiert (137). In einer anderen Studie war das Zellzyklusprotein CDK1 in Paclitaxel-resistenten Zellen und Tumoren erhöht exprimiert. Eine pharmakologische Inhibierung des Proteins führte in einem Xenograft-Versuch zu einem Rückgang der Resistenz (138). In einer weiteren Studie führte eine Zellzyklus-Synchronisation zur Umkehrung der Taxol-Resistenz in Ovarialkarzinom-Zellen (139).

Zusammenfassend lässt die aktuelle Studienlage keine Rückschlüsse auf prädiktive Kandidatengene oder -proteine zu, die bei der Vorhersage einer Therapieresistenz im Ovarialkarzinom von Bedeutung sind. Probleme in der Interpretation der Ergebnisse ergeben sich aus heterogenen Behandlungsschemata der eingeschlossenen Patientinnen, welche die Einordnung und Translatierbarkeit, ob eine die Standard-Erstlinientherapie mit Carboplatin und Paclitaxel durchgeführt werden soll, erschwert. In den Analysen auf DNA, RNA- und Proteinebene werden immer wieder Proteine in der DNA-Reparatur als prädiktive Kandidaten thematisiert, jedoch fehlt unter anderem bedingt durch die Verwendung von unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien (FFPE, kryokonserviertes Frischgewebe, Zelllinien) und dadurch resultierender Analysemethoden, ein umfassendes Verständnis für den Wirkmechanismus der potentiellen Kandidaten.

Proteinarray-Untersuchung mittels DigiWest-Technologie

In dieser Studie wurde zur initialen Charakterisierung therapieresistenter Ovarialkarzinome eine neue Protein-basierte Array-Methode, die DigiWest-Technologie, angewandt. Es handelt sich um eine Antikörper-basierte Methode, mit der aus wenig Gewebematerial Proteinlysate hergestellt, und anschließend Proteinmengen und Proteinmodifikationen quantifiziert werden können. Diese Methode wurde dazu verwendet, um therapiesensitive und -resistente Ovarialkarzinome anhand ihres Proteinprofils unterscheiden zu können. Im Vergleich zu RNA-basierten Microarrays, können hierbei neben der Quantifizierung der Proteinexpression ebenfalls Proteinmodifikationen wie Phosphorylierungen, Methylierungen oder proteolytische Veränderungen an spezifischen Proteinen gemessen werden (113).

Diskussion

Aus 4743 Messpunkten von 279 verwendeten Antikörpern wurden 30 signifikant differentiell vorhandene Proteine und Proteinmodifikationen in neun sensitiven und acht resistenten Patientinnen identifiziert. Ein Messpunkt entspräche bei analoger Betrachtung einer Western-Blot-Bande. Der dynamische Bereich der DigiWest-Methode entspricht dem einer klassischen Western-Blot-Analyse, jedoch wird für den DigiWest nur 1/100 des Ausgangsmaterials für den gleichen Erkenntnisgewinn benötigt (113). Die Auswahl der analysierten Proteine erfolgte nach Verfügbarkeit der Antikörper. Hierbei wurde in einem Vorversuch auf eine möglichst hohe Spezifität der Antikörper im Western Blot geachtet.

Durch die Analyse wurden Messwerte generiert, die rechtsschief verteilt waren. Viele der statistischen Tests beruhen auf einer Normalverteilungsannahme. Die Messwerte wurden daher für weitere Vergleiche logarithmisch transformiert. Nichtsdestotrotz konnte keine Normalverteilung erreicht werden, weswegen als statistischer Test eine Rangsummen-Analyse durchgeführt wurde. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass geringe Unterschiede in der Ergebnispräsentation nicht aufgezeigt werden. Die Analyse mittels t-Test zeigte jedoch überwiegend die gleichen auffälligen Proteine und Proteinmodifikationen. Ein Test zur Korrektur des multiplen Testens konnte jedoch aufgrund der geringen Probengröße nicht durchgeführt werden.

Die Clusteranalyse der signifikanten Proteine ergab eine Auftrennung in fünf Cluster. Im ersten Cluster fällt auf, dass Proteine, die der MAPK-Signalkaskade zuzuordnen sind, in den Tumoren der resistenten Patienten hochreguliert sind. MAP-Kinase-Signalwege dienen zur Signalweiterleitung innerhalb der Zelle und werden überwiegend über Phosphorylierungen der involvierten Proteine vermittelt. Sie umfassen mindestens drei sukzessiv aktivierte Kinasen: MAP3K-MAP2K-MAPK. Die Auflistung der Analyten im ersten Cluster der Heatmap erfolgt in der Reihenfolge wie auch die Proteine im MAPK-Signalweg MAP2K-MAPK phosphoryliert werden: MEK1/2 – ERK1/2 und zudem RSK1 und S6 (140). Im Ovarialkarzinom wird ein aktivierter MAP-Kinase-Weg überwiegend mit einem verschlechterten Überleben von Patientinnen, die Platin-basiert behandelt wurden, in Verbindung gebracht (141-143). ERK1/2 aktiviert das MAPKAPK-Protein 90RSK1 durch Phosphorylierung, welches als Vermittler dient und nachfolgend S6 phosphoryliert. Das S6

Diskussion

Protein gehört dem ribosomalen Komplex an. Es katalysiert die Proteinbiosynthese und besteht aus zwei Teilen: der kleinen 40S- und der großen 60S-Untereinheit. Das zytoplasmatische S6-Protein ist Teil der 40S-Untereinheit und somit an der Regulation der Translation beteiligt. Die Phosphorylierung an der Stelle Ser235/236 wird durch das aktivierte RSK1 Protein vermittelt, um die Komplexbildung zur Translation-Initiation zu fördern (144). Eine Aktivierung und Phosphorylierung der MEK-S6 Signalkaskade wurde in *high-grade* Ovarialkarzinomen, verglichen zum Normalgewebe, beobachtet. S6 wurde in dieser Studie als potentieller Biomarker vorgestellt, mit dem die ERK-Signalweg-Aktivierung gemessen werden kann (145). Analog dazu konnte die Effektivität einer Paclitaxel-Behandlung in Ovarialkarzinom-Zellen durch eine Inhibierung von S6 erhöht werden (146).

In Cluster 4 wurden zahlenmäßig die meisten Proteine zusammengefasst. Das Kladogramm beginnt mit den Proteinen EZH2 und SUZ12. EZH2 ist ein *Polycomb-group protein* (PcG) mit einer SET-Domäne und ist eine Histon-Lysin-N-Methyltransferase. Es ist die katalytische Untereinheit des PRC2/EED-EZH2-Komplexes, welches Lysin-9 (H3K9me) und Lysin-27 (H3K27me) im Histon H3 methyliert, was wiederum zur Transkriptionsrepression von Zielgenen führt. In seiner klassischen Funktion kontrolliert es die Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung embryonaler Stammzellen. In Ovarialkarzinom-Zellen ist die EZH2-Expression erhöht und wird mit Proliferation und Invasion assoziiert (147). In der Literatur sind EZH2-Mutationen bekannt, die entweder einen Funktionszuwachs oder Funktionsverlust des Proteins zur Folge haben und onkogene oder tumorsuppressive Funktionen besitzen. Diese ambivalente Wirkung lässt sich durch die konservierte Funktion des PRC2-Komplexes bei der Aufrechterhaltung der Gen-Inaktivierung erklären. Studien haben gezeigt, dass die Hauptfunktion von PRC2 darin besteht, die Stilllegung der Transkription aufrechtzuerhalten, anstatt sie zu induzieren. Daher besteht die Funktion von PRC2 nicht darin zu bestimmen, welche Gene unterdrückt werden sollen, sondern vielmehr, um den bereits etablierten stillgelegten Zustand eines Gens aufrechtzuerhalten, der für die Stabilisierung der Zellidentität kritisch ist (148, 149). Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) beispielsweise regulieren epigenetische Veränderungen durch die Phosphorylierung von EZH2 (150). Ebenso wurde beobachtet, dass EZH2 dem pRB-E2F Signalweg nachgeschaltet ist (124). SUZ12 ist ein Zinkfingerprotein, gehört wie EZH2 zum PRC2-Komplex und dient dem

Diskussion

Histon-Methyltransfer vorzugsweise an H3K27me3. SUZ12 wird zur Aktivierung von EZH2 benötigt. Es wird erhöht in Ovarialkarzinomgeweben im Vergleich zu Normalgewebe vorgefunden und korreliert sowohl mit einer EZH2-, als auch mit einer Ki67-Expression, die als Nachweis für die Proliferation gilt (151). pRb Ser807/811 steht mit den genannten Proteinen ebenfalls in Verbindung. Rb ist ein Tumorsuppressor und Schlüsselprotein in der Regulation der Zellteilung. Es hat mehrere Phosphorylierungsstellen. Das Protein ist aktiv, wenn es hypophosphoryliert vorliegt, und kann in diesem Zustand durch Bindung an den Repressor E2F1 die Transkriptionsaktivität hemmen, was schlussendlich zum Zellzyklusarrest führt. Die hier untersuchte Ser807/811 Phosphorylierungsstelle dient, so wird es vermutet, der Vorbereitung zur Phosphorylierung weiterer Stellen und führt abschließend zur Hyperphosphorylierung und anschließender Zellzyklusprogression (152). Weiterhin wird durch die Phosphorylierungsstelle der Apoptose vermittelnde Faktor Bax gebunden, der somit an der Induktion der Apoptose gehindert wird (153). Eine Rb1-Inaktivierung durch Mutationen wurde bereits im Ovarialkarzinom beobachtet (154). Zur hier analysierten Phosphorylierungsstelle an Ser807/811 ist in Ovarialkarzinomen jedoch nichts bekannt. Die Phosphorylierungen des Rb-Proteins unterliegen während der Zellzyklus-Progression großen Schwankungen, weswegen es in In-vitro-Versuchen nur erschwert untersucht werden kann.

Das Cluster 5 beinhaltet die Proteine Aurora B, Cyclin B1 und PLK1. Cyclin B1 ist ein Zellzyklusprotein, welches eine Rolle bei der Einleitung der Mitose spielt. Es wird hauptsächlich während der G2/M-Phase exprimiert, und bildet zusammen mit CDK1/CDC2 einen Komplex, den *maturation-promoting factor*. Daraufhin werden in der frühen Mitose essentielle Vorgänge initiiert, die der Zellteilung dienen, z.B. die Aktivierung von Kondensinen und die Destruktion der Kernmembran, was wiederum die Neuverteilung der Chromosomen ermöglicht. Niedrige Cyclin B1 Proteinmengen im Zellkern werden, im Gegensatz zu epithelialen Ovarialkarzinomen, maßgeblich in Ovarialtumoren mit niedrigem malignen Potential nachgewiesen (155).

Das Protein Aurora B wird mit den Mikrotubuli assoziiert und ist beteiligt an der Kontrolle der Chromosomenanordnung und Trennung der Schwesterchromatiden (Zytokinese) während der Mitose. Die Behandlung mit einem Aurora-Kinase-Inhibitor führte zusammen

Diskussion

mit Paclitaxel in Ovarialkarzinom-Zellen zu einer erhöhten Induktion der Apoptose verglichen zu Kontrollzellen (156). In Proben aus metastasierten Patientinnen nach einer Therapie wies die Expression des Aurora-B-Proteins auf eine Resistenz hin (157). Anzumerken ist hierbei, dass die Behandlung der Patientinnen variierte und dass neben Patientinnen mit einer Carboplatin und Paclitaxel Kombinationsbehandlung auch Patientinnen in die Studie eingeschlossen wurden, die mit einer Carboplatin-Monotherapie behandelt wurden.

PLK1 ist eine Serin/Threonin-Kinase welche den Eintritt in die Mitose reguliert indem es am mitotischen Checkpoint während der Anheftung der Kinetochore an den mitotischen Spindelapparat beteiligt ist. Es orchestriert die Zellteilung und wirkt proliferativ. PLK1 inhibiert zusammen mit CDK1 die zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden während der Mitose bis sie beendet ist (158). In primären Ovarialkarzinom-Zellen erschwert eine PLK1-Inhibierung die Checkpoint-Induktion nach Platinbehandlung (159). In stark platinvorbehandelten, resistenten Ovarialkarzinom-Patientinnen wurde in einer klinischen Phase-II-Studie die Behandlung mit einem PLK1-Inhibitor Volasertib mit der Behandlung einer üblichen Chemotherapie verglichen. Es konnte ein vermindertes progressionsfreies Überleben der Volasertib-behandelten Patienten im Vergleich zu den mit Chemotherapie behandelten beobachtet werden (160). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Studie wiesen einen geringeren PLK1-Gehalt der resistenten Zellen auf, was jedoch vermutlich nicht die Ursache für den Resistenzmechanismus, sondern eine Konsequenz des Checkpoint-Arrests ist. Die ausbleibende Wirksamkeit der PLK1-Inhibierung lässt sich somit erklären.

Topo2 Alpha (TOP2A) ist eine Untereinheit der DNA Topoisomerase II, die für ihre katalytische Funktion ATP benötigt. Das Enzym wirkt in der Chromosomen-Kondensierung und der Chromatidtrennung. Seine Hauptaktivität ist die Spaltung von DNA, um Torsionsstress, der während der Bewegung entsteht, zu vermeiden. Es wurden Veränderungen der TOP2A-Expression nach Platin-Behandlung in Ovarialkarzinomen beobachtet (161). In einer älteren Studie mit zugehörigem Microarray-Experiment gehörte TOP2A zu einem von neun Genen die eine Platinresistenz voraussagten (162).

Diskussion

Das letzte Protein in diesem Cluster ist MCM2. MCM2 formt einen Komplex mit MCM2-7 zu Beginn der S-Phase um die DNA-Replikation zu initiieren. Der Komplex unterstützt mit seiner Helikase-Aktivität die Bildung der Replikationsgabel. MCM2 nimmt im Ovarialkarzinom eine ambivalente Rolle ein, da es einerseits die Platinresistenz in Zellen erhöhen (163) andererseits aber auch reduzieren kann (164). In Tumoren korreliert es mit einer fortgeschrittenen Erkrankung und Tumorgrad. Eine eindeutige Korrelation zur Platinbehandlung konnte nicht festgestellt werden (165).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in sensitiven Tumoren Proteine und Proteinmodifikationen erhöht vorgefunden wurden, die eine proliferative Wirkung auf Zellen haben und im Normalgewebe nicht stark ausgeprägt sind. Folglich werden in der Literatur viele der Proteine aus dem hervorgegangenem Proteinprofil bereits als mögliche Ziele zur Behandlung einer Platinresistenz diskutiert und untersucht. Die Wirksamkeit von Carboplatin auf stark proliferierende Tumorzellen ist seit über 30 Jahren bekannt (166). Eine Standardtherapie besteht jedoch aus zwei Komponenten: Carboplatin, welches auf die replizierende DNA wirkt, und Paclitaxel, welches während der Mitose seine Wirkung entfaltet. Das Proteinprofil der Tumoren resistenter Patientinnen entspricht nicht dem klassischen Verständnis einer schnell wachsenden Tumorzelle, da zellzyklus- und proliferationsfördernde Proteine und Proteinmodifikationen reduziert vorlagen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Dysregulation des ohnehin schon aberranten Zellzyklus einer Tumorzelle zur Resistenzentstehung beiträgt. Zellzyklusarretierte Zellen, die sich noch nicht in der Mitose-Phase befinden, werden in resistenten Tumoren vorrangig vorgefunden und besitzen einen Vorteil, der für das Überleben während der Behandlung mit Paclitaxel und Carboplatin ausschlaggebend ist. Die Wirkungsweise von Paclitaxel wird voraussichtlich unterdrückt indem gänzlich die Bildung von Mitosespindeln durch einen vorgeschalteten Zellzyklusarrest vermieden wird. In einer Studie wurde der Zusammenhang zwischen niedrigem Proliferationsindex von Ovarialkarzinomen und einer schlechteren Prognose beschrieben. Hierbei wird auf die niedrig proliferierenden Zellen als mögliches Ziel einer Behandlung in schwer zu therapierenden Patientinnen verwiesen (167).

