

Die Rolle der Mitochondrien für den Cisplatin induzierten Zelltod von Ovarialkarzinomen

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Markus Kleih

aus Waiblingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Monilola Olayioye

Mitberichter: Prof. Dr. Walter E. Aulitzky

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2020

Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut

für klinische Pharmakologie Stuttgart und Universität Tübingen

und

Institut für Zellbiologie und Immunologie

der Universität Stuttgart

2021

Die vorliegende Dissertation wurde am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie Stuttgart unter der Anleitung von Prof. Dr. Walter E. Aulitzky angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe bzw. unerlaubte Hilfsmittel angefertigt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ulm, den 31.01.2021

Markus Kleih

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Aulitzky dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit erhalten habe in seiner Arbeitsgruppe meine Dissertation zu absolvieren. Vielen Dank für die vielen produktiven Diskussionen und Ratschläge die mir nicht nur viel Freude bereitet haben, sondern maßgeblich zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Monilola Olayioye danke ich für die Unterstützung und die sehr gute Betreuung von Seiten der Universität. Vielen Dank für die hilfreichen Diskussionen und auch das Vertrauen in unsere Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schwab danke ich für die Möglichkeit am Institut für klinische Pharmakologie Stuttgart meine Dissertation anzufertigen

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Frank Essmann. Sein großes Engagement, die zahlreichen Diskussionen und sein Wissen haben diese Arbeit ungemein bereichert und ohne ihn wäre die Arbeit in dieser Form wohl nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich herzlich bedanken bei meinen Kollegen Kathrin Böpple, Kerstin Willecke, Dr. Meng Dong, Simon Heine, Carolin Meyerhoff, Andrea Gaißler, Sandra Weller, Benjamin Schäfer und allen Mitarbeitern im IKP für die sehr schöne Zeit und die großartige Atmosphäre. Vielen Dank für eure Hilfe, die vielen Anregungen und Diskussionen.

Einen großen Dank gilt meiner Frau, meiner Familie und meinen Freunden für die hervorragende Unterstützung während meines Studiums und dieser Dissertation.

Zu guter Letzt gilt mein Dank Dr. Heiko van der Kuip. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke dass ich dich kennenlernen und mit dir arbeiten durfte. Du warst ein toller Mensch und ich werde dich ewig in Erinnerung behalten. Deine Hilfsbereitschaft und deine Hingabe für die Forschung waren einmalig. Ich hoffe dir gefällt was aus deiner Arbeit und deinen Ideen entstanden ist.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	X
Zusammenfassung	XIII
Summary	XV
1. Einleitung	1
1.1. Eierstockkrebs / Ovarialkarzinom	1
1.2. Cisplatin	2
1.2.1. Verwendung in der Krebstherapie	2
1.2.2. Wirkungsmechanismus	2
1.3. Mitochondrien	3
1.3.1. Die oxidative Phosphorylierung	4
1.3.2. Mitochondriale Biogenese	6
1.3.3. Mitophagie	7
1.4. Apoptose	8
1.4.1. Der Extrinsische Apoptose-Signalweg	8
1.4.2. Intrinsischer Apoptose-Signalweg	9
1.5. Resistenz gegen Cisplatin induzierter Apoptose	10
1.5.1. Mechanismen der Cisplatin-Resistenz	10
1.6. Ziele der Arbeit	12
2. Material und Methoden	14
2.1. Zellkultur	14
2.1.1. Zelllinien	14
2.1.2. Kultivierungsbedingungen	14
2.1.3. Kryokonservierung	15
2.1.4. Kultivierung von Primärmaterial	15
2.1.5. Bestimmung der Lebendzellzahl und Proliferationsrate	16
2.1.6. Generierung der Sub-Klone aus OVCAR3	16
2.2. Reagenzien	17
2.2.1. Cisplatin-Inkubation	17
2.2.2. Caspasen-Inhibition	17
2.2.3. ROS-Fänger	17
2.2.4. PARP-Inhibition	17
2.2.5. Inhibition der ATP-Synthase	18
2.2.6. Induktion von mtROS	18

2.2.7. Steigerung der Expression von PGC1 α	19
2.2.8. Inhibition der Autophagie	19
2.3. Analysen im Durchflusszytometer	19
2.3.1. Zellviabilitäts-Assays.....	19
2.3.2. Messung der mitochondrialen Masse	20
2.3.3. Messung des mitochondrialen ROS Levels	21
2.3.4. Messung des mitochondrialen Membranpotentials	21
2.3.5. Messung des Zellzyklus der Zellen	21
2.3.6. Messung des autophagosomalen Umsatzes der Zelle	22
2.4. Proteinanalysen.....	23
2.4.1. Proteinextraktion	23
2.4.2. Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE.....	23
2.4.3. Western Blot	24
2.4.4. Immunhistochemie.....	26
2.4.5. Immunfluoreszenz.....	27
2.5. Messung der Sauerstoffverbrauchsrate.....	28
2.6. RNA-Interferenz.....	30
2.7. Messung des ATP Levels	31
2.8. TCGA-Daten Analyse	31
2.9. Statistik.....	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Phänotypische Charakterisierung der Ovarialkarzinomzelllinien	33
3.1.1. Gruppierung der Zelllinien aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber dem Cisplatin induzierten Zelltod	33
3.1.2. Die Mitochondriale Masse korreliert mit der Sensitivität gegenüber Cisplatin induziertem Zelltod in Ovarialkarzinomzelllinien	34
3.1.3. Die Mitochondriale Masse korreliert mit der Sensitivität gegenüber Cisplatin induziertem Zelltod in Sub-Klonen von OVCAR3.....	37
3.2. Cisplatin induzierter Zelltod	40
3.2.1. Der Cisplatin induzierte Zelltod ist unabhängig von der Proliferation	40
3.2.2. Cisplatin induziert Apoptose über den intrinsischen Apoptose-Signalweg.....	41
3.2.3. PARP-Inhibition hat keinen Effekt auf die Cisplatin induzierte Apoptose	44
3.3. Direkte Wirkung von Cisplatin auf die Mitochondrien	46
3.3.1. Cisplatin induziert mtROS in Cisplatin-sensitiven aber auch in Cisplatin-resistenten Zelllinien.....	46
3.3.2. Cisplatin-Inkubation führt zu einer Zunahme der mitochondrialen Masse.....	47

3.3.3. Funktionalität der Cisplatin induzierten Mitochondrien ist Zelllinien-abhängig.....	52
3.3.4. Cisplatin-Inkubation steigert die mitochondriale Masse unabhängig von der Zellzyklus-Phase	59
3.4. Blockierung der mitochondrialen Aktivität in Kombination mit Cisplatin-Inkubation verhindert die Apoptose.....	62
3.4.1. Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin A blockiert die Cisplatin induzierte Apoptose.....	62
3.4.2. <i>Knock-down</i> von Schlüssel-Proteinen in der mitochondrialen Biogenese (PGC1 α und TFAM), verhindert den Cisplatin induzierten Zelltod.....	68
3.5. Die Mitochondriale Masse als prognostischer Marker für Ovarialkarzinompatientinnen.....	73
3.6. Steigerung von mtROS in Cisplatin-resistenten Zellen führt zu erhöhter Apoptose nach Cisplatin-Inkubation.....	78
3.6.1. H ₂ O ₂ steigert die Cisplatin induzierte Apoptose in Cisplatin-resistenten Zellen	78
3.6.2. Hohe Konzentration von Vitamin C steigert mtROS und die Cisplatin induzierte Apoptose.....	79
3.6.3. Inhibition von UCP2 steigert mtROS und induziert Apoptose in Kombination mit Cisplatin in der Cisplatin-resistenten OVCAR8.....	81
3.6.4. VLX600 sensitiviert Cisplatin-resistente Zellen für die Cisplatin induzierte Apoptose.	85
3.6.5. Mitochondriale Komplex-Inhibition durch Rotenone und Antimycin A induziert keine Apoptose in Kombination mit Cisplatin in OVCAR8.....	89
3.7. Steigerung der mitochondrialen Masse in OVCAR8.....	90
3.7.1. Reduzierung der Glukose steigert die mitochondriale Masse nicht.....	90
3.7.2. Inkubation mit den PGC1 α Aktivatoren Sildenafil und BAY-41-2272 steigern die mitochondriale Masse nicht.....	91
3.8. Mitophagie als potenzieller Resistenzmechanismus für die Cisplatin induzierte Apoptose.....	93
4. Diskussion	98
4.1. Cisplatin-sensitive Zellen haben eine höhere mitochondriale Masse als Cisplatin-resistente Zellen.....	99
4.2. Cisplatin induziert die mitochondriale Apoptose in Abhängigkeit der ROS-Induktion	102
4.3. Cisplatin-Inkubation erhöht die mitochondriale Masse, Aktivität und ROS Level.....	103
4.4. Zusätzliche Induktion von mtROS überwindet Cisplatin-Resistenzen in OVCAR8 Zellen	106
4.5. Die mitochondriale Masse konnte in OVCAR8 nicht gesteigert werden	110
4.6. Inhibition der Mitophagie als potenzieller Angriffspunkt zur Überwindung der Chemoresistenz	112

4.7. Die verwendeten Zelllinien können als Model für primäre Ovarialkarzinome dienen	113
4.8. Fazit und Ausblick	114
Literaturverzeichnis.....	118
Publikationen	132

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
2-DG	2-Desoxy-D-glucose
ABP	Annexin V-PI-Bindepuffer
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APAF-1	Apoptotic Protease-Activating Factor 1
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
DISC	Death inducing signaling complex
engl.	Englisch
ETC	Elektronentransportkette
FCS	Fetales Kälberserum
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FPKM	engl.: Fragments per kilobase of exon per million reads mapped
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase
GSH	Glutathion
h	Stunden
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
mA	Milliampere
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität

min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMR	DNA-Mismatch-Reparaturproteine
MOMP	Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran
mt	mitochondriale/s
mtDNA	mitochondriale DNA
MTG	Mitotracker Green
mtROS	Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies
N	Normalität
NAO	10-Nonylacridine orange bromide
nDNA	Nukleäre DNA
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
nM	Nanomol
nm	Nanometer
Ø	Durchschnitt
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate (engl. <i>oxygen consumption rate</i>)
OV3	OVCAR3
OV4	OVCAR4
OV5	OVCAR5
OV8	OVCAR8
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
rel.	relative
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>evolutions per minute</i>)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur

SD	Standardabweichung
sek	Sekunden
sGC	lösliche Guanylylcyclase
SMAC/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspases
sog.	sogenannte/r
TIMM23	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23
TMRM	Tetramethylrhodamine methyl ester
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
tRNA	Transfer-RNA
u.a.	unter anderem
UCPs	Uncoupling Proteine
v/v	Volumen / Volumen
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
w/v	Masse / Volumen
z.B.	zum Beispiel
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
$\rho 0$ -Zellen	Zellen mit entfernter mitochondrialer DNA

Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist eine maligne Tumorerkrankung der Eierstöcke und die fünfthäufigste Krebsentität, die bei Frauen zum Tod führt. Die 5-Jahres Überlebensrate beträgt nur 47 %, da nach der platinhaltigen Chemotherapie, die vielen Fällen sogar zur vollständigen Remission des Tumors führt, ein Rezidiv auftritt. Platinhaltige Chemotherapeutika, wie Cisplatin, induzieren DNA-Schäden durch kovalente Bindung an die nukleäre DNA und ebenfalls an die mitochondriale DNA. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der Mitochondrien für den Cisplatin induzierten Zelltod zu untersuchen und neue Therapien zu identifizieren, um die Chemoresistenz der Tumorzellen zu überwinden. Hierfür wurden 6 Ovarialkarzinomzelllinien aufgrund ihrer Viabilität nach der Cisplatin-Inkubation in Cisplatin-sensitiv (OVCAR3, OVCAR4 und IGROV-1) oder Cisplatin-resistente (OVCAR5, OVCAR8 und A2780) eingeteilt. Die Cisplatin-sensitiven Ovarialkarzinomzelllinien weisen eine höhere mitochondriale Masse und ROS Level auf, sowie einen höheren basalen Sauerstoffverbrauch als die Cisplatin-resistenten Zelllinien. In Subklonen der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR3 korreliert die mitochondriale Masse ebenfalls mit der Sensitivität gegenüber Cisplatin induzierter Apoptose. Daten des TCGA-OV Projektes und des *Human protein atlas* (www.proteinatlas.org) zeigen, dass eine hohe Expression der mitochondrialen Markerproteine TFAM und TIMM23 in Ovarialkarzinomen mit einer signifikant höheren 5-Jahres Überlebensrate einhergehen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Cisplatin induzierte Zelltod als ROS abhängige mitochondriale (intrinsische) Apoptose identifiziert, die nicht von der Proliferationsrate der Zellen oder PARP-Aktivität abhängt. Überraschenderweise führt die Inkubation mit Cisplatin zu einer Steigerung der mitochondrialen Masse und Aktivität. Einhergehend mit der höheren mitochondrialen Aktivität, wird das mitochondriale ROS Level durch Cisplatin-Inkubation erhöht. Die Blockierung der mitochondrialen Aktivität durch den ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin A und der mitochondrialen Biogenese durch den *Knock-down* der Transkriptionsfaktoren PGC1 α und TFAM reduzieren sowohl die mitochondriale ROS-Produktion als auch die Cisplatin-induzierte Apoptose. Entsprechend führt eine Steigerung des mitochondrialen ROS Levels durch Inkubation mit H₂O₂ oder einer hohen Konzentration von Ascorbinsäure zu vermehrter Cisplatin-induzierter Apoptose in der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8. Sowohl die Inhibition als auch der *Knock-down* des antioxidativen Proteins UCP2 führen zu einer

Erhöhung des mitochondrialen ROS Levels und zur signifikant gesteigerten Apoptose-Induktion nach Cisplatin-Inkubation in OVCAR8. Neben der mitochondrialen Biogenese spielt auch die Degradation der Mitochondrien durch die Autophagie eine wichtige Rolle in der Cisplatin induzierten Apoptose. Cisplatin steigert den autophagosomalen Umsatz der Zelle und die Blockierung des Abbaus der Mitochondrien durch den Autophagie-Inhibitor Liensinine führt zu einer signifikant gesteigerten Cisplatin-induzierten Apoptose. Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die mitochondriale Masse und das aus der mitochondrialen Aktivität resultierende mitochondriale ROS die Sensitivität gegenüber der Cisplatin induzierten Apoptose maßgeblich bestimmt. Zukünftig könnten mitochondriale Proteine als Biomarker für die Cisplatin-Sensitivität des Ovarialkarzinoms dienen. Denkbar ist die Entwicklung neuer Kombinationstherapien, die gezielt das mitochondriale ROS Level steigern, die mitochondriale Masse im Tumor erhöhen oder den Abbau der Mitochondrien durch Mitophagie verhindern, um Cisplatin-Resistenz zu überwinden, die Chemotherapie-überlebenden Zellen zu töten und somit die Rückfallquote zu verringern.

Summary

Ovarian cancer is a malignant tumor disease of the ovaries and the fifth most common cancer entity that leads to death in women. The 5-year survival rate is only 47 %, due to a high probability of tumor recurrence, after the platinum-containing chemotherapy leading often to complete remission of the tumor. Platinum-containing chemotherapeutic drugs, such as cisplatin, induce DNA damage through covalent binding to nuclear DNA and to mitochondrial DNA. The aim of the present work was to investigate the role of mitochondria in cisplatin-induced cell death. For this purpose, 6 ovarian cancer cell lines were categorized into cisplatin-sensitive cell lines (OVCAR3, OVCAR4 and IGROV-1) or cisplatin-resistant cell lines (OVCAR5, OVCAR8 and A2780) based on their viability after cisplatin incubation for 48 h. Cisplatin-sensitive ovarian cancer cell lines show higher mitochondrial mass, higher basal oxygen consumption rates and higher mtROS level than the cisplatin-resistant cell lines. This correlation between mitochondrial mass and the sensitivity to cisplatin induced cell death was confirmed in sub-clones of the cisplatin-sensitive cell line OVCAR3. In line with these results data from the TCGA-OV project and the Human protein atlas (www.proteinatlas.org) show that high expression of the mitochondrial marker proteins TFAM and TIMM23 in ovarian cancer cells is associated with a significantly higher 5-year survival rate of patients. Cisplatin-induced cell death was identified as ROS-dependent mitochondrial (intrinsic) apoptosis, which is independent of the proliferation rate and PARP activity. Surprisingly, incubation with cisplatin increases the mitochondrial mass of ovarian cancer cells. Along with a higher mitochondrial mass, the mitochondrial activity and the mitochondrial ROS level is also increased. Blocking mitochondrial activity by the ATP synthase inhibitor Oligomycin A and preventing mitochondrial biogenesis by knockdown of the transcription factors PGC1 α and TFAM reduces mitochondrial ROS induction and cisplatin-induced apoptosis. Consequently, an increase in the mitochondrial ROS level by incubation with H₂O₂ or high-dose ascorbic acid (2 mM) increases cisplatin-induced apoptosis in the cisplatin-resistant cell line OVCAR8. Inhibition or knockdown of the ROS-protective protein UCP2 also leads to an increased mitochondrial ROS level and increases significantly cisplatin-induced apoptosis in OVCAR8. In addition to mitochondrial biogenesis, mitochondrial degradation by autophagy plays an important role in cisplatin-induced apoptosis, because cisplatin increases autophagic activity, while blocking the degradation of

mitochondria by autophagy inhibitor Liensinine leads to a significantly increased cisplatin-induced apoptosis. In summary, this work shows that mitochondrial mass and mitochondrial ROS resulting from mitochondrial activity determine cellular sensitivity to cisplatin-induced apoptosis. Mitochondrial proteins could serve as biomarkers for cisplatin sensitivity of ovarian cancers. Additionally, new therapies could be developed that specifically increase mitochondrial ROS, enhance mitochondrial mass, or block mitochondrial degradation in tumor cells in combination with cisplatin treatment to overcome cisplatin-resistance and kill residual surviving cells to reduce the rate of recurrence.

1. Einleitung

Krebserkrankungen waren 2018 mit 9,6 Millionen Toten die zweithäufigste Todesursache weltweit [1]. Damit ist etwa jeder sechste Todesfall auf der Welt auf Krebs zurückzuführen. Mit der stetig steigenden Lebenserwartung steigt auch das Risiko an Krebs zu erkranken. Schätzungen zur Folge erkranken in Deutschland 1 von 2 Menschen an Krebs und 1 von 4 Männer und 1 von 5 Frauen stirbt in Folge der Krebserkrankung [2]. Krebserkrankungen können jedes Organ betreffen und unterscheiden sich stark in ihrer Häufigkeit, Letalität und Mutationen. Eine individuelle Therapie, die gezielt Schwachstellen des Tumors ausnutzt, kann in Zukunft die Letalität der Erkrankung senken.

1.1. Eierstockkrebs / Ovarialkarzinom

Das durchschnittliche Lebenszeitrisko einer Frau, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, beträgt 1,3 % in den USA und entspricht damit 1 von 78 Frauen [3]. Weltweit gab es im Jahr 2018 geschätzt 295.414 neu diagnostizierte und 184.799 verstorbene Ovarialkarzinompatientinnen [1]. Allein in Deutschland gab es 2018 geschätzt 6780 neue und 5400 verstorbene Ovarialkarzinompatientinnen [4]. Damit ist das Ovarialkarzinom die fünft häufigste Krebsentität, die bei Frauen in Europa und in den USA im Jahr 2018 zum Tode geführt hat [4,5]. Die 5-Jahres Überlebensrate der Patientinnen beträgt nur 47 % [3]. Dies liegt einerseits an der späten Erkennung der Erkrankung. Wird die Krankheit im Stadium I erkannt, dann liegt die Überlebensrate bei 89% [3]. Andererseits ist die Rückfallquote sehr hoch. Die meisten Ovarialkarzinom-Tumore sind sehr sensitiv gegenüber der Chemotherapie, die häufig zu einer kompletten Remission des Tumors führt. Jedoch kommt es mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit zu einem Rezidiv da ein paar wenige Zellen die Therapie überleben [6].

Das epitheliale Ovarialkarzinom ist mit 90% die häufigste Ovarialkarzinom-Art. Die epithelialen Ovarialkarzinome werden in Seröse (52 %), Endometrioid (10 %), Muzinöse (6 %), Klarzellige (6 %) und weitere seltene und unspezifische Klassen unterteilt [3]. Die Standardtherapie beim epithelialen Ovarialkarzinom ist die maximale operative Entfernung des Tumors gefolgt von einer platinhaltigen Chemotherapie [7]. Die Rezidiv-Behandlung hängt vom Zeitpunkt des Rückfalls ab. Der Tumor gilt als Platin-sensitiv bei einem Rückfall später als 6 Monate nach Beendigung der

Primärtherapie und als Platin-resistent bei Wiederauftreten des Tumors in weniger als 6 Monaten nach der Primärtherapie [6]. Bei Platin-sensitiven Tumoren ist die Sekundärtherapie wieder eine platinhaltige Chemotherapie [6].

Ein neuer Therapieansatz ist es, gleichzeitig verschiedene Zielproteine anzugreifen, um die Wirkung der Therapie zu verbessern. Ein Zielprotein ist der Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) oder sein Rezeptor (VEGF-R), die eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielen. Zugelassen ist Bevacizumab (Handelsname Avastin®), ein humanisierter anti-VEGF monoklonaler Antikörper, zur Behandlung von epithelialen Ovarialkarzinomen in Kombination mit der Chemotherapie [8]. Bevacizumab soll die Neubildung von Blutgefäßen im Tumor unterdrücken. Ein weiteres Zielprotein ist die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), die wichtig für die nukleäre DNA-Reparatur ist. Für die Ovarialkarzinomtherapie zugelassene PARP-Inhibitoren sind Olaparib (Handelsname Lynparza®) und Rucaparib (Handelsname Rubraca®) [6]. PARP-Inhibitoren werden als Monotherapie in der Erhaltungstherapie von Cisplatin-sensitiven Ovarialkarzinomen eingesetzt und sollen die erfolgreiche DNA Reparatur in den Zellen verhindern [9,10]. Trotz teilweise guter Erfolge mit den neuen zielgerichteten Therapien, konnte die Überlebensrate von Ovarialkarzinompatientinnen nur geringfügig gesteigert werden [3]. Zur Identifikation weiterer Zielstrukturen, die Schwachstellen des Tumors darstellen, erfordert es ein tieferes Verständnis der zellulären Reaktionen auf Chemotherapie, um Rezidive zu verhindern und die Überlebensrate der Patientinnen signifikant zu verbessern.

1.2. Cisplatin

1.2.1. Verwendung in der Krebstherapie

Cisplatin $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ wurde im Jahr 1978 von der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA zugelassen für die Therapie von Hodenkarzinomen [11]. Trotz des enormen Fortschritts in der Onkologie findet Cisplatin immer noch Verwendung in den Therapien für Hoden-, Ovarial-, Blasen-, Kopf- und Hals-, sowie in den Therapien für Hodgkin's und Non-Hodgkin's Lymphome, Neuroblastome, Sarkome, Multiple Myelome, Melanome und Mesotheliome [11].

1.2.2. Wirkungsmechanismus

Seit 40 Jahren wird Cisplatin in der Therapie von verschiedenen Krebserkrankungen verwendet, jedoch ist die Wirkung von Cisplatin auf die Zelle immer noch nicht

vollständig erforscht. Nach der Aufnahme von Cisplatin in die Zelle wird Cisplatin hydrolysiert und die beiden Chlorid-Moleküle werden, aufgrund der niedrigen Chlorid-Konzentration in der Zelle, durch Wasser oder Hydroxid-Moleküle ersetzt [12]. Cisplatin wird dadurch stark elektrophil und kann zwei neutrophile DNA-Basen binden, indem die Wasser oder Hydroxid-Gruppe substituiert wird. Cisplatin bindet bevorzugt an Guanin und Adenin und bildet dadurch Inter- oder Intrastrang-Quervernetzungen, die Cisplatin-DNA-Addukte. Diese Addukte haben zur Folge, dass die Replikation der DNA nicht mehr stattfinden kann und die Zelle in den Zellzyklus-Arrest geht. Dieser DNA-Schaden muss adäquat repariert werden, andernfalls induziert die Zelle den programmierten Zelltod (Apoptose).

Weniger gut untersucht ist die Folge der Bindung von Cisplatin an die mitochondriale DNA. In Zellen die mit Cisplatin inkubiert wurden, konnte ebenfalls mtDNA-Schäden nachgewiesen werden und mitochondriale Cisplatin-DNA-Addukte sind 300 bis 500-fach häufiger als Addukte mit nukleärer DNA [13,14]. Die Mitochondrien und die mitochondriale DNA (mtDNA) spielen eine essenzielle Rolle für den Cisplatin induzierten Zelltod. Ovarialkarzinomzelllinien die sensitiv gegenüber Cisplatin induzierter Apoptose sind, werden Apoptose-resistent durch die Entfernung der mtDNA (p0-Zellen) [15]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Apoptose nach Cisplatin-Inkubation in Hodenkeimzelltumor-Zellen nicht abhängig von Schlüsselproteinen der nDNA-Schadens-Antwort (bspw. ATM, ATR oder DNA-PK, [16]) ist und selbst entkernte Zellen noch Apoptose nach Cisplatin-Inkubation induzieren [16].

Cisplatin induziert neben DNA-Schäden auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die Blockierung der ROS-Induktion verringert die Induktion der Apoptose, während die Steigerung von ROS zu einer erhöhten Apoptose-Rate führt [17–19]. Die wichtigste Quelle der ROS-Produktion in Säugetierzellen sind die Mitochondrien und die Steigerung des ROS-Levels nach Cisplatin-Inkubation ist vorwiegend abhängig von den Mitochondrien [20,21].

1.3. Mitochondrien

Mitochondrien sind Semi-Autonom, besitzen ein eigenes Genom (mtDNA) und eine eigene Proteinbiosynthese-Maschinerie. Die mtDNA hat eine zirkuläre Doppel-Strang-Struktur mit 16.569 Basenpaare und 37 Genen, codierend für 22 tRNAs, 2 rRNAs und

13 Proteine der Atmungskette [22,23]. 99% der mitochondrialen Proteine werden im Nukleus kodiert, von zytosolischen Ribosomen synthetisiert und ins Mitochondrium importiert [24]. Ein Mitochondrium hat 2 - 10 mtDNA Kopien und je nach Zelltyp können bis zu 1000 Mitochondrien pro Zelle vorkommen [25,26].

Mitochondrien werden aufgrund ihrer essentiellen Funktion - der Generierung von ATP mit Hilfe der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) (siehe 1.3.1, Die oxidative Phosphorylierung) - auch die „Kraftwerke der Zellen“ genannt. Neben der Generierung von ATP, haben die Mitochondrien eine wichtige Rolle in der Ausführung der Apoptose. Der Zellmetabolismus spielt zusätzlich eine Rolle in der Regulation der Apoptose durch „metabolische Kontrollpunkte“, die die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung widerspiegeln [27]. Umgekehrt haben auch wichtige Apoptose-Regulatoren wie BAX, MCL-1 oder p53 Einfluss auf den Zellmetabolismus [27]. MCL-1 ist wichtig für die mitochondriale Fusion und ist erforderlich für die effiziente Assemblierung der ATP-Synthase. MCL-1 Deletion führt daher zu einer geringeren mitochondrialen Aktivität [28]. Der Tumorsuppressor p53 reguliert das Gleichgewicht zwischen Glykolyse und OXPHOS [29].

Otto Warburg beschrieb als Erster Veränderungen im Metabolismus von Krebszellen [30]. Der nach ihm benannte „Warburg Effekt“ ist die Glykolyse unter aeroben Bedingungen von Krebszellen, in der ATP durch die Umwandlung von Glukose zu Laktat, erzeugt wird, obwohl genügend Sauerstoff für die mitochondriale ATP Generierung vorhanden ist. In späteren Studien wurde jedoch gezeigt, dass nicht alle Krebszellen abhängig von der aeroben Glykolyse sind. Der Wechsel von OXPHOS zur aeroben Glykolyse und umgekehrt ist abhängig von der Lokalisation der Krebszelle im Gewebe und den temporären Anpassungen der Zelle an Veränderungen (Proliferation, Quieszenz, Metastasierung) [31].

1.3.1. Die oxidative Phosphorylierung

OXPHOS, bestehend aus der Atmungskette (Elektronentransportkette) und der ATP-Synthase, dient zur ATP-Generierung in Mitochondrien. Die sog. Atmungskette wird von vier Proteinkomplexen gebildet: die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (NADH-Dehydrogenase / Komplex I), die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Succinat-Dehydrogenase / Komplex II), der Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Cytochrom-c-Reduktase / Komplex III und der Cytochrom-c-O₂-Oxidoreduktase (Cytochrom-c-Oxidase / Komplex IV) die an der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind.

In der Atmungskette werden Elektronen von NADH und FADH₂ (Produkte aus dem Citratzyklus) genutzt, um molekularen Sauerstoff zu Wasser zu reduzieren. Dabei werden die Elektronen von Komplex I, über Komplex II, III, und IV auf molekularen Sauerstoff übertragen, der mit freien Protonen zu Wasser reduziert wird ($4 e^- + O_2 + 4 H^+ \rightarrow 2 H_2O$) (Abbildung 1). NADH wird an Komplex I zu NAD⁺ oxidiert und die Elektronen von FADH₂ werden an Komplex II in die Atmungskette übertragen. Komplex I, III und IV pumpen bei der Elektronen-Weiterleitung Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum. Der resultierende Protonengradient ist Grundlage der protonenmotorischen Kraft, die von der ATP-Synthase (Komplex V) genutzt wird, um die Reaktion von ADP + Phosphat zu ATP zu katalysieren [32].