DNA-Sequenzierung von Genen mit zentralen regulatorischen Funktionen

Da es in der DigiWest-Analyse Unterschiede innerhalb der beiden untersuchten Gruppen „resistent“ und „sensitiv“ gab, wurde auf DNA-Ebene untersucht, ob durch vorherrschende Mutationen eines Gens eine Substratifizierung durchgeführt werden könnte. Die eindeutige Subgruppe der resistenten Tumoren mit aktiviertem MAPK-Signalweg lies zunächst die Vermutung zu, dass es durch eine *BRAF*-V600E-Mutation zu einer Überaktivierung des Signalwegs kommt. *BRAF* ist eine Isoform aus der Familie der Raf-Proteinkinasen. Es existieren die Isoformen A-Raf, B-Raf und C-Raf/Raf-1. Das *Raf*-Gen gilt als Onkogen, welches die MAPK/ERK-Signalwegskaskade initialisieren kann (168). In der Onkologie ist die B-Raf aktivierende Mutation des Gens *BRAF* V600E als pathogene Variante bekannt. Das konstitutiv hyperaktivierte Protein phosphoryliert MEK1/2 und induziert somit den MAPK/ERK-Signalweg. Es wird vermehrt in Kolorektal- und Lungenkarzinomen sowie in Melanomen und papillären Schilddrüsenkarzinomen vorgefunden (169). Im Ovarialkarzinom wird diese Mutation in 20,6% der Tumoren beobachtet, in der Untergruppe der serösen *high-grade* Tumoren dagegen in nur 4% der Fälle. Jedoch wurde kein Zusammenhang zum Gesamtüberleben nach Behandlung mit Carboplatin oder Paclitaxel beobachtet (170). Im Rahmen dieser Arbeit wurden in ausgesuchten Tumorproben der einzelnen Subgruppen untersucht, ob eine V600E-Mutation vorzufinden war. In keiner der untersuchten Patientenproben konnte eine Mutation detektiert werden, weswegen im weiteren Verlauf eine Multigen-Sequenzierung durchgeführt wurde.

Ziel war es, Mutationen in Genen zu identifizieren, deren Proteine in der DNA-Reparatur mitwirken. Die Sequenzierung zeigte zunächst, dass *TP53*-Mutationen in fast allen untersuchten Tumoren dieser Studie gefunden wurden. *TP53* ist eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene, das bei der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle spielt. Es codiert das Protein p53, welches in der Prävention entarteter Zellen seiner Aufgabe nachgeht, fehlerhaft replizierende Zellen durch unterschiedliche Mechanismen an der Ausbreitung zu hindern. Es reguliert die Expression seiner Zielgene, welche wiederum den Zellzyklusarrest, die Apoptose, Seneszenz, die DNA-Reparatur oder Änderungen im Metabolismus initiieren

Diskussion

können (171). Mutationen in diesem Gen führen zu einem Wachstumsvorteil einer Zelle und sind in Tumorzellen häufig vorzufinden (172). In der Literatur wird eine *TP53* Mutationsfrequenz von 96% in serösen *high-grade* Ovarialkarzinomen beschrieben (173). Der hohe Prozentsatz an *TP53*-mutierten Proben entspricht der Beobachtung dieser Studie (94%). *TP53*-Mutationen dienen im Allgemeinen jedoch auch der Abgrenzung von serösen *high-grade* Tumoren zu anderen Subtypen (174).

BRCA1 und *BRCA2* sind Tumorsuppressorgene, deren Proteine in der DNA-Reparatur aktiv sind. Sie werden in der Diagnostik des hereditären Mamma- und Ovarialkarzinoms analysiert und geben Aufschluss darüber ob prospektiv ein erhöhtes Risiko der Tumorentstehung in noch nicht erkrankten Individuen besteht (175). *BRCA1* und 2 haben zwar eine unterschiedliche Struktur, regulieren jedoch beide elementare Funktionen der DNA-Reparatur. *BRCA1* agiert an Doppelstrangbrüchen der DNA, die nach einer Beschädigung der DNA-Doppelhelix auftreten können. Hier komplexiert es mit *RAD51* sowie *BRCA2* und repariert Schäden nach dem Prinzip der homologen Rekombination. *BRCA2* dient der Initiierung der homologen Rekombination (176). Mutationen im *BRCA2*-Gen werden aufgrund der weitreichenden Folgen des Funktionsverlusts in der DNA-Reparatur, mit einer Platinsensitivität im Ovarialkarzinom assoziiert (177-179).

In der Sequenzierung fielen zunächst häufige Varianten der Gene *BRCA1* p.Pro871Leu, p.Glu1038Gly, p.Lys1183Arg, p.Ser1613Gly, *BRCA2* p.Asn372His und *TP53* p.Pro72Arg auf. Es handelt sich hierbei um Einzelnukleotidpolymorphismen. Polymorphismen sind häufige Sequenzveränderungen in einem Gen zu denen Einzelnukleotidpolymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs), Insertions- und Deletionspolymorphismen unter 50 Nukleotiden (INDELs) oder Kopienzahlvarianten (*Copy Number Variations*, CNVs) zählen. Eine Variante muss in mindestens in 1% der Bevölkerung vertreten sein, um als Polymorphismus zu gelten (180). Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens wird ihnen häufig keine destruktive Funktion auf das Protein zugesprochen. Dadurch spielen Gen-Polymorphismen keine Rolle in der Risikobewertung des hereditären Mamma- und Ovarialkarzinoms von gesunden Individuen. In zahlreichen Projekten, in denen Genomsequenzierungen von zahlreichen Patientenproben durchgeführt wurden, gewinnen

Diskussion

sie jedoch immer mehr an Bedeutung hinsichtlich der Vorhersage des Ansprechens auf eine Therapie einer Tumorerkrankung (181). Varianten, die in gesunden, noch nicht erkrankten Individuen keinen Einfluss auf grundlegende zelluläre Mechanismen haben, können in einem aberranten Tumorumfeld wiederum einen Einfluss auf die Zellphysiologie besitzen (182). Sieht man von den *BRCA1*- und *BRCA2*-Varianten ab, die als Polymorphismus gelten, wurden in fünf von 17 Patientinnen (30%) Mutationen gefunden, die eindeutig zu einem Funktionsverlust des Proteins führen. Vier Patientinnen gehörten der Gruppe resistent an, eine galt als sensitiv. In der Literatur werden 10 bis 15% der Ovarialkarzinome als *BRCA*-mutiert aufgeführt, wobei nur *BRCA2*-Mutationen überwiegend mit einer Platinsensitivität assoziiert werden (177). Hier konnten die Mutationen und Varianten keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden. Neben der Vorhersagbarkeit des Risikos in gesunden Individuen, ist die Erfassung des *BRCA1/2*-Mutationsstatus auf Keimbahn- oder somatischer Ebene für die Behandlung der Ovarialkarzinom-Patientin mit PARP-Inhibitoren von Bedeutung. Hierbei wird der Mechanismus der synthetischen Letalität (183) genutzt: In Tumorzellen, die durch eine *BRCA*-Mutation in ihrer DNA-Reparatur eingeschränkt sind, wird das Überleben durch das PARP-Protein sichergestellt. Wird es durch einen Inhibitor an seiner Funktion gehindert, muss die Zelle aufgrund der fehlerhaften DNA die Apoptose einleiten. Bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms gewinnt diese Art der Therapie zunehmend an Bedeutung (184).

ATM-Mutationen werden ebenso in der Diagnostik des hereditären Mammakarzinoms untersucht (185). *ATM* ist eine Kinase der DNA-Reparatur. Es erkennt DNA-Doppelstrangbrüche und wird durch diese aktiviert. Anschließend phosphoryliert es weitere Proteine, die zur DNA-Checkpoint-Aktivierung (G1/S und G2/M) und zum Aufbau eines Komplexes für die Reparatur notwendig sind. Innerhalb dieser Signalweiterleitung werden auch *BRCA1* und *2* zum Ort der Reparatur rekrutiert. Die Aktivierung des Checkpoints erfolgt über die Effektor-Kinase *CHEK2*. Sie wird von *ATM* phosphoryliert und damit aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert die Phosphatase *CDC25A*, worauf das Protein abgebaut wird und nicht mehr den *CDK1*-*CyclinB1*-Komplex dephosphorylieren kann, was abschließend zu einem Zellzyklusarrest führt (186). Das verwendete Panel in dieser Studie deckt den gesamten codierenden Bereich des verhältnismäßig großen *ATM*-Gens (13147 bp) ab. So war es möglich,

Diskussion

nicht nur „Hotspot“-Mutationen in bekannten Bereichen zu detektieren, sondern sämtliche Varianten der Sequenz zu erfassen. Es wurden in fast 53% der Patientenproben *ATM*-Varianten gefunden. In sieben von acht resistenten Tumoren sowie zwei von neun sensitiven wurde mindestens eine Variante vorgefunden. Keine der Varianten hat jedoch einen eindeutigen Funktionsverlust des Proteins durch einen Translationsabbruch, einem Stopcodon, oder durch eine Leserasterverschiebung zur Folge. Zudem befinden sich die Varianten nicht in Bereichen, welche funktionelle Domänen des Proteins codieren. Jedoch können sie einen Effekt auf die Konformation des Proteins und/oder die Bindeaffinität eines Interaktionspartners haben, was wiederum zu einer Deregulation von *ATM* und seinen Zielproteinen bewirken könnte. Interessanterweise konnte in der Literatur für eine Variante, die als Polymorphismus klassifiziert wurde (p.Asp1853Asn), eine Verbindung zu einem verschlechtertem progressionsfreien Überleben nach einer Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und Paclitaxel hergestellt werden (187). Es wäre somit ein möglicher Einfluss der gefundenen, aber bisher nicht klassifizierten *ATM*-Variante auf ein verändertes Therapieansprechen sowie eine potentiell veränderte Funktionsweise von *ATM* denkbar, was jedoch in nachfolgenden Studien validiert und genauer entschlüsselt werden muss.

Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte somatische Mutationen einiger DNA-Reparaturgene von Ovarialkarzinomen longitudinal vor und nach einer Chemotherapie (188). Es konnten nur 2% der Mutationen vor als auch nach einer Therapie in den jeweiligen Patientinnen detektiert werden. Unter anderem wurden deletäre Mutationen im *ATM*-Gen, die zu einem Funktionsverlust führen, nicht mehr in den Tumoren nach einer Behandlung vorgefunden, was darauf hindeutet, dass ein aktives und funktionelles *ATM*-Protein in resistenten Tumorzellen benötigt wird.

ATM wird bereits in einigen Studien als therapeutisches Ziel betrachtet. Die Behandlung mit einer zielgerichteten Inhibierung erwies sich jedoch als schwierig (189). *ATM* wird von nicht aberranten, benignen Zellen für wichtige physiologische Funktionen benötigt. Eine nicht-selektive Inhibierung dieser Funktion ist mit Nebenwirkungen und Schädigungen normaler Körperzellen verbunden. Des Weiteren wurde in Ovarialkarzinom-Zellen eine Inhibierung von *ATM* nicht mit einem verbessertem Ansprechen auf eine platinhaltige Behandlung

Diskussion

beobachtet, jedoch mit einer erhöhten Sensitivität auf ionisierende Strahlung (190). Einige Studien berufen sich auf das Prinzip der synthetischen Letalität, ausgelöst durch *ATM*-Mutationen. In diesem Zusammenhang werden Inhibitoren für ATR, PARP oder CHK1/2 genannt (191). Das CHEK2-Gen wurde ebenfalls mithilfe des Sequenzierpanels analysiert. Es konnte jedoch keine Mutation nachgewiesen werden. Weitere Varianten anderer Gene wurden ebenfalls nicht auffällig oft in einer der beiden Gruppen, resistent oder sensitiv, beobachtet.

In dieser Arbeit wurde für die Sequenzierung DNA aus primärem Tumorgewebe verwendet. Somit können nur Aussagen über somatische Mutationen und nicht über vererbte Mutationen in der Keimbahn getroffen werden. Hierfür müsste in einem weiteren Ansatz DNA beispielsweise aus Blut untersucht werden.

Abgleich des ATM-Proteinexpressionsprofils

Die Quantifizierung des ATM-Proteins durch die DigiWest-Analyse wies keinen Zusammenhang zwischen Proteinmenge und einer der beiden Gruppen, „resistent“ oder „sensitiv“, auf. Aufgrund des weitreichenden Einflusses von ATM auf Regulationsmechanismen der Zelle, wurde eine PTM-Analyse durchgeführt. Diese diente dazu, Proteinprofile eines Proteins in den Tumoren mit Profilen der weiteren 278 Proteine zu vergleichen, die in der DigiWest-Analyse gemessen wurden. Ähnliche Profile werden anschließend erfasst (192).

Hierbei waren Analyten von Bedeutung, die in der Zellzyklusprogression involviert sind (CDK2, CHEK2, CDK5) sowie in epigenetischen Prozessen eine regulatorische Funktion haben (EZH2, SUZ12, Histon-Methylierungen und Acetylierungen). Einige der Analyten wurden in der vorangegangenen Analyse als differentiell in den beiden Tumorgruppen resistent und sensitiv identifiziert, darunter SUZ12, EZH2, ADAMTS1, Aurora B Kinase, phospho-STAT1, CTGF und Raptor).

Diskussion

Wie bereits beschrieben, ist ATM in der Signalweiterleitung der Zellzyklus-Checkpoint-Aktivierung involviert. ATM aktiviert CHK2 wenn DNA-Schäden während der G2-Phase auftreten, was wiederum den Cyclin B/CDK1 Komplex blockt und schließlich zur Verhinderung der Mitose führt (193). Phosphorylierte 14-3-3 Proteine verhindern durch das Zurückhalten von CDC25 ebenfalls den Eintritt der Zelle in die Mitose indem der Cyclin B/CDK1 Komplex nicht mehr aktiviert werden kann. 14-3-3 Proteine gelten als wichtige Vermittler von Signalen in der Zellzykluskontrolle sowie der Initiierung der Apoptose (194, 195).

Eine direkte Beteiligung von ATM an der Histon-Methylierung ist in der Literatur nicht beschrieben. Jedoch wurde beobachtet, dass Doppelstrangbrüche der DNA das H3K9 Methylierungsmuster im Genom verändern können, vermutlich mit dem Zweck die Chromatinstruktur zu stabilisieren und DNA-Reparaturproteine zu rekrutieren (196).

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch ein Zusammenhang mit der Histon-Methyltransferase EZH2 beobachtet werden, welches im DigiWest-Proteinscreening identifiziert werden konnte. In einer Studie wurde ATM als Kinase von EZH2 beschrieben. Eine ATM-Defizienz führte, so wurde es in dieser Studie beschrieben, zu einer EZH2 Hyperaktivierung und schließlich zur Neurodegeneration (197). Auch in der DNA-Reparatur spielt es eine Rolle, indem es zusammen mit SUZ12 zu Stellen rekrutiert wird, an denen DNA-Schäden von Proteinen wahrgenommen wurden (198). Unklar ist hierbei, inwieweit eine die Histon-Methylierung an Lysin 27, eine der Hauptfunktionen von EZH2, in der DNA-Reparatur benötigt wird. In einer anderen Studie wurde beobachtet, dass eine Reduktion von EZH2 in Fibroblasten zur Initiierung der DNA-Reparatur über ATM führt, noch bevor eine Veränderung der Histon-Methylierung eintritt (199).