In der Atmungskette treten jedoch häufig Nebenreaktionen auf, wodurch die Weiterleitung der einzelnen Elektronen in den Komplexen I, II und III unvollständig wird, die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übergehen und so Superoxide (O₂⁻) entstehen [33]. Das Mitochondrium ist einer der Haupterzeuger von intrazellulären ROS [21]. Superoxide werden in der mitochondrialen Matrix durch Superoxid-Dismutasen zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) umgewandelt [21]. H₂O₂ diffundiert entweder aus dem Mitochondrium ins Zytosol oder wird direkt im Mitochondrium durch Glutathionperoxidasen, Peroxiredoxin oder Thioredoxin-2 zu Wasser reduziert [21].

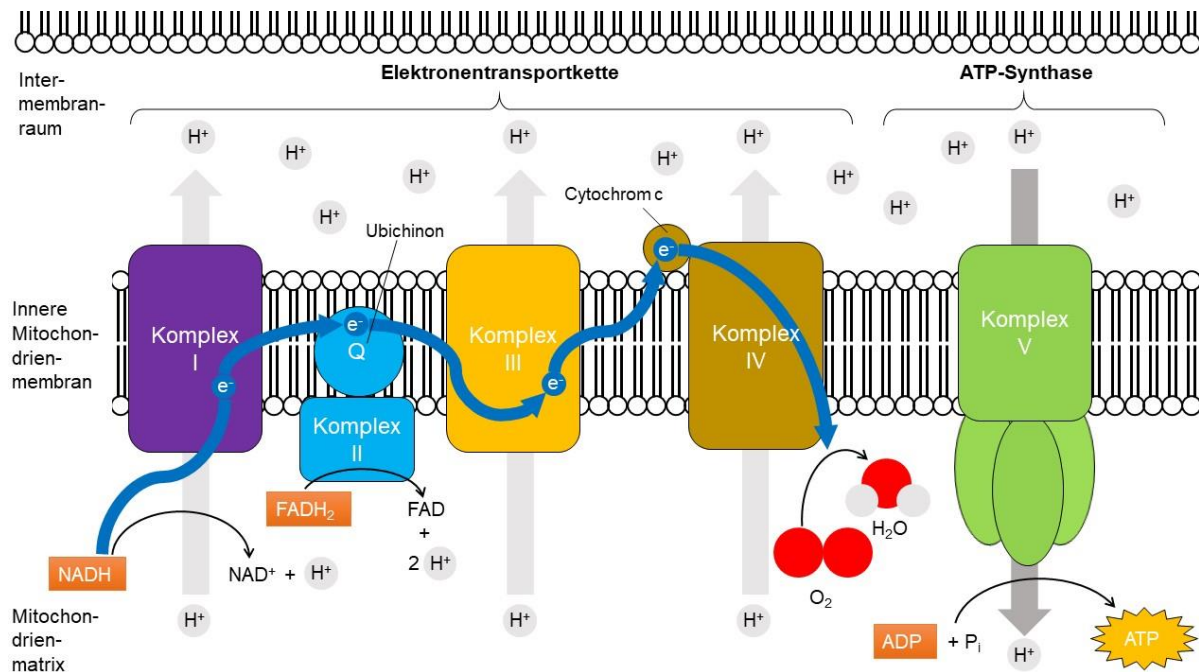


Abbildung 1: Die Atmungskette und die ATP-Synthase. Elektronen werden von NADH und FADH₂ an Komplex I und Komplex II in die Atmungskette übertragen. Die Elektronen werden in der Elektronentransportkette über Komplex III und Komplex IV auf molekularen Sauerstoff übertragen. Durch die Reaktion mit freien Protonen entsteht aus dem molekularen Sauerstoff und den Elektronen aus der Atmungskette Wasser. Bei der Elektronenweiterleitung werden Protonen durch Komplex I, Komplex III und Komplex IV aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum gepumpt. Dadurch entsteht ein Protonengradient. Diese protonenmotorische Kraft wird von der ATP-Synthase (Komplex V) genutzt, um die Reaktionen von ADP + Phosphat zu ATP zu katalysieren. Verändert aus: Purves Biologie (S.234) [34].

1.3.2. Mitochondriale Biogenese

Mitochondrien haben eine große Bandbreite an Funktionen innerhalb der Zelle. Da die meisten mitochondrialen Proteine im Zellkern kodiert werden, sind Anpassungen sowohl im Mitochondrium als auch im Zellkern notwendig, um auf Reize wie Energieverlust oder Temperaturveränderung geeignet zu reagieren. Dazu werden Signale vom Zellkern ans Mitochondrium benötigt, die die Transkription mitochondrialer Gene und die mitochondriale Biogenese aktivieren. Ebenso sind retrograde Signale vom Mitochondrium an den Zellkern notwendig, die den mitochondrialen Funktionszustand widerspiegeln (z.B. Defekte in der Atmungskette oder mtDNA-Mutationen) [35].

Mitochondrien werden nicht *de novo* synthetisiert. Die mitochondriale Masse steigt durch Replikation von bereits existierenden Mitochondrien. Deshalb muss einerseits die mtDNA repliziert werden, aber auch mitochondriale und nukleäre mitochondriale Proteine synthetisiert werden. Eine zentrale Rolle in der mitochondrialen Biogenese spielt der nukleäre Transkriptionsfaktor PGC1 α (*Peroxisome proliferator-activated*

receptor gamma coactivator 1-alpha), der deshalb auch „Schlüsselprotein der mitochondrialen Biogenese“ (engl.: *Master regulator of mitochondrial biogenesis*) genannt wird [36]. PGC1 α reguliert die Transkription der *Nuclear Respiratory Factor* Proteine NRF1 und NRF2 [37]. NRF1 und NRF2 regulieren ihrerseits die Expression von nukleär codierten OXPHOS- und mitochondrialen Import-Proteinen, sowie den mitochondrialen Transkriptionsfaktor TFAM [37,38]. PGC1 α wird sowohl transkriptionell als auch post-translational reguliert durch zelluläre Stressreize wie Nährstoffarmut, ROS und Hypoxie [38]. Die Transkription von PGC1 α wird unter anderem vom cAMP Response Element-Binding Protein (CREB) und YingYang1 (YY1) reguliert [38]. Post-translational wird PGC1 α aktiviert durch Phosphorylierung durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), die auf das AMP / ATP Verhältnis reagiert. Durch eine erhöhte NAD⁺-Konzentration deacetyliert Sirtuin-1 (Sirt1) PGC1 α , wodurch es ebenfalls aktiviert wird. Dementsprechend wird PGC1 α durch Acetylierung durch die Histonacetyltransferase GCN5 deaktiviert. Weitere post-translationale Modifikationen von PGC1 α sind Sumoylierung, Ubiquitinierung und Glucosaminierung, mit denen eine Art Feinabstimmung möglich ist [38]. Eine erhöhte Aktivität von PGC1 α führt zu einer erhöhten Transkription von TFAM. TFAM transloziert ins Mitochondrium und steigert die Transkription der mitochondrial kodierten Proteine. Zusätzlich reguliert TFAM auch die mtDNA Replikation und eine erhöhte TFAM Aktivität führt zu erhöhter mtDNA Replikation. Da sowohl die Transkription der mitochondrialen Proteine als auch die Menge an mtDNA wichtig für die mitochondriale Biogenese sind, hat TFAM direkten Einfluss auf die mitochondriale Masse [39].

1.3.3. Mitophagie

Für die mitochondriale Masse der Zelle spielt nicht nur die mitochondriale Biogenese eine wichtige Rolle, sondern auch die Degradation von Mitochondrien. Alte und geschädigte Mitochondrien, die nicht mehr repariert werden können, werden mit Hilfe der Autophagie abgebaut. Allgemein werden in der Autophagie Zellorganellen und Proteine in ihre Bestandteile zerlegt und recycelt. Der spezifische Abbau von Mitochondrien über die Autophagie wird Mitophagie genannt. Die Mitophagie wird über die Proteine *PTEN-induced kinase 1* (PINK1) und Parkin vermittelt [40]. PINK1 transloziert zum Mitochondrium und wird bei intakten Mitochondrien von der *mitochondrial processing peptidase* (MPP) und *mitochondrial intramembrane cleaving protease* (PARL) geschnitten und daraufhin proteasomal abgebaut. In dysfunktionalen Mitochondrien wird PINK1 hingegen an der mitochondrialen Membran stabilisiert und

durch Homodimerisierung aktiviert, wodurch Parkin an die äußere mitochondriale Membran rekrutiert wird. Parkin ubiquitiniert Proteine auf der äußeren mitochondrialen Membran. Diese ubiquitinierten Proteine werden von Autophagie-Rezeptoren erkannt und verschmelzen das Mitochondrium mit dem Autophagosom [40,41]. Eines der wichtigsten Strukturproteine der Autophagosomen ist LC3B, das zum Nachweis von Autophagosomen genutzt wird [42]. Das Autophagosom besteht aus einer Doppelmembran, in die die *autophagy related* Proteine (ATG Proteine) integriert sind. Nach der Aufnahme der Zellorganellen in das Autophagosom, verschmilzt die äußere Membran der Doppelmembran des Autophagosoms und die einfache Membran des Lysosoms und bilden zusammen das Autolysosom [43]. Im Autolysosom verdauen Hydrolasen die internalisierten Zellorganellen und Proteine und geben die Produkte, wie Aminosäuren oder Fettsäuren, ins Zytosol ab und können dort wiederverwertet werden [44].

1.4. Apoptose

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist ein evolutionär konservierter Prozess. Die Apoptose ist charakterisiert durch Zellschrumpfung, Kondensation, Fragmentierung der DNA, Membran-Ausstülpungen und der Abschnürung sog. „apoptotischer Körperchen“ [45]. Die apoptotischen Zellen werden von Makrophagen abgebaut [46]. Im Gegensatz zum aktiven physiologischen Prozess der Apoptose ist die Nekrose ein passiver, unphysiologischer Prozess, bei dem die Zellen anschwellen und schließlich platzen, sodass der Zellinhalt freigesetzt wird und eine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird [47]. Die Apoptose kann durch extrazelluläre (extrinsische) oder intrazelluläre (intrinsische) Signale induziert werden.

1.4.1. Der Extrinsische Apoptose-Signalweg

Der Extrinsische Signalweg der Apoptose wird durch Bindung von Todesliganden an die zugehörigen Todesrezeptoren auf der Zellmembran vermittelt. Todesrezeptoren gehören zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNF-R). Die Todesrezeptoren besitzen eine extrazelluläre TNF-R typische Cystein-reiche Domäne aufweisen, sowie eine homologe, zytoplasmatische Todesdomäne [48]. Zu den Todesrezeptoren gehören *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1* (TRAIL-R1, *Death receptor 4* (DR4)), TRAIL-R2, (DR5), DR3, DR6, *p75-nerve growth factor receptor* (p75-NGFR), *ectodermal dysplasia receptor* (EDAR) und der am besten

untersuchte Todesrezeptor CD95 (Fas, Apo1) [49]. Bindung des Fas-Liganden (CD95L) an CD95 führt zum Rezeptor-Clustering und zur Bildung des „death inducing signaling complex“ (DISC) an der Todesdomäne. Am DISC werden daraufhin Caspasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*) aktiviert. Caspasen sind Cysteinproteasen, die Peptidbindungen von Zielproteinen spezifisch nach Aspartat schneiden können. Es wird unterschieden zwischen Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, 10), die weitere Caspasen aktivieren und so eine Caspasen-Kaskade auslösen und Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7), die wiederum Protein-Substrate spalten und schließlich zum Zelltod führen [50–52]. Caspasen werden als inaktive Form synthetisiert (Pro-Caspasen). Initiator-Caspasen werden aktiviert, indem sie durch die Bindung an Adapter-Proteine, bspw. im DISC, dimerisieren. Aktive Initiator-Caspasen schneiden daraufhin Effektor-Pro-Caspasen, wodurch diese wiederum aktiviert werden. Da eine Initiator-Caspase mehrere Effektor-Caspasen aktivieren kann, wird das Todessignal durch die Caspase-Kaskade verstärkt.

1.4.2. Intrinsischer Apoptose-Signalweg

Der intrinsische oder auch mitochondriale Apoptose-Signalweg wird durch Stress-Signale wie DNA-Schaden induziert. Im intrinsischen Apoptose-Signalweg wird die äußere mitochondriale Membran permeabilisiert (MOMP). Die äußere mitochondriale Membran ist im intakten Zustand nur für sehr kleine Moleküle durchlässig. Die MOMP wird durch Poren-Bildung durch die Bcl-2 Familien Mitglieder BAX und BAK hervorgerufen und es können Moleküle größer als 100 kDa aus dem Mitochondrium ins Zytosol gelangen [53]. Zu den aus Mitochondrien freigesetzten Proteinen zählen u.a. Cytochrom c und das Protein *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases* (SMAC). Cytochrom c initiiert die Bildung des Apoptosoms, einem Komplex aus heptameren APAF-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor 1*), Pro-Caspase-9, dATP und Cytochrom c. Die Initiator-Caspase-9 wird durch die Rekrutierung an das Apoptosom aktiviert, spaltet und aktiviert die Effektor-Caspasen 3 und 7, die schließlich zum Zelltod führen [54]. SMAC, das ebenfalls bei der MOMP freigesetzt wird, verstärkt den Apoptose-Stimulus, indem es IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) inhibiert. Ohne SMAC binden IAPs an Caspasen, wodurch diese nicht aktiviert werden können und nicht den Zelltod auslösen können.

Da MOMP das Schicksal der Zelle bestimmt, wird es in der Zelle sorgfältig reguliert, sodass es nicht unbeabsichtigt zum Zelltod kommt. Hierfür Hauptverantwortlich ist das

Gleichgewicht zwischen anti- und pro-apoptotischen Mitgliedern der BCL-2-Proteinfamilie. Diese Familie besteht unter anderem aus den anti-apoptotischen Proteinen BCL-2, BCL-xL und MCL-1, sowie den pro-apoptotischen Proteinen BAX und BAK und den BH-3-only Proteinen BID, BAD, NOXA und PUMA [55]. Während BCL-2 und BCL-xL MOMP verhindern, indem sie BAX und BAK inhibieren, können BH-3-only Proteine BAX und BAK aktivieren, indem sie die anti-apoptotischen BCL-2 Proteine inhibieren.

Der extrinsische Apoptose-Signalweg kann durch MOMP und Cytochrom c Freisetzung verstärkt werden, indem Caspase-8 das BH3-only Protein BID spaltet und das entstandene tBID (*truncated* BID) zum Mitochondrium transloziert und BAX und BAK aktiviert [56].

Lange Zeit galt MOMP und die Aktivierung der Caspasen als „*Point of no Return*“ für die Aktivierung des Zelltodes. Dieses Dogma gilt aber unter bestimmten Voraussetzungen nicht mehr. Es kann auch nur zu einer unvollständigen MOMP (iMOMP) kommen, was bedeutet, dass MOMP in vielen aber nicht allen Mitochondrien erfolgt. Ebenfalls bekannt ist eine miniMOMP, in der es nur in einem kleinen Anteil der Mitochondrien zu MOMP kommt. Dies kann durch Behandlung mit einer subletalen Dosis einer Substanz passieren [54]. MiniMOMP kann auch Caspasen auf subletalem Niveau aktivieren, führt jedoch zu DNA-Schäden und Aktivierung von nicht-apoptotischen Caspase-Signalwegen, die eine Transformation der Zelle fördern [54].

1.5. Resistenz gegen Cisplatin induzierter Apoptose

Die meisten Tumore der Ovarialkarzinom-Patientinnen sind Apoptose-sensitiv auf die initiale platinhaltige Chemotherapie. Es überleben jedoch einige Tumorzellen und es kommt mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit zu einem Rezidiv. Dieses Rezidiv ist oft weiterhin sensitiv gegenüber der Chemotherapie, aber es entwickeln sich mit zunehmender Dauer der Therapie mehr resistente Zellen. Die Aufklärung der Mechanismen der Resistenz gegenüber Cisplatin kann somit helfen, die Therapien zu verbessern.

1.5.1. Mechanismen der Cisplatin-Resistenz

Influx. Resistenzen gegenüber Cisplatin können durch eine verminderte intrazelluläre Konzentration von Cisplatin auftreten. Die intrazelluläre Konzentration ist gesenkt durch eine verminderte Aufnahme von Cisplatin. Bekannt ist, dass das Protein „copper

transport 1“ (CTR1), ein Transmembranprotein für die Kupfer-Aufnahme, eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Cisplatin spielt und eine niedrige Expression oder ein Knockout zu verminderter intrazellulärer Konzentration von Cisplatin führt [57,58].

Efflux. Ebenfalls kann ein erhöhter Efflux von Cisplatin zu niedriger intrazellulärer Konzentration von Cisplatin führen. Dabei spielen die Kupfer-Efflux-Proteine ATP7A und ATP7B, sowie die *Multidrug Resistance* Proteine MRP1, MRP2, MRP3 und MRP5 eine wichtige Rolle. Eine erhöhte Expression oder Aktivität kann zu Cisplatin-Resistenz führen [59].

Nucleotide Excision Repair (NER). Ein weiterer Mechanismus für Cisplatin-Resistenzen ist die DNA-Schadensreparatur-Maschinerie. Die Cisplatin-DNA-Addukte werden hauptsächlich von der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) entfernt. Eine erhöhte Reparatur kann zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin führen [59,60]. Das bekannteste Protein im Zusammenhang mit Cisplatin Resistenz ist das NER-Protein „Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, Complementation Group 1“ (ERCC1).

Mismatch repair. Neben NER-Mechanismen sind auch die DNA-Mismatch-Reparaturproteine (MMR) in Cisplatin-Resistenzen involviert. Diese Proteine erkennen den Cisplatin-DNA-Schaden, den sie zwar nicht reparieren können, jedoch können sie die Apoptose einleiten. In Cisplatin-resistenten Zellen sind die MMR häufig mutiert oder runterreguliert. Wichtige MMR-Proteine in Cisplatin-Resistenzen sind MSH2 und MLH1 [59].

Veränderungen im Metabolismus. Nur die Wirkung von Cisplatin auf die nDNA zu betrachten ist genauso unzureichend wie nur Resistenzmechanismen in der Aufnahme und Abgabe von Cisplatin, sowie der DNA-Schadensreparatur zu untersuchen. Nur 1 % des intrazellulären Cisplatin bindet die nDNA [61]. Auch der Metabolismus spielt für die Resistenz gegenüber Cisplatin eine wichtige Rolle. Die Blockierung der Induktion von ROS führt zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin. Veränderungen im Antioxidationssystem der Zelle beeinflussen ebenfalls die Induktion der Apoptose nach Cisplatin-Inkubation. So kann durch Inhibition oder Knockout des Proteins *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (abgekürzt: NRF2; nicht zu verwechseln mit dem *Nuclear Respiratory Factor 2* der auch NRF2 abgekürzt wird) die Zytotoxizität von Cisplatin signifikant gesteigert werden [62]. NRF2 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription von antioxidativen Proteinen reguliert (z.B. die Glutamatcysteinylgase,

die für die GSH Synthese wichtig ist [63]) und daher wichtig für die Reaktion der Zelle auf oxidativen Stress ist [64]. In Cisplatin-resistenten A2780 Zellen wurde eine Überexpression von NRF2 und *downstream* Zielgenen nachgewiesen. Diese Zellen konnten für die Cisplatin induzierte Apoptose sensitiviert werden, indem die Expression von NRF2 durch siRNA reduziert wurde [65]. Dass eine erhöhte antioxidative Aktivität zu einer Cisplatin-Resistenz führt, zeigt auch die Überexpression des antioxidativen Proteins Peroxiredoxin 6 (Prdx6), wodurch ROS und die Cisplatin induzierte Apoptose reduziert wird [66].

Die mtDNA spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Cisplatin-Resistenzen. Der komplette Verlust der mtDNA in Zellen führt bei Cisplatin-sensitiven Zellen zur Resistenz gegenüber der Cisplatin induzierten Apoptose (siehe 1.2.2 Wirkungsmechanismus). Jedoch sind auch mtDNA Mutationen im Gen des Komplex I Proteins *Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2* (MT-ND2), die zu einer 50 % verringerten Aktivität von Komplex I führen, mit der Resistenz gegenüber Cisplatin assoziiert [67]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Cisplatin-resistente Zelllinien stärker abhängig von der Glykolyse zur ATP Generierung sind, als Cisplatin-sensitive Zelllinien, die eine höhere Abhängigkeit von der mitochondrialen ATP Erzeugung haben [15].

1.6. Ziele der Arbeit

Platinhaltige Chemotherapeutika sind wichtiger Bestandteil der Therapie gegen viele Tumorentitäten, wie die hochgradig serösen Ovarialkarzinome. Bei den meisten Patientinnen wird durch die platinhaltige Primärtherapie eine komplette Remission erreicht. Die meisten Patientinnen erleiden jedoch nach kurzer Zeit einen Rückfall, weshalb die 5-Jahres Überlebensrate der Ovarialkarzinompatientinnen gering ist (47 %). Die Chemotherapie überlebenden Tumorzellen haben Mechanismen, die sie vor dem Cisplatin induzierten Zelltod schützen. Die Mitochondrien und das Antioxidationssystem der Zelle spielen in der Chemoresistenz von Zellen eine wichtige Rolle. Die Wirkung von Cisplatin auf die Mitochondrien als zentraler Spieler in der Apoptose und der ROS-Induktion sind jedoch bisher nicht ausreichend erforscht. In dieser Arbeit wurden Cisplatin-resistente und Cisplatin-sensitive Ovarialkarzinomzellen auf Unterschiede in der mitochondrialen Masse und Aktivität untersucht und die direkte Wirkung von Cisplatin auf die Mitochondrien analysiert. Des Weiteren wurde die mitochondriale Aktivität in den Zellen moduliert, um die zelluläre

Antwort auf die Cisplatin-Inkubation zu verändern. Im Detail wurden folgende Fragestellung bearbeitet:

- Welche Rolle spielen die Mitochondrien oder mitochondriale Parameter (bzw. respiratorische Aktivität oder ROS-Produktion) für die Cisplatin Sensitivität gegenüber Cisplatin induzierter Apoptose?
- Welche Wirkung hat die Cisplatin-Inkubation auf die mitochondrialen Parameter?
- Von welchen zellulären Signalwegen ist der Cisplatin induzierte Zelltod abhängig?
- Kann durch Modulation der mitochondrialen Aktivität die Cisplatin vermittelte Induktion des Zelltodes gesteigert oder reduziert werden?

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zelllinien

In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Ovarialkarzinomzelllinien

Zelllinie	Herkunft
OVCAR3	NCI-60
OVCAR4	NCI-60
OVCAR5	NCI-60
OVCAR8	NCI-60
IGROV-1	NCI-60
A2780	NCI-60

2.1.2. Kultivierungsbedingungen

Alle Zelllinien wurden mit RPMI-1640-Medium und den folgenden Zusätzen kultiviert:

RPMI-1640	Biochrom, Berlin, Deutschland
10% (v/v) Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
0.1 g/l Penicillin/Streptomycin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
10 mM HEPES, pH 7.4	Merck, Darmstadt, Deutschland
2 mM L-Glutamine	Biochrom, Berlin, Deutschland
1 mM Natriumpyruvat	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
0.13 mM L-Asparagine	Serva, Heidelberg, Deutschland
0.05 mM 2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
1 mM SDS	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
1x nicht essenzielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin, Deutschland

Die Zellen wurden bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Hierfür wurde die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst.

Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten	Corning, Corning, USA
Trypsin/EDTA	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Sterilbank	Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland
Trypan Blau 0.5 % (w/v)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lochplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
15 ml und 50 ml Polypropylenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Phosphate-buffered saline (PBS) (0,27 M NaCl, 0,005 M KCl, 0,015 M Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, 0,003 M KH ₂ PO ₄)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Rottana/S Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.3. Kryokonservierung

Um starke genetische Veränderungen in den Zelllinien zu vermeiden, wurden die Zelllinien alle 3 - 4 Monate durch kryokonservierte Zelllinien ersetzt.

Zur Kryokonservierung wurden 10⁶ Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO) gelöst und über Nacht in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80 °C gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Zur Reaktivierung wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut und direkt in 10 ml Medium überführt, zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, Raumtemperatur (RT)), in frischem Medium resuspendiert und weiterkultiviert.

DMSO	Sigma Aldrich, München, Deutschland
5100 Cryo 1 °C Einfrierbox „Mr. Frosty“	Nalgene Nunc, Rochester, New York, USA
1,8 ml Cryo Tube TM	Nalgene Nunc, Rochester, New York, USA,

2.1.4. Kultivierung von Primärmaterial

Für die verwendeten Proben lagen, gemäß der Deklaration von Helsinki, ein Ethikvotum und eine Einverständniserklärung der Patienten vor.

Das frische Patientenmaterial wurde mit Hilfe eines Vibratoms in kaltem PBS + 0,1 % Penicillin Streptomycin (Pen Strep) zu ca. 300 µm dicken Schnitten geschnitten. Die Schnitte wurden in einer 24-Loch Platte einzeln bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die Schnitte in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, in der Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhaus entwässert und in Paraffin eingebettet.

Vibratoms VT1200 S	Leica Biosystems, Buffalo Grove, Illinois, USA
4% Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.5. Bestimmung der Lebendzellzahl und Proliferationsrate

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden die Zellen in einer definierten Zellzahl in einer 6-Loch-Platte ausgesät und die Zellzahl in den vier nachfolgenden Tagen gemessen. Hierfür wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet und anschließend mit einer Trypanblau-Färbung angefärbt. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der nicht membrangängig ist und daher nur in toten Zellen ohne intakte Zellmembran akkumuliert. Die Zellen wurden anschließend auf EVE™ Objektträgern zur Zellzählung aufgetragen und mit dem Gerät EVE™ Automatisierter Zellzähler gezählt.

EVE™ Automatisierter Zellzähler	VWR, Darmstadt, Deutschland
EVE™ Objektträger zur Zellzählung	VWR, Darmstadt, Deutschland

2.1.6. Generierung der Sub-Klone aus OVCAR3

Zur Generierung der Sub-Klone von OVCAR3 wurde 1000 Zellen in eine Petrischale ausgesät. Nachdem sich Kolonien ausgebildet haben, wurden diese getrennt gepickt. Zum Picken wurde ein steriler Silikonring um die Kolonie befestigt und die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Kolonie wurde daraufhin in eine 96-Loch-Platte überführt und bei Konfluenz in eine größere Platte bzw. Zellkulturflasche überführt. Es dauerte ungefähr 3-4 Wochen bis eine T175-Zellkulturflasche konfluent bewachsen war und die Zellen daraufhin kryokonserviert wurden.

2.2. Reagenzien

2.2.1. Cisplatin-Inkubation

Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin) bindet die DNA und bildet Quervernetzungen, sogenannte Cisplatin-DNA-Addukte, aus. Die Zelllinie und Sub-Klone wurden mit 10 μM Cisplatin für 48 h und das Primärmaterial mit 13 μM Cisplatin für 72 h inkubiert.

Cisplatin

Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart,
Deutschland

2.2.2. Caspasen-Inhibition

Caspasen sind Cysteinproteasen und die wichtigsten Enzyme in der Induktion der Apoptose. z.VAD.fmk (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-aspartyl-[O-methyl]-fluormethylketon) ist ein Pancaspase-Inhibitor, der an das katalytische Zentrum der Caspasen bindet und damit die Aktivität der Caspasen inhibiert. Die Zellen wurden mit 50 μM z.VAD.fmk 2 h vorinkubiert und anschließend mit und ohne Cisplatin für 48 h kultiviert.

z.VAD.fmk

Selleckchem, München, Deutschland

2.2.3. ROS-Fänger

Glutathion (GSH) fängt freie Sauerstoffradikale ab, indem es oxidiert wird und von seiner monomeren Form GSH in ein Dimer GSSG übergeht. Die Zellen wurden mit 2 mM GSH 2 h vorinkubiert und anschließend mit und ohne Cisplatin für 48 h kultiviert.

Glutathion

Sigma Aldrich, München, Deutschland

2.2.4. PARP-Inhibition

PJ34, Rucaparib und Olaparib sind Inhibitoren der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1). Rucaparib und Olaparib sind zugelassene Medikamente in der Therapie für Ovarialkarzinome [6]. Die Zellen wurden mit 8 μM PJ34 0,4 μM Rucaparib und 3 μM Olaparib 2 h vorinkubiert und anschließend mit und ohne Cisplatin für 48 h kultiviert.

PJ34	Selleckchem, München, Deutschland
Rucaparib	Selleckchem, München, Deutschland
Olaparib	Selleckchem, München, Deutschland

2.2.5. Inhibition der ATP-Synthase

Oligomycin A inhibiert die ATP-Synthase indem es den Protonen-Kanal blockiert, der für die Produktion von ATP aus ADP + Phosphat notwendig ist. Die Zellen wurden mit 5 μ M Oligomycin 2 h vorinkubiert und anschließend mit und ohne Cisplatin für 48 h kultiviert.