Bezogen auf den ersten Vergleich der Proteinprofile zwischen resistenten und sensitiven Tumoren kann interessanterweise die Induktion des MAPK/ERK-Signalwegs in resistenten Tumoren durch eine ATM-Aktivierung erklärt werden. Unabhängig von p53 kann es nach DNA-Schäden einen Zellzyklusarrest und folglich die Apoptose induzieren (200). Umgekehrt kann ERK1/2 auch ATM aktivieren (201).

Diskussion

Weitere Proteine, die in der Literatur dafür bekannt sind durch ATM reguliert zu werden sind EVI1 (202), Aurora B Kinase (203, 204), JNK/SAPK (205), RSK1 (206), S6 (207), PKC (208), BMI1 (209), CBP (210), Cyclin A (211), Acetyl Carboxylase 1 (212, 213), cIPARP (190, 214), Rb (215-218), MCM2 (219, 220), Cyclin B1 (221), PLK1 (222, 223) und TOP2A (224).

Im Protein-Screening von Tumorproben aus Ovarialkarzinom-Patientinnen konnte eine deutliche Auftrennung von resistenten und sensitiven Patientinnen erreicht werden. Aus 30 signifikant unterschiedlich vorhandenen Proteinen und Proteinmodifikationen in beiden Gruppen wurde anhand einer Clusteranalyse eine Subgruppierung der Proteine erzielt. Hierbei wurden pro-proliferative sowie mitotische Proteine erhöht in der sensitiven Gruppe vorgefunden. Zum Teil wurde eine verringerte MAPK-Signalweg in resistenten Patientinnen beobachtet. Durch eine DNA-Sequenzierung der Tumoren konnte weiterhin in fast allen Proben eine *TP53* Mutationen beobachtet werden. Außerdem deuteten Varianten im *ATM*-Gen auf ein schlechteres Ansprechen auf eine Therapie hin.

Betrachtet man die Proteinprofile vor dem Hintergrund einer ATM-Aktivität, sieht man, dass ATM durch seine zahlreichen und weitreichenden Effekte auf viele Proteine die Ursache für die Zusammensetzung des Proteinprofils unter den resistenten Tumoren sein kann.

Evaluierung der differentiellen Proteinexpression anhand öffentlich zugänglicher Expressionsdatensätze

Die vielversprechendsten Kandidaten aus der vorangegangenen Untersuchung wurden in zwei weiteren Kollektiven mit einer erhöhten Anzahl an Patienten untersucht. Hierbei war eine Therapie mit Carboplatin und Paclitaxel Voraussetzung, sowie die Dokumentation des krankheitsfreien oder progressionsfreien Überlebens.

Diskussion

Im ersten Validierungskollektiv wurden Datensätze mit mRNA-Expressionsdaten aus Tumoren von 616 Ovarialkarzinom-Patientinnen untersucht. Die Behandlung der Ovarialkarzinom-Patientinnen mit Caboplatin und Paclitaxel war hierbei Voraussetzung. Die öffentlich zugänglichen Microarray-Daten wurden durch eine Online-Plattform zur Verfügung gestellt (117). Der Unterschied zu vorangegangenen Überlebensanalysen mithilfe von Geweben war, dass hierbei das progressionsfreie und nicht das krankheitsfreie Überleben für die Analyse verwendet wurde. Lokalrezidive wurden somit in der Statistik nicht berücksichtigt. Auch sind mRNA-Daten nicht gleichzusetzen mit Proteindaten, da in der Zelle ebenso auf post-transkriptionaler Ebene die Proteinexpression modifiziert werden kann und nicht unbedingt mit der absoluten Proteinmenge übereinstimmt. Aufgrund der hohen Patientenzahl ($n = 616$) dieser Kohorte wird dieser Aspekt jedoch nicht weiterhin berücksichtigt.

Zunächst wurden Expressionsdaten auffälliger Proteine aus der ersten Proteinarray-Untersuchung betrachtet. Hierbei konnten nur Gesamtproteine berücksichtigt werden. Für EZH2, PLK1, MCM2 und TOP2 konnte bei einer erhöhten Expression einen Zusammenhang für ein verbessertes progressionsfreies Überleben beobachtet werden. Die gleiche Tendenz wurde auch in der Proteinarray-Untersuchung registriert. Eine Gen-Ontologie-Analyse dieser Proteine offenbarte eine deutliche Assoziation der Proteine mit Prozessen der Zellzyklus-Regulation und der mitotischen Phasen-Transition. Die Untergruppen implizieren insbesondere DNA-Konformationsänderungen und die Chromosomenorganisation (Bindung der Proteine an das Chromatin, Entwinden der DNA). Da die untersuchten Gene in resistenten Tumoren deutlich niedriger exprimiert werden, kann davon ausgegangen werden, dass diese Prozesse in resistenten Zellen vermindert stattfinden. In der Literatur wird bei einer Inhibierung der Mitose ebenfalls eine reduzierte Wirksamkeit von Paclitaxel beschrieben (225). Ein Zellzyklus-Arrest vor der M-Phase würde Tumorzellen einen Vorteil bringen, indem das in der Therapie verwendete Paclitaxel nicht an seine Zielstruktur, die Mikrotubuli, binden kann. Das Blockieren der Spindel ist eine Schlüsselfunktion der Wirkungsweise von Paclitaxel indem es so das Zellwachstum hemmt.

Diskussion

Die ATM-Expression wurde ebenfalls untersucht. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen ATM^{hoch} und $ATM^{niedrig}$ exprimierenden Tumoren hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens festgestellt werden. Werden die 616 Patienten allerdings in vier nicht überlappende Gruppen separiert, nämlich $EZH2^{hoch}$ und $EZH2^{niedrig}$ sowie ATM^{hoch} und $ATM^{niedrig}$, sieht man einen signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppe, die $EZH2$ niedrig exprimiert. Hierbei haben die Patientinnen einen deutlich schlechteren klinischen Verlauf, wenn ATM erhöht vorliegt. In der Literatur wurde dieser Effekt der beiden Proteine noch nicht beschrieben. Dieses Ergebnis deutet erneut auf einen Zusammenhang zwischen $EZH2$ und ATM hin, sowie auf eine zentrale Rolle von ATM in der Resistenzentwicklung von Ovarialkarzinom-Zellen.

Die Ergebnisse der Analyse dieser großen, unabhängigen Patientenkohorte lassen auf eine Anwendung dieser Erkenntnisse zu therapeutischen Zwecken hoffen. Erweist sich zunächst der basale $EZH2$ -Gehalt als niedrig, kann bei einem hohen ATM-Gehalt von einer schlechteren Prognose nach einer Erstlinientherapie mit Carboplatin und Paclitaxel geschlossen werden. ATM kann hierbei nach dem Prinzip der synthetischen Letalität als mögliches Ziel dazu dienen, die Funktion des Proteins entweder direkt zu inhibieren oder die Signalweiterleitung in nachgeschaltete Proteinnetzwerken zu inaktivieren.

Immunmarkierung von primärem Tumormaterial

Im zweiten Validierungskollektiv wurden zusätzlich Färbungen von FFPE-Tumorproben von 34 Patientinnen angefertigt. Neben $EZH2$ wurden auch ATM, pRb und pERK1/2 als Kandidatenproteine ausgewählt, um in weiteren Patientenkollektiven einen Zusammenhang zur möglichen Vorhersage der Wirksamkeit einer Chemotherapie zu belegen. $EZH2$, ATM, pRb und pERK1/2 wurden immunhistochemisch gefärbt und von einer Pathologin nach der Intensität und Prozentzahl an positiven Zellen bewertet. Es wurden die gleichen Antikörper wie in der DigiWest-Analyse verwendet. Die Spezifität der Antikörper im Gewebe wurde mittels Negativkontrollen überprüft, in denen der Primärantikörper durch eine äquivalente

Diskussion

Menge an entsprechendem unspezifischem Antikörper des gleichen Isotyps ersetzt wurde, oder indem der Primärantikörper gänzlich weggelassen wurde. Das Ausbleiben einer Färbung im umliegenden Bindegewebe des Tumors diente ebenfalls als Kontrolle.

Die Auswertung der Färbung erfolgte mithilfe des Immunreaktiven Scores (121). Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen sensitiven und resistenten Tumorproben ermittelt werden. Vergleicht man Patientinnen mit einem hohen IRS gegen Patientinnen mit einem niedrigen in einer Überlebenszeitanalyse, in welcher die Überlebenszeiträume jeder Patientin einzeln berücksichtigt wird, kann ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden. Der Grund hierfür könnte in der höheren Sensitivität der DigiWest-Proteinanalyse liegen, in der Unterschiede von EZH2, pRb und pERK1/2 verdeutlicht wurden. Der absolute Unterschied des EZH2-Gehalts in beiden Gruppen ist gering, jedoch ist jede Tumorprobe deutlich einer Gruppe zuzuordnen, was wiederum durch die Signifikanz im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verdeutlicht wird. Der dynamische Bereich der Quantifizierung der Proteine in der DigiWest-Methode ist in den niedrigeren Messwerten sehr stabil (113). Für die Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung hingegen ist ein Verschwimmen geringer Proteinunterschiede durch eine Absättigung im DAB-Färbeprozess leicht möglich. Auch werden sehr geringe Signale wie beispielsweise von pERK1/2 nur marginal abgebildet.

Dennoch konnte in konsekutiven Schnitten ein gleiches Färbemuster von ATM, EZH2 und pRb beobachtet werden. Ein Zusammenhang zwischen den drei Proteinen wäre demnach möglich und müsste validiert werden. Ob ERK1/2 in der Abwesenheit der anderen Proteine ebenfalls vermehrt phosphoryliert wird, geht aus den Färbungen nicht eindeutig hervor.

Da in der Literatur bereits eine Interaktion von EZH2 und ATM beschrieben wurde (197) und die Daten auf einen Zusammenhang von EZH2 und ATM mit der mutmaßlichen Konsequenz einer Phosphorylierung des Zellzyklus-Proteins Rb hindeuten, wurde die räumliche Annäherung der beiden Proteine EZH2 und pATM in den gleichen Tumorproben analysiert, in denen bereits die immunhistochemische Färbung durchgeführt wurde. Hierfür wurde die Methode Proximity Ligation Assay *in situ* verwendet (122). Zur Detektion einer Co-Lokalisation wurde je ein Antikörper gegen EZH2 und gegen phosphoryliertes ATM (Ser1981)

Diskussion

verwendet. Erfolgt die Phosphorylierung an dieser Stelle, wird das Protein von einem inaktiven Dimer zu einem aktiven Monomer konvertiert. Dieser Vorgang findet bei der Akquirierung des Proteins zu DNA-Schäden statt (125). Als Kontrollen wurden analog zur immunhistochemischen Färbung statt der Primärantikörper, Isotyp-Äquivalente verwendet.

In 34 Proben konnte, ähnlich wie bei der immunhistochemischen Färbung, ebenfalls kein signifikanter Unterschied im direkten Vergleich der beiden Gruppen „resistent“ und „sensitiv“ beobachtet werden. Eine Überlebensanalyse hingegen verdeutlichte einen Zusammenhang von Tumoren mit einer hohen Anzahl an PLA-Signalen und dem krankheitsfreien Überleben.

Die initiale Stratifizierung der Proben in „sensitiv“ und „resistent“ ist angelehnt an die Definition der Einteilung in der Klinik. Dort werden Tumoren als „resistent“ klassifiziert, wenn innerhalb von 6 Monaten nach Ende der platinhaltigen Therapie, ein Rezidiv oder eine Metastase auftritt. Die Definition der „resistenten“ Tumoren in dieser Studie wurde aufgrund fehlender Follow-Up-Daten modifiziert. Hierbei gelten Tumoren als resistent, wenn ein Rezidiv, eine Metastase oder das Versterben der Patientin innerhalb von 12 Monaten nach der primären Resektion des Tumors erfolgt. Da nach der Resektion eine Pause von mindestens vier Wochen erfolgt und die Behandlung mit Chemotherapeutika meist über vier Monate dauert, stimmt die absolute Dauer für die Definition in den meisten Fällen überein.

Dennoch entspricht die Einteilung basierend auf klinischen Daten hierbei nicht dem molekularen Profil, wie anhand der PLA-Analyse deutlich wurde. Ein Grund hierfür kann beispielsweise sein, dass Ereignisse wie Rezidive oder Metastasen aufgrund technischer Limitationen spät detektierbar sind oder die Nachuntersuchung zu einem ungünstigen Zeitpunkt stattfindet.

Die Anzahl an PLA-Signalen auf einer Fläche von $541 \mu\text{m}^2$ beliefen sich oftmals auf unter 100. Ein Grund für die allgemein niedrigen Zahlen verglichen zu der Anzahl an Zellen ist vermutlich, dass die Zellen DNA-Schäden aufweisen müssen, um einen Stimulus für die Phosphorylierung von ATM zu generieren, welches durch den Antikörper detektiert wird. ATM agiert hierbei als Sensor von DNA-Schäden, vor allem von Doppelstrangbrüchen, und

Diskussion

initiiert die DNA-Reparaturkaskade. Eine Untersuchung mit dieser Methode in Tumoren von neoadjuvant behandelten Patientinnen könnte hierbei die Anzahl an Signalen erhöhen, da durch die Kombinationsbehandlung vermehrt DNA-Schäden induziert werden.

Der Nachweis der von Li et al. (197) beschriebenen Phosphorylierungsstelle von EZH2 an Ser734 wäre ebenfalls eine Möglichkeit die Kinaseaktivität von ATM nachzuweisen. Jedoch wurde die Phosphorylierungsstelle in der Studie nicht durch einen Antikörper, sondern durch Massenspektrometrie nachgewiesen. Ein kommerziell erwerblicher Antikörper für diese Phosphorylierungsstelle ist nicht bekannt.

Es gibt keine Methode, alternativ zur PLA-Methode, mit welcher eine Interaktion direkt in FFPE-Tumorgewebe nachgewiesen werden könnte. Der Nachweis einer Interaktion mittels einer Co-Immunpräzipitation beider Proteine würde eine sehr große Materialmenge an frischem Gewebe benötigen, welche in diesem Kollektiv nicht zur Verfügung steht, und würde zudem eine genaue Lokalisation der Interaktion im zellulären Kontext vermissen lassen. Ein Nachteil ist jedoch, dass mit der PLA-Methode nur die Nähe beider Proteine, nicht jedoch eine direkte enzymatische Aktivität nachgewiesen werden kann. Ein Aufeinandertreffen zweier Komplexe, in denen die Proteine wirken kann ebenso ein Grund für das erhaltene Ergebnis sein.

Die Korrelationsanalyse der PLA-Signale mit den IRS-Werten der EZH2 und ATM-Färbung zeigte nur für EZH2 einen signifikanten Zusammenhang, was auf die EZH2-Menge als kritischen Faktor für eine Co-Lokalisation hindeutet. Eine Analyse des ATM-Gens in den Tumoren die einen hohen EZH2- und ATM-IRS, aber nur wenig PLA-Signale aufweisen (z.B. Patientin 6, 16, 21, 24 oder 25) wäre hierbei ein Ansatz, um genetische Aberrationen mit dem Ausbleiben einer Co-Lokalisation in Verbindung zu bringen.