Oligomycin A	Sigma Aldrich, München, Deutschland
--------------	-------------------------------------

2.2.6. Induktion von mtROS

Das mtROS Level der Zellen wurde gesteigert indem die Zellen mit H₂O₂, VLX600, Rotenone, Antimycin, hochdosierter Ascorbinsäure und dem UCP2-Inhibitor Genipin inkubiert wurden. VLX600 ist ein Eisenchelator der eine mitochondriale Dysfunktion verursacht. Rotenone (Komplex I) und Antimycin A (Komplex III) sind mitochondriale Komplex-Inhibitoren die mtROS induzieren. Ascorbinsäure in niedriger Konzentration wirkt als Antioxidationsmittel, jedoch erzeugt es ROS in hohen Konzentrationen [68,69]. Die Uncoupling Proteine (UCPs) der Mitochondrien sind Teil einer autoregulatorische Rückkopplungsschleife, die bei Stress aktiviert werden. UCP2 wird durch mtROS aktiviert und reduziert das mitochondriale Membranpotential durch die Leckage von Protonen durch die innere mitochondriale Membran, wodurch weniger mtROS erzeugt wird [70–72]. Die Zellen wurden mit 300 μ M H₂O₂, 2 mM Ascorbinsäure, 2 μ M VLX600 oder 6 μ M VLX600 vorinkubiert und anschließend mit und ohne Cisplatin für 48 h kultiviert. Die Genipin-Inkubation erfolgte gleichzeitig mit der Cisplatin-Inkubation in einer Konzentration von 100 μ M Genipin.

H ₂ O ₂	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, Deutschland
L(+)-Ascorbinsäure	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Genipin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
VLX600	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Rotenone	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Antimycin A	Sigma Aldrich, München, Deutschland

2.2.7. Steigerung der Expression von PGC1 α

Die Expression von PGC1 α kann über den Signalweg von Cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und löslicher Guanylylcyclase (sGC) gesteigert werden [73]. BAY 41-2272, ein Aktivator von sGC, und Sildenafil, dass durch die Inhibition der Phosphodiesterase-5 das cGMP Level erhöht, wurden in dieser Arbeit verwendet, um die Expression von PGC1 α in der Zelle zu steigern. Die Zellen wurden 2 Woche mit 1 μ M BAY 41-2272, 4 μ M BAY 41-2272, 25 μ M Sildenafil und 50 μ M Sildenafil kultiviert und anschließend mit Cisplatin inkubiert.

BAY 41-2272	Selleckchem, München, Deutschland
Sildenafil	Selleckchem, München, Deutschland

2.2.8. Inhibition der Autophagie

Liensinine blockiert die Verschmelzung von Lysosom und Autophagosom zum Autophagolysosom und inhibiert somit die Autophagie [74]. Die Zellen wurden mit 40 μ M Liensinine 2 h vorinkubiert und anschließend mit und ohne Cisplatin für 48 h kultiviert.

Liensinine	ChemFaces Biochemical, Wuhan, China
------------	-------------------------------------

2.3. Analysen im Durchflusszytometer

2.3.1. Zellviabilitäts-Assays

Während der frühen Apoptose der Zellen kommt es zum Verlust der Zellmembransymmetrie indem das Phospholipid Phosphatidylserin von der inneren Membranseite auf die äußere transloziert. Dieses Phospholipid wird hoch affin von Annexin V gebunden, welches mit Fluoreszein Isothiocyanat (FITC) oder Allophycocyanin (APC) konjugiert ist. PI ist eine fluoreszierende, in die DNA interkalierende Substanz, die durch eine intakte Zellmembran nicht in lebende Zellen eindringen kann. Während der späten Apoptose wird die Zellmembran permeabel und somit kann PI, aber auch Annexin V, an der inneren Membran binden. Gehen Zellen von einem Annexin V/PI negativen Status in einen Annexin V positiven, PI negativen (frühe Apoptose) Status und danach in einen Annexin V/PI positiven Status über, ist es ein guter Hinweis, dass die Zellen die Apoptose durchlaufen haben, statt einer Nekrose. Bei einer Nekrose sind die Zellen sofort Annexin V/PI positiv. Die Zellen

wurden nach der Inkubation pelletiert (5 min, 1400 rpm, RT), einmal mit PBS gewaschen und anschließend einmal mit Annexin V/PI-Bindepuffer (ABP; (0,1 M HEPES/NaOH pH 7,4; 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) gewaschen. Danach folgte die Inkubation für 15 min im Dunkeln mit 70 µl der Annexin V/PI-Färbelösung (5 % (v/v) Annexin V, 2,5 % (v/v) PI (50 µg/ml), 92,5 % (v/v) ABP). Zur Analyse am Durchflusszytometer wurden zusätzlich 400 µl ABP zugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe der CELLQuest-Software am FACSCalibur™ oder der BD FACSuite™ Research Software am FACSLyric™ analysiert und ausgewertet. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet.

Annexin V-FITC	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Annexin V-APC	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Propidiumiodid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Fluorescence Activated Cell Analyzer "FACSCalibur™"	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Fluorescence Activated Cell Analyzer "FACSLyric™"	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
CELLQuest-Software	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
BD FACSuite™ Research Software	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA

2.3.2. Messung der mitochondrialen Masse

Zur Bestimmung der mitochondrialen Masse wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Mitotracker Green oder 10-Nonylacridineorange (NAO) gefärbt. Mitotracker Green diffundiert durch die Zellmembran und akkumuliert in aktiven Mitochondrien, unabhängig vom mitochondrialen Membranpotential. An den Mitochondrien bindet es mitochondriale Proteine, indem es mit freien Thiol-Gruppen von Cystein-Resten reagiert [75]. NAO akkumuliert ebenfalls in Mitochondrien indem es Cardiolipin, ein Mitochondrien-spezifisches Lipid, bindet [76]. Die Zellen wurden mit 200 nM Mitotracker Green oder 2 µM NAO in RPMI-Medium für 30 min bei 37 °C gefärbt, 3x mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst und zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, RT). Die Zellen wurden in 300 µl PBS resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert.

MitoTracker™ Green FM	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
10-Nonylacridineorange	Sigma Aldrich, München, Deutschland

2.3.3. Messung des mitochondrialen ROS Levels

Zur Bestimmung des mitochondrialen ROS Levels wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX Red gefärbt. MitoSOX Red ist Zellmembranpermeabel und akkumuliert im Mitochondrium. Im Mitochondrium wird es durch Superoxide oxidiert und fluoresziert nachdem es an die mitochondriale DNA gebunden hat. Die Zellen wurden geerntet mit Trypsin/EDTA, zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, RT), gezählt und 200.000 Zellen mit 600 µl der Färbelösung (5 µM MitoSOX Red in PBS) bei 37 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und am Durchflusszytometer analysiert.

MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
--	---

2.3.4. Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) gefärbt. TMRM ist Zellmembrangängig und akkumuliert in intakten Mitochondrien und die Fluoreszenzemission korreliert mit dem mitochondrialen Membranpotential. Bei Verlust des Membranpotentials ist TMRM im Zytosol verteilt und hat eine deutlich schwächere Fluoreszenzemission. Die Zellen wurden geerntet mit Trypsin/EDTA, zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, RT), gezählt und 200.000 Zellen mit 600 µl der Färbelösung (50 nM TMRM in Medium) bei 37 °C für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und am Durchflusszytometer analysiert.

Tetramethylrhodamine methyl ester	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
-----------------------------------	---

2.3.5. Messung des Zellzyklus der Zellen

Zur Bestimmung des Zellzyklus wurde der DNA-Gehalt der Zelle mit Hilfe von PI gemessen und zusätzlich der Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA während der Replikation analysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff PI interkaliert in die doppelsträngige DNA, weshalb die Emission der Fluoreszenz mit dem DNA-Gehalt der Zelle korreliert. BrdU ist ein Uridinderivat, dass während der Replikation statt Thymidin in die DNA eingebaut werden kann. Das BrdU kann daraufhin mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Zellen in der G1-Phase sind somit BrdU negativ und

haben einen doppelten Chromosomensatz. Zellen in der S-Phase replizieren die DNA, bauen BrdU in ihr Genom ein und sind somit BrdU positiv und haben einen DNA-Gehalt zwischen einem doppelten und vierfachen Chromosomensatz. Zellen in der G2-Phase hingegen sind BrdU negativ und haben einen vierfachen Chromosomensatz und daher den doppelten DNA-Gehalt als G1-Phase-Zellen. Die Zellen wurden 45 min vor der Ernte mit 10 μ M BrdU inkubiert, damit die Zellen, die sich in der S-Phase befinden, BrdU in ihr Genom einbauen können. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet und mit eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 N HCl + 5 % Triton X-100 für 30 min denaturiert und mit 0,1 M Boraxlösung neutralisiert. Anschließend wurden die Proben mit Blockinglösung (1% (v/v) BSA, 0,5% (v/v) Tween 20 in PBS) für 30 min geblockt und für 30 min bei 4 °C mit Anti-BrdU-Antikörper inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Blockinglösung wurden die Proben mit FITC-markiertem Sekundärantikörper für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1 % Glucose in PBS wurde die Proben mit PI-Färbelösung (50 mg/ml PI, 1 mg/ml RNase A, 1 % Glucose, in PBS) für 10 min bei RT inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert.

Triton X-100	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
BrdU	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Anti-BrdU- Antikörper	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
GAM-FITC Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
RNase A	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.3.6. Messung des autophagosomalen Umsatzes der Zelle

Zur Bestimmung des autophagosomalen Umsatzes der Zelle, wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cytold gefärbt. Cytold ist membrangängig und akkumuliert in den Autophagosomen mit einer schwachen Affinität für Lysosomen [77]. Die Zellen wurden geerntet mit Trypsin/EDTA, zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, RT), gezählt und 200.000 Zellen mit 500 μ l der Färbelösung (1 μ l CYTO-ID® Green Detection Reagent in 1 ml 1x Assay Buffer) bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1x Assay Buffer gewaschen und am Durchflusszytometer analysiert.

CYTO-ID® Autophagy Detection Kit

Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach,
Deutschland

2.4. Proteinanalysen

2.4.1. Proteinextraktion

Die Zellen wurden abhängig vom jeweiligen Experiment in einer definierten Zellzahl ausgesät und für die angegebene Zeit kultiviert bevor sie mit Trypsin/EDTA geerntet wurden. Nach einem Waschschritt mit kaltem PBS und dem Entfernen des Überstandes, wurden die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Zelllyse wurden die Pellets in Lysepuffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 5 mM EDTA, pH 8,0) mit zugesetzten Protease- als auch Phosphatase-Inhibitoren gelöst. Zur Lyse der Zellen, wurden sie sonifiziert (50 Zyklen, 20 sek) und abzentrifugiert (4°C, 13000 rpm, 15 min). Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde der Überstand zuerst in ein neues Aliquot überführt und anschließend 1 µl Probe mit 799 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz vermischt. Ebenso wurde zur Erstellung einer Standardkurve eine Bovines Serumalbumin (BSA)-Verdünnungsreihe hergestellt. Die photometrischen Messungen zur Bestimmung der optischen Dichten erfolgten bei 595 nm.

TRIS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich, München, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
PhosphoSTOP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ultraschall Homogenisator Sonopuls HD200 MS72 Mikrospritze aus Titan	Bandelin Elektronik, Berlin, Deutschland
Advanced protein assay reagent	Cytoskeleton Inc., Denver, USA
BSA	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Novaspec II Visible Spectrophotometer	GE Healthcare, München, Deutschland

2.4.2. Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE

Jeweils identische Proteinkonzentrationen wurden mit 1x Lämmli-Puffer (62,5 mM Tris/HCl, 20% (v/v) Glycerol, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 1%

Bromphenolblau, pH 6,8) verdünnt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Proteine wurden daraufhin mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt (SDS-PAGE). Die verwendeten Gele bestehen aus Acrylamid, 1,5 mM Tris Puffer pH 8,8 und SDS. Abhängig vom Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine variierte die Dichte der Gele durch unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen. Proteine mit niedrigem Molekulargewicht wurden mit hochprozentigen Acrylamidgelen aufgetrennt und Proteine mit hohem Molekulargewicht mit niederprozentigen Gelen aufgetrennt. Zur Größenidentifikation wurde zusätzlich ein Proteinmarker aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgte bei konstanten 6 mA über Nacht mit Hilfe des Elektrophoresepuffers (25 mM Tris-Base, 0,2 M Glycin, 1% SDS) in einer Elektrophoresekammer.

Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
30 % Acrylamid/Bis-Lösung, 37,5:1	Bio-Rad, München, Deutschland
40 % Acrylamid/Bis-Lösung, 37,5:1	Bio-Rad, München, Deutschland
Vertikal-Elektrophoresekammer, Protean® II xi Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Prestained Protein Marker, Broad Range	Cell Signaling, Danvers, USA

2.4.3. Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch mit Hilfe einer Trans-Blot® Semi-Dry Transferkammer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde in der Kammer das Gel auf die Membran und auf drei Lagen in Transferpuffer (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M Glycin, 20% (v/v) Ethanol, 1% (w/v) SDS) eingelegtes Filterpapier gelegt. Über das Gel wurden weitere drei Lagen in Transferpuffer eingelegtes Filterpapier gelegt. Gebloftet wurde mit konstanten 1,5 mA / cm² für 90 min. Geblockt wurde für 60 min mit 5 % (w/v) Magermilch in TBST (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris-Base, 0,1 % (v/v) Tween 20, pH 7,4). Nach 3 Waschschritten mit TBST, erfolgte die Inkubation mit Primärantikörpern (Tabelle 2) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der Blot viermal je 15 min in 1x TBST gewaschen und anschließend für 1 h bei

RT mit einem Peroxidase(POD)-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 3) inkubiert. Nach erneuten Waschschritten wurde mittels „SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate“ das Signal detektiert am LAS-1000. Die Kontrolle der Beladungen wurde durch Inkubieren mit *Stripping*-Puffer für 15 min bei RT und einer erneuten Antikörperfärbung gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein sogenanntes *House-keeping*-Gen, bestätigt.

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
Anti-Bak #3814	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA	1:1000 in 5 % (w/v) BSA in TBST
Anti-Bax #2772	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA	1:1000 in 5 % (w/v) BSA in TBST
Anti-GAPDH (14C10) #2118	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA	1:2000 in 5 % (w/v) Magermilch in TBST
Anti-TFAM (D5C8) #8076	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA	1:1000 in 5 % (w/v) BSA in TBST
Anti-PGC1 alpha (ab54481)	Kaninchen	Abcam, Berlin, Deutschland	1:1000 in 5 % (w/v) Magermilch in TBST
Anti-UCP2 (D1O5V) #89326	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA	1:1000 in 5 % (w/v) Magermilch in TBST

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
anti-rabbit-IgG-HRP	Ziege	Cell Signaling, Danvers, USA	1:2000 in 5 % (w/v) Magermilch in TBST

KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Amersham Protran 0,45 µm	GE Healthcare, München, Deutschland
Nitrocellulose Membran	
Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Filterpapier „Gel-Blotting Papier“	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Magermilchpulver	Sigma Aldrich, München, Deutschland

SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce Biotechnology, Waltham, USA
LAS-1000, Luminescent imager	Medical Systems, Stamford, USA

2.4.4. Immunhistochemie

Zur Bestimmung des Protein Levels von TFAM im Primärmaterial wurde der in Paraffin eingebettete Tumor mit einem Mikrotom in 3 µm starke Schnitte geschnitten und auf einen Objektträger aufgetragen. Zur Fixierung der Schnitte auf den Objektträger, wurde dieser über Nacht bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Neo-Clear vom Paraffin befreit und durch eine absteigende Alkoholreihe (100 % Ethanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol, H₂O für jeweils 3 min inkubiert) rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte in einem Dampfgarer für 30 min in vorgewärmtem Citratpuffer pH 6 vorbehandelt, nach dem Abkühlen gewaschen mit TBST, mit Peroxidase Blocking für 10 min geblockt und mit dem Primärantikörper (Tabelle 4) für 60 min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Schnitte mit dem Peroxidase-markiertem Polymer *rabbit/mouse* Sekundärantikörper für 30 min bei RT inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten wurden die Schnitte mit dem Substrat Chromogen (1:50 in Puffer) für 10 min inkubiert. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte mit Hämalaunlösung nach Mayer gegengefärbt und unter fließendem Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100% Ethanol) dehydriert, in Neo-Clear gewaschen und mit Eindeckmedium eingedeckelt.

Die Bilder der gefärbten Schnitte wurden mit einem Objektträger-Scanner-Mikroskop aufgenommen.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
Anti-TFAM (D5C8) #8076	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA	1:200 in 5 % (w/v) BSA in TBST

Rotationsmikrotom RM 2255	Leica Microsystems, Wetzlar
Citratpuffer, pH 6	DakoCytomation, Dänemark
Dako Envision Kit	DakoCytomation, Dänemark
Neo-Clear	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Peroxidase markierter Polymer HRP rabbit/mouse	DakoCytomation, Dänemark
Olympus VS120	Olympus, Hamburg, Deutschland

2.4.5. Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung des Protein Levels und der Lokalisation von LC3B wurde die Zellen mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Dafür wurden die Zellen auf beschichtete Kammerobjektträger ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10 μ M Cisplatin für 48 h inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA für 30 min fixiert. Im weiteren Schritt wurden die Zellen mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 20 min bei RT permeabilisiert, und mit Blocking-Lösung (1 % BSA, 2 % FCS in PBS) für 30 min bei RT geblockt. Nach dem Blocken wurden die Zellen für 1 h mit Primärantikörpern (Tabelle 5) inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Zellen für 1 h bei RT mit Sekundärantikörpern inkubiert wurden. Nach weiteren drei Waschschritten wurden die Zellen mit Eindeckmedium, dass DAPI enthält, eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

Die Bilder der Zellen wurden am nächsten Tag mit einem Konfokalen-Mikroskop erstellt.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
Anti-LC3B (D11)	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA	1:200 in Blocking- Lösung
anti-Rabbit IgG (H+L) Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	Hühnchen	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland	1:500 in Blocking- Lösung

Super-Frost-Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Konfokales Mikroskop - Leica TCS SP8	Leica Microsystems, Wetzlar

2.5. Messung der Sauerstoffverbrauchsrate

Die Sauerstoffverbrauchsrate der Zellen wurde in einem Seahorse Extracellular Flux Analyzer mit einem MitoStress-Test gemessen. Dafür wurden, 18 h vor der Messung, die Sensorkartuschen-Platte mit Kalibrierungslösung hydratisiert und das Seahorse-Medium mit 1 mM Pyruvat, 2 mM Glutamin und 10 mM Glukose versetzt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Am Tag des Assays wurden die Zellen geerntet, 35.000 Zellen im Seahorse-Medium gelöst, in die Seahorse Cell Culture Platte überführt und zentrifugiert (200 g, 1 min, RT, ohne Bremse). Für den MitoStress-Test wurden mit einem finalen Volumen im Well von 1,5 μ M Oligomycin A, 1 μ M FCCP und 0,5 μ M Rotenone/Antimycin A (jeweils in Seahorse-Medium verdünnt), die Substanzen in die Einspritzöffnungen A, B und C vorgelegt.

Das Schema des MitoStress-Tests ist in Abbildung 2 abgebildet. Für die Messung des Sauerstoffverbrauchs wird die Sauerstoffkonzentration im Medium für 3 min gemessen. Die Differenz zwischen der Sauerstoffkonzentration am Ende der Messung und dem Anfangswert ist der Sauerstoffverbrauch der Zellen. Vor jeder Messung wird die Platte 3 min geschüttelt, damit der Sauerstoffgehalt wieder auf den Ausgangswert zurückgeht. Jeder Wert wird in 3 Messungen bestimmt.

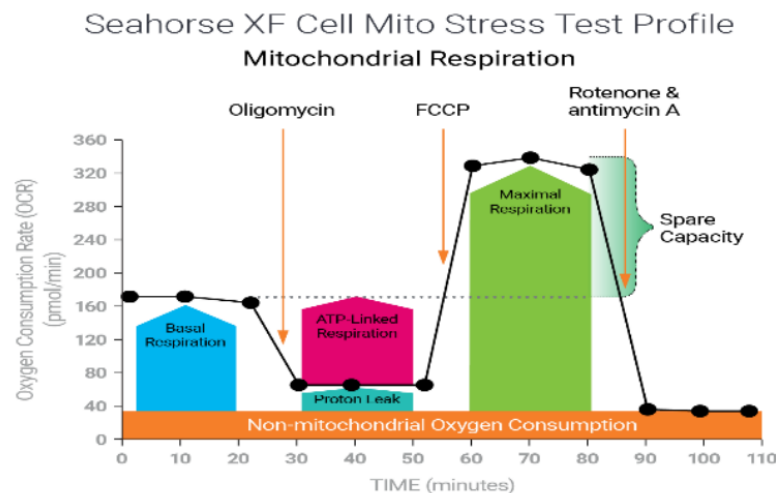


Abbildung 2: Schema des Agilent Seahorse XF Cell MitoStress-Test. Die basale Respiration wird in den ersten 3 Messungen bestimmt. Die Differenz zwischen dem gemessenen Sauerstoffverbrauch und dem später ermittelten nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch ist die basale Respiration. Nach jeder Injektion wird der Sauerstoffverbrauch ebenfalls in 3 Messungen bestimmt. Nach der Injektion des ATP-Synthase-Inhibitors Oligomycin A sinkt der Sauerstoffverbrauch der Zellen. Diese Differenz korreliert mit der ATP-Produktion der Zellen. Die Differenz zwischen dem gemessenen Wert und der nicht-mitochondrialen Respiration korreliert mit der Protonen-Leckage. Die Elektronentransportkette pumpt Protonen in den Intermembranraum, die jedoch durch die Inhibition der ATP-Synthase nicht für die ATP-Produktion genutzt werden können, sondern durch die Membran diffundieren oder von Uncoupling Proteinen zurück in die mitochondriale Matrix befördert werden. Nach der Injektion mit dem Entkoppler FCCP steigt der Sauerstoffverbrauch stark an, da die Elektronen ungehindert durch die Elektronentransportkette durchströmen können. Die Differenz aus dem gemessenen Wert und der nicht-mitochondrialen Respiration ist die maximale Respiration der Mitochondrien. Die Differenz zwischen der maximalen Respiration und dem Sauerstoffverbrauch nach der ATP-Synthase-Inhibition durch Oligomycin A ist die freie Atmungskapazität (engl.: spare capacity). Nach der Injektion der Komplex I- und Komplex III-Inhibitoren Rotenone und Antimycin A sinkt der Sauerstoffverbrauch auf den nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch. Die Elektronentransportkette ist vollständig inhibiert und die Mitochondrien können keinen Sauerstoff verbrauchen. Quelle: Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide [78].

Nach der Messung wurden Fotos im Mikroskop von jedem Well erstellt, um die Zellzahl zu bestimmen und die Werte des Sauerstoffverbrauchs auf die Zellzahl zu normalisieren. Dafür wurde die Software ImageJ genutzt. Die Auswertung des MitoStress-Tests erfolgte mit der Wave Software.

Glukose	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit	Agilent, Santa Clara, USA
Seahorse XFe96 FluxPak	Agilent, Santa Clara, USA
Seahorse XFe96 Analyzer	Agilent, Santa Clara, USA
Seahorse XF RPMI Medium	Agilent, Santa Clara, USA
Seahorse XF Calibrant Solution	Agilent, Santa Clara, USA
Wave 2.6.0	Agilent, Santa Clara, USA
ImageJ 1.46r	National Institutes of Health, USA
Olympus CKX41	Olympus, Hamburg, Deutschland

2.6. RNA-Interferenz

Zur Bestimmung des Einflusses von einzelnen Proteinen auf die Viabilität oder die mtROS-Produktion der Zellen nach Cisplatin-Inkubation, wurden diese Proteine (Tabelle 6) mit Hilfe der RNA-Interferenz runterreguliert. Dazu wurden die Zellen liposomal mit vier siRNAs gegen das entsprechende Zielgen transfiziert. Dabei wurde zuerst die siRNA mit Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium auf eine Konzentration von 400 nM verdünnt. Als Transfektionsreagenz wurde DharmaFECT1 1:25 mit Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium verdünnt, die verdünnte siRNA mit dem Transfektionsreagenz 1:1 gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde das Gemisch aus Transfektionsreagenz und der siRNA in einer Verdünnung von 1:10,7 auf die Zellen gegeben, sodass die Zellen mit einer Endkonzentration von 1:535 DharmaFECT 1 und 18,7 nM siRNA transfiziert wurden. 6 h nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und mit Zellkulturmedium ersetzt. Um einen vollständigen *Knock-down* zu gewährleisten wurden die Versuche 72 h nach der Transfektion durchgeführt. Zur Kontrolle des *Knock-downs* wurden jeweils vor Beginn und nach Ende des Versuchs Proteinproben genommen.

Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
DharmaFECT1	Dharmacon, Inc., Lafayette, USA

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten siRNAs

Genname	Gensequenz	
BAX	GAACUGAUCAGAACCAUCA	CUGAGCAGAUCAUGAAGAC
	ACAUGUUUUCUGACGGCAA	CAUUGGACUUCCUCCGGGA
BAK	CAGAGAAUGCCUAUGAGUA	CAACCGACGCUAUGACUCA
	CGACAUCAACCGACGCUAU	GCUUCGUGGUCGACUUCAU
PPARGC1A	GAGAAUUCAUGGAGCAAUA	CAAUGAGCCUUCAAACAUA
	GAAGAGCGCCGUGUGAUUU	AAAGAUGUCUCCUCUGAUU
TFAM	CGGAGUGGCAGGUUAUUA	GAAGAAUUGCCCAGCGUUG
	UCUUCUACGUCGCACAAUA	CCAAGAAGCUAAGGGUGAU
UCP2	GCAUCGGCCUGUAUGAUUC	AAGCCAACCUCAUGACAGA
	CCGAGAGGCUCCCUUCUGA	UCAAACAGUUCUACACCAA

2.7. Messung des ATP Levels

Zur Bestimmung des zellulären ATP Levels wurde das ADP/ATP ratio Assay Kit verwendet. Die Zellen wurden nach der Kultivierung geerntet mit Trypsin/EDTA, zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, RT), gezählt und 2000 Zellen in 10 µl PBS in eine weiße 96-Loch-Platte überführt. Daraufhin wurden 90 µl der ATP-Lösung (96,9 % (v/v) Assay-Puffer; 1,0 % (v/v) Substrat; 1,0 % (v/v) Co-Substrat; 1,0 % (v/v) ATP-Enzym) hinzugegeben. Die Platte wurde für 1 min bei RT inkubiert und daraufhin am EnSpire Multimode Plate Reader die Lumineszenz gemessen.

ADP/ATP Ratio Assay Kit

Sigma Aldrich, München, Deutschland

EnSpire Multimode Plate Reader

PerkinElmer, Inc, Waltham, USA

2.8. TCGA-Daten Analyse

Zur TCGA-Daten Analyse wurden die Daten des TCGA-OV-Projektes vom TCGA Research Network (<http://cancergenome.nih.gov/>) heruntergeladen. Die dazugehörigen RNA Expressions-Daten der Patientinnen wurden mit Hilfe des Human Protein Atlas Project (v15.0) ermittelt (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108064-TFAM/pathology/ovarian+cancer>) [79].

2.9. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5 for Windows. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) von mindestens drei unabhängigen Experimenten oder ein repräsentatives Experiment. Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-Test analysiert. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Bei Vergleichen mit mehreren Zelllinien und keiner Angabe eines Signifikanzniveaus wurde nur eine Tendenz festgestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Phänotypische Charakterisierung der Ovarialkarzinomzelllinien

3.1.1. Gruppierung der Zelllinien aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber dem Cisplatin induzierten Zelltod

Platinbasierte Chemotherapeutika wie Cisplatin binden kovalent an die DNA, was zu Doppelstrangbrüchen führen kann. Doppelstrangbrüche in der nukleären DNA können Apoptose in den betroffenen Zellen hervorrufen. Eine weitere wichtige, jedoch weniger gut untersuchte Zielstruktur von Cisplatin ist die mitochondriale DNA. Um den möglichen Einfluss der Mitochondrien auf die Sensitivität gegenüber Cisplatin induzierter Apoptose zu untersuchen, wurden Zelllinien von hoch serösen Ovarialkarzinomen aus dem NCI-60 Panel ausgewählt. OVCAR3, OVCAR4, OVCAR5, OVCAR8, IGROV-1, A2780 wurden mit 10 μ M Cisplatin inkubiert und die Zellviabilität nach 48 h mit Hilfe einer Annexin V/PI-Färbung durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 3).