Funktionelle Charakterisierung der Kandidatenproteine in Ovarialkarzinom-Zelllinien

Zur funktionellen Charakterisierung wurden weitere Versuche *in vitro* mit Zelllinien durchgeführt. Hierfür wurden zunächst acht verschiedene Zelllinien entsprechend ihres Ansprechens auf eine Behandlung mit Carboplatin, Paclitaxel oder der Kombination von beiden Agenzien, miteinander verglichen.

Der Vorteil von Zellkultur-Experimenten ist in erster Linie, dass uneingeschränkt Material zur Verfügung steht. Die Zellen expandieren durch Teilung, wenn die Bedingungen optimal sind. Der Ursprung der Zelllinien ist dokumentiert, und die Identität der verwendeten Zelllinien wurde durch eine Authentifizierung mit STR-Analysen bestätigt. Weiterhin wurden sie in Studien ausgiebig charakterisiert (226-229). Drüsengewebe besteht meist aus Epithelzellen. Das Epithel des Ovars ist einschichtig und isoprismatisch, weswegen sich Zelllinienzellen für ein einschichtiges Wachstum („2D“) in Zellkulturgefäßen gut eignen. Die verwendeten Zelllinien wurden aus unterschiedlichem Material isoliert wie beispielsweise aus primärem Gewebe, Metastasengewebe oder Aszites. Jedoch wird für alle Zelllinien ein Adenokarzinom als Ursprung angegeben (229). Ein Nachteil der Zellkultivierung ist die Selektion der Zellen nach Proliferation. Nur proliferierende Zellen werden geteilt und expandiert: somit werden die Eigenschaften sensibler Tumore gefördert. Resistente Zellen wachsen langsamer und haben eine geringere Anzahl an Mitosephasen, was zu einem Selektionsnachteil in der Zellkultur führt.

Für die Versuche wurden die Zelllinienzellen mit Carboplatin und Paclitaxel behandelt. Die angewendeten Konzentrationen entsprechen den Messungen der Agenzien im Serum von Patientinnen während einer Behandlung (123, 230). Für die Einordnung des Resistenzverhaltens wurde von jeder Zelllinie die IC₅₀-Konzentration anhand einer nichtlinearen Regression berechnet. Die Darstellung der Messwerte erfolgte auf einer logarithmischen Y-Achse. Die Schwankungen der Messung beruhten vermutlich auf nicht vermeidbare Pipettierungenauigkeiten kleinster Volumina, die sukzessive verdünnt wurden.

Diskussion

Die Auswertung durch den ATP-Assay könnte ein zusätzlicher Faktor für Ungenauigkeiten in den Messwerten darstellen. Hierbei wird ATP, welches sich intrazellulär nur in lebenden und metabolisch aktiven Zellen befindet, gemessen. Die Methode sieht ein Waschen der Zellen mit Waschpuffer, eine Lyse der Zellen und schließlich den Nachweis von ATP durch eine Luciferase, vor. Das Enzym generiert in einer Reaktion mit Luciferin, Sauerstoff und ATP als Co-Factor, energetisch angeregtes Oxyluciferin. Das Oxyluciferin fällt in seinen Grundzustand zurück indem es ein Photon abgibt, welches im Experiment als Lichtsignal gemessen wird (231). Anhand der Lichtsignalintensitäten der Endpunktmessung kann, wenn initial gleiche Zellzahlen ausgesät wurden, die Menge der lebenden Zellen verglichen werden. Der ATP-Assay ist eine sehr sensitive Methode, mit welcher man Lichtsignale von zehn lebenden Zellen und weniger in einem Reaktionsgefäß detektieren kann. Im Vergleich zu anderen Viabilitätstests wie XTT und MTT, denen ein anderer, farbgebender Prozess zu Grunde liegt, wird beim ATP-Assay während des Versuchs kein Inkubationsschritt in lebenden Zellen benötigt, der ebenfalls oftmals Fehler bei der Auswertung verursachen kann (232, 233). Die Chemosensitivitätstestung von Ovarialkarzinomen *ex vivo* ist seit den späten achtziger Jahren bekannt (234). Zur Bestimmung der Effektivität eines Chemotherapeutikums in der klinischen Anwendung wird er jedoch nicht verwendet (235).

Die Auswertung der IC₅₀-Werte der acht homogenen Zelllinienzellen nach einer In-vitro-Behandlung zeigte eine deutliche Korrelation zwischen Zellen auf, die schlecht auf eine Paclitaxel sowie auf eine Kombinationsbehandlung ansprachen. Eine Voraussetzung der Zelle für eine Resistenzentwicklung ist somit das Ausbilden von Eigenschaften, die zunächst für eine Resistenz einzig gegen Paclitaxel benötigt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Paclitaxel in höheren Konzentrationen einen mitotischen Arrest und schließlich die Induktion der Apoptose bewirkt. In niedrigeren Konzentrationen verursacht es multipolare Teilungen der Zellen (236). Die Bedeutung von Resistenzmechanismen gegen Paclitaxel gewinnen, im Vergleich zum unzulänglichen Verständnis der Resistenzmechanismen gegen eine Platin-Behandlung, immer mehr an Bedeutung (237).

Im weiteren Verlauf wurde der Proteingehalt aller Zelllinien in unbehandeltem Zustand durch Western Blots analysiert. Der unbehandelte Zustand entspricht den Tumoren aus

Diskussion

Patientinnen, da diese adjuvant, also nachdem der Tumor resektiert wurde, mit einer Chemotherapie behandelt wurden. Hierbei wird der Fokus auf die intrinsische Resistenz gelegt, somit auf Charakteristika, die vor einem Kontakt mit den Agenzien vorherrschen.

Die Analyse belief sich auf EZH2, phosphoryliertes Rb, Cyclin B1 sowie phosphoryliertes ERK1/2 und ATM. Die Proteinmodifikationen von Rb und ERK1/2 wurden mit dem Gesamtprotein, Rb oder ERK1/2, normalisiert. Es konnte eine statistisch signifikante, negative Korrelation von EZH2 und ATM zum Resistenzverhalten gegen eine Monobehandlung mit Paclitaxel oder gegen eine Kombinationsbehandlung mit Carboplatin und Paclitaxel festgestellt werden. Entgegen dieser Beobachtung wurde in einer externen Studie bei einem Vergleich zwischen den sensitiven A2780 und den platinresistenten A2780cis-Zellen ein erhöhter EZH2-Gehalt in den Platin-resistenten Zellen vorgefunden. So führte ein Knockdown zu einer verminderten Zellproliferation und einem G2/M-Phasen-Arrest in A2780cis (238). Eine aktuelle Studie, in der A2780-Zellen und ein Xenograft-Modell verwendet wurde, zeigte jedoch das Gegenteil (239).

Die Berechnung des Verhältnisses von ATM zu EZH2 ist eine Möglichkeit, um die Ergebnisse aus der Überlebensanalyse der Expressionsdaten im Zellkulturmodell nachzuvollziehen. Interessanterweise konnte hierbei beobachtet werden, dass das ATM2/EZH2-Verhältnis in Zelllinien mit niedrigem EZH2-Gehalt ansteigt, je resistenter die Zelle wird. Diese Tendenz wurde in der großen Validierungskohorte ebenfalls beobachtet.

Die Analyse der Zellzyklus-abhängigen Proteine Cyclin B1, pRb, und pERK1/2 ergab keine statistisch signifikante Übereinstimmung. Messungenauigkeiten, die durch die Zellzyklusabhängigkeit der Proteine entstanden sein könnten, konnten nicht ausgeschlossen werden, da die Zellen nicht in ihrem Zellzyklus synchronisiert wurden. Die Bestimmung des ATM/EZH2 Verhältnisses hingegen bietet eine interessante Möglichkeit, um Zusammenhänge der beiden Proteine mit dem Resistenzverhalten *in vitro* zu untersuchen.

Reduktion und Überexpression der Proteinexpression von EZH2 und ATM in Ovarialkarzinom-Zelllinien

Anknüpfend an diese Versuche wurde zur funktionalen Charakterisierung von EZH2 und ATM eine Reduktion der endogenen Proteinexpression mittels RNA-Interferenz durchgeführt. Die als sensitiv klassifizierte Zelllinie A2780 wurde wegen ihres hohen Gehalts an endogenem EZH2 und ATM als Modellsystem verwendet. Der *Knockdown* der einzelnen Proteine sowie beider Proteine gleichzeitig, konnte während der gesamten Laufzeit der Behandlung von drei Tagen auf Proteinebene durch eine Western-Blot-Analyse bestätigt werden. Der auf den ersten Blick mutmaßliche Einfluss einer ATM-Suppression auf den endogenen EZH2-Gehalt konnte in zwei weiteren Versuchsdurchführungen (n = 3) nicht bestätigt werden.

Die Versuche ergaben, dass für eine Resistenz gegenüber einer Therapie in EZH2 niedrig exprimierenden Zellen, ATM vorhanden sein muss. Dies weist auf ATM als zentrales Protein in der Resistenzentwicklung hin. In Gegenwart von EZH2 hatte ATM jedoch keinen Effekt auf die Therapie. Dieser Umstand spricht für eine inhibitorische Funktion von EZH2 auf die ATM-Funktion. Diese In-vitro-Versuche bestätigten das Ergebnis der vorangegangenen Überlebensanalyse von 616 Ovarialkarzinom-Patientinnen. Eine Reduktion von ATM alleine sensitivierte die Zellen sogar für eine Carboplatin-Behandlung. In der Literatur wurde dieser Umstand ebenfalls in Tumorzellen mit einem p53-defektivem Hintergrund beobachtet (240). Eine erneute DigiWest-Proteinanalyse der signifikanten Proteine und Proteinmodifikationen aus den Tumorproben der Patientengruppen „resistent“ und „sensitiv“ unterstrich den Einfluss einer EZH2-Suppression in Gegenwart von ATM, auf Zellzyklusproteine. Die Suppression verringerte pro-proliferative und mitotische Proteine. Eine Reduktion beider Proteine, EZH2 und ATM, führte jedoch nur vereinzelt zu Veränderungen. Eine weitere Analyse mit einem erweiterten Antikörper-Set zur Detektion mitotischer Proteine verdeutlichte den Einfluss von EZH2 auf Proteine, die in der mitotischen Zellzyklusprogression beteiligt sind. In einer aktuellen Studie wird ein Verlust von EZH2 mit einer multiplen Resistenz in der akuten myeloischen Leukämie assoziiert (241). Hierbei wurde durch das Zellzyklusprotein CDK1 eine Reduktion von EZH2 und somit ein Rückgang der

Diskussion

H3K27-Trimethylierung beobachtet, was zur Resistenz gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren und zytotoxischen Substanzen führt.

Weitere Daten, die mit der DigiWest-Analyse von Lysaten der einzelnen siRNA-Ansätze generiert wurden, zeigten einen deutlichen Rückgang der Proteine in EZH2-supprimierten Zellen, die der Regulation des Zellzyklus und der Mitose-Phase zugeordnet wurden. Diese Proteine wurden jedoch nicht in EZH2 und ATM-supprimierten Zellen beobachtet. In einem erweiterten Ansatz mit weiteren Analyten, die mit der Zellzyklusprogression assoziiert sind, ließ einen Zusammenhang insbesondere im Hinblick auf die Mitose erkennen.

Im weiteren Verlauf wurde in einem reziproken Ansatz zur RNA-Interferenz-Behandlung, SKOV3-Zellen mit einer vergleichsweise niedrigen basalen Expression von EZH2 und ATM transient mit einem Plasmid transfiziert, welches eine EZH2-Überexpression erzeugt. Transfizierte Zellen wurden auf ihre Resistenz gegenüber Carboplatin und Paclitaxel untersucht. Es konnte, analog zu den vorangegangenen Knockdown-Versuchen, eine leichte Sensitivierung der Zellen gegenüber einer Kombinationsbehandlung beobachtet werden, jedoch nicht gegenüber einer Behandlung der beiden einzelnen Agenzien. Die Rolle von EZH2 in der Resistenzentwicklung konnte hierbei weiter validiert werden. Der Versuch wurde jedoch, im Unterschied zu den Knockdown-Versuchen, unter permanentem Selektionsdruck durch das Antibiotikum Geneticin durchgeführt. Dies kann zu Veränderungen der Genexpression und Regulation führen (242), welche in dieser Studie nicht berücksichtigt wurden. In einer Studie in der die EZH2-Wirkungsweise in SKOV3-Zellen bezüglich der epithelialen-mesenchymalen Transition untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass durch EZH2 der Transkriptionsfaktor ZEB2 unterdrückt wird, was zur Aufrechterhaltung des epithelialen Phänotyps beiträgt (243). Die hier verwendete Methode der transienten Transfektion eignet sich zwar als ersten Versuch zur Überexpression eines Gens um den Effekt auf die Zellen zu untersuchen. Ein stabil integriertes System mit einer induzierbaren Expressionskassette des EZH2-Gens und einem Reportergen könnte jedoch für eine gezielte Expression von Vorteil sein. Die Expressionsstärke des Plasmids könnte durch dieses System ebenfalls erhöht werden.

Diskussion

Abschließend führte eine Behandlung mit der Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel oder nur Paclitaxel alleine, in sensitiven A2780 Zellen zu einer erhöhten Co-Lokalisation von EZH2 und pATM. Dies deutet auf eine Inangangsetzung eines allgemeinen Mechanismus der Zellen hin, der benötigt wird um eine Wirksamkeit von antimitotischen Agenzien zu vermitteln. Die Signale konnten überwiegend um den Zellkern herum lokalisiert werden, was auf eine Co-Lokalisation der beiden Proteine im Endoplasmatischen Retikulum oder in den Kernporen der Zelle hindeutet. Die Anreicherung an Kernporen könnte dazu dienen, ATM an seiner Funktion als Sensor von DNA-Schäden zu hindern, und es außerhalb des Zellkerns zu immobilisieren.

Schlussfolgerung

Seit längerem ist bekannt, dass eine Chemotherapieresistenz oftmals durch die Zellzyklus-Phasen bestimmt wird. Ein G2/M-Phasen-Arrest verhindert das Ansprechen auf eine Kombinationsbehandlung beispielsweise mit Cisplatin und Paclitaxel. Eine hohe Sensitivität gegenüber Carboplatin wird bei Tumorzellen beobachtet, die sich überwiegend in der G1/S-Phase befinden (244).

EZH2 wurde in dieser Studie als Kandidatenprotein identifiziert, welches für die Wirksamkeit einer Chemotherapie des Ovarialkarzinoms essentiell ist. Zudem wurde in einem umfassenden Ansatz ein weiteres Schlüsselprotein in der Resistenzentwicklung identifiziert: ATM. Nach dem Prinzip der synthetischen Letalität wurde gezeigt, dass eine Reduktion von EZH2 bei einem hohem ATM Gehalt zur Resistenz führt indem Zellzyklus-fördernde Faktoren abnehmen.

Es wird erstmals eine regulatorische und inhibitorische Funktion von EZH2 auf ATM vorgeschlagen, die in der Wirkungsweise von Carboplatin und Paclitaxel eine Rolle spielt (Abbildung 10.1).