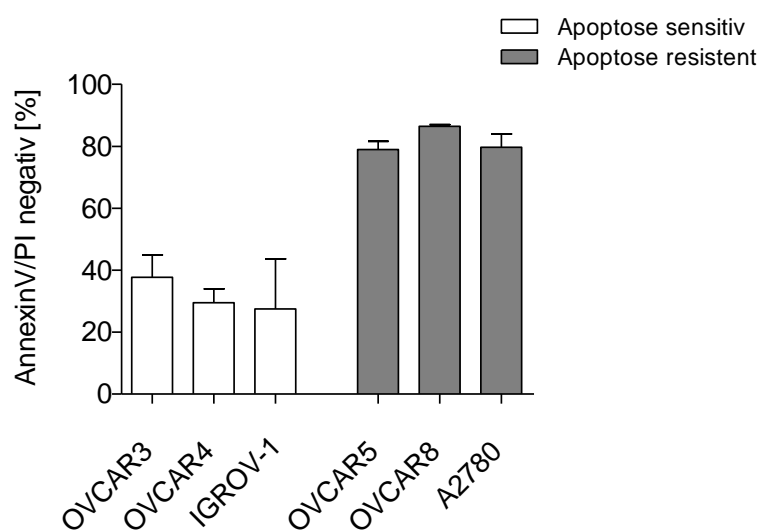


Abbildung 3: Gruppierung von Ovarialkarzinomzelllinien in Cisplatin-sensitiv und Cisplatin-resistent. Sechs NCI-60 Ovarialkarzinomzelllinien wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert, anschließend mit Annexin V/PI gefärbt und in einem Durchflusszytometer die Viabilität (Annexin V/PI) analysiert. Die Zelllinien OVCAR3, OVCAR4 und IGROV-1 zeigen eine verringerte Viabilität (unter 40%) nach der Cisplatin-Inkubation und wurden als Cisplatin-sensitiv eingestuft. Die Zelllinien OVCAR5, OVCAR8 und A2780 hingegen zeigen auch nach der Cisplatin-Inkubation eine hohe Viabilität (über 75%) und wurden als Cisplatin-resistent identifiziert. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

In den Zelllinien OVCAR3, OVCAR4 und IGROV-1 sinkt die Zellviabilität durch die Cisplatin-Inkubation durchschnittlich auf unter 40 %, wohingegen Cisplatin in den

Zelllinien OVCAR5, OVCAR8 und A2780 die Viabilität nur geringfügig reduziert (Viabilität über 75%). Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurden die Zelllinien in Cisplatin-sensitiv und Cisplatin-resistent gruppiert.

3.1.2. Die Mitochondriale Masse korreliert mit der Sensitivität gegenüber Cisplatin induziertem Zelltod in Ovarialkarzinomzelllinien

Zur Untersuchung des Einflusses der Mitochondrien auf die Cisplatin-Sensitivität wurde untersucht, ob Unterschiede in der mitochondrialen Masse in den Zelllinien der Cisplatin-sensitiven und der Cisplatin-resistenten Gruppe existieren. Hierfür wurden die Zellen mit dem Mitochondrien-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker Green inkubiert. Die Fluoreszenzeigenschaften von Mitotracker Green sind unabhängig vom mitochondrialen Membranpotential sodass die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge an Mitochondrien ist. Die Fluoreszenz der Mitotracker Green gefärbten Zellen wurde im Durchflusszytometer analysiert und die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten zur besseren Vergleichbarkeit auf die Werte der Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zelllinie normalisiert. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 (1,78-fach zu OVCAR8), OVCAR4 (1,23-fach zu OVCAR8) und IGROV-1 (1,56-fach zu OVCAR8) zeigen höhere Fluoreszenzsignale und dementsprechend eine höhere mitochondriale Masse als die Cisplatin-resistenten Zelllinien OVCAR5 (1,07-fach zu OVCAR8), OVCAR8 (1,0) und A2780 (0,66-fach zu OVCAR8) (Abbildung 4A). Der Mittelwert aller drei Cisplatin-sensitiven Zelllinien ist mit 1,52-fach zu OVCAR8 deutlich höher im Vergleich zu den drei Cisplatin-resistenten Zelllinien die einen einem Mittelwert von 0,98-fach zu OVCAR8 aufweisen.

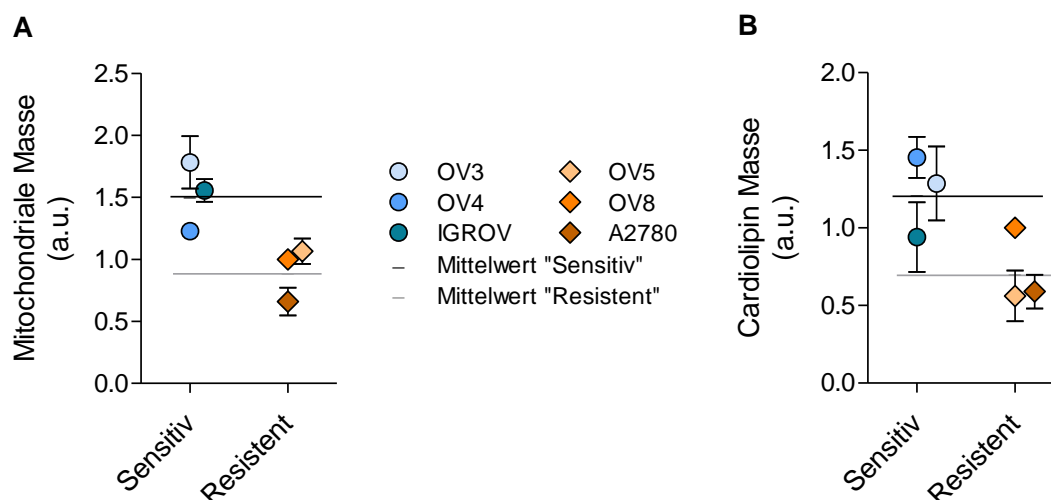


Abbildung 4: Cisplatin-sensitive Zelllinien haben eine höhere mitochondriale Masse als die Cisplatin-resistenten Zelllinien. Die Zellen von OVCAR3, OVCAR4, IGROV-1 (Cisplatin-sensitiv), OVCAR5, OVCAR8 und A2780 (Cisplatin-resistent) wurden mit **(A)** Mitotracker Green zur Bestimmung der mitochondrialen Masse, oder **(B)** mit 10-Nonylacridine orange zur Bestimmung des Mitochondrien-spezifischen Lipids Cardioliplin, gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien haben sowohl eine höhere mitochondriale Masse als auch ein höheres Level an Cardioliplin als die Cisplatin-resistenten Zelllinien. Die Daten wurden auf die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 normalisiert. Gezeigt sind Tendenzen zwischen den einzelnen Zelllinien. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde das Mitochondrien-spezifische Lipid Cardioliplin mit 10-Nonylacridineorange (NAO) gefärbt und die Zellen wiederum im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 4B). Relativ zu OVCAR8 ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 (1,29-fach zu OVCAR8), OVCAR4 (1,45-fach zu OVCAR8) und IGROV-1 (0,94-fach zu OVCAR8) höher als die der Cisplatin-resistenten Zelllinien OVCAR5 (0,56-fach zu OVCAR8), OVCAR8 (1,0) und A2780 (0,59-fach zu OVCAR8). Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien enthalten also im Einklang mit ihrem höheren Gehalt an Mitochondrien auch eine größere Menge an Cardioliplin als die Cisplatin-resistenten Zelllinien. Der Mittelwert aller drei Cisplatin-sensitiven Zelllinien zusammen ist mit 1,23-fach zu OVCAR8 höher als der der drei Cisplatin-resistenten Zelllinien zusammen, der 0,72-fach zu OVCAR8 beträgt. Aufgrund der höheren Menge an Cardioliplin in Cisplatin-sensitiven Zelllinien, untermauert dieser Befund die Hypothese, dass Cisplatin-sensitive Zellen eine höhere mitochondriale Masse als Cisplatin-resistente Zellen haben.

Die höhere mitochondriale Masse der Cisplatin-sensitiven Zelllinien legt eine höhere mitochondriale Aktivität nahe und dementsprechend einen höheren Sauerstoffverbrauch. Um den Sauerstoffverbrauch der Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zellen zu untersuchen, wurde die basale mitochondriale

Sauerstoffverbrauchsrate (*oxygen consumption rate*, OCR) aller 6 verwendeten Zelllinien in einem Seahorse Extracellular Flux Analyzer gemessen.

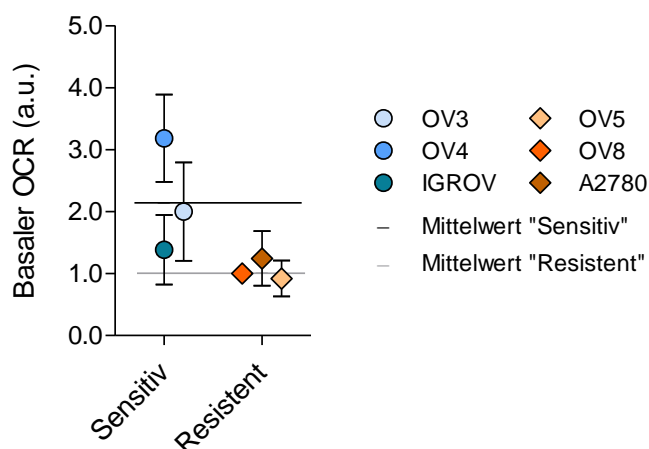


Abbildung 5: Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3, OVCAR4 und IGROV-1 haben eine höhere Sauerstoffverbrauchsrate als die Cisplatin-resistenten Zelllinien OVCAR5, OVCAR8 und A2780. Mit Hilfe eines Seahorse Extracellular Flux Analyzer wurde die basale mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) bestimmt. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien verbrauchen in Einklang mit ihrem höheren Gehalt an Mitochondrien mehr Sauerstoff als die Cisplatin-resistenten Zelllinien. Gezeigt sind Tendenzen zwischen den einzelnen Zelllinien. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die gemessene OCR wurde zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf den für die Zelllinie OVCAR8 bestimmten Wert normiert. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien haben jeweils eine höherer rel. OCR (OVCAR3: 2,0-fach, OVCAR4: 3,18-fach und IGROV-1: 1,38-fach) als die Cisplatin-resistenten Zelllinien (OVCAR5: 0,92-fach, OVCAR8: 1,0 und A2780: 1,24-fach) (Abbildung 5). Im Mittel zeigen die Cisplatin-sensitiven Zelllinien einen doppelt so hohen Sauerstoffverbrauch ($\bar{\varnothing} = 2,19$ -fach) im Vergleich zu den Cisplatin-resistenten Linien ($\bar{\varnothing} = 1,06$ -fach zu OVCAR8).

Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch bei der oxidativen Phosphorylierung geht zwangsläufig mit der Generierung von Sauerstoffradikalen ($O_2^{\cdot-}$) einher. Eine höhere mitochondriale Aktivität kann daher eine erhöhte Produktion toxischer mitochondrialer (mt) reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) zur Folge haben. Um dies in den Ovarialkarzinomzelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen mit MitoSOX Red gefärbt und in einem Durchflusszytometer analysiert. Wie erwartet zeigen die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 (1,41-fach zu OVCAR8), OVCAR4 (1,90-fach zu OVCAR8) und IGROV-1 (1,28-fach zu OVCAR8) basal einen höheren Gehalt an mtROS als die Cisplatin-resistenten Zelllinien OVCAR5 (0,85-fach zu OVCAR8) und OVCAR8 (1,0). Lediglich die Cisplatin-resistente A2780 hat ein leicht erhöhtes basales

mtROS Level (1,29-fach zu OVCAR8) (Abbildung 6). Der durchschnittliche Mittelwert aller drei Cisplatin-sensitiven Zelllinien ($\bar{\sigma} = 1,53$ -fach zu OVCAR8) ist um den Faktor 1,5 höher als der Mittelwert aller drei Cisplatin-resistenten Zelllinien ($\bar{\sigma} = 1,04$ -fach zu OVCAR8).

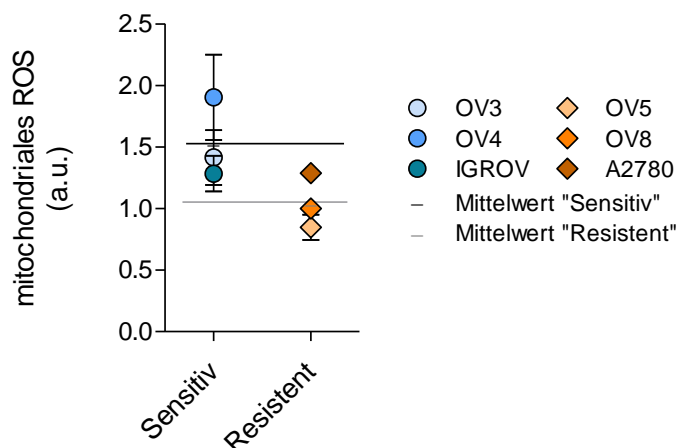


Abbildung 6: Cisplatin-sensitive Zelllinien haben ein höheres mitochondriales ROS Level als die Cisplatin-resistenten Zelllinien. Die Zellen von OVCAR3, OVCAR4, IGROV-1 (Cisplatin-sensitiv), OVCAR5, OVCAR8 und A2780 (Cisplatin-resistent) wurden mit MitoSOX Red zur Bestimmung des mitochondrialen ROS (mtROS) Levels gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien haben im Einklang mit der höheren mitochondrialen Masse und Aktivität ein höheres Level an mtROS als die Cisplatin-resistenten Zelllinien. Gezeigt sind Tendenzen zwischen den einzelnen Zelllinien. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zusammengenommen zeigen die Cisplatin-sensitiven Zelllinien eine höhere mitochondriale Masse einhergehend mit einer höheren mitochondrialen Aktivität und auch einer höheren mitochondrialen ROS-Produktion im Vergleich zu Cisplatin-resistenten Zelllinien.

3.1.3. Die Mitochondriale Masse korreliert mit der Sensitivität gegenüber Cisplatin induziertem Zelltod in Sub-Klonen von OVCAR3

Die Mitochondrien werden bei der Zellteilung heterogen zwischen Mutter- und Tochterzellen verteilt [80], sodass Zellen mit höherer mitochondrialen Masse und Zellen mit niedrigerer mitochondrialen Masse entstehen. Um dieses Phänomen auszunutzen, wurden monoklonale Sub-Klone der Cisplatin-sensitiven OVCAR3 hergestellt und ihre mitochondriale Masse analysiert. Dabei zeigen die Sub-Klone, wie erwartet, eine heterogene Verteilung der mitochondrialen Masse (Abbildung 7). Der Mittelwert der mitochondrialen Masse der Sub-Klone entspricht mit 1,09-fach fast dem Wert der parentalen OVCAR3 (1,0). Es sind jedoch sowohl klonale Linien mit einer

höheren mitochondrialen Masse als auch Klone mit einer geringeren mitochondrialen Masse entstanden.

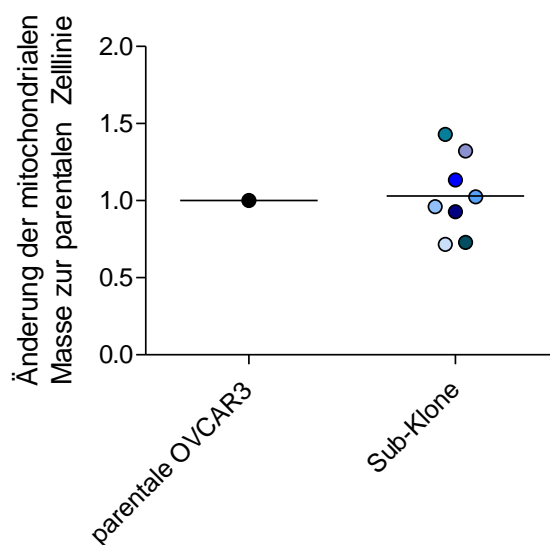


Abbildung 7: Sub-Klone von OVCAR3 haben eine heterogene Verteilung der mitochondrialen Masse. Die Sub-Klone von OVCAR3 wurden gepickt, für 2 Wochen expandiert und anschließend mit Mitotracker Green zur Bestimmung der mitochondrialen Masse gefärbt. Anschließend wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die parentale OVCAR3 normalisiert. Die Verteilung der mitochondrialen Masse ist heterogen um die parentale Zelllinie herum. Daher gibt es Klone die eine niedrigere mitochondriale Masse und Klone, die eine höhere mitochondriale Masse besitzen. Gezeigt ist der Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Daten sind in Zusammenarbeit mit Andrea Gaißler entstanden.

Die generierten klonalen OVCAR3 Sublinien wurden mit 10 μ M Cisplatin für 48 h inkubiert und ihre Viabilität im Durchflusszytometer analysiert. Die erhaltenen Messwerte zeigen, dass die Viabilität nach Cisplatin-Inkubation signifikant negativ ($r = -0,74$) mit der mitochondrialen Masse korreliert (Abbildung 8). Somit haben Klone, die eine geringere mitochondriale Masse haben, eine geringere Apoptose-Rate und umgekehrt.

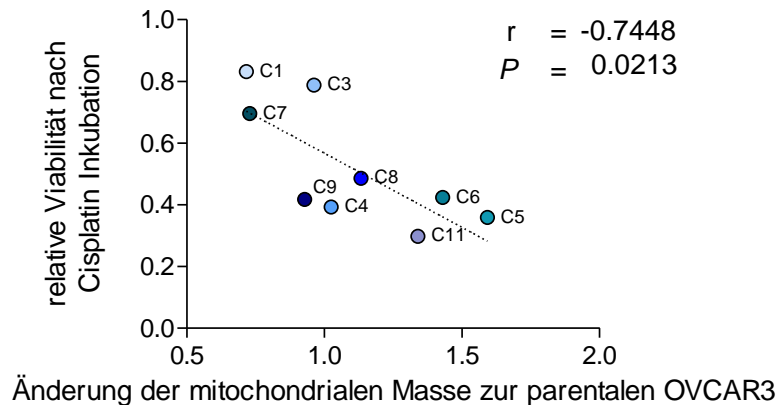


Abbildung 8: Die mitochondriale Masse korreliert mit der Viabilität nach Inkubation mit Cisplatin. Die Sub-Klone von OVCAR3 und die parentale OVCAR3 wurden mit 10 μ M Cisplatin für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet und die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Aufgetragen ist die normalisierte Viabilität gegen die Änderung der mitochondrialen Masse zur parentalen OVCAR3 (Abbildung 7). Die mitochondriale Masse korreliert negativ signifikant mit der Viabilität nach Cisplatin-Inkubation mit $r = -0.7448$. Gezeigt ist der Mittelwert von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten. Daten sind in Zusammenarbeit mit Andrea Gaißler entstanden.

Zur Überprüfung, ob auch die mitochondriale Aktivität mit der Sensitivität gegenüber Cisplatin induziertem Zelltod korreliert, wurden die Sub-Klone von OVCAR3 und die parentale Zelllinie auf ihre OCR im Seahorse Extracellular Flux Analyzer untersucht. Die Messwerte in Abbildung 9 zeigen, dass im Einklang mit der höheren mitochondrialen Masse auch die OCR und damit die mitochondriale Aktivität signifikant negativ ($r = -0.69$) mit der Viabilität nach Cisplatin-Inkubation korreliert.

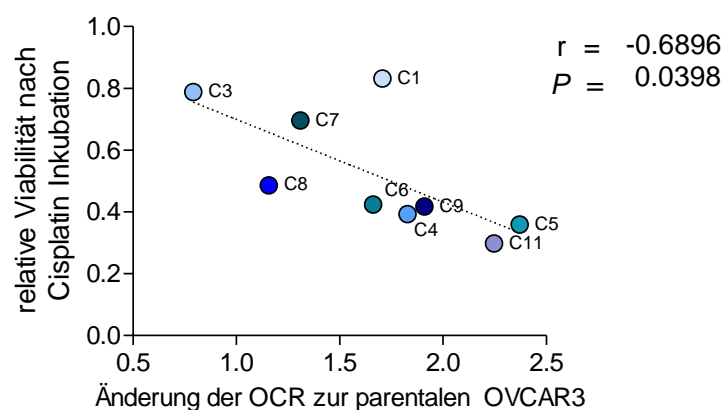


Abbildung 9: Die basale Sauerstoffverbrauchsrate korreliert mit der Viabilität nach Inkubation mit Cisplatin. Die Sub-Klone von OVCAR3 und die parentale OVCAR3 wurden im Seahorse Extracellular Flux Analyzer auf ihre basale mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) untersucht. Aufgetragen ist die normalisierte Viabilität aus Abbildung 8 gegen die Änderung der OCR zur parentalen OVCAR3. Die OCR korreliert negativ signifikant mit der Viabilität nach Cisplatin-Inkubation mit $r = -0.6896$. Gezeigt ist der Mittelwert von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten. Daten sind in Zusammenarbeit mit Andrea Gaißler entstanden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl in unterschiedlichen Zelllinien, insbesondere aber auch in Zellen mit identischem genetischen Hintergrund (Sublinien), die mitochondriale Masse und die mitochondriale Aktivität mit der Sensitivität gegenüber Cisplatin induziertem Zelltod korreliert. Zugleich haben die Cisplatin-sensitiven Zelllinien im Einklang mit der höheren mitochondrialen Masse ein höheres mitochondriales ROS Level als die Cisplatin-resistenten.

3.2. Cisplatin induzierter Zelltod

3.2.1. Der Cisplatin induzierte Zelltod ist unabhängig von der Proliferation

Zur Identifizierung der Rolle der Mitochondrien für den Cisplatin induzierten Zelltod, ist eine genauere Analyse des Zelltodes nach Cisplatin-Inkubation essenziell.

Agencien, die vorwiegend über die Schädigung der nDNA Apoptose induzieren, wirken auf schnell wachsende Zellen toxischer als auf langsam proliferierende Zellen [81–84]. Um den Einfluss der Proliferation auf den durch Cisplatin induzierten Zelltod in den sechs Ovarialkarzinomzelllinien zu untersuchen, wurden die Teilungsraten der Zellen durch wiederholtes Auszählen und Subkultivierung bestimmt. Überraschenderweise haben die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 (0,62 Teilungen / Tag), OVCAR4 (0,77 Teilungen / Tag) und IGROV-1 (0,88 Teilungen / Tag) eine tendenziell geringere, jedoch nicht signifikant unterschiedliche Teilungsrate als die Cisplatin-resistenten Zelllinien OVCAR5 (0,94 Teilungen / Tag), OVCAR8 (1,11 Teilungen / Tag) und A2780 (1,50 Teilungen / Tag) (Abbildung 10).

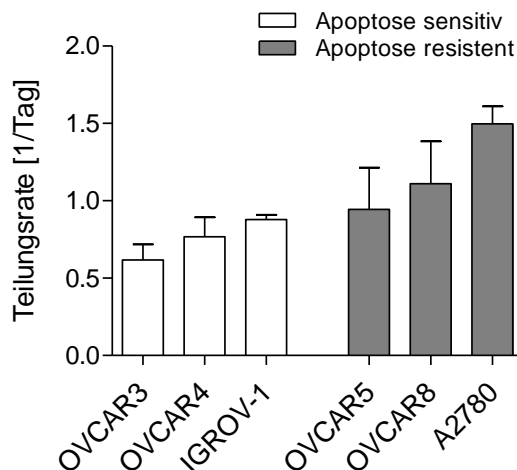


Abbildung 10: Cisplatin-sensitive Zelllinien haben eine tendenziell geringere Teilungsrate als Cisplatin-resistente Zelllinien. Die Teilungsrate wurde bestimmt, indem an fünf aufeinanderfolgenden Tagen die Zellzahl der ausgesäten Zellen gemessen wurde. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien haben eine leicht geringere aber nicht signifikant unterschiedliche Teilungsrate als die Cisplatin-resistenten Zelllinien. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.2.2. Cisplatin induziert Apoptose über den intrinsischen Apoptose-Signalweg

Neben dem klassisch programmierten Zelltod, der Apoptose, können Zellen auch auf eine unkontrollierte Art, die Nekrose, oder einer der vielfältig beschriebenen Abwandlungen der Apoptose oder Nekrose, wie die Nekroptose, sterben [85]. Die klassische intrinsische Apoptose ist durch die Aktivierung der Caspasen und der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP) gekennzeichnet. MOMP wird dabei vorwiegend durch die Di- und Multimerisierung der porenbildenden Proteine der Bcl-2-Familie, BAX und BAK, ausgelöst [86]. Durch die gleichzeitige Inkubation von Cisplatin und dem Pancaspase-Inhibitor z.VAD.fmk, sind die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 nahezu vollständig vor dem Cisplatin induzierten Zelltod geschützt (Abbildung 11). In OVCAR3 wird die Viabilität von 37,8 % mit Cisplatin allein, auf 85,2 % in der Kombination mit z.VAD.fmk erhöht. In OVCAR4 ist die Viabilität von 35,1 % mit Cisplatin allein auf 81,9 % in der Kombination mit z.VAD.fmk erhöht.

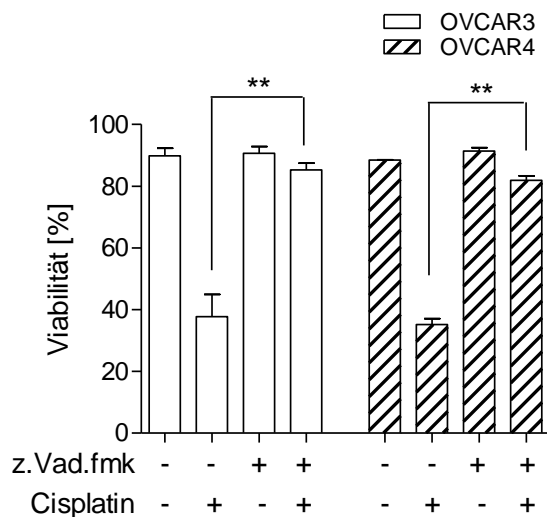


Abbildung 11: Der von Cisplatin induzierte Zelltod ist abhängig von der Aktivität von Caspasen. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und dem Pancaspase-Inhibitor z.VAD.fmk (50 μ M) allein und in Kombination inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Die Inhibition der Caspasen durch z.VAD.fmk rettet die Zellen vor dem Cisplatin induzierten Zelltod. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zur Untersuchung ob Cisplatin MOMP-abhängig den Zelltod induziert, wurden die porenbildenden Proteine BAX und BAK durch einen *Knock-down* in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 runterreguliert (Abbildung 12 A) und anschließend die Viabilität nach Cisplatin-Inkubation im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 12 B). Die Viabilität ist in den mit Kontroll-siRNA und Cisplatin inkubierten Zellen von 39,4 % in OVCAR3 und 18,5 % in OVCAR4 auf 65,4 % in OVCAR3 und 47,7 % in OVCAR4 durch Inkubation mit BAX+BAK-siRNA und Cisplatin erhöht. Daher konnte gezeigt werden, dass Cisplatin abhängig von der Permeabilisierung der Mitochondrien und daher über den intrinsischen Signalweg, den Zelltod induziert.

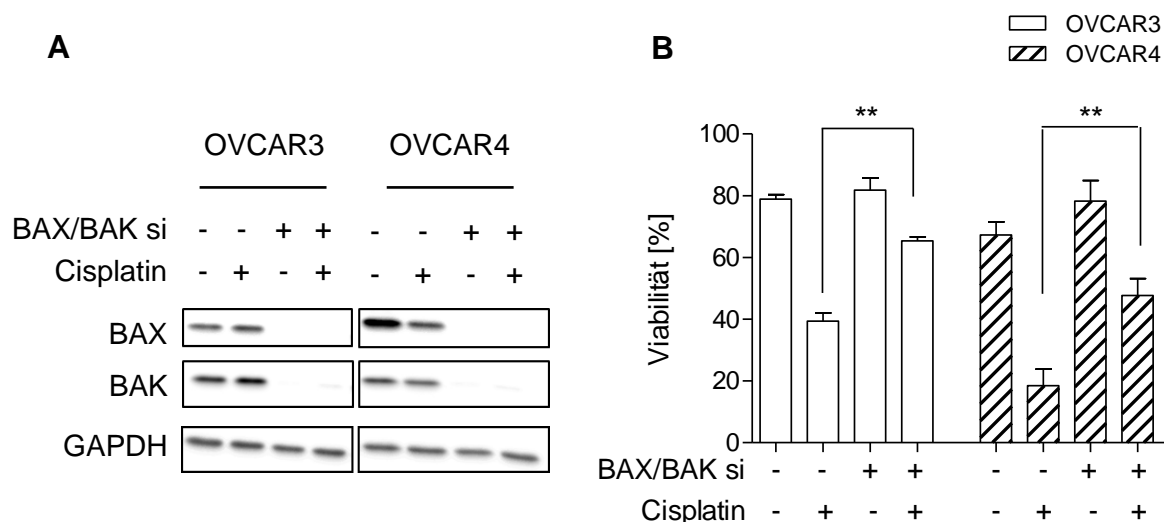


Abbildung 12: Cisplatin induziert die intrinsische Apoptose. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden transfiziert mit siRNA für BAX und BAK oder mit Kontroll-siRNA. Nach Inkubation mit 10 μ M Cisplatin für 48 h wurden die Zellen entweder **(A)** geerntet für die Western Blot Analyse oder **(B)** mit Annexin V/PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Der *Knock-down* von BAX und BAK rettet die Zellen signifikant vor dem Cisplatin induzierten Zelltod. Gezeigt ist in **(A)** ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten und in **(B)** der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Cisplatin ist ein bekannter ROS-Induktor [17–19]. Um die Rolle von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) für den Cisplatin induzierten Zelltod zu untersuchen, wurden die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 in An- und Abwesenheit des ROS-Fängers Glutathion (GSH) mit Cisplatin inkubiert (Abbildung 13). GSH allein hat keinen Einfluss auf die Viabilität von OVCAR3 (Kontrolle: 83,7 % zu GSH: 89,8 %) und OVCAR4 (Kontrolle: 84,1 % zu GSH: 88,4 %). In der Kombination mit Cisplatin jedoch resultiert die Inkubation mit GSH in einer deutlich reduzierten Apoptose-Induktion (OVCAR3: 75,8% auf 37,8% und OVCAR4: 67,2% auf 35,1 %).

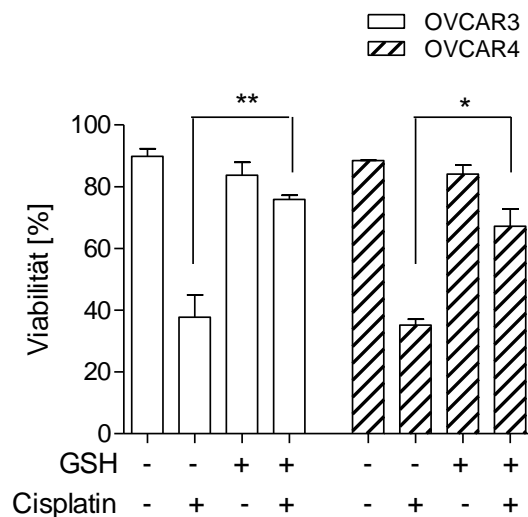


Abbildung 13: ROS-Fänger Glutathion (GSH) verhindert den Cisplatin induzierten Zelltod. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und dem Antioxidans GSH (2 mM) allein und in Kombination inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Die Reduzierung von radikalen Sauerstoffspezies rettet die Zellen vor dem Cisplatin induzierten Zelltod. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Der Cisplatin induzierte Zelltod ist neben der Abhängigkeit von der Aktivierung von Caspasen und von MOMP, zusätzlich abhängig von der Bildung radikaler Sauerstoffspezies.

3.2.3. PARP-Inhibition hat keinen Effekt auf die Cisplatin induzierte Apoptose

Die Inkubation der Zellen mit platinhaltiger Chemotherapie führt zu nukleärem DNA-Schaden, der über die Aktivierung der DNA-Schadens-Antwort repariert wird. Ein wichtiger Bestandteil dieser DNA-Schadens-Antwort ist die Aktivierung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) [87,88]. Durch Inhibition von PARP soll die erfolgreiche Reparatur des nukleären DNA-Schadens reduziert werden, wodurch die Wirkung der platinhaltigen Chemotherapie gesteigert werden soll. Bereits für die Ovarialkarzinomtherapie zugelassene PARP-Inhibitoren sind Olaparib und Rucaparib [6]. Um den Einfluss der PARP-Inhibition auf die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 und die Cisplatin-sensitive Zelllinie OVCAR3 zu untersuchen, wurden die Zellen mit drei unterschiedlichen PARP-Inhibitoren allein oder zusammen mit Cisplatin inkubiert (Abbildung 14).

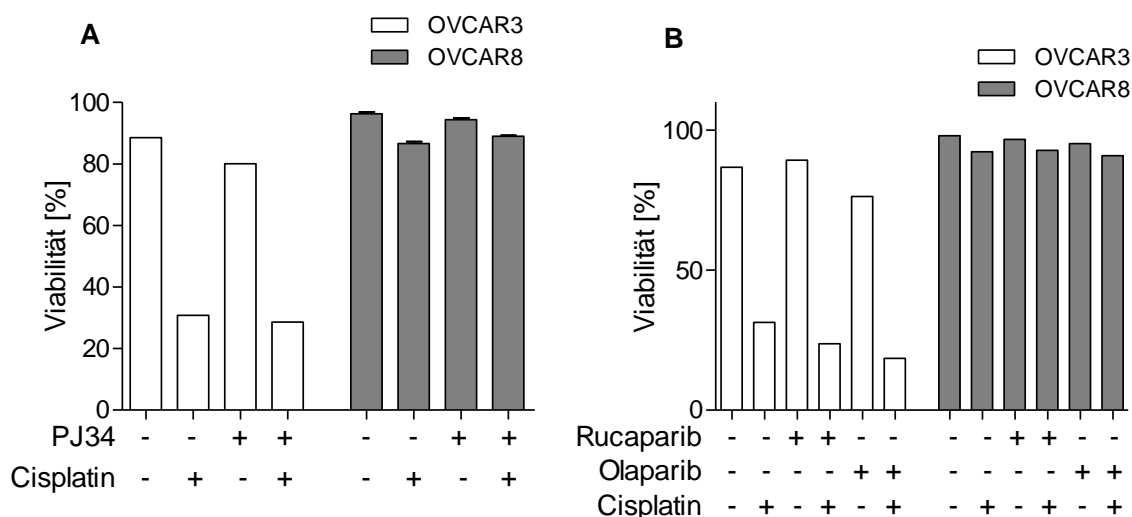


Abbildung 14: PARP-Inhibition hat keine Wirkung auf die Cisplatin induzierte Apoptose. Die sensitive Zelllinie OVCAR3 und die resistente Zelllinie OVCAR8 wurden für 48 h mit 10 μM Cisplatin und den PARP-Inhibitoren **(A)** PJ34 (8 μM), **(B)** Rucaparib (0,4 μM) und Olaparib (3 μM) allein und in Kombination inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Die Inhibition von PARP verstärkt nicht die Apoptose in der Cisplatin-resistenten OVCAR8 und verhindert ebenfalls nicht die Cisplatin induzierte Apoptose in der Cisplatin-sensitiven OVCAR3. Gezeigt ist ein Experiment, außer in **(A)** OVCAR8. Hier ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Der PARP-Inhibitor PJ34 induziert allein nur sehr geringfügig Apoptose in der Cisplatin-sensitiven Linie OVCAR3 (Kontrolle: 86,7 % Viabilität; PJ34: 80,1 % Viabilität) und in der Cisplatin-resistenten Linie OVCAR8 (Kontrolle: 96,3 % Viabilität; PJ34: 94,4 % Viabilität). In der Kombination von PJ34 mit Cisplatin ist kein signifikanter Unterschied zur Cisplatin-Inkubation allein nachweisbar in der OVCAR3 (Cisplatin: 30,1 % Viabilität; Kombination: 28,6 % Viabilität) als auch in der OVCAR8 (Cisplatin: 86,6 % Viabilität; Kombination: 89,0 % Viabilität).

Die für die Ovarialkarzinomtherapie zugelassenen PARP-Inhibitoren Rucaparib und Olaparib induzieren jeweils allein keine Apoptose in OVCAR3 (Kontrolle: 86,7 % Viabilität; Rucaparib: 89,2% Viabilität; Olaparib: 76,4 % Viabilität) und in OVCAR8 (Kontrolle: 98,0 % Viabilität; Rucaparib: 96,7 % Viabilität; Olaparib: 92,5 %). Auch in der Kombination von Rucaparib und Olaparib mit Cisplatin ist kein signifikanter Unterschied zu Cisplatin-Inkubation allein nachweisbar. In der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR3 beträgt die Viabilität nach Cisplatin-Inkubation 31,4 % und nach Inkubation mit Rucaparib + Cisplatin 23,7 % bzw. Olaparib + Cisplatin: 18,6 %. In der Cisplatin-resistenten Zelllinien OVCAR8 beträgt die Viabilität 92,3 % nach Cisplatin-Inkubation, in Gegenwart von Rucaparib + Cisplatin 92,8 % Viabilität bzw. Olaparib + Cisplatin 90,9 % Viabilität.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Cisplatin induzierte Zelltod über den intrinsische Apoptose-Signalweg abläuft, abhängig von der Induktion von ROS ist, jedoch unabhängig von der Teilungsrate der Zellen und der PARP Aktivität.

3.3. Direkte Wirkung von Cisplatin auf die Mitochondrien

3.3.1. Cisplatin induziert mtROS in Cisplatin-sensitiven aber auch in Cisplatin-resistenten Zelllinien

Die ROS-Induktion durch Cisplatin ist essenziell für die Induktion der Apoptose, jedoch ist der Ursprung der von Cisplatin induzierten reaktiven Sauerstoffspezies nicht vollständig aufgeklärt. Mitochondrien sind in Säugertierzellen ein wichtiger Ursprung für intrazellulär produzierte ROS [21]. Vor allem die ROS-Induktion nach Cisplatin-Inkubation scheint abhängig von den Mitochondrien zu sein [20]. Zur Untersuchung, ob Cisplatin die mtROS-Produktion in Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4, sowie der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8 steigert, wurden die Zellen nach der Cisplatin-Inkubation mit dem mtROS-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Die Analysen zeigen in Cisplatin-sensitiven ebenso wie Cisplatin-resistenten Zellen eine erhöhte MitoSOX-Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit Cisplatin. Dies bedeutet, dass Cisplatin sowohl in den beiden Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 als auch in der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8 mtROS induziert (Abbildung 15). Jedoch haben die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 unter Kontrollbedingungen als auch nach der Cisplatin-Inkubation einen jeweils höheren mtROS-Level als die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 (Abbildung 15 - gestrichelte Linie).

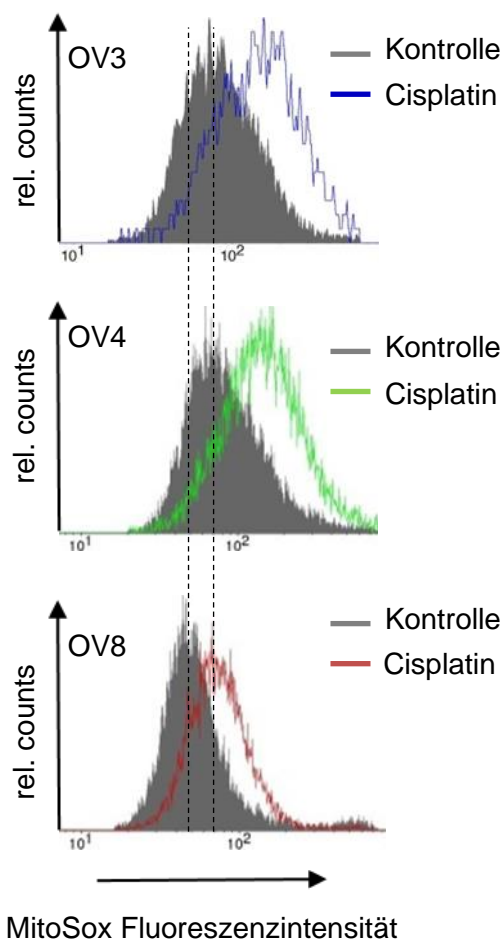


Abbildung 15: Cisplatin induziert mitochondriales ROS in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 und in der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4, sowie die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert und anschließend mit MitoSOX Red zur Bestimmung des mitochondrialen ROS (mtROS) Levels gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Alle Zelllinien zeigen eine Induktion von mtROS nach Cisplatin-Inkubation. Jedoch hat die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 sowohl in der Kontrolle als auch in der Cisplatin-inkubierten Probe ein geringeres mtROS-Level als die Cisplatin-sensitiven Zelllinien (Veranschaulicht durch die gestrichelten Linien). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.3.2. Cisplatin-Inkubation führt zu einer Zunahme der mitochondrialen Masse

Vorherige Ergebnisse zeigen, dass die Cisplatin-Sensitivität mit der mitochondrialen Masse in Ovarialkarzinomzelllinien korreliert (Abbildung 4, Abbildung 8). Cisplatin kann die mtDNA binden und DNA-Schaden induzieren [13,14]. Da mitochondrialer DNA-Schaden und mtROS-Induktion zu mitochondrialer Biogenese führen kann [89], wurde die Wirkung von Cisplatin auf die mitochondriale Masse untersucht, indem die Zellen nach der Cisplatin-Inkubation mit Mitotracker Green gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert wurden. Sowohl in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 als auch in der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8 ist die mitochondriale Masse durch die Cisplatin-Inkubation gesteigert (Abbildung 16 A).

Jedoch ist die mitochondriale Masse, im Einklang mit dem mtROS-Level, in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien, vor und nach der Inkubation mit Cisplatin, höher als in der Cisplatin-resistenten OVCAR8 (Abbildung 16 A - gestrichelten Linien). Normalisiert auf die resistente Zelllinie OVCAR8 haben die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 (1,66-fach zu OVCAR8), OVCAR4 (1,29-fach zu OVCAR8) und IGROV-1 (1,14-fach zu OVCAR8) eine höhere mitochondriale Masse nach der Cisplatin-Inkubation (Abbildung 16 B) als die Cisplatin-resistenten Zelllinien OVCAR5 (0,69-fach zu OVCAR8), OVCAR8 (1,0) und A2780 (0,65-fach zu OVCAR8). Der Mittelwert der Cisplatin-sensitiven Zelllinien beträgt 1,34-fach zu OVCAR8 und der Mittelwert der Cisplatin-resistenten 0,78-fach zu OVCAR8.

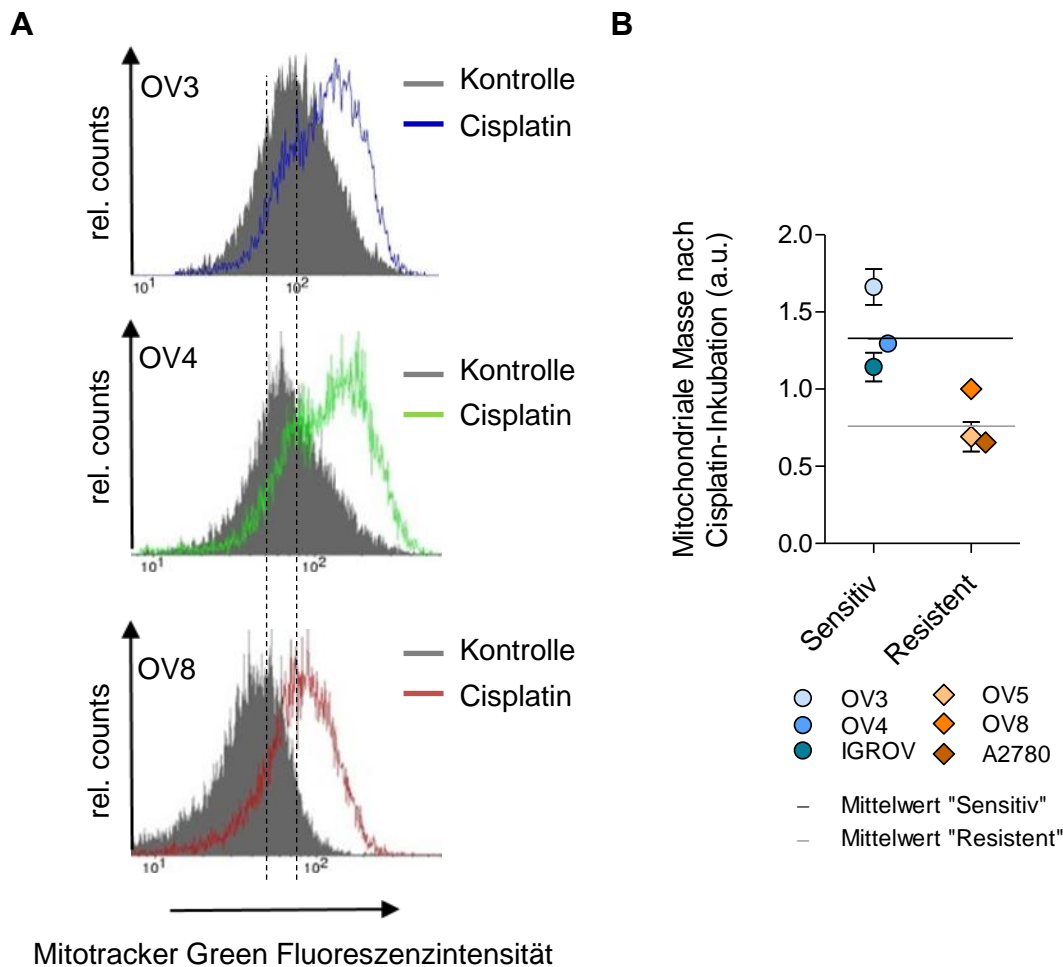


Abbildung 16: Cisplatin induziert mitochondriale Masse in Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zellen. (A) Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 (OV3) und OVCAR4 (OV4), sowie die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 (OV8) wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert und anschließend mit Mitotracker Green zur Bestimmung der mitochondrialen Masse gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Alle Zelllinien zeigen eine Steigerung der mitochondrialen Masse nach Cisplatin-Inkubation. Jedoch hat die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 sowohl in der Kontrolle als auch in der Cisplatin-inkubierten Probe eine geringere mitochondriale Masse als die Cisplatin-sensitiven Zelllinien (Angedeutet durch die gestrichelten Linien). **(B)** OVCAR3, OVCAR4, IGROV-1 (IGROV), OVCAR5 (OV5), OVCAR8 und A2780 Zellen wurden wie in (A) beschrieben mit Cisplatin inkubiert, mit Mitotracker Green gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien haben auch nach Inkubation mit Cisplatin eine höhere mitochondriale Masse als die Cisplatin-resistenten Zelllinien. Die Daten wurden auf die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 normalisiert. Gezeigt sind Tendenzen zwischen den einzelnen Zelllinien. Gezeigt ist **(A)** ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten und **(B)** der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Um die mitochondriale Masse in Abhängigkeit der Cisplatin-Inkubation zu quantifizieren, wurde eine Konzentrations- und Zeitreihe in der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8 durchgeführt. Die OVCAR8 Zellen wurden in Gegenwart von Cisplatin kultiviert und anschließend die Mitochondrien mit Mitotracker Green zur Bestimmung der mitochondrialen Masse gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Die mitochondriale Masse steigt konzentrationsabhängig bis 10 μ M Cisplatin auf den 2,3-fachen Wert verglichen mit der Kontrolle, erreicht jedoch ein

Plateau, sodass die Inkubation mit 20 μM Cisplatin keine weitere Steigerung der mitochondrialen Masse bewirkt im Vergleich zu 10 μM Cisplatin (Abbildung 17 A). Die Zeitreihe mit 10 μM Cisplatin (Abbildung 17 B) zeigt, dass diese Steigerung der mitochondrialen Masse keine sofortige Reaktion auf die Cisplatin-Inkubation ist, sondern nach 24 h beginnt (1,33-fach zur Kontrolle) und bis 48 h (2,2-fach zur Kontrolle) weiter steigt.

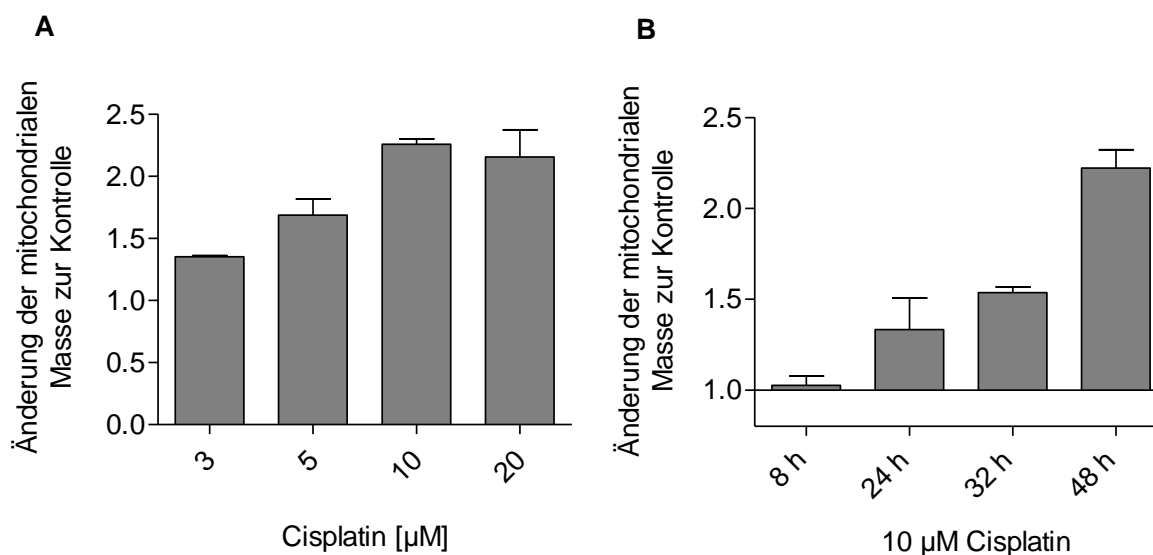


Abbildung 17: Cisplatin induziert die mitochondriale Masse konzentrations- und zeitabhängig.

Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde mit **(A)** den angegebenen Konzentrationen von Cisplatin für 48 h oder **(B)** mit 10 μM Cisplatin für die angegebene Zeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Mitotracker Green zur Bestimmung der mitochondrialen Masse gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Die Änderung der mitochondrialen Masse steigt mit höherer Konzentration von Cisplatin, erreicht jedoch ein Plateau ab 10 μM Cisplatin. Die Steigerung der mitochondrialen Masse beginnt ab 24 h nach der Cisplatin-Inkubation. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zur Bestimmung der mitochondrialen Masse nach der Cisplatin-Inkubation in den Cisplatin-sensitiven Zellen wurden die abgelösten und damit toten Zellen verworfen und nur die lebenden und noch nicht abgelösten apoptotischen Zellen analysiert. Die Blockierung der Apoptose in Cisplatin-sensitiven Zellen könnte jedoch eine stärker gesteigerte mitochondriale Masse in den Zellen zur Folge haben. Um dies zu überprüfen, wurden OVCAR3 und OVCAR4 Zellen mit dem Pancaspase-Inhibitor z.VAD.fmk, der effektiv die Apoptose auf Ebene der Caspasen verhindert (Abbildung 11), zusammen mit Cisplatin inkubiert und die mitochondriale Masse mit einer Mitotracker Green-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt (Abbildung 18). Die Inhibition der Caspasen allein hat keine Auswirkung auf die mitochondriale Masse (1,08-fach zur Kontrolle in OVCAR3 und 0,95-fach zur Kontrolle in OVCAR4). In der Kombination von z.VAD.fmk und Cisplatin (2,42-fach zur Kontrolle in OVCAR3 und

1,77-fach zur Kontrolle in OVCAR4) ist kein signifikanter Unterschied zur Einzelbehandlung mit Cisplatin (2,37-fach zur Kontrolle in OVCAR3 und 2,06-fach zur Kontrolle in OVCAR4) nachweisbar. Somit ist eine stärker gestiegene mitochondriale Masse in den Cisplatin-sensitiven Zellen ist durch die Blockierung der Apoptose nicht nachweisbar.

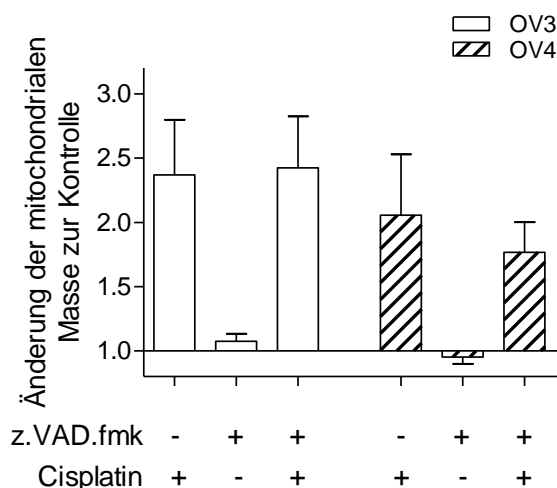


Abbildung 18: Cisplatin induziert die Steigerung der mitochondrialen Masse unabhängig von der Zelltod-Induktion durch Caspasen-Aktivität. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden für 48 h mit 10 μM Cisplatin und dem Pancaspase-Inhibitor z.VAD.fmk (50 μM) allein und in Kombination inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Mitotracker Green zur Bestimmung der mitochondrialen Masse gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Die Inhibition der Caspasen zeigt keinen Unterschied bezogen auf die Steigerung der mitochondrialen Masse nach der Cisplatin-Inkubation. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Mitochondrien generieren ROS in Form von Superoxiden ($\text{O}_2^{\cdot-}$), die wiederum von Superoxid-Dismutasen zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt werden. H_2O_2 wird dann mit Hilfe der Glutathionperoxidasen zu Wasser umgewandelt. Für die Umwandlung von H_2O_2 zu H_2O benötigen Glutathionperoxidasen reduziertes GSH [21,90]. Da die Induktion von ROS essenziell für den Cisplatin induzierten Zelltod ist, wurde die Rolle von ROS auf die Steigerung der mitochondrialen Masse durch die simultane Inkubation mit Cisplatin und GSH in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 untersucht (Abbildung 19). Die Zellen wurden nach der Inkubation mit Cisplatin und GSH zur Bestimmung der mitochondrialen Masse mit Mitotracker Green gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Kontrolle normalisiert. GSH allein hat keine Wirkung auf die mitochondriale Masse (0,99-fach zur Kontrolle in OVCAR3 und 0,95-fach zur Kontrolle in OVCAR4). Die Kombination von GSH und Cisplatin zeigt, dass in OVCAR3 (2,72-fach zur Kontrolle) und OVCAR4 (2,74-fach zur Kontrolle) ein nicht

signifikanter Anstieg der mitochondrialen Masse zur Cisplatin-Inkubation allein (2,37-fach zur Kontrolle in OVCAR3 und 2,06-fach zur Kontrolle in OVCAR4) nachweisbar ist. Dies bedeutet, dass die mitochondriale Masse unabhängig von der ROS-Induktion durch Cisplatin-Inkubation zunimmt. Die Steigerung der mitochondrialen Masse ist somit nicht eine Folge der erhöhten ROS-Menge, sondern die gesteigerte mitochondriale Masse kann der Grund für das gesteigerte ROS Level sein. Gleichzeitig zeigen die Daten, dass GSH nicht die Wirkung von Cisplatin verhindert, da in diesem Fall auch die Zunahme der mitochondrialen Masse verhindert werden würde. Die Wirkung von GSH besteht also vielmehr in der Reduktion von ROS, wodurch ein Teil der toxischen Wirkung von Cisplatin aufgehoben wird.

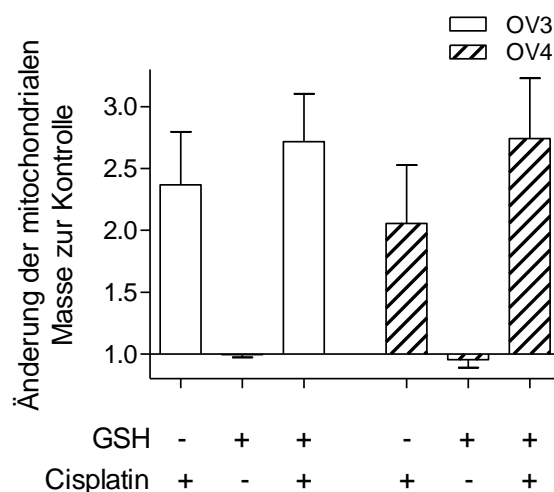


Abbildung 19: Cisplatin-Inkubation steigert die mitochondriale Masse unabhängig der ROS-Induktion. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und dem ROS-Fänger GSH (2mM) allein und in Kombination inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Mitotracker Green zur Bestimmung der mitochondrialen Masse gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Das Abfangen von ROS zeigt keinen signifikanten Unterschied bezogen auf die Steigerung der mitochondrialen Masse nach der Cisplatin-Inkubation. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.3.3. Funktionalität der Cisplatin induzierten Mitochondrien ist Zelllinien-abhängig

Cisplatin-Inkubation steigert die mitochondriale Masse in den Zellen. Eine erhöhte mitochondriale Masse von funktionellen Mitochondrien könnte mit einer erhöhten mitochondrialen Aktivität einhergehen. Zur ATP-Produktion benötigen die Mitochondrien ein Membranpotential zwischen der inneren Matrix der Mitochondrien und dem Intermembranraum (Membranzwischenraum) [91]. Das Membranpotential der Mitochondrien entsteht durch die Elektronentransportkette in den Mitochondrien die Protonen aus der inneren Matrix in den Intermembranraum schleusen. Das

Membranpotential der Mitochondrien kann mit Hilfe des Farbstoffs Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM) nachgewiesen werden. Zur Analyse des mitochondrialen Membranpotentials nach Cisplatin-Inkubation, wurden die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 und die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 mit und ohne Cisplatin für 48 h kultiviert, anschließend mit TMRM gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 20). Die Fluoreszenzintensitäten wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf OVCAR8 normalisiert. OVCAR3 (1,44-fach zu OVCAR8) und OVCAR4 (2,10-fach zu OVCAR8) haben ohne Cisplatin-Inkubation ein höheres Gesamt-Membranpotential als OVCAR8. Da nicht das Membranpotential eines Mitochondriums gemessen wird, sondern das Membranpotential einer ganzen Zelle, kann hier keine Aussage über die Aktivität eines einzelnen Mitochondriums getroffen werden, sondern nur das Gesamtpotential pro Zelle. Nach der Cisplatin-Inkubation wird das Membranpotential von OVCAR3 (2,90-fach zur OVCAR8 Kontrolle) und OVCAR8 (1,76-fach zur Kontrolle) stark gesteigert. Jedoch kann in der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR4 trotz gesteigerter mitochondrialer Masse (Abbildung 16) kein signifikant gesteigertes Membranpotential durch Cisplatin-Inkubation nachgewiesen werden (2,60-fach zur OVCAR8 Kontrolle). Dies deutet auf teilweise depolarisierte, dysfunktionale Mitochondrien hin, in denen das positiv geladene TMRM nicht oder nur schwach akkumuliert.