Diskussion

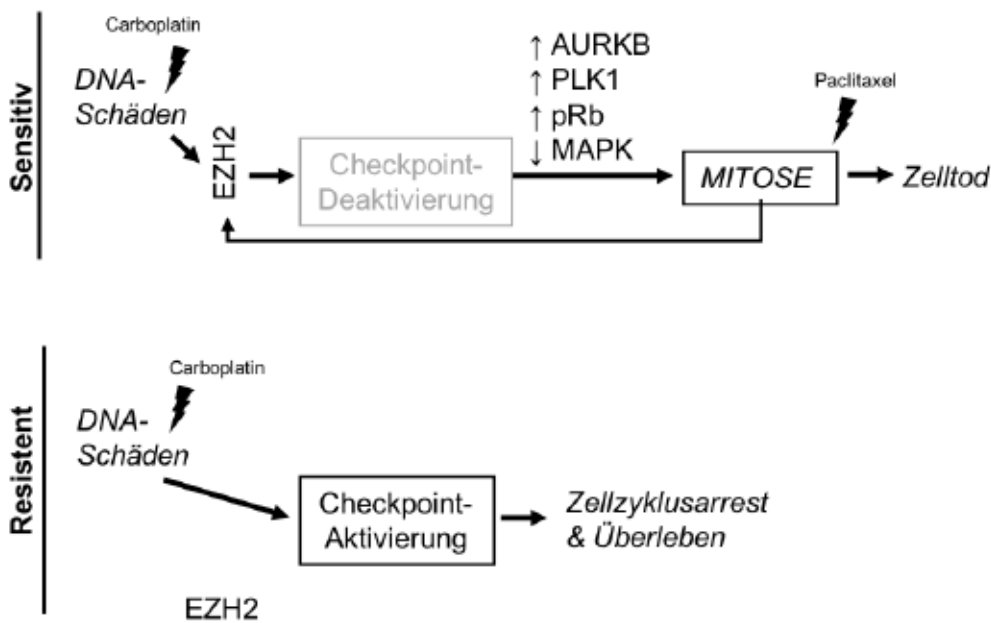


Abbildung 10.1 Schematische Darstellung der potentiellen Wirkungsweise einer Kombinationsbehandlung mit Carboplatin und Paclitaxel.

Aufgrund der erhöhten Expression im Ovarialkarzinom verglichen zum Normalgewebe und seiner proliferativen Wirkung, wird EZH2 oft als potentielles Ziel einer Behandlung betrachtet (149). Die hier dargestellte Charakterisierung resistenter und sensibler Tumoren und Ovarialkarzinom-Zelllinien ergab, dass Tumorzellen, die nicht auf eine Behandlung ansprechen, weder proliferative noch mitotische Eigenschaften besitzen. Eine therapeutische Inhibierung von EZH2 könnte demnach die Resistenz fördern, wenn ATM in den Tumoren erhöht exprimiert wird.

Ausblick

Weitere Untersuchungen der Therapieresistenz im Ovarialkarzinom sollten sich auf die Inhibierung einer Zellzyklusblockierung konzentrieren. Hierbei wurde bereits in einer vielversprechenden Studie der Tyrosinkinase-Inhibitor Adavosertib (AZD1775) getestet. Er inhibiert die Wirkung von Wee1, einem Protein, welches durch die Inhibierung von CDK1 den Zellzyklus arretiert. Das Ausbleiben seiner Funktion führt zum Voranschreiten des Zellzyklus

Diskussion

und somit zur Angreifbarkeit resistenter Tumorzellen durch entsprechende Chemotherapeutika. In einer klinischen Phase-II-Studie wurden in der Anwendung für das refraktäre und resistente, TP53-mutierte Ovarialkarzinom in Verbindung mit Carboplatin bereits vielversprechende Erfolge erzielt (245).

Der PARP-Inhibitor Olaparib (AZD-2281) erzielte zuletzt ebenfalls gute Ergebnisse in der Behandlung des Ovarialkarzinoms (184). PARP1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1) ist ein Enzym, welches an der DNA-Reparatur von Einzelstrangbrüchen beteiligt ist. Wird es inhibiert, kann die DNA-Reparatur nur noch über die homologe Reparatur erfolgen, welche in Tumorzellen oftmals ohnehin defekt ist. Die Zelle leitet letztlich die Apoptose ein (246, 247). Olaparib wurde zunächst nur bei einer *BRCA*-Mutation des Tumors empfohlen. Mittlerweile zeigten Studien, dass eine Olaparib-Behandlung auch in nicht *BRCA*-mutierten Ovarialkarzinomen zu einem verbesserten progressionsfreien Überleben führt (58). In Zelllinien führten Funktionsverlustmutationen in weiteren Genen wie *RAD51*, *RAD54*, *DSS1*, *RPA1*, *NBS1*, *ATR*, *ATM*, *CHK1*, *CHK2*, *FANCD2*, *FANCA*, oder *FANCC* zu einer erhöhten Sensitivität einer PARP-Inhibition (248). In einer weiteren aktuellen Studie führte eine Reduktion *EZH2* in *BRCA2*-mutierten Tumoren zu einer Resistenz gegen eine PARP-Inhibitor-Behandlung (249). In dieser Studie wurde die Methylierung als kritischer Faktor zur Erhaltung der genomischen Stabilität ermittelt.

Weitere Proteine, die aus der Zellzyklus-Regulation bekannt sind, könnten bei vorhergehender Charakterisierung der Tumoren bezüglich des *EZH2*- und *ATM*-Gehalts oder des Mutationsstatus als Zielproteine gehemmt werden. Beispiele hierfür sind *CHK1* oder 2, *ATR* oder sogar *ATM* selbst (250).

11 Literaturverzeichnis

1. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.
2. Knudson AG, Jr.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 820-3.
3. Alberts B: *Molecular biology of the cell*. 4th. New York: Garland Science; 2002.
4. Lodish HF: *Molecular cell biology*. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2004.
5. Bower JJ, Vance LD, Psioda M, et al.: Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells. *NPJ Breast Cancer* 2017; 3: 9.
6. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: *Lehninger principles of biochemistry*. Fourth edition.
7. medici Tv: Interphase, Mitose und Zellzykluskontrolle <https://viamedici.thieme.de/lernmodule/biologie/interphase+mitose+und+zellzykluskontrolle> (abgerufen am 21.12. 2018).
8. Püschel G: *Taschenlehrbuch Biochemie*. Stuttgart u.a.: Thieme; 2011.
9. May P, May E: Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999; 18: 7621-36.
10. Mutter GL, Prat JD: *Pathology of the female reproductive tract*. Third edition.
11. Kim J, Coffey DM, Ma L, Matzuk MM: The ovary is an alternative site of origin for high-grade serous ovarian cancer in mice. *Endocrinology* 2015; 156: 1975-81.
12. Scully RE: Pathology of ovarian cancer precursors. *J Cell Biochem Suppl* 1995; 23: 208-18.
13. Scully RE: Early de novo ovarian cancer and cancer developing in benign ovarian lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 1995; 49 Suppl: S9-15.
14. Karlan BY, Bristow RE, Li AJ: *Gynecologic oncology : clinical practice & surgical atlas*. New York: McGraw-Hill Medical; 2012.
15. Piek JM, Kenemans P, Verheijen RH: Intraperitoneal serous adenocarcinoma: a critical appraisal of three hypotheses on its cause. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 718-32.
16. Kim J, Coffey DM, Creighton CJ, Yu Z, Hawkins SM, Matzuk MM: High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 3921-6.
17. Labidi-Galy SI, Papp E, Hallberg D, et al.: High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat Commun* 2017; 8: 1093.
18. Kurman RJ, Shih Ie M: The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol* 2016; 186: 733-47.

Literaturverzeichnis

19. Shih Ie M, Kurman RJ: Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004; 164: 1511-8.
20. Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ: Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol* 2009; 16: 267-82.
21. O'Neill CJ, Deavers MT, Malpica A, Foster H, McCluggage WG: An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB1, BCL2, HER-2/neu, and C-KIT in high-grade neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1034-41.
22. Prat J: Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch* 2012; 460: 237-49.
23. Berek JS, Crum C, Friedlander M: Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet* 2015; 131 Suppl 2: S111-22.
24. Prat J, Oncology FCoG: Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet* 2014; 124: 1-5.
25. Kurman RJ, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization: WHO classification of tumours of female reproductive organs.
26. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, et al.: The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet* 2016; 293: 695-700.
27. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C: TNM classification of malignant tumours. Eighth edition.
28. Binder PS, Prat J, Mutch DG: The future role of molecular staging in gynecologic cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2015; 131 Suppl 2: S127-31.
29. Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, Webb PM, Green AC: Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2003; 104: 228-32.
30. Fathalla MF: Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2: 163.
31. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian C, Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G: Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet* 2008; 371: 303-14.
32. Whittemore AS, Harris R, Itnyre J: Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 1184-203.
33. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M: Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371: 569-78.

Literaturverzeichnis

34. Aune D, Navarro Rosenblatt DA, Chan DS, et al.: Anthropometric factors and ovarian cancer risk: a systematic review and nonlinear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer* 2015; 136: 1888-98.
35. Biesecker BB, Boehnke M, Calzone K, et al.: Genetic counseling for families with inherited susceptibility to breast and ovarian cancer. *JAMA* 1993; 269: 1970-4.
36. King MC, Marks JH, Mandell JB, New York Breast Cancer Study G: Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003; 302: 643-6.
37. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al.: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
38. Tutt A, Ashworth A: The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends in molecular medicine* 2002; 8: 571-6.
39. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
40. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA: Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med* 2017; 14: 9-32.
41. Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland für 2013/2014. Robert Koch-Institut 2017.
42. Kreienberg R: Management des Ovarialkarzinoms : Interdisziplinäres Vorgehen [Elektronische Ressource]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009.
43. Zentrum für Krebsregisterdaten Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2013/2014 ICD-10 C56
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c56_eierstoecke.pdf?__blob=publicationFile (abgerufen am 12.09.2018 2018).
44. Earle CC, Schrag D, Neville BA, et al.: Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 172-80.
45. Engelen MJ, Kos HE, Willemse PH, et al.: Surgery by consultant gynecologic oncologists improves survival in patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2006; 106: 589-98.
46. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, et al.: Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 113-25.
47. Colombo N, Guthrie D, Chiari S, et al.: International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1: a randomized trial of adjuvant chemotherapy in women with early-stage ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 125-32.
48. Coleman RL, Monk BJ, Sood AK, Herzog TJ: Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10: 211-24.
49. Bristow RE, Eisenhauer EL, Santillan A, Chi DS: Delaying the primary surgical effort for advanced ovarian cancer: a systematic review of neoadjuvant chemotherapy and interval cytoreduction. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 480-90.

Literaturverzeichnis

50. Mazzeo F, Berliere M, Kerger J, et al.: Neoadjuvant chemotherapy followed by surgery and adjuvant chemotherapy in patients with primarily unresectable, advanced-stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 163-9.
51. Vergote I, Trope CG, Amant F, et al.: Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 943-53.
52. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG): Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-035-OLk_Ovarialkarzinom_2017-11.pdf (abgerufen am 12.09.2018 2018).
53. International Collaborative Ovarian Neoplasm G: Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. *Lancet* 2002; 360: 505-15.
54. Neijt JP, Engelholm SA, Tuxen MK, et al.: Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3084-92.
55. du Bois A, Luck HJ, Meier W, et al.: A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1320-9.
56. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, et al.: Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* 2011; 365: 2473-83.
57. Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, et al.: Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 928-36.
58. Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al.: Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 852-61.
59. Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, et al.: Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 87-97.
60. Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, et al.: Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J Clin Oncol* 2015; 33: 244-50.
61. Rustin GJ, van der Burg ME, Griffin CL, et al.: Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial. *Lancet* 2010; 376: 1155-63.
62. Neijt JP, Lund B: Paclitaxel with carboplatin for the treatment of ovarian cancer. *Semin Oncol* 1996; 23: 2-4.
63. Ozols RF: Paclitaxel plus carboplatin in the treatment of ovarian cancer. *Semin Oncol* 1999; 26: 84-9.

Literaturverzeichnis

64. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T: Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 1965; 205: 698-9.
65. Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson AJ: The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum(IV) complexes. *J Biol Chem* 1967; 242: 1347-52.
66. Johnson NP, Butour J-L, Villani G, et al.: Metal Antitumor Compounds: The Mechanism of Action of Platinum Complexes. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 1989; S. 1-24.
67. Hongo A, Seki S, Akiyama K, Kudo T: A comparison of in vitro platinum-DNA adduct formation between carboplatin and cisplatin. *Int J Biochem* 1994; 26: 1009-16.
68. Knox RJ, Friedlos F, Lydall DA, Roberts JJ: Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res* 1986; 46: 1972-9.
69. Calvert AH, Newell DR, Gore ME: Future directions with carboplatin: can therapeutic monitoring, high-dose administration, and hematologic support with growth factors expand the spectrum compared with cisplatin? *Semin Oncol* 1992; 19: 155-63.
70. Alberts DS: Carboplatin versus cisplatin in ovarian cancer. *Semin Oncol* 1995; 22: 88-90.
71. Sundquist WI, Lippard SJ, Stollar BD: Monoclonal antibodies to DNA modified with cis- or trans-diamminedichloroplatinum(II). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 8225-9.
72. Wang D, Lippard SJ: Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 307-20.
73. Go RS, Adjei AA: Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol* 1999; 17: 409-22.
74. Calvert AH, Newell DR, Gumbrell LA, et al.: Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1748-56.
75. Calvert AH, Harland SJ, Newell DR, et al.: Early clinical studies with cis-diammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate platinum II. *Cancer Chemother Pharmacol* 1982; 9: 140-7.
76. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ: The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans* 2018; 47: 6645-53.
77. Tixier F, Ranchon F, Iltis A, et al.: Comparative toxicities of 3 platinum-containing chemotherapy regimens in relapsed/refractory lymphoma patients. *Hematol Oncol* 2017; 35: 584-90.
78. Grigorian A, O'Brien CB: Hepatotoxicity Secondary to Chemotherapy. *J Clin Transl Hepatol* 2014; 2: 95-102.
79. Ohmichi M, Hayakawa J, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y: Mechanisms of platinum drug resistance. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 113-6.
80. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, et al.: Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via

Literaturverzeichnis

- Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res* 2000; 60: 5988-94.
81. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971; 93: 2325-7.
 82. Suffness M: Taxol : science and applications. Boca Raton, Fla.: CRC Press; 1995.
 83. Yang CH, Horwitz SB: Taxol((R)): The First Microtubule Stabilizing Agent. *Int J Mol Sci* 2017; 18.
 84. Schiff PB, Horwitz SB: Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 1561-5.
 85. Parness J, Horwitz SB: Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J Cell Biol* 1981; 91: 479-87.
 86. Torres K, Horwitz SB: Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res* 1998; 58: 3620-6.
 87. Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L: Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 9552-6.
 88. Blagosklonny MV, Schulte T, Nguyen P, Trepel J, Neckers LM: Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res* 1996; 56: 1851-4.
 89. Runowicz CD, Wiernik PH, Einzig AI, Goldberg GL, Horwitz SB: Taxol in ovarian cancer. *Cancer* 1993; 71: 1591-6.
 90. Trimble EL, Arbuck SG, McGuire WP: Options for primary chemotherapy of epithelial ovarian cancer: taxanes. *Gynecol Oncol* 1994; 55: S114-21.
 91. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer : principles & practice of oncology. 10th edition.
 92. Jordan MA, Wilson L: Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 253-65.
 93. Dumontet C, Jordan MA: Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 790-803.
 94. Yvon AM, Wadsworth P, Jordan MA: Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 947-59.
 95. Roy SN, Horwitz SB: A phosphoglycoprotein associated with taxol resistance in J774.2 cells. *Cancer Res* 1985; 45: 3856-63.
 96. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, et al.: Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21: 152-61.