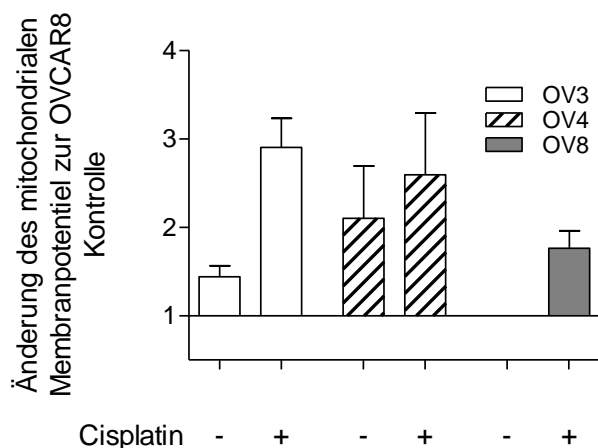


Abbildung 20: Cisplatin steigert das Gesamt-Membranpotential der OVCAR3 und OVCAR8 Zellen, jedoch nicht von OVCAR4 Zellen. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 sowie die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit TMRM zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die unbehandelte Kontrolle von OVCAR8 normalisiert. Cisplatin-Inkubation steigert das Gesamt-Membranpotential pro Zelle in OVCAR3 und OVCAR8 stark. In OVCAR4 ist kein signifikanter Unterschied durch die Cisplatin-Inkubation nachweisbar. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Mitochondrien verbrauchen Sauerstoff während der Produktion von ATP. In der Elektronentransportkette werden Elektronen von Komplex I über Komplex II und III zu Komplex IV transportiert. Komplex IV überträgt die Elektronen auf molekularen Sauerstoff, wodurch zusammen mit freien Protonen Wasser entsteht (Abbildung 1). Der Sauerstoffverbrauch korreliert somit mit der mitochondrialen Aktivität. Dieser Sauerstoffverbrauch wurde zur genaueren Untersuchung der Aktivität der Mitochondrien nach der Cisplatin-Inkubation mit dem Seahorse Extracellular Flux Analyzer gemessen. OVCAR3 Zellen haben sowohl mit als auch ohne Cisplatin-Inkubation einen höheren basalen Sauerstoffverbrauch (ersten 3 Werte) als OVCAR8 Zellen (Abbildung 21). Nach Zugabe von Oligomycin A (ATP-Synthase-Inhibitor) fällt der Sauerstoffverbrauch auf ein Minimum ab. Diese Verringerung korreliert mit der ATP-Produktion im Mitochondrium. Beide Zelllinien haben nach der Cisplatin-Inkubation funktionsfähige Mitochondrien, die ATP produzieren. Nach Zugabe des Entkopplers FCCP steigt der Sauerstoffverbrauch auf den maximalen Wert an. Im Einklang mit der Steigerung der mitochondrialen Masse, steigt die maximale Respiration durch die Cisplatin-Inkubation. Daher folgt, dass durch Cisplatin-Inkubation in den Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8 die Masse an funktionellen Mitochondrien gesteigert wird. Nach Zugabe von Rotenone + Antimycin A (Komplex I

und III -Hemmer) sinkt der Sauerstoffverbrauch auf den nicht mitochondrialen Anteil der Zelle.

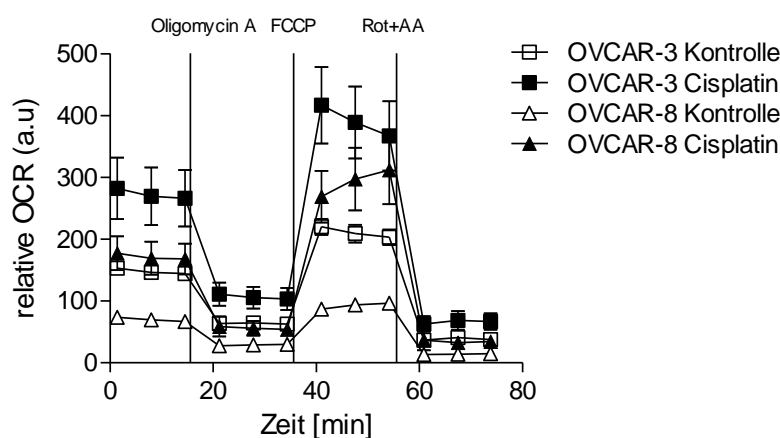


Abbildung 21: Cisplatin steigert funktionelle Mitochondrien in OVCAR3 und OVCAR8. Die sensitive Zelllinie OVCAR3 und die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert. Anschließend wurden die noch adhärenen Zellen geerntet und 35.000 Zellen für die Messung in die Seahorse Cell Culture Platte überführt. Die Zellen wurden mit einem MitoStress-Test im Seahorse Extracellular Flux Analyzer auf ihre mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) untersucht. Die sensitive Zelllinie OVCAR3 hat einen höheren basalen OCR (Werte 1-3) und eine höhere maximale Respiration (Werte 7-9) als OVCAR8. Cisplatin steigert den Sauerstoffverbrauch beider Zelllinien, jedoch hat die sensitive Zelllinie OVCAR3 auch nach Cisplatin-Inkubation einen höheren OCR als die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die senkrechten Striche zeigen den Zeitpunkt der Injektion der jeweiligen Substanz im MitoStress-Test. Rot+AA: Rotenone + Antimycin A.

Die basale OCR und die maximale Respiration wird neben OVCAR3 und OVCAR8, auch in OVCAR5 durch Cisplatin-Inkubation gesteigert (Abbildung 22). Diese 3 Zelllinien haben auch eine gesteigerte ATP-Produktion nach Cisplatin-Inkubation (OVCAR3: von 2,03 auf 3,89; OVCAR8: von 1 auf 2,87; OVCAR5: von 0,99 auf 1,98). In der Cisplatin-resistenten Zelllinie A2780 wird die basale OCR (von 1,24 auf 1,73), die ATP-Produktion (von 1,14 auf 1,35) und die maximale Respiration (von 1,24 auf 1,49) nur geringfügig durch die Cisplatin-Inkubation gesteigert. In den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR4 und IGROV-1 verringert sich die basale OCR (OVCAR4: von 3,18 auf 2,23; IGROV-1: 1,63 auf 0,96), die ATP-Produktion (OVCAR4: von 2,66 auf 1,84; IGROV-1: von 1,13 auf 0,84) und die maximale Respiration (OVCAR4: von 4,39 auf 3,74; IGROV-1: von 1,63 auf 0,84) durch die Cisplatin-Inkubation trotz gesteigerter mitochondrialer Masse. Cisplatin steigert die Masse an funktionellen Mitochondrien in vier von sechs Zelllinien, führt jedoch in zwei Cisplatin-sensitiven Zelllinien (OVCAR4 und IGROV-1) zu einer verringerten mitochondrialen Aktivität.

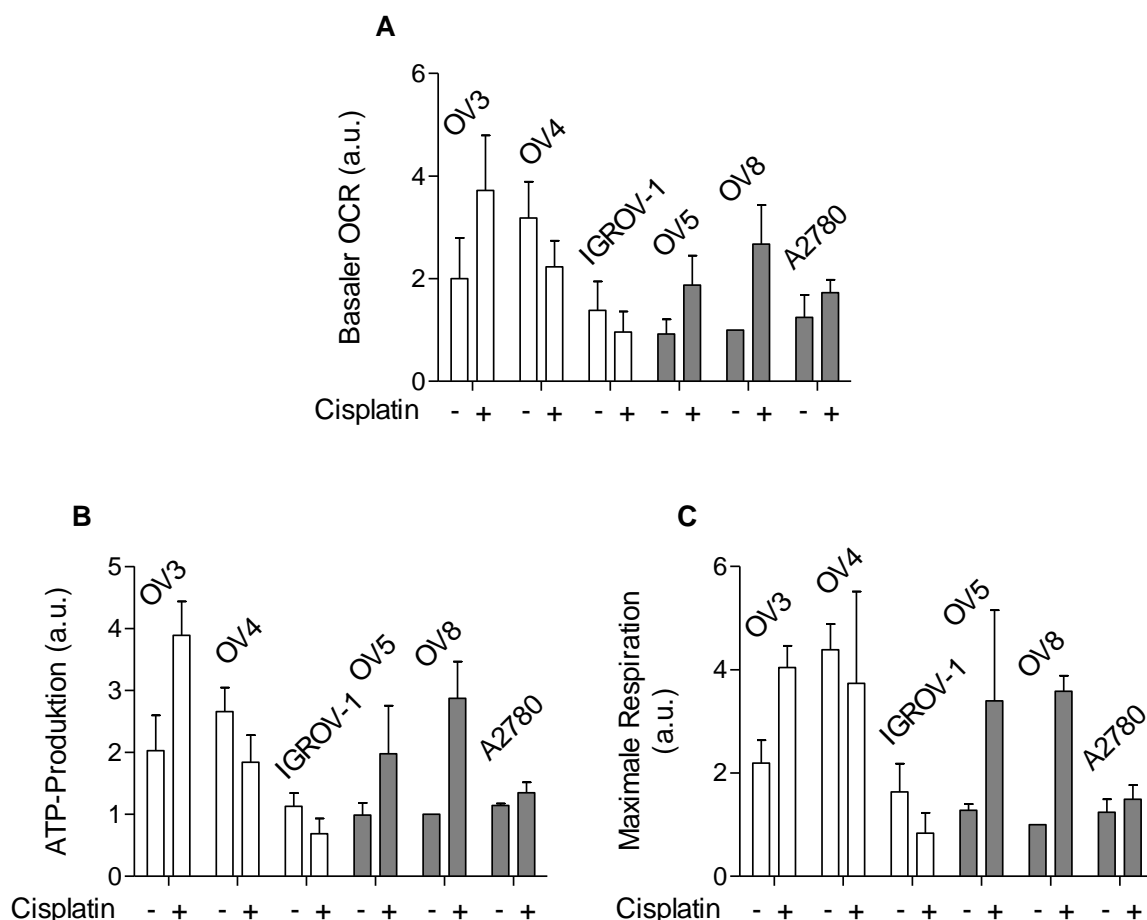


Abbildung 22: Cisplatin-Inkubation steigert Zelllinien-abhängig funktionelle oder dysfunktionale Mitochondrien. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 (OV3), OVCAR4 (OV4) und IGROV-1 die Cisplatin-resistenten Zelllinien OVCAR5 (OV5), OVCAR8 (OV8) und A2780 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert. Anschließend wurden die adhärennten Zellen geerntet und 35.000 Zellen für die Messung in die Seahorse Cell Culture Platte überführt. Die Zellen wurden mit einem MitoStress-Test im Seahorse Extracellular Flux Analyzer auf ihre mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) untersucht. Die Daten wurden auf die Kontrolle von OVCAR8 normalisiert. In den Cisplatin-resistenten Zelllinien OVCAR5 und OVCAR8 sowie in der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR3 werden **(A)** der basale OCR, **(B)** die ATP-Produktion und **(C)** die maximale Respiration durch Cisplatin stark gesteigert. In der Cisplatin-resistenten Zelllinie A2780 ist nur eine leichte Steigerung der basalen OCR, der ATP-Produktion und der maximalen Respiration erkennbar. In den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR4 und IGROV-1 sinken die basale OCR, die ATP-Produktion und die maximale Respiration durch die Cisplatin-Inkubation. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Änderung der basalen OCR nach Cisplatin-Inkubation korreliert ($r = 0,6523$) mit der Viabilität (Abbildung 23). Die zwei Zelllinien mit der höchsten Sensitivität gegenüber Cisplatin induzierter Apoptose, OVCAR4 und IGROV-1, haben weniger funktionelle Mitochondrien nach der Cisplatin-Inkubation als davor, trotz Steigerung der mitochondrialen Masse.

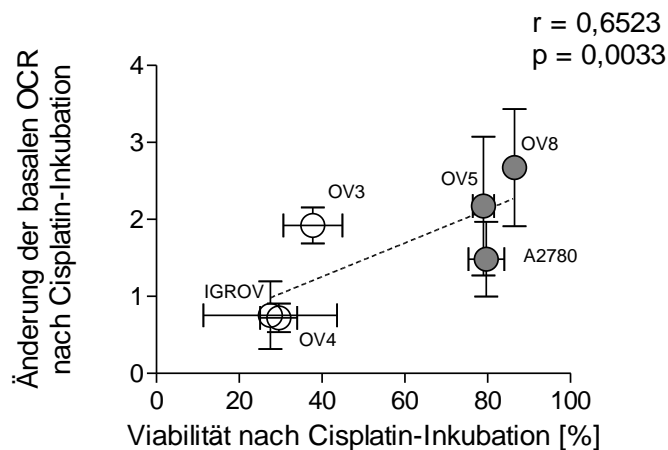


Abbildung 23: Die Änderung der basalen OCR nach Cisplatin-Inkubation korreliert mit der Viabilität. Aufgetragen ist die Viabilität aus Abbildung 3 und die Änderung des basalen OCR nach Cisplatin-Inkubation aus Abbildung 22. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Dysfunktionale Mitochondrien könnten durch die Induktion der Apoptose in den beiden Zelllinien verursacht werden. Zur Überprüfung ob die Caspasen-Kaskade die Dysfunktionalität der Mitochondrien zur Ursache hat, wurden die OVCAR4 Zellen mit Cisplatin und dem Pancaspase-Inhibitor z.VAD.fmk inkubiert und anschließend die OCR im Seahorse Extracellular Flux Analyzer gemessen. Trotz Inhibition der Caspasen sinkt die basale Sauerstoffverbrauchsrate der Zellen nach der Cisplatin-Inkubation (Abbildung 24) und es ist kein Unterschied in der basalen OCR (Werte 1-3), zwischen Cisplatin allein und der Kombination von z.VAD.fmk und Cisplatin nachweisbar. Ein Unterschied ist jedoch in der maximalen Respiration (Werte 7-9) sichtbar. Die Inkubation mit z.VAD.fmk führt allein zu keiner Verringerung der maximalen Respiration, jedoch sinkt die maximale Respiration in der Kombination von z.VAD.fmk und Cisplatin im Vergleich zur Inkubation mit Cisplatin allein.

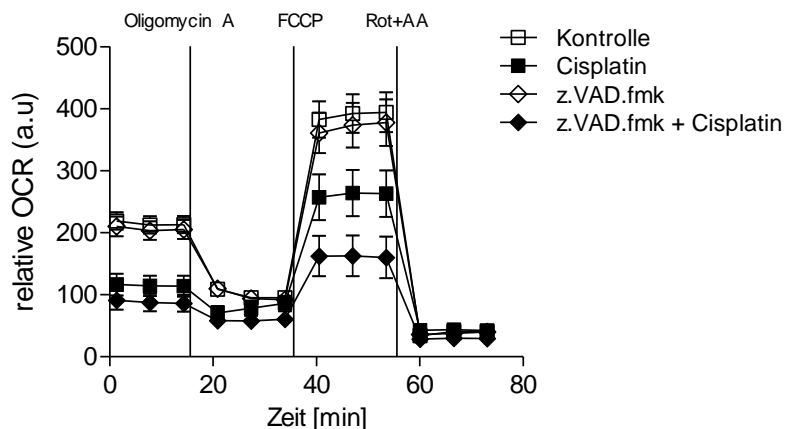


Abbildung 24: Caspasen-Inhibition hat keinen Einfluss auf die basale OCR nach Cisplatin-Inkubation. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR4 wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und mit 50 μ M z.VAD.fmk allein oder in Kombination inkubiert. Anschließend wurden die adhärenen Zellen geerntet und 35.000 Zellen für die Messung in die Seahorse Cell Culture Platte überführt. Die Zellen wurden mit einem MitoStress-Test im Seahorse Extracellular Flux Analyzer auf ihre mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) untersucht. Die basale OCR wird verringert durch die Cisplatin-Inkubation, trotz Inhibition der Caspasen (Werte 1-3). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die senkrechten Striche zeigen den Zeitpunkt der Injektion der jeweiligen Substanz im MitoStress-Test. Rot+AA: Rotenone + Antimycin A.

ROS-Induktion kann die Mitochondrien schädigen und zur Dysfunktionalität führen. Um dies zu prüfen, wurden OVCAR4 Zellen mit Cisplatin und dem ROS-Fänger GSH inkubiert und anschließend der Sauerstoffverbrauch der Zellen im Seahorse Extracellular Flux Analyzer gemessen. Cisplatin-Inkubation senkt die basale Sauerstoffverbrauchsrate der OVCAR4 Zellen (Abbildung 25). GSH allein hat keinen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität. Jedoch in Kombination von Cisplatin und GSH steigt die basale OCR stark an. Auch die ATP-Produktion und die maximale Respiration steigen durch die Kombination von GSH und Cisplatin in OVCAR4-Zellen.

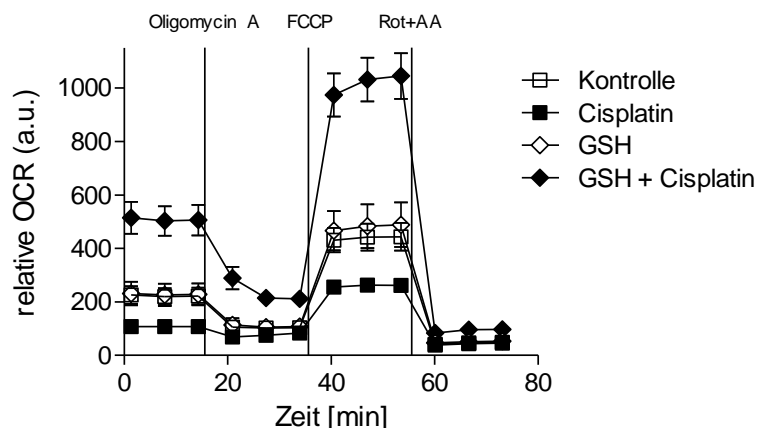


Abbildung 25: Blockierung der ROS-Induktion führt zu gesteigerter OCR nach Cisplatin-Inkubation. Die sensitive Zelllinie OVCAR4 wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und 2 mM GSH allein und in Kombination inkubiert. Anschließend wurden die noch adhärenen Zellen geerntet und 35.000 Zellen für die Messung in die Seahorse Cell Culture Platte überführt. Die Zellen wurden mit einem MitoStress-Test im Seahorse Extracellular Flux Analyzer auf ihre mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) untersucht. Die basale OCR wird durch die Inkubation mit Cisplatin bei gleichzeitiger Blockierung der ROS-Induktion durch den ROS-Fänger GSH gesteigert (Werte 1-3). Zusätzlich ist auch die maximale Respiration erhöht (Werte 7-9). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die senkrechten Striche zeigen den Zeitpunkt der Injektion der jeweiligen Substanz im MitoStress-Test. Rot+AA: Rotenone + Antimycin A.

Cisplatin induziert funktionelle Mitochondrien in den Cisplatin-resistenten Zelllinien OVCAR5, OVCAR8 und A2780 und der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR3. In den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR4 und IGROV-1 wird hingegen die mitochondriale Aktivität durch Cisplatin verringert. Dies wird in OVCAR4 durch die Blockierung der ROS-Induktion durch Inkubation mit GSH verhindert.

3.3.4. Cisplatin-Inkubation steigert die mitochondriale Masse unabhängig von der Zellzyklus-Phase

Cisplatin induziert nukleären DNA Schaden und infolge dessen einen Zellzyklus-Arrest [92]. Die Arretierung der Zellen in der S- bzw. G2-Phase könnte der Grund für die erhöhte mitochondriale Masse sein, da die G1-Phase die Wachstumsphase der Zellen ist, sodass sie vor der Zellteilung in der S-/G2-Phase ihre Gesamtgröße gesteigert haben. Um dies zu überprüfen, wurde der Zellzyklus mit und ohne Cisplatin-Inkubation nach 48 h analysiert (Abbildung 26).

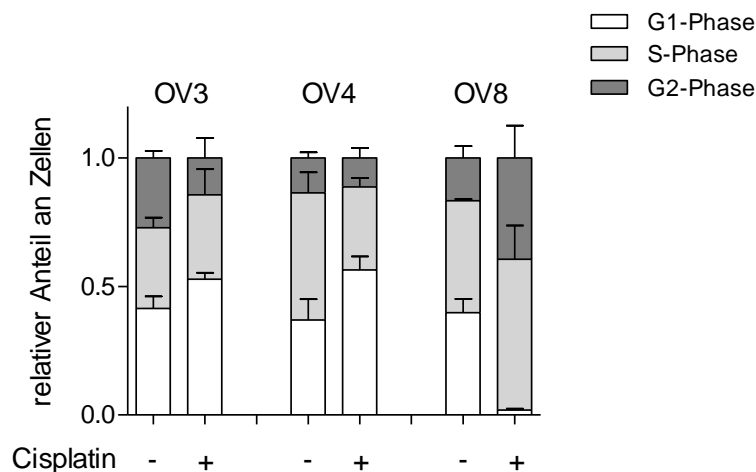


Abbildung 26: OVCAR3 und OVCAR4 haben keinen S-/G2-Phasen-Arrest nach Cisplatin-Inkubation, im Gegensatz zu OVCAR8. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4, sowie die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit BrdU gepulst, geerntet, fixiert, permeabilisiert und mit Primärantikörpern gegen BrdU gefärbt. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen mit PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. OVCAR3 und OVCAR4 zeigen keine S-/G2-Phasen-Arretierung durch die Cisplatin-Inkubation. OVCAR8 hingegen hat einen starken S-/G2-Phasen-Arrest wodurch nur ein sehr geringer Anteil an Zellen in der G1-Phase verbleiben. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. OV3: OVCAR3; OV4: OVCAR4; OV8: OVCAR8.

Cisplatin induziert keinen S-/G2-Phasen-Arrest in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4. Überraschenderweise steigt der Anteil der Zellen in der G1-Phase nach 48 h Cisplatin-Inkubation von 41,5 % auf 52,8 % in OVCAR3 und von 37,0 % auf 56,5 % in OVCAR4. Der Anteil an Zellen in der S-Phase bleibt unverändert bei ca. 32 % in OVCAR3 und sinkt in OVCAR4 von 49,4 % auf 32,2 %. In der G2-Phase sinkt der Anteil an Zellen der OVCAR3 Zelllinie von 27,1 % auf 14,3 % durch die Cisplatin-Inkubation und bleibt unverändert bei ca. 12 % in OVCAR4 Zellen. In der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8 hingegen werden die Zellen in der S- und G2-Phase arretiert. Der Anteil an Zellen in der G1-Phase sinkt von 39,8 % auf 1,9 %. In der S-Phase befinden sich vor der Cisplatin-Inkubation 43,6 % und nach 48 h Cisplatin-Inkubation 58,7 % der Zellen. In der G2-Phase steigt der Anteil der Zellen von 16,6 % auf 39,4 %. Da der Anteil an S-/G2-Phase Zellen in den OVCAR3 und OVCAR4 nicht steigt, jedoch eine erhöhte mitochondriale Masse nachweisbar ist, kann der Zellzyklus-Arrest nicht ursächlich für die gesteigerte mitochondriale Masse sein. Zur Überprüfung, ob die Steigerung der mitochondrialen Masse in allen Zellzyklus-Phasen nach Cisplatin-Inkubation stattfindet, wurde die mitochondriale Masse in den unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen untersucht (Abbildung 27). Hierfür wurden die Zellen für 48 h mit Cisplatin inkubiert und mit dem zellpermeablen Fluoreszenzfarbstoff

Vybrant DyeCycle Ruby und Mitotracker Green gefärbt. Vybrant DyeCycle Ruby bindet die DNA und emittiert daraufhin ein fluoreszierendes Signal, das mit der DNA-Menge korreliert. Die Zellen wurden nach der Färbung im Durchflusszytometer analysiert. Die Werte wurden auf die Kontrollzellen der jeweiligen Zellzyklus-Phase normiert.

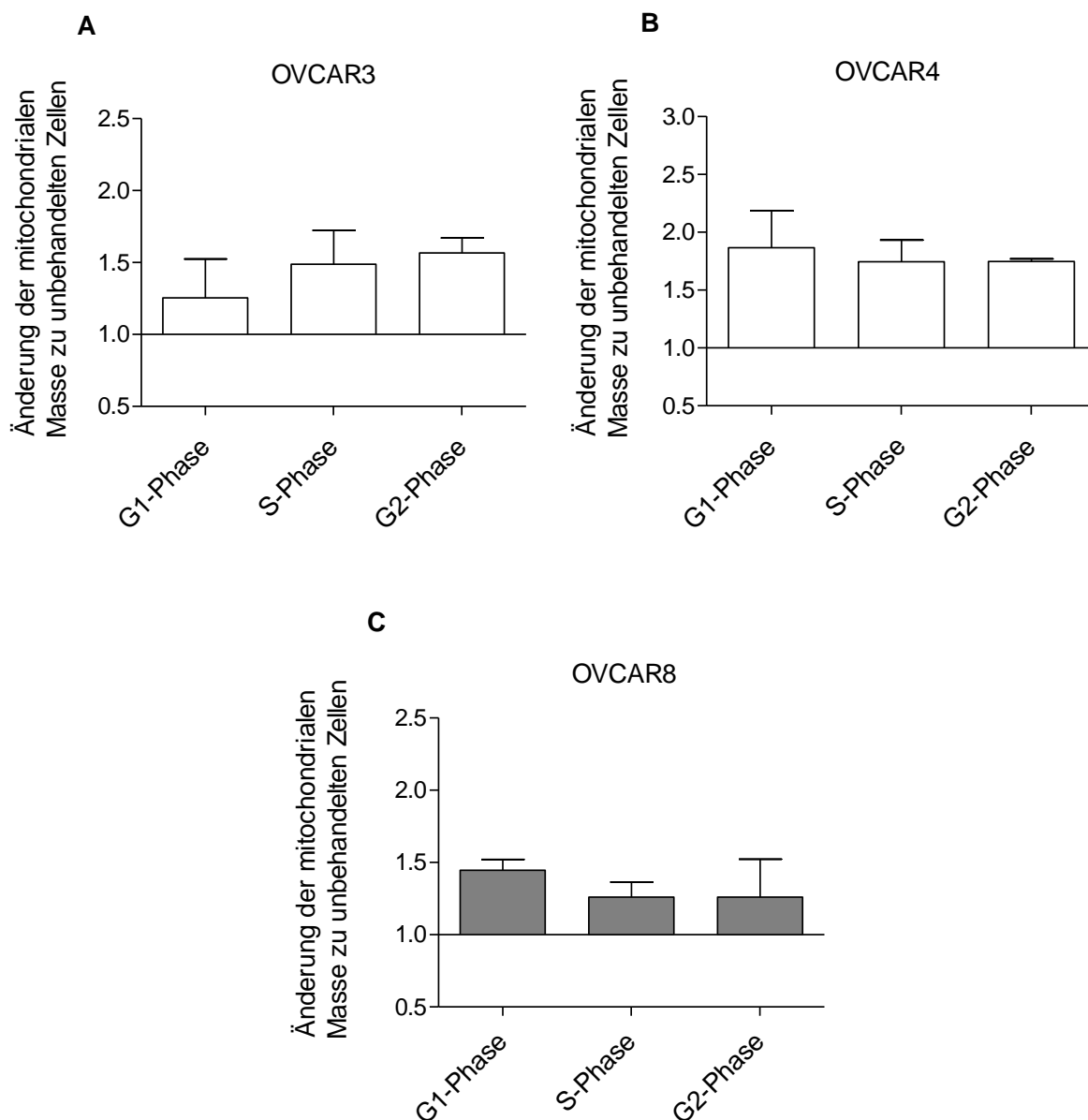


Abbildung 27: Die mitochondriale Masse steigt in allen Zellzyklus-Phasen durch Cisplatin-Inkubation in OVCAR3, OVCAR4 und OVCAR8. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4, sowie die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit Vybrant DyeCycle Ruby zur Bestimmung des Zellzyklus und mit Mitotracker Green zur Bestimmung der mitochondrialen Masse gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Sowohl die Cisplatin-sensitiven Zelllinien (**A+B**) OVCAR3 und OVCAR4 als auch die Cisplatin-resistente Zelllinie (**C**) OVCAR8 steigern ihre mitochondriale Masse in allen Zellzyklus-Phasen nach Cisplatin-Inkubation. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Die mitochondriale Masse steigt sowohl in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 (G1-Phase: 1,26-fach zur Kontrolle; S-Phase: 1,49-fach zur Kontrolle; G2-Phase: 1,57-fach zur Kontrolle) und OVCAR4 (G1-Phase: 1,87-fach zur Kontrolle; S-Phase: 1,74-fach zur Kontrolle; G2-Phase: 1,75-fach zur Kontrolle) als auch in der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8 (G1-Phase: 1,45-fach zur Kontrolle; S-Phase: 1,26-fach zur Kontrolle; G2-Phase: 1,26-fach zur Kontrolle) in allen Zellzyklus-Phasen nach Inkubation mit Cisplatin für 48 h.

Cisplatin-Inkubation induziert die Steigerung der mitochondrialen Masse und mitochondriales ROS in Cisplatin-resistenten und Cisplatin-sensitiven Zelllinien. Jedoch haben die Cisplatin-sensitiven Zelllinien weiterhin eine höhere mitochondriale Masse als die Cisplatin-resistenten Zelllinien. Diese Steigerung ist keine unmittelbare Reaktion auf die Cisplatin-Inkubation, sondern beginnt 24 h nach der Inkubation (Abbildung 17). Die Steigerung der mitochondrialen Masse durch Cisplatin-Inkubation ist unabhängig von der ROS-Induktion, Caspase-Aktivität und der Zellzyklus-Phase der Zelle. Diese gesteigerte mitochondriale Masse ist in vier von sechs Zelllinien überwiegend funktional, jedoch aufgrund der ROS-Induktion dysfunktional in OVCAR4 und IGROV-1.

3.4. Blockierung der mitochondrialen Aktivität in Kombination mit Cisplatin-Inkubation verhindert die Apoptose

3.4.1. Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin A blockiert die Cisplatin induzierte Apoptose

Die Sensitivität von Zellen gegenüber der Induktion von Apoptose durch Cisplatin-Inkubation korreliert mit der mitochondrialen Masse (Abschnitt 3.1). Unklar ist jedoch, welche Rolle, die damit einhergehende erhöhte mitochondrialen Aktivität bei der Cisplatin induzierten Apoptose spielt. Um dies zu untersuchen, wurde die mitochondriale Funktion mit dem ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin A blockiert und die Zellen mit Cisplatin inkubiert.

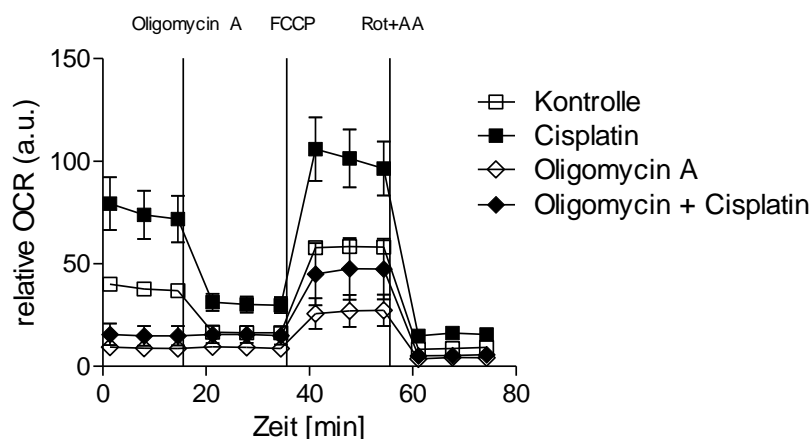


Abbildung 28: 5 μM Oligomycin A inhibiert die ATP-Synthase vollständig. Die sensitive Zelllinie OVCAR3 wurde für 48 h mit 10 μM Cisplatin und 5 μM Oligomycin A inkubiert. Anschließend wurden die noch adhärennten Zellen geerntet und 35.000 Zellen für die Messung in die Seahorse Cell Culture Platte überführt. Die Zellen wurden mit einem MitoStress-Test im Seahorse Extracellular Flux Analyzer auf ihre mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) untersucht. Die basale OCR ist durch die Inkubation mit Oligomycin A stark reduziert und wird durch eine weitere Oligomycin A Injektion nicht weiter gesenkt (Werte 4-6). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die senkrechten Striche zeigen den Zeitpunkt der Injektion der jeweiligen Substanz im MitoStress-Test. Rot+AA: Rotenone + Antimycin A.

Zuerst wurde die Blockierung der mitochondrialen Aktivität durch Oligomycin A überprüft. Dafür wurden OVCAR3 Zellen in Kombination mit Cisplatin und Oligomycin A für 48 h inkubiert und anschließend die Sauerstoffverbrauchsrate im Seahorse Extracellular Flux Analyzer gemessen (Abbildung 28). Die Inkubation der Zellen mit Oligomycin A für 48 h senkt die basale OCR in der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR3 stark. Im MitoStress-Test wird Oligomycin A injiziert (Abbildung 28 - nach 18 min). Diese Injektion verändert die OCR in den Oligomycin A inkubierten Zellen nicht, im Gegensatz zu den nicht mit Oligomycin A inkubierten Zellen. In Kombination von Oligomycin A und Cisplatin ist die basale OCR stark verringert gegenüber den Cisplatin inkubierten Zellen oder den Kontrollzellen und nur leicht erhöht gegenüber der Inkubation mit Oligomycin A. Auch die maximale Respiration ist durch die Inkubation mit Oligomycin A (48 h) gesenkt. In der Kombination von Oligomycin A und Cisplatin ist die maximale Respiration verringert gegenüber der Inkubation mit Cisplatin allein, jedoch höher als mit Oligomycin A allein. Eine Inkubation mit 5 μM Oligomycin A für 48h blockiert somit die mitochondriale Aktivität effektiv.

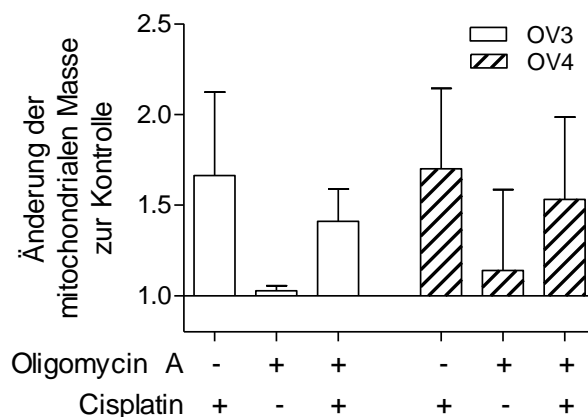


Abbildung 29: Inhibition der ATP-Synthase hat keinen Einfluss auf die Cisplatin induzierte mitochondriale Masse Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und dem ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin A (5 μ M) allein und in Kombination inkubiert und anschließend mit Mitotracker Green zur Bestimmung der mitochondrialen Masse gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle normalisiert. Cisplatin steigert die mitochondriale Masse. Oligomycin A allein hat keinen Einfluss auf die mitochondriale Masse der Zelle und verändert in der Kombination mit Cisplatin die Steigerung der mitochondrialen Masse nicht. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurden die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 mit Oligomycin A und Cisplatin für 48 h inkubiert, mit Mitotracker Green gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. Die Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin A hat keinen Einfluss auf die mitochondriale Masse (Abbildung 29). Cisplatin steigert die mitochondriale Masse in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 (1,66-fach zur Kontrolle) und OVCAR4 (1,7-fach zur Kontrolle) als Einzelbehandlung und auch in der Kombination mit Oligomycin A gegenüber unbehandelten Zellen (OVCAR3: 1,41-fach zur Kontrolle; OVCAR4: 1,53-fach zur Kontrolle).

Da Oligomycin A die mitochondriale Aktivität blockiert (Abbildung 28), kann dies zu einer Veränderung des Gesamt-Membranpotential der Mitochondrien führen. Um dies zu überprüfen wurden die OVCAR3 und OVCAR4 Zellen mit Oligomycin A und Cisplatin inkubiert wurden, mit TMRM gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin A-Inkubation verhindert die Steigerung des Membranpotentials in OVCAR3 und OVCAR4 (Abbildung 30). Oligomycin A allein senkt das Gesamt-Membranpotential der Mitochondrien stark (OVCAR3: 0,73-fach zur Kontrolle; OVCAR4: 0,80-fach zur Kontrolle). Das Gesamt-Membranpotential der Mitochondrien wird auch in der Kombination von Oligomycin A und Cisplatin leicht gesenkt gegenüber den Kontrollzellen (OVCAR3: 0,92-fach zur

Kontrolle; OVCAR4: 0,96-fach zur Kontrolle). Hingegen steigert Cisplatin das Gesamt-Membranpotential der Mitochondrien signifikant (OVCAR3: 1,65-fach zur Kontrolle; OVCAR4: 1,28-fach zur Kontrolle).

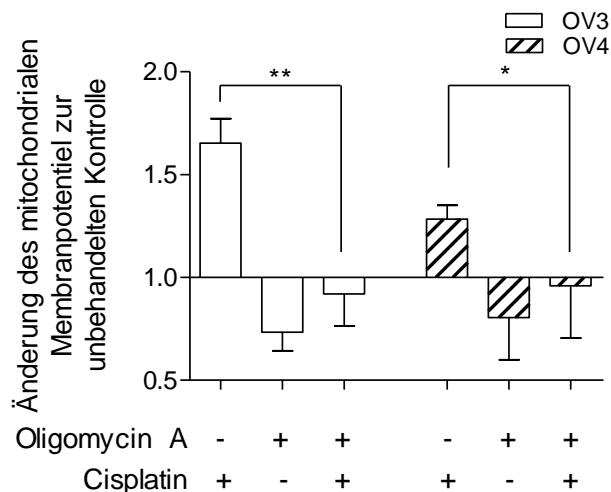


Abbildung 30: Inhibition der ATP-Synthase blockiert die Cisplatin induzierte Steigerung des mitochondrialen Gesamt-Membranpotentials der Zelle. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden für 48 h mit 10 μM Cisplatin und dem ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin A (5 μM) inkubiert und anschließend mit TMRM zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die jeweilige Kontrolle normalisiert. Cisplatin steigert das Gesamt-Membranpotential der Zelle. Oligomycin A allein senkt das Gesamt-Membranpotential der Mitochondrien und verhindert in der Kombination mit Cisplatin die Steigerung des Gesamt-Membranpotentials signifikant in OVCAR3 und in OVCAR4. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Daraufhin wurde die Wirkung der ATP-Synthase-Inhibition durch Oligomycin A auf die mtROS-Produktion durch Cisplatin-Inkubation gemessen. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden mit Oligomycin A und Cisplatin für 48 h inkubiert, mit MitoSOX gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Die Blockierung der mitochondrialen Aktivität durch die Inhibition der ATP-Synthase mit Oligomycin A führt zu einer Verringerung des mtROS Levels der Cisplatin-sensitiven OVCAR3 und OVCAR4 Zellen (Abbildung 31). In Kombination mit Cisplatin blockiert Oligomycin A die Cisplatin induzierte Steigerung des mtROS Levels signifikant. Dabei sinkt das mtROS Level von 1,47-fach zur Kontrolle mit Cisplatin allein auf 0,90-fach zur Kontrolle in der Kombination von Oligomycin A und Cisplatin in OVCAR3. In OVCAR4 sinkt das mtROS Level von 1,88-fach zur Kontrolle mit Cisplatin auf 1,20-fach zur Kontrolle in der Kombination von Oligomycin A und Cisplatin.

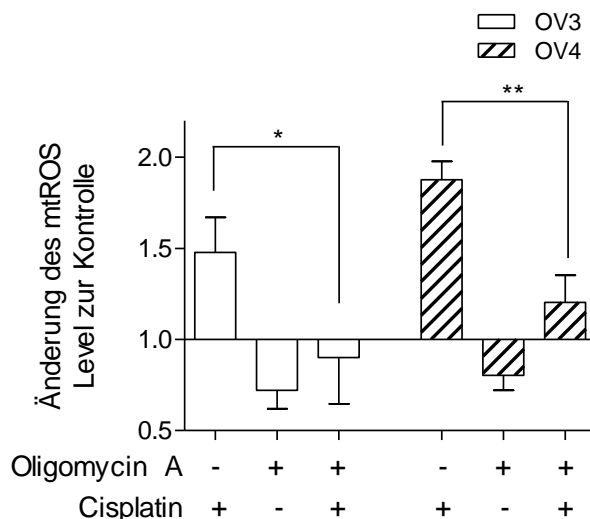


Abbildung 31: Inhibition der ATP-Synthase verringert das Cisplatin induziertes mtROS. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und dem ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin A (5 μ M) allein und in Kombination inkubiert und anschließend mit MitoSOX Red zur Bestimmung des mtROS Levels gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die jeweilige Kontrolle normalisiert. Cisplatin induziert mtROS. Oligomycin A allein senkt das mtROS Level der Zellen geringfügig und verhindert in der Kombination mit Cisplatin die Induktion von mtROS signifikant in OVCAR3 und in OVCAR4. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Abschließend wurde der Einfluss von Oligomycin A auf den Cisplatin induzierten Zelltod untersucht. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden mit Oligomycin A und Cisplatin für 48 h inkubiert, mit Annexin V/PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 32). Oligomycin A als Einzelsubstanz hat keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen (OVCAR3: 81,6 % Viabilität; OVCAR4: 73,3 % Viabilität). In der Kombination von Oligomycin A und Cisplatin erhöht sich die Viabilität in OVCAR3 von 39,7 % mit Cisplatin allein auf 76,4 % in der Kombination und in OVCAR4 von 27,0 % Viabilität mit Cisplatin allein auf 56,5 % Viabilität in der Kombination. Somit führt die Verhinderung der Induktion von mtROS durch Cisplatin, aufgrund der Blockierung der mitochondrialen Aktivität durch Oligomycin A-Inkubation, zu einer signifikanten Reduzierung der Cisplatin induzierten Apoptose.

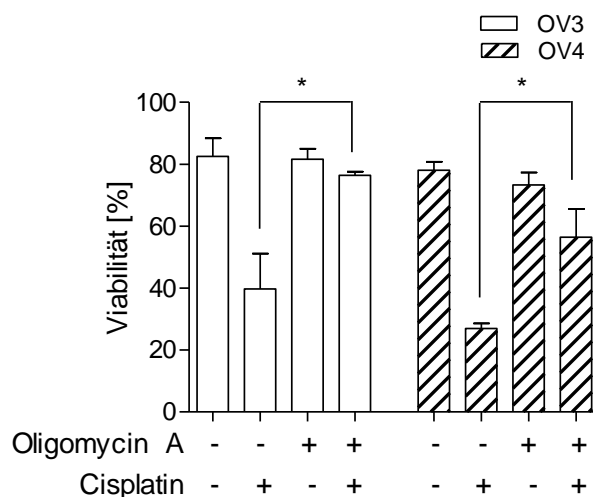


Abbildung 32: Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin A verhindert die Cisplatin induzierte Apoptose. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und dem ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin A (5 μ M) allein und in Kombination inkubiert und anschließend mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Die Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin A rettete die Zellen signifikant vor dem Cisplatin induzierten Zelltod. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

ATP-Depletion durch Oligomycin A führt zu einer geringeren Aufnahme und Akkumulation von Cisplatin in der Zelle [93]. Um die Rolle von ATP für die reduzierte Cisplatin induzierte Apoptose nach Inkubation mit Oligomycin A zu überprüfen, wurde das zelluläre ATP Level bestimmt. Hierfür wurden die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 für 48 h mit Oligomycin A inkubiert und anschließend mit dem ADP/ATP ratio Assay Kit das zelluläre ATP Level bestimmt (Abbildung 33). 48 h nach Inkubation mit Oligomycin A ist keine signifikante Veränderung im zellulären ATP Level von OVCAR3 und OVCAR4 nachweisbar. Die Zellen wurden während der Inkubation in RPMI1640 Medium mit Glukose kultiviert, die somit ausreicht, um für 48 h das ATP Level aufrechtzuerhalten ohne mitochondriale Aktivität.

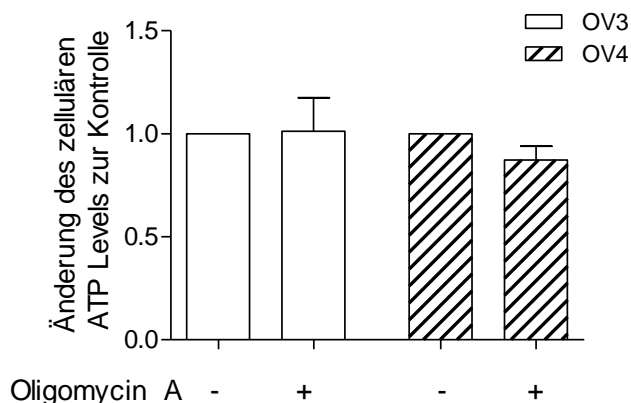


Abbildung 33: Inkubation mit Oligomycin für 48 h hat keinen Einfluss auf die ATP Menge der Zelle. Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 wurden für 48 h mit ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin A (5 μ M) inkubiert. Anschließend die Zellen geerntet und das zelluläre ATP Level mit Hilfe des ADP/ATP ratio Assay Kit bestimmt. Die Inhibition der mitochondrialen ATP-Synthase durch Oligomycin A für 48 h hat keinen Einfluss auf die zelluläre ATP Menge. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Die reduzierte Induktion der Apoptose nach Inkubation mit Oligomycin A und Cisplatin ist nicht auf das ATP Level zurückzuführen, sondern auf das reduzierte mtROS Level. Dies zeigt, dass die von Cisplatin gesteigerte mitochondriale Aktivität zur Induktion von mtROS führt und unterstreicht die wichtige Rolle von mtROS für die Cisplatin induzierte Apoptose.

3.4.2. *Knock-down* von Schlüssel-Proteinen in der mitochondrialen Biogenese (PGC1 α und TFAM), verhindert den Cisplatin induzierten Zelltod

Der mitochondriale Transkriptionsfaktor TFAM ist essenziell für die Transkription der mitochondrial-kodierten Proteine und somit für mitochondriale Aktivität. Zusätzlich spielt TFAM auch eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Biogenese [39,94]. Im Einklang mit der gesteigerten mitochondrialen Masse, ist nach Cisplatin-Inkubation das Protein Level von TFAM in der Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8 erhöht (Abbildung 34).

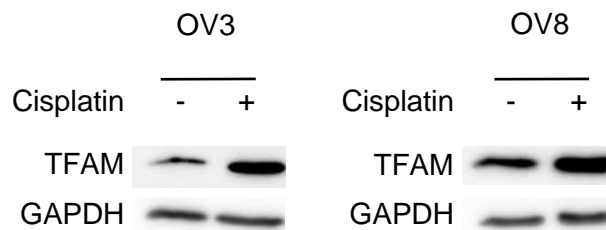


Abbildung 34: Cisplatin erhöht das Protein Level von TFAM. Die Cisplatin-sensitive Ziellinie OVCAR3 und die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert und anschließend geerntet für die Western Blot Analyse. Cisplatin erhöht das Protein Level des mitochondrialen Transkriptionsfaktor TFAM in OVCAR3 und in OVCAR8. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

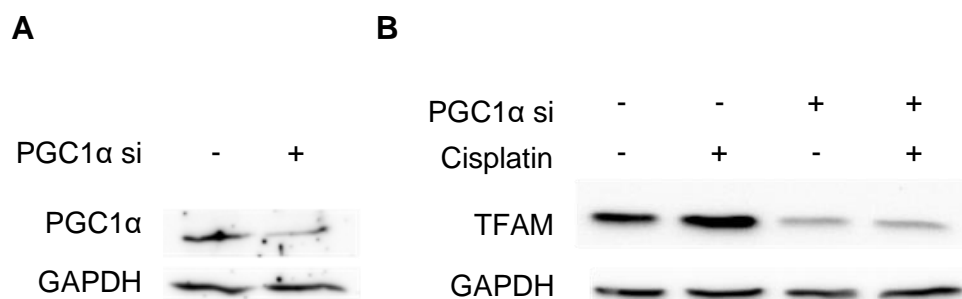


Abbildung 35: Knock-down von PGC1α verhindert gesteigertes Protein Level des Downstream Zielproteins TFAM. Die Cisplatin-sensitive Ziellinie OVCAR4 wurden transfiziert mit siRNA für PGC1α oder mit Kontroll-siRNA. Nach Inkubation mit 10 μ M Cisplatin für 48 h wurden die Zellen geerntet für die Western Blot Analyse. **(A)** Der *Knock-down* von PGC1α ist effektiv in OVCAR4. **(B)** Das Protein Level des nachgeordnete Zielprotein TFAM wird durch Inkubation von Cisplatin in OVCAR4 gesteigert. Durch den *Knock-down* von PGC1α wird das Protein Level verringert und wird durch Cisplatin-Inkubation nicht gesteigert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Expression von TFAM wird durch das „Schlüsselprotein der mitochondrialen Biogenese“ PGC1α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) reguliert [36]. Zur Untersuchung der Auswirkung der mitochondrialen Biogenese auf den Cisplatin induzierten Zelltod, wurde das Schlüsselprotein PGC1α durch RNA-Interferenz mit Hilfe von siRNA runterreguliert. Dieser *Knock-down* von PGC1α wurde im Western Blot überprüft und ist effektiv (Abbildung 35A) in der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR4. Anschließend wurde die Wirkung des *Knock-downs* auf das *downstream* Zielprotein TFAM im Western Blot analysiert. Der *Knock-down* von PGC1α verringert die Expression von TFAM und verhindert auch die Cisplatin vermittelte gesteigerte Expression von TFAM (Abbildung 35B). Die PGC1α-*Knock-down*-Zellen wurden für 48 h mit Cisplatin inkubiert, mit MitoSOX gefärbt und

im Durchflusszytometer analysiert, um den Einfluss der PGC1 α Expression auf die Cisplatin induzierte ROS-Produktion zu untersuchen. Die Werte wurde auf die Kontrolle der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen normalisiert (Abbildung 36). In den Kontroll-siRNA transfizierten Zellen steigt das mtROS nach Cisplatin-Inkubation stark an (1,85-fach zur Kontrolle). In den PGC1 α -siRNA-Zellen wird die Steigerung des mtROS Levels durch Cisplatin-Inkubation signifikant reduziert (1,40-fach zur Kontrolle). Der *Knock-down* von PGC1 α allein hat keine Wirkung auf das mtROS Level (1,08-fach zur Kontrolle) Somit verhindert der *Knock-down* von PGC1 α signifikant die Induktion von mtROS nach Cisplatin-Inkubation.

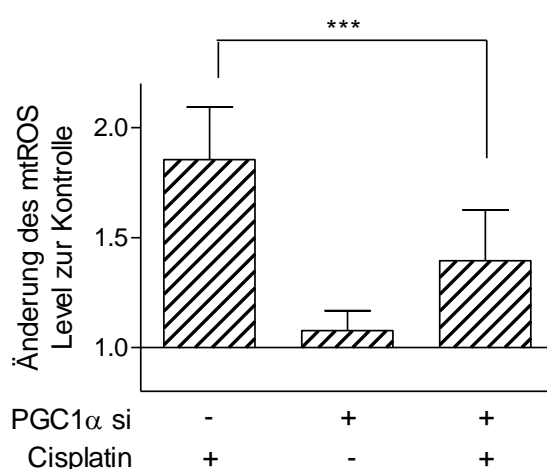


Abbildung 36: *Knock-down* von PGC1 α verhindert gesteigertes mtROS Level nach Cisplatin-Inkubation. Die sensitive Ziellinien OVCAR4 wurden transfiziert mit siRNA für PGC1 α oder mit Kontroll-siRNA. Nach Inkubation mit 10 μ M Cisplatin für 48 h wurden die Zellen mit MitoSOX Red, zur Bestimmung des mtROS Levels, gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle normalisiert. Der *Knock-down* des Schlüsselproteins der mitochondrialen Biogenese hat allein keinen Einfluss auf das mtROS Level, jedoch verhindert es die Induktion von mtROS durch Cisplatin-Inkubation. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurde die Wirkung der verringerten Expression von PGC1 α auf die Cisplatin induzierte Apoptose untersucht. Die PGC1 α -*Knock-down*-Zellen und die Kontroll-siRNA-Zellen wurden mit Cisplatin inkubiert, mit Annexin V/PI gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. (Abbildung 37). PGC1 α -siRNA hat allein keinen Einfluss auf die Viabilität (Kontroll-siRNA Zellen: 72,6 % Viabilität; PGC1 α -siRNA Zellen: 74,5% Viabilität). Die Viabilität nach Cisplatin-Inkubation steigt von 20,9 % in den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen auf 48,7 % in den mit PGC1 α -siRNA transfizierten Zellen. Die Reduktion der mtROS-Induktion durch Cisplatin führt zu einem signifikant besseren Überleben der Zellen nach Cisplatin-Inkubation.

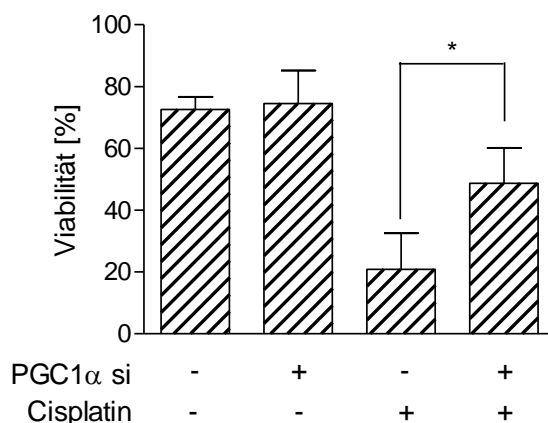


Abbildung 37: Knock-down von PGC1α verhindert die Cisplatin induzierte Apoptose. Die sensitive Ziellinie OVCAR4 wurde mit siRNA für PGC1α oder mit Kontroll-siRNA transfiziert. Nach Inkubation mit 10 μ M Cisplatin für 48 h wurden die Zellen mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Der *Knock-down* des Schlüsselproteins der mitochondrialen Biogenese, PGC1α, hat allein keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Jedoch verhindert der *Knock-down* von PGC1α signifikant die Induktion der Apoptose nach Cisplatin-Inkubation in der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR4. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde die sensitive Zelllinie OVCAR3 mit siRNA für PGC1α transfiziert, der *Knock-down* im Western Blot kontrolliert (Abbildung 38 A) und nach Cisplatin-Inkubation und Annexin V/PI-Färbung im Durchflusszytometer die Viabilität analysiert (Abbildung 38 B). Da der *Knock-down* das PGC1α Protein Level nur geringfügig verringert wird die Viabilität nach Cisplatin-Inkubation durch die Transfektion mit PGC1α-siRNA zwar schwach, aber nicht signifikant, erhöht (Kontroll-siRNA Zellen: 19,4% Viabilität nach Cisplatin-Inkubation; PGC1α-siRNA Zellen: 34,8% Viabilität nach Cisplatin-Inkubation).

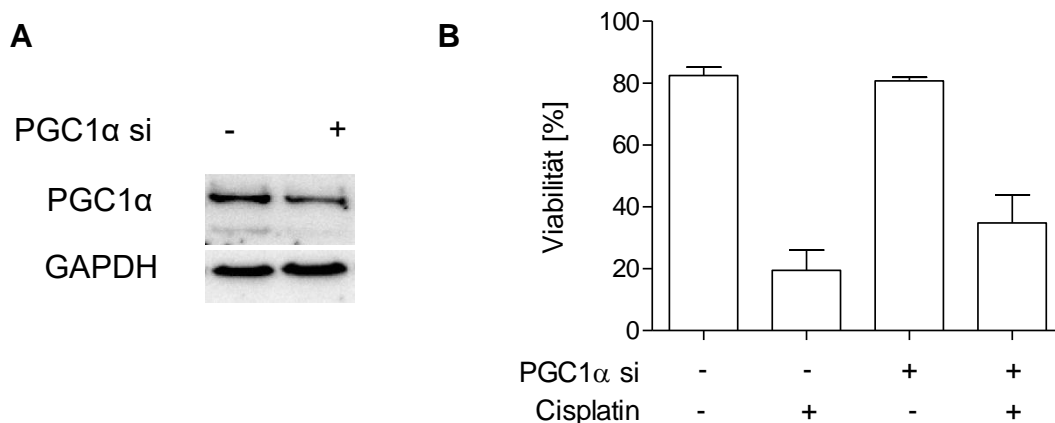


Abbildung 38: Knock-down von PGC1 α in OVCAR3 ist nicht effektiv und verringert nur geringfügig die Cisplatin induzierte Apoptose. Die sensitive Ziellinie OVCAR3 wurden mit siRNA für PGC1 α oder mit Kontroll-siRNA transfiziert. Nach Inkubation mit 10 μ M Cisplatin für 48 h wurden die Zellen entweder **(A)** geerntet für die Western Blot Analyse oder **(B)** mit Annexin V/PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Der *Knock-down* des Schlüsselproteins der mitochondrialen Biogenese ist nicht effektiv und verhindert daher die Induktion der Apoptose nach Cisplatin-Inkubation nur geringfügig in der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR3. Gezeigt ist in (A) ein repräsentatives von mindestens drei unabhängigen Experimenten und in (B) der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Da PGC1 α in vielen Signalwegen beteiligt ist wurde überprüft, ob die Steigerung der Viabilität nach Cisplatin-Inkubation durch den *Knock-down* von PGC1 α auf die verminderte Expression des TFAM Protein Levels zurückzuführen ist. Hierfür wurde ein *Knock-down* von TFAM durch siRNA in den Cisplatin-sensitiven OVCAR4 Zellen durchgeführt.