Literaturverzeichnis

97. Bouchet BP, Bertholon J, Falette N, et al.: Paclitaxel resistance in untransformed human mammary epithelial cells is associated with an aneuploidy-prone phenotype. *Br J Cancer* 2007; 97: 1218-24.
98. Swanton C, Nicke B, Schuett M, et al.: Chromosomal instability determines taxane response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 8671-6.
99. Galmarini CM, Kamath K, Vanier-Viornery A, et al.: Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics. *Br J Cancer* 2003; 88: 1793-9.
100. Lord CJ, Ashworth A: PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science* 2017; 355: 1152-8.
101. McLornan DP, List A, Mufti GJ: Applying synthetic lethality for the selective targeting of cancer. *N Engl J Med* 2014; 371: 1725-35.
102. Chan DA, Giaccia AJ: Harnessing synthetic lethal interactions in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 351-64.
103. O'Neil NJ, Bailey ML, Hieter P: Synthetic lethality and cancer. *Nat Rev Genet* 2017; 18: 613-23.
104. Brown JS, O'Carrigan B, Jackson SP, Yap TA: Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. *Cancer Discov* 2017; 7: 20-37.
105. Morel D, Almouzni G, Soria JC, Postel-Vinay S: Targeting chromatin defects in selected solid tumors based on oncogene addiction, synthetic lethality and epigenetic antagonism. *Ann Oncol* 2017; 28: 254-69.
106. Sun C, Yin J, Fang Y, et al.: BRD4 Inhibition Is Synthetic Lethal with PARP Inhibitors through the Induction of Homologous Recombination Deficiency. *Cancer Cell* 2018; 33: 401-16 e8.
107. Knutson SK, Warholic NM, Wigle TJ, et al.: Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 7922-7.
108. Bitler BG, Aird KM, Zhang R: Epigenetic synthetic lethality in ovarian clear cell carcinoma: EZH2 and ARID1A mutations. *Mol Cell Oncol* 2016; 3: e1032476.
109. Bitler BG, Aird KM, Garipov A, et al.: Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nat Med* 2015; 21: 231-8.
110. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 671-5.
111. Schroeder MP, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N: Visualizing multidimensional cancer genomics data. *Genome Med* 2013; 5: 9.
112. Chu VT, Gottardo R, Raftery AE, Bumgarner RE, Yeung KY: MeV+R: using MeV as a graphical user interface for Bioconductor applications in microarray analysis. *Genome Biol* 2008; 9: R118.

Literaturverzeichnis

113. Treindl F, Ruprecht B, Beiter Y, et al.: A bead-based western for high-throughput cellular signal transduction analyses. *Nat Commun* 2016; 7: 12852.
114. Graham H: DigiWest: Reimaging Western Blotting on the Proteomic Scale <https://www.luminexcorp.com/blog/digwest-reimaging-western-blotting-proteomic-scale/> (abgerufen am 11.10.2018).
115. Bosmuller H, Fischer A, Pham DL, et al.: Detection of the BRAF V600E mutation in serous ovarian tumors: a comparative analysis of immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody and allele-specific PCR. *Hum Pathol* 2013; 44: 329-35.
116. Andrulis M, Lehnert N, Capper D, et al.: Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma. *Cancer Discov* 2013; 3: 862-9.
117. Györfy B, Lanczky A, Szallasi Z: Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19: 197-208.
118. Aescht E, Boom F, Büchl-Zimmermann S, et al.: *Romeis Mikroskopische Technik [Elektronische Ressource]*. 18. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
119. van Bogaert LJ, van Craynest MP, Quinones JA: Diaminobenzidine histochemistry in light microscopy. *Acta Histochem* 1981; 69: 61-9.
120. Herzog V, Fahimi HD: A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donor. *Anal Biochem* 1973; 55: 554-62.
121. Remmele W, Stegner HE: [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987; 8: 138-40.
122. Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, et al.: Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 2006; 3: 995-1000.
123. Konecny G, Crohns C, Pegram M, et al.: Correlation of drug response with the ATP tumorchemosensitivity assay in primary FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 258-63.
124. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K: EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003; 22: 5323-35.
125. Bakkenist CJ, Kastan MB: DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003; 421: 499-506.
126. Lloyd KL, Cree IA, Savage RS: Prediction of resistance to chemotherapy in ovarian cancer: a systematic review. *BMC Cancer* 2015; 15: 117.
127. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, et al.: Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* 2015; 521: 489-94.
128. Jacobs I, Bast RC, Jr.: The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* 1989; 4: 1-12.

129. Jung JG, Shih IM, Park JT, et al.: Ovarian Cancer Chemoresistance Relies on the Stem Cell Reprogramming Factor PBX1. *Cancer Res* 2016; 76: 6351-61.
130. Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E: Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest* 1994; 94: 703-8.
131. Matondo A, Jo YH, Shahid M, et al.: The Prognostic 97 Chemoresponse Gene Signature in Ovarian Cancer. *Sci Rep* 2017; 7: 9689.
132. Carey MS, Agarwal R, Gilks B, et al.: Functional proteomic analysis of advanced serous ovarian cancer using reverse phase protein array: TGF-beta pathway signaling indicates response to primary chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2852-60.
133. Avril S, Dincer Y, Malinowsky K, et al.: Increased PDGFR-beta and VEGFR-2 protein levels are associated with resistance to platinum-based chemotherapy and adverse outcome of ovarian cancer patients. *Oncotarget* 2017; 8: 97851-61.
134. Stewart JJ, White JT, Yan X, et al.: Proteins associated with Cisplatin resistance in ovarian cancer cells identified by quantitative proteomic technology and integrated with mRNA expression levels. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 433-43.
135. Lund RJ, Huhtinen K, Salmi J, et al.: DNA methylation and Transcriptome Changes Associated with Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer. *Sci Rep* 2017; 7: 1469.
136. Liu D, Zhang XX, Li MC, et al.: C/EBPbeta enhances platinum resistance of ovarian cancer cells by reprogramming H3K79 methylation. *Nat Commun* 2018; 9: 1739.
137. McGrail DJ, Khambhati NN, Qi MX, et al.: Alterations in ovarian cancer cell adhesion drive taxol resistance by increasing microtubule dynamics in a FAK-dependent manner. *Sci Rep* 2015; 5: 9529.
138. Bae T, Weon KY, Lee JW, Eum KH, Kim S, Choi JW: Restoration of paclitaxel resistance by CDK1 intervention in drug-resistant ovarian cancer. *Carcinogenesis* 2015; 36: 1561-71.
139. Wang X, Pan L, Mao N, Sun L, Qin X, Yin J: Cell-cycle synchronization reverses Taxol resistance of human ovarian cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 2013; 13: 77.
140. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W: Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J* 2005; 392: 249-61.
141. Penzvalto Z, Lanczky A, Lenart J, et al.: MEK1 is associated with carboplatin resistance and is a prognostic biomarker in epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2014; 14: 837.
142. Hew KE, Miller PC, El-Ashry D, et al.: MAPK Activation Predicts Poor Outcome and the MEK Inhibitor, Selumetinib, Reverses Antiestrogen Resistance in ER-Positive High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 935-47.
143. Cossa G, Lanzi C, Cassinelli G, et al.: Differential outcome of MEK1/2 inhibitor-platinum combinations in platinum-sensitive and -resistant ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett* 2014; 347: 212-24.

Literaturverzeichnis

144. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, et al.: RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* 2007; 282: 14056-64.
145. Ventura AP, Radhakrishnan S, Green A, et al.: Activation of the MEK-S6 pathway in high-grade ovarian cancers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010; 18: 499-508.
146. Choi JI, Park SH, Lee HJ, Lee DW, Lee HN: Inhibition of Phospho-S6 Kinase, a Protein Involved in the Compensatory Adaptive Response, Increases the Efficacy of Paclitaxel in Reducing the Viability of Matrix-Attached Ovarian Cancer Cells. *PLoS One* 2016; 11: e0155052.
147. Li H, Cai Q, Godwin AK, Zhang R: Enhancer of zeste homolog 2 promotes the proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 1610-8.
148. Comet I, Rüsing EM, Leblanc B, Helin K: Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer. *Nat Rev Cancer* 2016; 16: 803-10.
149. Jones BA, Varambally S, Arend RC: Histone Methyltransferase EZH2: A Therapeutic Target for Ovarian Cancer. *Mol Cancer Ther* 2018; 17: 591-602.
150. Chen S, Bohrer LR, Rai AN, et al.: Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 1108-14.
151. Li H, Cai Q, Wu H, et al.: SUZ12 promotes human epithelial ovarian cancer by suppressing apoptosis via silencing HRK. *Mol Cancer Res* 2012; 10: 1462-72.
152. Ren S, Rollins BJ: Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 2004; 117: 239-51.
153. Antonucci LA, Egger JV, Krucher NA: Phosphorylation of the Retinoblastoma protein (Rb) on serine-807 is required for association with Bax. *Cell Cycle* 2014; 13: 3611-7.
154. Liu Y, Heyman M, Wang Y, et al.: Molecular analysis of the retinoblastoma gene in primary ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 1994; 58: 663-7.
155. Zheng H, Hu W, Deavers MT, et al.: Nuclear cyclin B1 is overexpressed in low-malignant-potential ovarian tumors but not in epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201: 367 e1-6.
156. Scharer CD, Laycock N, Osunkoya AO, et al.: Aurora kinase inhibitors synergize with paclitaxel to induce apoptosis in ovarian cancer cells. *J Transl Med* 2008; 6: 79.
157. Hetland TE, Nymo DA, Holth A, et al.: Aurora B expression in metastatic effusions from advanced-stage ovarian serous carcinoma is predictive of intrinsic chemotherapy resistance. *Hum Pathol* 2013; 44: 777-85.
158. Benada J, Burdova K, Lidak T, von Morgen P, Macurek L: Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis. *Cell Cycle* 2015; 14: 219-31.
159. Belur Nagaraj A, Kovalenko O, Avelar RA, et al.: Mitotic Exit dysfunction through the deregulation of APC/C characterizes cisplatin resistant state in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2018.

Literaturverzeichnis

160. Pujade-Lauraine E, Selle F, Weber B, et al.: Volasertib Versus Chemotherapy in Platinum-Resistant or -Refractory Ovarian Cancer: A Randomized Phase II Groupe des Investigateurs Nationaux pour l'Etude des Cancers de l'Ovaire Study. *J Clin Oncol* 2016; 34: 706-13.
161. Chekerov R, Klamann I, Zafrakas M, et al.: Altered expression pattern of topoisomerase IIalpha in ovarian tumor epithelial and stromal cells after platinum-based chemotherapy. *Neoplasia* 2006; 8: 38-45.
162. Helleman J, Jansen MP, Span PN, et al.: Molecular profiling of platinum resistant ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006; 118: 1963-71.
163. Macleod K, Mullen P, Sewell J, et al.: Altered ErbB receptor signaling and gene expression in cisplatin-resistant ovarian cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 6789-800.
164. Fan G, Wrzeszczynski KO, Fu C, et al.: A quantitative proteomics-based signature of platinum sensitivity in ovarian cancer cell lines. *Biochem J* 2015; 465: 433-42.
165. Gakiopoulou H, Korkolopoulou P, Levidou G, et al.: Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 in non-benign epithelial ovarian tumours: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications. *Br J Cancer* 2007; 97: 1124-34.
166. Plooy AC, van Dijk M, Lohman PH: Induction and repair of DNA cross-links in chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds in relation to platinum binding to DNA, cytotoxicity, mutagenicity, and antitumor activity. *Cancer Res* 1984; 44: 2043-51.
167. Kondoh E, Mori S, Yamaguchi K, et al.: Targeting slow-proliferating ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 2010; 126: 2448-56.
168. Garnett MJ, Marais R: Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004; 6: 313-9.
169. Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, Peeper DS: BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene* 2008; 27: 877-95.
170. Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, et al.: KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 2020-8.
171. Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-31.
172. Mantovani F, Collavin L, Del Sal G: Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death & Differentiation* 2018.
173. Cancer Genome Atlas Research N: Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474: 609-15.
174. Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Temple J, et al.: Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J Pathol* 2010; 221: 49-56.
175. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al.: Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1117-30.

176. Roy R, Chun J, Powell SN: BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 2011; 12: 68-78.
177. Liu G, Yang D, Sun Y, et al.: Differing clinical impact of BRCA1 and BRCA2 mutations in serous ovarian cancer. *Pharmacogenomics* 2012; 13: 1523-35.
178. Yang D, Khan S, Sun Y, et al.: Association of BRCA1 and BRCA2 mutations with survival, chemotherapy sensitivity, and gene mutator phenotype in patients with ovarian cancer. *JAMA* 2011; 306: 1557-65.
179. Sohn I, Jung WY, Sung CO: Somatic hypermutation and outcomes of platinum based chemotherapy in patients with high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2012; 126: 103-8.
180. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C: Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics* 2015; 8: 37.
181. Khrunin AV, Moisseev A, Gorbunova V, Limborska S: Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Pharmacogenomics J* 2010; 10: 54-61.
182. Lander ES: Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* 2011; 470: 187-97.
183. Dobzhansky T: Genetics of natural populations; recombination and variability in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 1946; 31: 269-90.
184. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, et al.: Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 2010; 376: 245-51.
185. Thorstenson YR, Roxas A, Kroiss R, et al.: Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3325-33.
186. Blackford AN, Jackson SP: ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell* 2017; 66: 801-17.
187. Tecza K, Pamula-Pilat J, Kolosza Z, Radlak N, Grzybowska E: Genetic polymorphisms and gene-dosage effect in ovarian cancer risk and response to paclitaxel/cisplatin chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2015; 34: 2.
188. Beltrame L, Di Marino M, Fruscio R, et al.: Profiling cancer gene mutations in longitudinal epithelial ovarian cancer biopsies by targeted next-generation sequencing: a retrospective study. *Ann Oncol* 2015; 26: 1363-71.
189. Weber AM, Ryan AJ: ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther* 2015; 149: 124-38.
190. Teng PN, Bateman NW, Darcy KM, et al.: Pharmacologic inhibition of ATR and ATM offers clinically important distinctions to enhancing platinum or radiation response in ovarian, endometrial, and cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2015; 136: 554-61.
191. Choi M, Kipps T, Kurzrock R: ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* 2016; 15: 1781-91.

Literaturverzeichnis

192. Pavlidis P, Noble WS: Analysis of strain and regional variation in gene expression in mouse brain. *Genome Biol* 2001; 2: RESEARCH0042.
193. Abraham RT: Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 2001; 15: 2177-96.
194. Gardino AK, Yaffe MB: 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 2011; 22: 688-95.
195. Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD: ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* 1998; 19: 175-8.
196. Ayrapetov MK, Gursoy-Yuzugullu O, Xu C, Xu Y, Price BD: DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 9169-74.
197. Li J, Hart RP, Mallimo EM, Swerdel MR, Kusnecov AW, Herrup K: EZH2-mediated H3K27 trimethylation mediates neurodegeneration in ataxia-telangiectasia. *Nat Neurosci* 2013; 16: 1745-53.
198. Campbell S, Ismail IH, Young LC, Poirier GG, Hendzel MJ: Polycomb repressive complex 2 contributes to DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* 2013; 12: 2675-83.
199. Ito T, Teo YV, Evans SA, Neretti N, Sedivy JM: Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage- and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Rep* 2018; 22: 3480-92.
200. Tang D, Wu D, Hirao A, et al.: ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* 2002; 277: 12710-7.
201. Wei F, Xie Y, Tao L, Tang D: Both ERK1 and ERK2 kinases promote G2/M arrest in etoposide-treated MCF7 cells by facilitating ATM activation. *Cell Signal* 2010; 22: 1783-9.
202. Paredes R, Schneider M, Stevens A, et al.: EVI1 carboxy-terminal phosphorylation is ATM-mediated and sustains transcriptional modulation and self-renewal via enhanced CtBP1 association. *Nucleic Acids Res* 2018; 46: 7662-74.
203. Yang C, Tang X, Guo X, et al.: Aurora-B mediated ATM serine 1403 phosphorylation is required for mitotic ATM activation and the spindle checkpoint. *Mol Cell* 2011; 44: 597-608.
204. Tang X, Hui ZG, Cui XL, Garg R, Kastan MB, Xu B: A novel ATM-dependent pathway regulates protein phosphatase 1 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 2559-66.
205. Helbig L, Damrot J, Hulsenbeck J, et al.: Late activation of stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases triggered by cisplatin-induced DNA damage in repair-defective cells. *J Biol Chem* 2011; 286: 12991-3001.
206. Panta GR, Kaur S, Cavin LG, et al.: ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF-kappaB through a common MEK/extracellular signal-

Literaturverzeichnis

- regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1823-35.
207. Li Y, Mitsunashi S, Ikejo M, et al.: Relationship between ATM and ribosomal protein S6 revealed by the chemical inhibition of Ser/Thr protein phosphatase type 1. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76: 486-94.
 208. Soriano-Carot M, Quilis I, Bano MC, Igual JC: Protein kinase C controls activation of the DNA integrity checkpoint. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: 7084-95.
 209. Wei F, Ojo D, Lin X, et al.: BMI1 attenuates etoposide-induced G2/M checkpoints via reducing ATM activation. *Oncogene* 2015; 34: 3063-75.
 210. Shi Y, Venkataraman SL, Dodson GE, Mabb AM, LeBlanc S, Tibbetts RS: Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 5898-903.
 211. Goldstone S, Pavey S, Forrest A, Sinnamon J, Gabrielli B: Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR. *Oncogene* 2001; 20: 921-32.
 212. Marmisolle I, Martinez J, Liu J, et al.: Reciprocal regulation of acetyl-CoA carboxylase 1 and senescence in human fibroblasts involves oxidant mediated p38 MAPK activation. *Arch Biochem Biophys* 2017; 613: 12-22.
 213. Luo DX, Peng XH, Xiong Y, Liao DF, Cao D, Li L: Dual role of insulin-like growth factor-1 in acetyl-CoA carboxylase- α activity in human colon cancer cells HCT-8: downregulating its expression and phosphorylation. *Mol Cell Biochem* 2011; 357: 255-62.
 214. Haince JF, Kozlov S, Dawson VL, et al.: Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 2007; 282: 16441-53.
 215. Pizarro JG, Folch J, de la Torre AV, et al.: ATM is involved in cell-cycle control through the regulation of retinoblastoma protein phosphorylation. *J Cell Biochem* 2010; 110: 210-8.
 216. Al-Khalaf HH, Hendrayani SF, Aboussekhra A: The atr protein kinase controls UV-dependent upregulation of p16INK4A through inhibition of Skp2-related polyubiquitination/degradation. *Mol Cancer Res* 2011; 9: 311-9.
 217. Shamma A, Suzuki M, Hayashi N, et al.: ATM mediates pRB function to control DNMT1 protein stability and DNA methylation. *Mol Cell Biol* 2013; 33: 3113-24.
 218. Smith EM, Proud CG: cdc2-cyclin B regulates eEF2 kinase activity in a cell cycle- and amino acid-dependent manner. *EMBO J* 2008; 27: 1005-16.
 219. Cortez D, Glick G, Elledge SJ: Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10078-83.
 220. Yoo HY, Shevchenko A, Shevchenko A, Dunphy WG: Mcm2 is a direct substrate of ATM and ATR during DNA damage and DNA replication checkpoint responses. *J Biol Chem* 2004; 279: 53353-64.

221. Siu WY, Lau A, Arooz T, Chow JP, Ho HT, Poon RY: Topoisomerase poisons differentially activate DNA damage checkpoints through ataxia-telangiectasia mutated-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 621-32.
222. van Vugt MA, Smits VA, Klompmaker R, Medema RH: Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion. *J Biol Chem* 2001; 276: 41656-60.
223. Lee HJ, Hwang HI, Jang YJ: Mitotic DNA damage response: Polo-like kinase-1 is dephosphorylated through ATM-Chk1 pathway. *Cell Cycle* 2010; 9: 2389-98.
224. Tamaichi H, Sato M, Porter AC, Shimizu T, Mizutani S, Takagi M: Ataxia telangiectasia mutated-dependent regulation of topoisomerase II alpha expression and sensitivity to topoisomerase II inhibitor. *Cancer Sci* 2013; 104: 178-84.
225. Orth JD, Kohler RH, Foijer F, Sorger PK, Weissleder R, Mitchison TJ: Analysis of mitosis and antimitotic drug responses in tumors by in vivo microscopy and single-cell pharmacodynamics. *Cancer Res* 2011; 71: 4608-16.
226. Ince TA, Sousa AD, Jones MA, et al.: Characterization of twenty-five ovarian tumour cell lines that phenocopy primary tumours. *Nat Commun* 2015; 6: 7419.
227. Beaufort CM, Helmijr JC, Piskorz AM, et al.: Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS One* 2014; 9: e103988.
228. Hernandez L, Kim MK, Lyle LT, et al.: Characterization of ovarian cancer cell lines as in vivo models for preclinical studies. *Gynecol Oncol* 2016; 142: 332-40.
229. Anglesio MS, Wiegand KC, Melnyk N, et al.: Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. *PLoS One* 2013; 8: e72162.
230. Neubauer H, Stefanova M, Solomayer E, et al.: Predicting resistance to platinum-containing chemotherapy with the ATP tumor chemosensitivity assay in primary ovarian cancer. *Anticancer Res* 2008; 28: 949-55.
231. McElroy WD, Seliger HH, White EH: Mechanism of bioluminescence, chemiluminescence and enzyme function in the oxidation of firefly luciferin. *Photochem Photobiol* 1969; 10: 153-70.
232. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al.: Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., (eds.): *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD)2004.
233. Petty RD, Sutherland LA, Hunter EM, Cree IA: Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J Biolumin Chemilumin* 1995; 10: 29-34.
234. Sevin BU, Peng ZL, Perras JP, Ganjei P, Penalver M, Averette HE: Application of an ATP-bioluminescence assay in human tumor chemosensitivity testing. *Gynecol Oncol* 1988; 31: 191-204.
235. O'Meara AT, Sevin BU: Predictive value of the ATP chemosensitivity assay in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 334-42.
236. Weaver BA: How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell* 2014; 25: 2677-81.

Literaturverzeichnis

237. Kampan NC, Madondo MT, McNally OM, Quinn M, Plebanski M: Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 413076.
238. Hu S, Yu L, Li Z, et al.: Overexpression of EZH2 contributes to acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2010; 10: 788-95.
239. Lu F, Xu H, Wang Q, Li M, Meng J, Kuang Y: Inhibition of enhancer of zeste homolog 2 increases the expression of p16 and suppresses the proliferation and migration of ovarian carcinoma cells in vitro and in vivo. *Oncol Lett* 2018; 15: 3233-9.
240. Jiang H, Reinhardt HC, Bartkova J, et al.: The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response. *Genes Dev* 2009; 23: 1895-909.
241. Gollner S, Oellerich T, Agrawal-Singh S, et al.: Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 2017; 23: 69-78.
242. Ryu AH, Eckalbar WL, Kreimer A, Yosef N, Ahituv N: Use antibiotics in cell culture with caution: genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Sci Rep* 2017; 7: 7533.
243. Cardenas H, Zhao J, Vieth E, Nephew KP, Matei D: EZH2 inhibition promotes epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7: 84453-67.
244. Shah MA, Schwartz GK: Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2168-81.
245. Leijen S, van Geel RM, Sonke GS, et al.: Phase II Study of WEE1 Inhibitor AZD1775 Plus Carboplatin in Patients With TP53-Mutated Ovarian Cancer Refractory or Resistant to First-Line Therapy Within 3 Months. *J Clin Oncol* 2016; 34: 4354-61.
246. Underhill C, Toulmonde M, Bonnefoi H: A review of PARP inhibitors: from bench to bedside. *Ann Oncol* 2011; 22: 268-79.
247. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al.: Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; 434: 917-21.
248. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, et al.: Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res* 2006; 66: 8109-15.
249. Rondinelli B, Gogola E, Yucel H, et al.: EZH2 promotes degradation of stalled replication forks by recruiting MUS81 through histone H3 trimethylation. *Nat Cell Biol* 2017.
250. Otto T, Sicinski P: Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2017; 17: 93-115.
251. Waldemarson S, Krogh M, Alaiya A, et al.: Protein expression changes in ovarian cancer during the transition from benign to malignant. *J Proteome Res* 2012; 11: 2876-89.
252. Moreau K, Dizin E, Ray H, et al.: BRCA1 affects lipid synthesis through its interaction with acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 2006; 281: 3172-81.
253. Chajes V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V: Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res* 2006; 66: 5287-94.

254. Vazquez-Martin A, Corominas-Faja B, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Dalla Venezia N, Menendez JA: Serine79-phosphorylated acetyl-CoA carboxylase, a downstream target of AMPK, localizes to the mitotic spindle poles and the cytokinesis furrow. *Cell Cycle* 2013; 12: 1639-41.
255. Liu Y, Yasukawa M, Chen K, et al.: Association of Somatic Mutations of ADAMTS Genes With Chemotherapy Sensitivity and Survival in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol* 2015; 1: 486-94.
256. Ren H, Du P, Ge Z, et al.: TWIST1 and BMI1 in Cancer Metastasis and Chemoresistance. *J Cancer* 2016; 7: 1074-80.
257. Wang E, Bhattacharyya S, Szabolcs A, et al.: Enhancing chemotherapy response with Bmi-1 silencing in ovarian cancer. *PLoS One* 2011; 6: e17918.
258. Wells JE, Howlett M, Cole CH, Kees UR: Deregulated expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is linked to poor outcome in human cancer. *Int J Cancer* 2015; 137: 504-11.
259. Huang KC, Yang J, Ng MC, et al.: Cyclin A1 expression and paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Eur J Cancer* 2016; 67: 152-63.
260. Shi N, Chen X, Liu R, et al.: Eukaryotic elongation factors 2 promotes tumor cell proliferation and correlates with poor prognosis in ovarian cancer. *Tissue Cell* 2018; 53: 53-60.
261. Seino M, Okada M, Sakaki H, et al.: Time-staggered inhibition of JNK effectively sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel. *Oncol Rep* 2016; 35: 593-601.
262. Siu MK, Chan HY, Kong DS, et al.: p21-activated kinase 4 regulates ovarian cancer cell proliferation, migration, and invasion and contributes to poor prognosis in patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 18622-7.
263. Im-aram A, Farrand L, Bae SM, et al.: The mTORC2 component rictor contributes to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *PLoS One* 2013; 8: e75455.
264. Stronach EA, Alfraidi A, Rama N, et al.: HDAC4-regulated STAT1 activation mediates platinum resistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 4412-22.
265. Pfankuchen DB, Baltes F, Batool T, Li JP, Schlesinger M, Bendas G: Heparin antagonizes cisplatin resistance of A2780 ovarian cancer cells by affecting the Wnt signaling pathway. *Oncotarget* 2017; 8: 67553-66.
266. Wu HH, Wang PH, Yeh JY, et al.: Serum cytokeratin-19 fragment (Cyfra 21-1) is a prognostic indicator for epithelial ovarian cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2014; 53: 30-4.

12 Anhang

Liste Proteine/Antikörper der DigiWest-Analyse

14-3-3 epsilon	Adipophilin	CD44
14-3-3 zeta delta	Afadin - phospho Ser1718	CDK12
4E-BP1 - phospho Thr37/46	Akt1	CDK2
53BP1	Akt1 - phospho Ser473	CDK2 - phospho Thr160 CDK4
53BP1 - phospho Thr543	Akt2 - phospho Ser474	CDK5
A-Raf - phospho Tyr301/302	Akt3	CDKN2A (p16-ink4a, CDK4I,p16INK4A, p16- INK4, Multiple tumor suppressor 1, MTS-1,
ABCG2	Apaf-1	
ABCG5	Aurora A (AIK)	
ADAM12	Aurora B (AIM1)	CIP2A
ADAM9	Aven	CTGF
ADAMTS1	Axl	CTR1 (SLC31A1)
AML1	Axl - phospho Tyr702	CYR61
AML1 - phospho Ser249	BID	Caseinkinase 1 epsilon
AMPA Receptor (GluR 2)	BMP4	Caspase 7 - cleaved Asp198
AMPA Receptor (GluR 2) – phospho Tyr869/Tyr873/Tyr876	BRCA1 - phospho Ser1524	Caspase 9
	Bcl2	CHK2
ATF4	Bcl6	CHK2 - phospho Thr68
ATM	Bmi1	Claudin-1
ATM - phospho Ser1981	C/EBP alpha	Connexin 32
ATP7b	CBP	Cox1
Acetyl-CoA Carboxylase - phospho Ser79	CD133	Cyclin A
Ack1 - phospho Tyr284	CD36	Cyclin B1

Anhang

Cyclin D2	Erk1/2 (MAPK p44/42) - phospho Thr202/Tyr204	GSK3 alpha/beta - phospho Ser21/9
Cyclin E1		GTF3C6
Cyclin E1 - phospho Thr62	Evi-1	Gab2 - phospho Ser159
Cyp7A1	Ezh2	Gab2 - phospho Tyr452
Cytokeratin 19	FABP4	Glucose 6 phosphatase alpha
Cytokeratin 5	FAK - phospho Tyr397	Glypican 3
DKK2	FAK - phospho Tyr576/577	HES-1
DLL1	FAK - phospho Tyr925	HSP 27
DLL3	FBXO25	HSP 70
DLL4	FDPS (farnesyl diphosphate synthase)	Harmonin
DNA Polymerase beta	FGF Receptor - phospho Tyr653/654	Histon Deacetylase 1 (HDAC1)
DUSP1 (MKP1) - phospho Ser359	FGF Receptor 1	Histon Deacetylase 3 (HDAC3)
DUSP14 (MKP6, MKP-6, MKP-L)	FGF Receptor 2	Histon H3 - acetyl Lys18
DUSP6 (MKP3, MKP-3, PYST1)	FGF-1	Histon H3 - monomethyl Lys4
DUSP9 (MKP4, MKP-4)	FRA2	Histon H3 - phospho Ser10
Dab2	Fibronectin	Histon H3 - trimethyl Lys27
Dematin	FoxO1/O3a/O4 - phospho Thr24/Thr32/Thr28	Histon H3 - trimethyl Lys9 IDH2
E-Cadherin	FoxO3a - phospho Ser413	IGF1
EMSY	Frizzled-1	IGF1 Receptor beta and Insulin Receptor beta (CD221) - phospho Tyr1135/1136 resp
ER (Estrogen Receptor)	GADD45B	
ER alpha	GAS2	
Elk-1 - phospho Ser383	GDF8 (Myostatin)	
Endothelin A Receptor	GP130	IGFBP-3 (IGF-binding protein 3)
Eotaxin		

Anhang

IKK epsilon	MEK1/2 - phospho Ser217/221	PAK 4/5/6 - phospho Ser474/Ser602/Ser560
ILK1 - phospho Ser259	MEK2	PARP - cleaved Asp214
INPP4b	MERTK	PDK1
IRS-1 - phospho Ser636/639	MKK3/6 - phospho Ser189/207	PEA-15 (PED) - phospho Ser104
IRS-1 - phospho Tyr1222	MKK4 (SEK1) - phospho Ser257/Thr261	PKC theta - phospho Thr538
IRS-1 - phospho Tyr895		PKLR (Pyruvat-Kinase L/R)
IkappaB alpha - phospho Ser32	MKK7	PKN1
Integrin beta3	MSK1	PLK1
JNK/SAPK 1/2/3 - phospho Tyr185/Tyr223	MSK1 - phospho Ser376	PP5
Jagged1	MUC1 (CD227)	PPAR gamma
Jagged2	Mre11	PPAR gamma - phospho Ser112
Jak 1	Mre11 - phospho Ser676	PTCH1
KLF4	N-Cadherin	PTCH2
KSR1 - phospho Ser392	NF-kB p65 - acetyl Lys310	PTEN - phospho Ser380
Ki-67	NF-kB p65 - phospho Ser536	RASGRF1
Ku80	NR5A2	RBPSUH
LATS1 - phospho Ser909	Nanog	RHEB
LEF1	Notch 1 - cleaved Val1744	RING1A
Lck - phospho Tyr505	Notch 2	RING1B
Lipoprotein lipase	Notch 3	RKIP (PBP, PEBP, PEBP1)
MAML1	Numb	RSK 1 (p90RSK) - phospho Thr573
MAML2	OB-Cadherin	RSK 1/2/3
MAPK15	PAI-1	RSK 4 - phospho Ser235
MCM2	PAK 4	
MDM2		

Anhang

Rab25	STAT 4 - phospho Tyr693	Tubulin acetylated
Rac1/cdc42	SUFU	Twist
Rac1/cdc42 - phospho Ser71	SUZ12	VE-Cadherin
Rad50	Scribble	VEGFR 2 (FLK-1)
Rad52	Shh	VEGFR 2 (FLK-1)- phospho Tyr1059
Raptor	Slug	VEGFR 2 (FLK-1)- phospho Tyr1175
Raptor - phospho Ser792	Smad4	VEGFR 2 (FLK-1)- phospho Tyr951
Ras	Smad5	VEGFR 2 (FLK-1)- phospho Tyr996
Rb - phospho Ser608	Sox2	Vimentin
Rb - phospho Ser807/811	Src Family - phospho Tyr416	Vimentin - phospho Ser56
Rb2 (p130)	TACE	Vimentin - phospho Ser83
Rb2 (p130) - phospho Ser952	TAZ	XLIF
RecQL1	TBK1 (NAK)	YAP - phospho Ser127
RelB	TBK1 (NAK) - phospho Ser172	YB1
Rictor	TCF4	YB1 - phospho Ser102
S6 Ribosomal Protein - phospho Ser235/236	TCF8 (ZEB1)	ZO-1
SFRP2	TGF beta Receptor I	beta-Catenin
SP1	TGF-beta Receptor II	beta-Catenin - phospho Ser675
SPON2	TOPK (PBK, Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase)	c-Met (HGF/SF Receptor) - phospho Tyr1349
SPRED2	TOPK (PBK, Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase) – phospho	eEF2
STAT 1 - phospho Tyr701	Telomerase reverse transcriptase (TERT)	eEF2 - phospho Thr56
STAT 3 - acetyl Lys685	Topo 2 alpha	eIF2 alpha - phospho Ser51
STAT 3 - phospho Ser727		
STAT 3 - phospho Tyr705		
STAT 4		

Anhang

eIF4E - phospho Ser209	p107 - phospho Thr369	p53 - phospho Ser392
eNOS	p27 (Kip1, CDKN1B) - phospho Thr187	p95 (NBS1) - phospho Ser343
g-Catenin	p38/MAPK - phospho	
p107	Thr180/Tyr182	

Lage der Primer für die BRAF V600E Mutationsdetektion

Primer Lage V600E Mutation

dunkelgrau: Primer

hellgrau: Sequenzierte Nukleotide

Fett: V600 Codon

Unterstrichen: Mutationsstelle V600

ATCTCTTACCTAAACTCTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGATCTACTGTT
TTCCTTTACTTACTACACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATA
GGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAA
CAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTATTTTCCACTGATTA
AATTTTGGCCCTGAGATGCTGCTGAGTTACTAGAAGTCATTGAAGGTCTCAACTATA
GTATTTTCATAGTTCCCAGTATTCACAAAAATCAGTGTTCTTATTTTTTATGTAAATAG
AGtc

Anhang

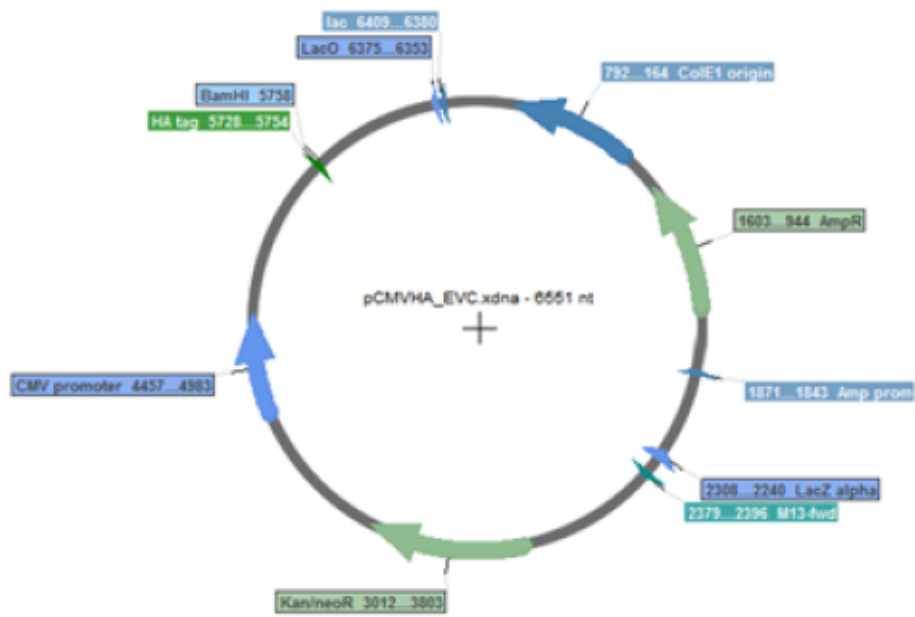


Abbildung 12.1 Vektorkarte des Leervektors pCMVHA EVC.

Anhang

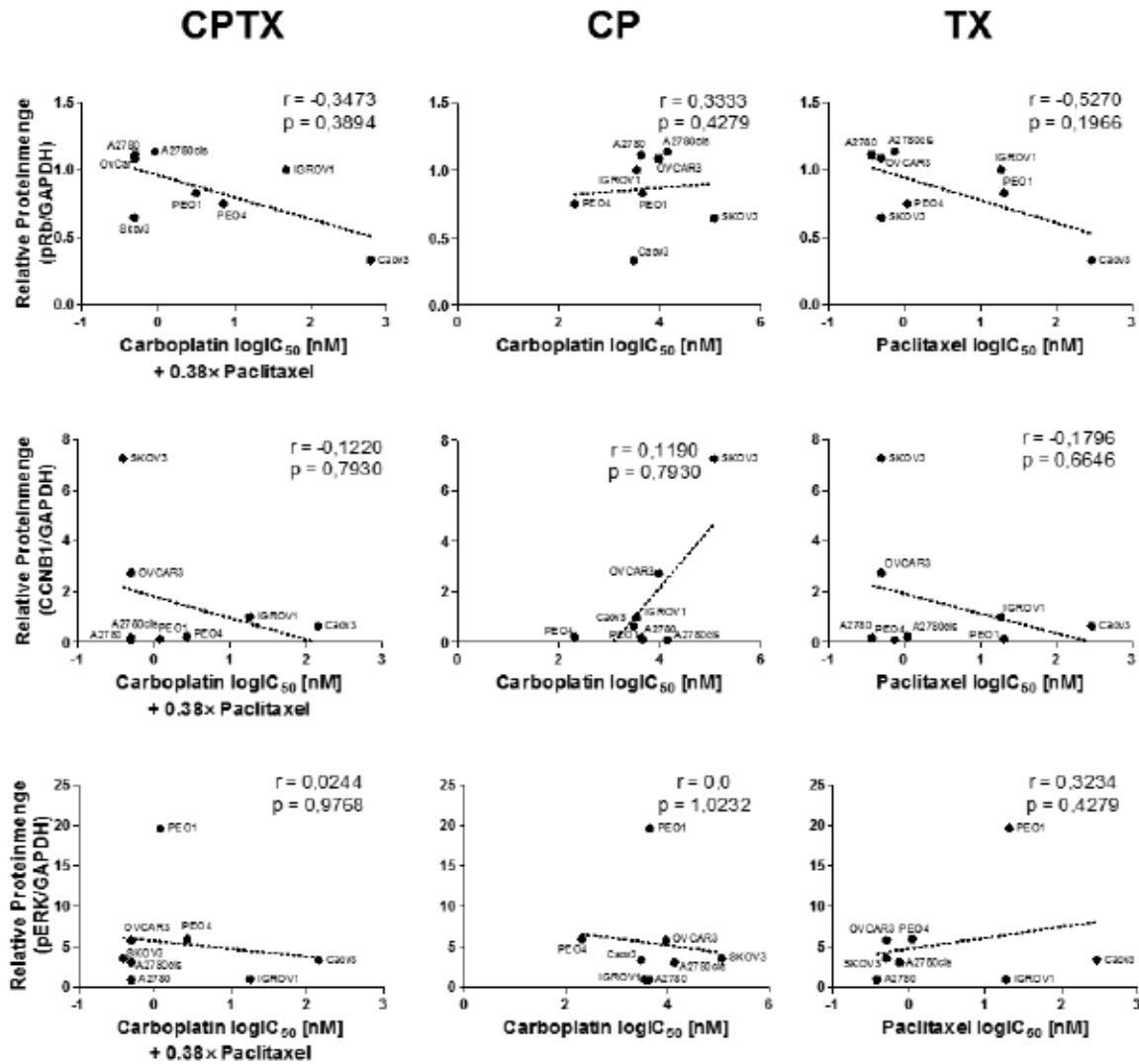


Abbildung 12.2 Korrelationsanalysen der Resistenzen verschiedener Ovarialkarzinom-Zelllinien. Der Gehalt von pRb (oben), Cyclin B1 (CCNB1, Mitte) und pERK1/2 (unten) wurde mit den IC₅₀-Werten der unterschiedlichen Behandlungen CPTX (links), CP (Mitte) und TX (rechts); Rangkorrelationsanalyse nach Spearman; n=4.

Anhang

Tabelle 12.1 Funktion einiger Proteine in resistenten Ovarialkarzinomen aus der DigiWest-Analyse mit Verweisen zu Studien in Ovarialkarzinomen.

Protein	Funktion/ Allgemeine Informationen auf GeneCards	Beobachtung	Studie
14-3-3 Epsilon	• Zellzyklus-und Checkpoint-Kontrolle • Interaktion mit CDC25-Phosphatasen	• Transformation von benigne zu maligne in Ovarialgewebe	(251)
Acetyl-CoA Carboxylase	• im phosphorylierten Zustand inaktiv • Lipogenese • Zellseparation	• Interagiert mit BRCA1 • Verminderte Fettsäuresynthese → Schwächung der Tumorzellen • phosphoryliertes Protein an den Spindelpolen während der Mitose	(252) (253) (254)
ADAMTS1	• Metalloprotease • follikuläre Ruptur während der Ovulation	• Mutationen sind mit Platinsensitivität assoziiert	(255)
BMI1	• <i>Polycomb Group Complex 1</i>(PRC1) • Chromatin Remodellierung	• ↑Bmi1 → Platinresistenz • ↓Bmi → Resistenz gegen Paclitaxel	(256) (257) (256)
CBP	• <i>Creb-Binding Protein</i> • Chromatin-Remodellierung • Histon-Acetyltransferase	-	
clPARP	• PARP→ DNA Reparatur • clPARP→ Apoptose • proteolytische Spaltung durch Caspase-3	-	
CTGF	• extrazellulärer Wachstumsfaktor	• In Tumoren erhöht	(258)
Cyclin A	• Zellzyklusprotein • G2-Phase	• OvCa: Chemoresistenz • Reduktion sensitierte Zellen gegen Paclitaxel	(259)
eEF2	• Elongationsfaktor • Translation	• Zellproliferation über PIK3K/Akt Signalweg	(260)

Anhang

JNK/SAPK	• MAPK-Protein	• basale Reduktion JNK erhöhte Sensitivität gegen Cisplatin und Paclitaxel in OvCa-Zellen	(261)
PAK 4/5/6	• Serin/Threonin Proteinkinasen Subgruppe II • Remodellierung des Aktin-Zytoskeletts • Mikrotubuli	• schlechte Prognose	(262)
PKC Theta	• Isoenzym Proteinkinase C	-	
PKN1	• Regulation Intermediärfilamente • Aktin-Zytoskelett	-	
RICTOR	• mTORC2-Komplex Zellwachstum und Überleben Reorganisation von Aktin	• Resistenz gegen Cisplatin in Zellen	(263)
STAT1	• Transkriptionsfaktor	• Acetyliertes STAT1 → Platinsensitivität in Ovarialkarzinomen	(264)
TCF4	• Transkriptionsfaktor • Chromatin- Restrukturierung • Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen	• Indikator der Wnt-Signalwegs-Aktivierung	(265)
Zytokeratin 19	• Intermediärfilament-protein • strukturelle Integrität von Epithelzellen	• Mutmaßlicher prognostischer Marker für das Ovarialkarzinom	(266)

13 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans Neubauer danke ich für die interessante und aktuelle Themenstellung, die Übernahme des Gutachtens und die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Constantin Czekelius möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Frau Prof. Dr. Tanja Fehm danke ich für die Möglichkeit, im Forschungslabor der Frauenklinik meine Promotion absolvieren zu können.

Ebenso möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern am NMI Reutlingen, Dr. Markus Templin und Dr. Yvonne Beiter, für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Dr. Dieter Niederacher danke ich für seine Geduld und die stetige Diskussionsbereitschaft bezüglich aller wissenschaftlichen, aber auch praktischen Fragestellungen, die in meiner Doktorandenzeit oftmals aufkamen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Ruan van Rensburg für die Ermutigung und die Mithilfe während der Promotion sowie bei Prof. Dr. Martina Rudelius für ihre Hilfe und ihre wertvollen Ratschläge.

Ellen Honisch danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und all die nützlichen Tipps rund um das Thema DNA. Weiterhin danke ich Nora, Ulla, Doro R. und Dagmar für die nette Aufnahme im Labor und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Danke auch an André, Marina, Franziska, Doro, Andrea und Knud sowie meinen ehemaligen Mitstreitern Martin, Helen, Christina und Rita für die gemeinsamen Stunden im Labor und die gute Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden Dugena, Fabian, Hannah und Natalie für ihr Verständnis, die Unterstützung und die vielen lieben Worte bedanken. Meinem Bruder Philipp danke ich für die vielen Gespräche und seine Einschätzung der Dinge.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen wunderbaren Eltern, die mir auf meinem Weg durch das Studium und die Promotion zur Seite standen und mich stets dazu ermutigt haben, weiterzumachen.

Von ganzem Herzen danken möchte ich auch meinem Freund Martin, der mich seelisch und moralisch unterstützt hat und grenzenloses Verständnis aufbrachte.

14 Eidesstattliche Versicherung

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.

Johanna Naskou