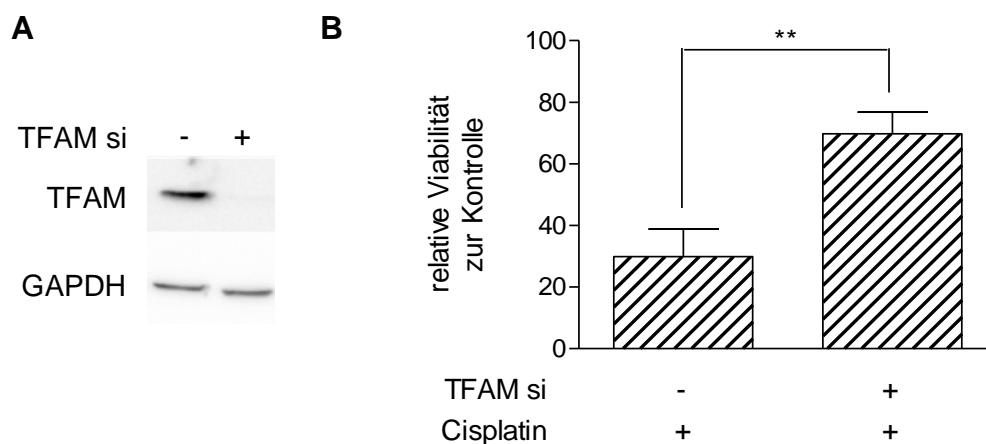


Abbildung 39: Knock-down von TFAM verhindert die Cisplatin induzierte Apoptose. Die sensitive Zelllinien OVCAR4 wurden transfiziert mit siRNA für TFAM oder mit Kontroll-siRNA. Nach Inkubation mit 10 μ M Cisplatin für 48 h wurden die Zellen entweder **(A)** geerntet für die Western Blot Analyse oder **(B)** mit Annexin V/PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Der *Knock-down* des mitochondrialen Transkriptionsfaktor TFAM ist effektiv und verhindert die Induktion der Apoptose nach Cisplatin-Inkubation in der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR4. Gezeigt ist **(B)** der Mittelwert \pm SD oder **(A)** ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Der *Knock-down* wurde durch einen Western Blot kontrolliert (Abbildung 39 A) und nach Cisplatin-Inkubation und Annexin V/PI-Färbung die Viabilität im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 39 B). Der effektive *Knock-down* von TFAM verhindert die Induktion der Cisplatin induzierten Apoptose in der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR4. Die relative Viabilität nach Cisplatin-Inkubation wird von 29,9 % in den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen auf 69,8 % in den mit TFAM-siRNA transfizierten Zellen erhöht.

3.5. Die Mitochondriale Masse als prognostischer Marker für Ovarialkarzinompatientinnen

Die essenzielle Rolle der Mitochondrien in der Cisplatin induzierten Apoptose wurde mit Hilfe von Ovarialkarzinomzelllinien gezeigt. Da dieses Modell nur bedingt die Realitäten in Tumoren von Patientinnen widerspiegeln kann, wurde Primärmaterial von Ovarialkarzinomen mit Cisplatin inkubiert und das TFAM Expression Level mit Hilfe der Immunhistochemie-Färbung analysiert (Abbildung 40).

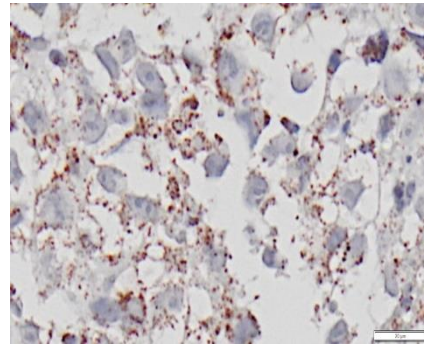
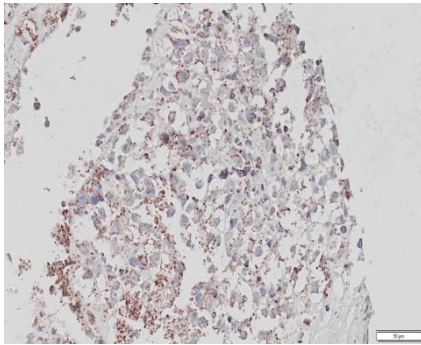
Patient #1

Übersicht

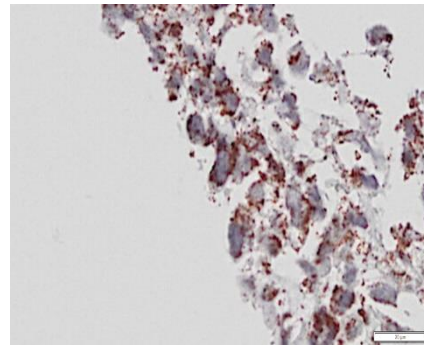
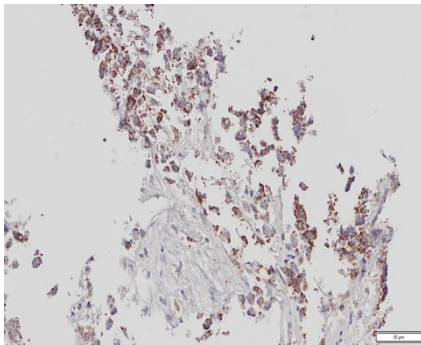
Vergrößert

TFAM

Kontrolle



Cisplatin

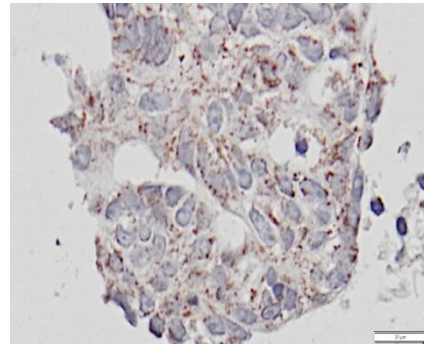
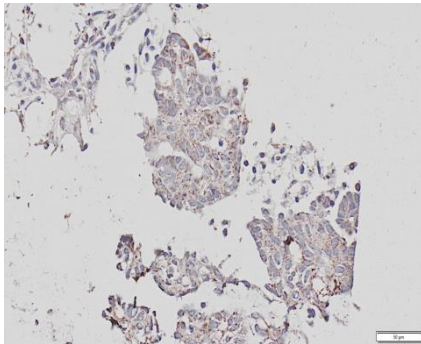
**Patient #2**

Übersicht

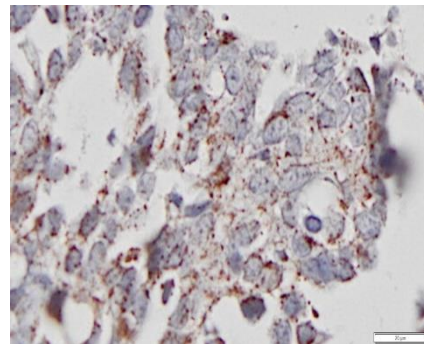
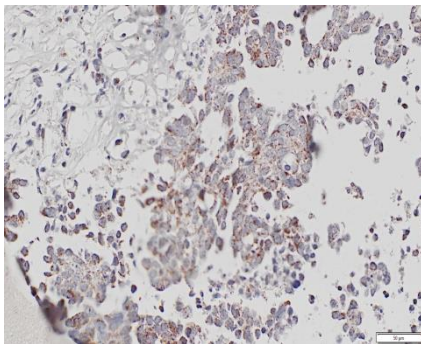
Vergrößert

TFAM

Kontrolle



Cisplatin



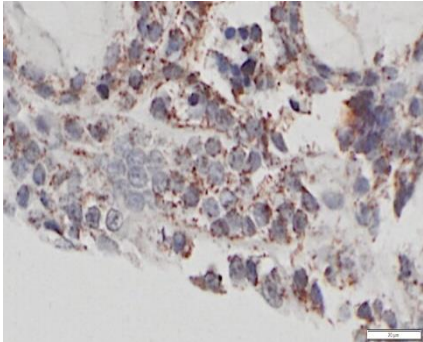
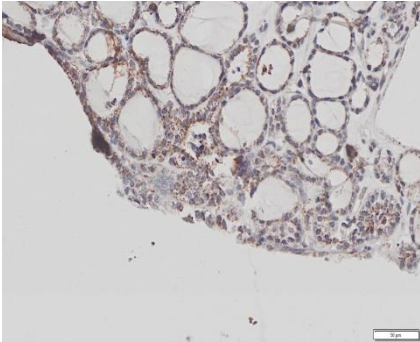
Patient #3

Übersicht

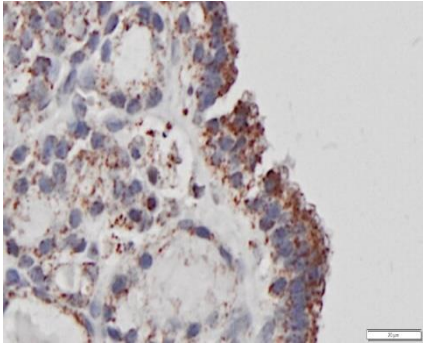
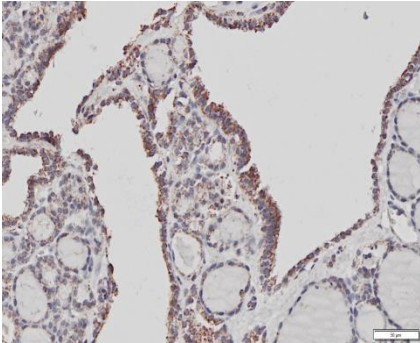
Vergrößert

TFAM

Kontrolle



Cisplatin



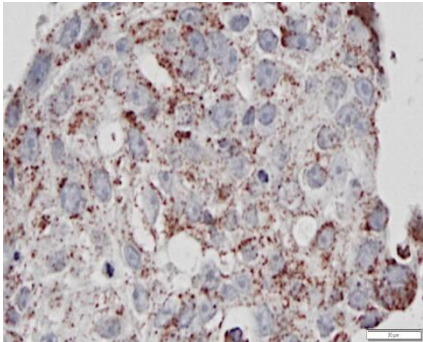
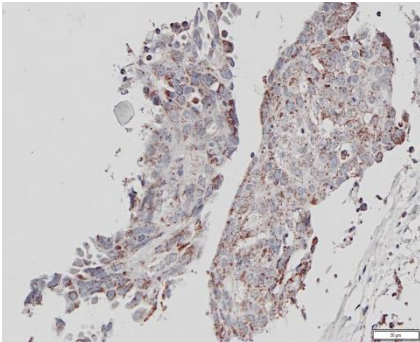
Patient #4

Übersicht

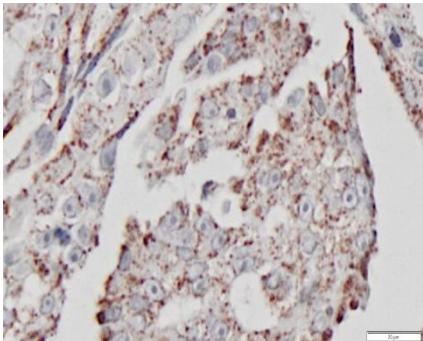
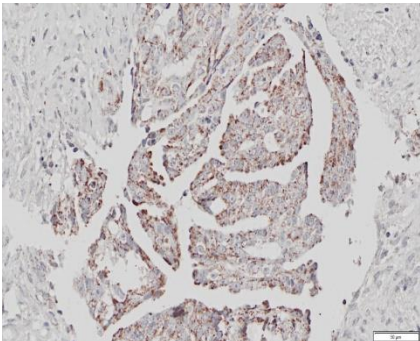
Vergrößert

TFAM

Kontrolle



Cisplatin



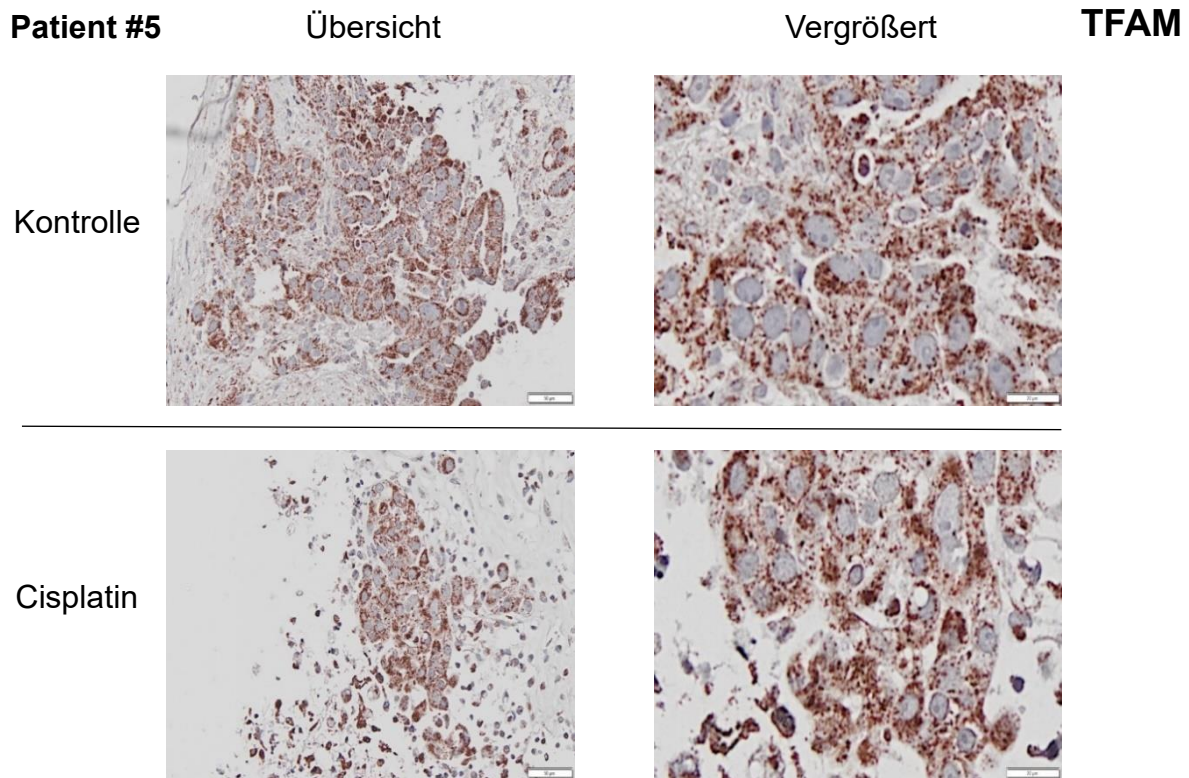


Abbildung 40: Erhöhtes TFAM Protein Level nach Cisplatin-Inkubation in Primär-Ovarialkarzinomen. Primäre Ovarialkarzinome wurden in Schnitte mit ca. 300 µm geschnitten und 72 h mit 13 µM Cisplatin inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Danach wurden 3 µm dicke Schnitte abgeschnitten und eine Immunhistochemie-Färbung mit Primärantikörper gegen TFAM durchgeführt. Das TFAM Protein Level ist in Patient #1 und #3 stark erhöht nach Cisplatin-Inkubation. In Patient #2 und #4 wird das Protein Level von TFAM nur leicht gesteigert und bei Patient #5 ist keine Veränderung nach Cisplatin-Inkubation sichtbar. Übersicht: 4x Vergrößerung; Vergrößert: 20x Vergrößerung. Messbalken = 50 µM.

Die Änderung der Expression von TFAM nach Cisplatin-Inkubation ist heterogen in den fünf Patientinnen. Patientin #1 und Patientin #3 haben ein stark erhöhtes Protein Level von TFAM nach Cisplatin, wohingegen Patientin #2 und Patientin #4 nur eine schwache Steigerung aufweisen. In Patientin #5 ist kein Unterschied zwischen der Cisplatin inkubierten Probe und der Kontrolle sichtbar. Jedoch ist das Gesamtprotein Level von TFAM deutlich höher als in den anderen vier Patientinnen. Die gesteigerte mitochondriale Masse nach Cisplatin-Inkubation ist somit nicht nur in den Ovarialkarzinomzelllinien, sondern auch in Primärtumoren nachweisbar und die Zelllinien können als Modell genutzt werden.

Die Expression von TFAM und des mitochondrialen Membranprotein TIMM23 (Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23) spiegeln die mitochondriale Masse der Zellen wider und könnten deshalb als Indikator für das Ansprechen von Tumoren auf die platinhaltige Primärtherapie nach der Operation dienen. Daher wurde untersucht, ob die Expression der beiden Gene als Marker für

ein besseren Überleben in Ovarialkarzinompatientinnen dienen können. Hierfür wurden die Expressions-Daten aus dem TCGA-OV Projekt von TFAM und TIMM23 und die Überlebens-Daten der Patientinnen analysiert (Abbildung 41). Die Daten zeigen eine signifikant besser 5-Jahres Überlebensrate von Patientinnen mit einer hohen Expression von TFAM (41 % Überleben) oder TIMM23 (45 % Überleben) gegenüber Patientinnen mit einer niedrigen Expression von TFAM (28 % Überleben) oder TIMM23 (28 % Überleben).

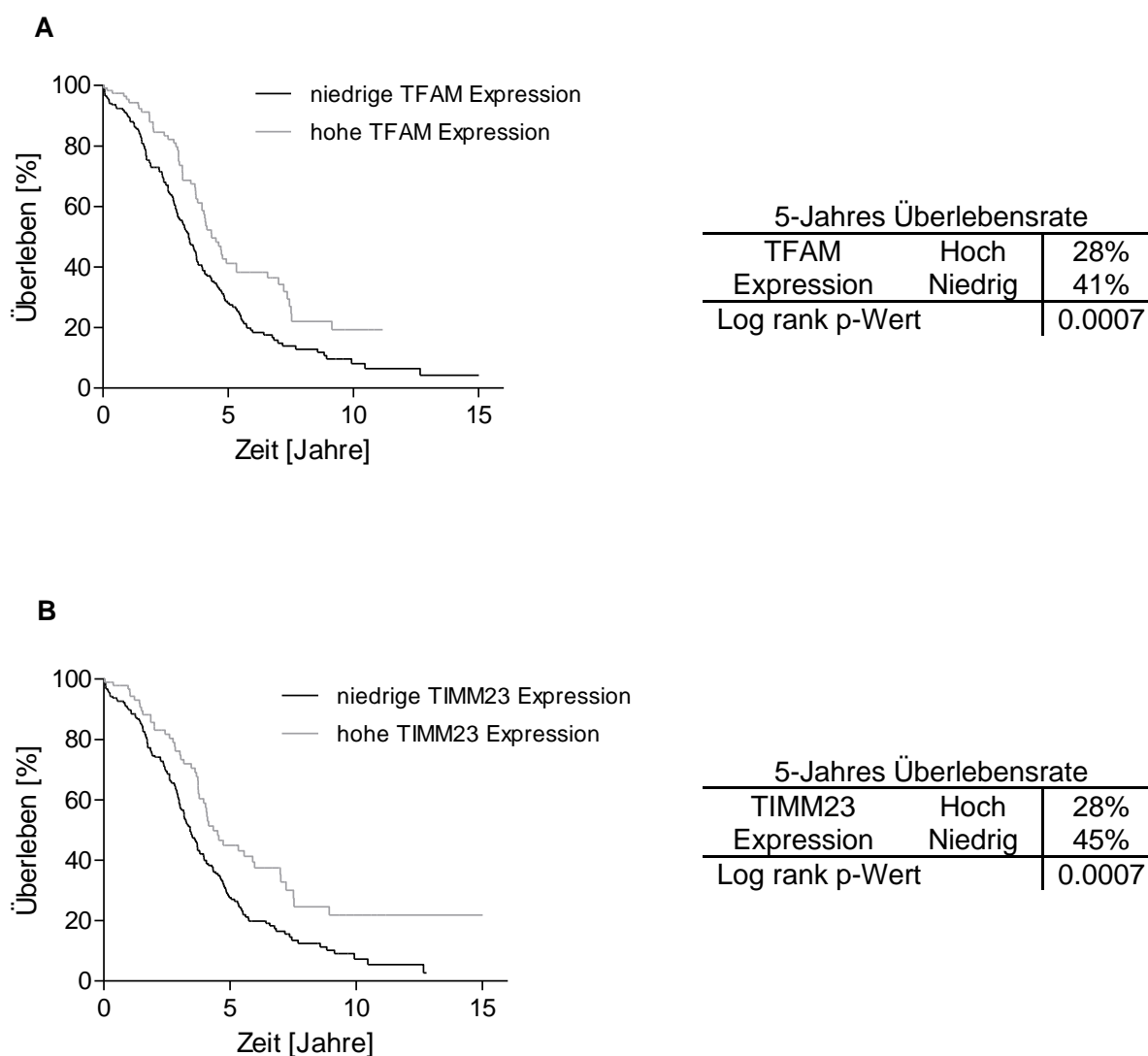


Abbildung 41: Die Mitochondriale Masse korreliert mit der 5-Jahres Überlebensrate von Ovarialkarzinompatientinnen. Analyse von Überlebens- und Expressions-Daten des TCGA-OV-Projektes (v15.0). **(A)** Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit hoher oder niedriger TFAM Expression mit der Abtrennung bei 10,82 FPKM. **(B)** Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit hoher oder niedriger TIMM23 Expression mit der Abtrennung bei 61,81 FPKM. **(A+B)** Die Daten wurden erhoben vom TCGA Research Network (<http://cancergenome.nih.gov>) und dem *Human protein atlas* (www.proteinatlas.org).

Den Einfluss der Mitochondrien auf die Therapie bei Ovarialkarzinompatientinnen konnte bestätigt werden. Die untersuchten Zelllinien sind geeignet als Modell für die

Rolle der gesteigerten mitochondrialen Masse für das Überleben der Zellen nach der Cisplatin-Inkubation.

3.6. Steigerung von mtROS in Cisplatin-resistenten Zellen führt zu erhöhter Apoptose nach Cisplatin-Inkubation

3.6.1. H₂O₂ steigert die Cisplatin induzierte Apoptose in Cisplatin-resistenten Zellen

Die Inhibition der mitochondrialen Aktivität sowie der mitochondrialen Biogenese führen zu einem besseren Überleben in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien nach Cisplatin-Inkubation. Der Cisplatin induzierte Zelltod korreliert mit der mitochondrialen Masse und ist abhängig von der Induktion von mtROS. Cisplatin-resistente Zellen haben ein geringeres mtROS Level als die Cisplatin-sensitiven Zellen. Die Steigerung von mtROS in Cisplatin-resistenten Zellen ist somit potenzielles Ziel, um die Resistenz gegenüber Cisplatin zu überwinden und Apoptose zu induzieren.

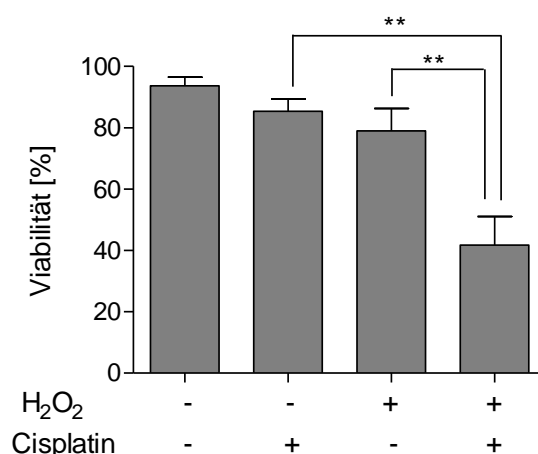


Abbildung 42: Cisplatin in Kombination mit H₂O₂ induziert Apoptose in Cisplatin-resistenten Zellen. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 µM Cisplatin und 300 µM H₂O₂ allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. H₂O₂ und Cisplatin allein haben keine Auswirkung auf die Viabilität der Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen, jedoch steigert die Kombination von H₂O₂ und Cisplatin die induzierte Apoptose signifikant. Gezeigt ist der Mittelwert ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Superoxide werden in den Mitochondrien zu hochreaktivem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) umgewandelt [21]. Die direkte Inkubation mit H₂O₂ führt zu einem erhöhten ROS Level. Die Wirkung der Erhöhung des ROS Levels durch H₂O₂-Inkubation auf den Cisplatin induzierten Zelltod wurde in den Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen untersucht. Die Inkubation mit 2 mM H₂O₂ reduziert die Viabilität nur geringfügig in OVCAR8 Zellen

(Kontrolle: 93,7 % Viabilität; H₂O₂: 79 % Viabilität) (Abbildung 42). In der Kombination von H₂O₂ und Cisplatin wird jedoch die Viabilität signifikant reduziert gegenüber der Inkubation mit Cisplatin allein (Cisplatin: 85,3 % Viabilität; H₂O₂ + Cisplatin: 41,7 % Viabilität). Demzufolge wird die Resistenz der OVCAR8 Zelllinie gegenüber Cisplatin durch Steigerung des intrazellulären ROS Levels überwunden. Dies bestätigt die wichtige Rolle von mtROS für den Cisplatin induzierten Zelltod.

3.6.2. Hohe Konzentration von Vitamin C steigert mtROS und die Cisplatin induzierte Apoptose

Ascorbinsäure (Vitamin C) ist ein vielfach verwendetes Antioxidationsmittel [95]. Jedoch wirkt Vitamin C in hoher Konzentration gegenteilig und ist ein ROS-Induktor [68,69]. Um die ROS-Induktion von Ascorbinsäure zu überprüfen wurde die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 mit einer hohen Konzentration von Ascorbinsäure (2 mM) inkubiert und auf die mtROS-Induktion untersucht (Abbildung 43). Die Zellen wurden mit Ascorbinsäure allein und in Kombination mit Cisplatin für 48 h inkubiert, mit MitoSOX gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Ascorbinsäure steigert das mtROS Level auf das 1,30-fache zu den Kontrollzellen. Das von Cisplatin induzierte mtROS Level (1,47-fach zur Kontrolle) steigt in Gegenwart von Ascorbinsäure signifikant auf das 2,27-fache.

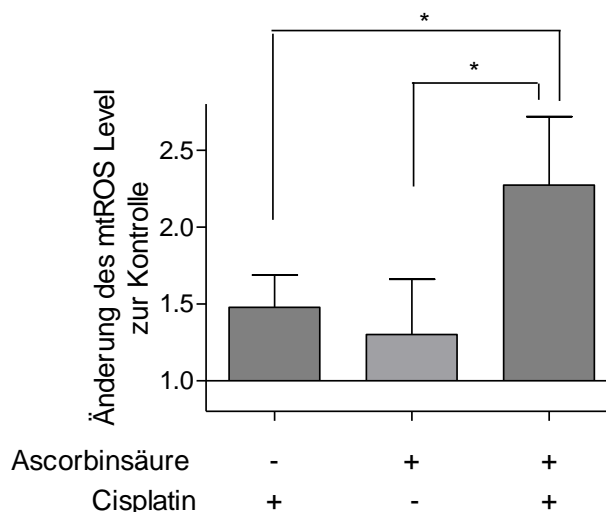


Abbildung 43: Ascorbinsäure (Vitamin C) steigert das Cisplatin induzierte mtROS. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und 2 mM Ascorbinsäure allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit MitoSOX Red zur Bestimmung des mtROS Levels gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Ascorbinsäure und Cisplatin allein induzieren mtROS. In Kombination erhöht die Ascorbinsäure das Cisplatin induzierte mtROS Level. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zur Untersuchung, ob auch Ascorbinsäure die Cisplatin-Resistenz der OVCAR8 Zellen überwinden kann, wurde in den OVCAR8 Zellen 48h nach der Inkubation mit Cisplatin und Ascorbinsäure die Viabilität mit Annexin V/PI im Durchflusszytometer untersucht. Im Einklang mit der Reduktion der Viabilität durch die Kombination von H_2O_2 und Cisplatin, steigert auch die Kombination der Ascorbinsäure mit Cisplatin die Apoptose signifikant (Cisplatin: 90,7 % Viabilität; Ascorbinsäure + Cisplatin: 39,3 % Viabilität) in der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8 (Abbildung 44). Eine hohe Konzentration von Ascorbinsäure (2 mM) hingegen hat keinen Effekt auf die Zellviabilität (Kontrolle: 96,1 % Viabilität; Ascorbinsäure: 91,8 % Viabilität).

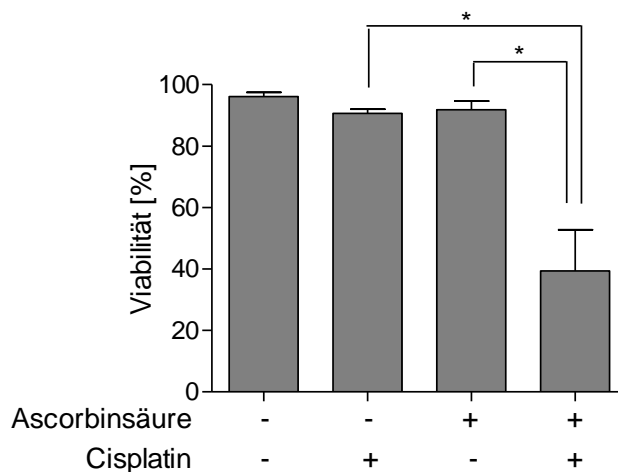


Abbildung 44: Cisplatin in Kombination mit Ascorbinsäure induziert Apoptose in Cisplatin-resistenten Zellen. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und 2 mM Ascorbinsäure allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Ascorbinsäure und Cisplatin allein haben keine Auswirkung auf die Viabilität der Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen. Jedoch steigert die Kombination die induzierte Apoptose signifikant. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.6.3. Inhibition von UCP2 steigert mtROS und induziert Apoptose in Kombination mit Cisplatin in der Cisplatin-resistenten OVCAR8

Die Mitochondrien besitzen eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife zur Reduzierung von mtROS in Stresssituationen die von den Uncoupling Proteinen (UCPs) gebildet werden. Diese reduzieren mtROS und das mitochondriale Membranpotential durch die Leckage von Protonen durch die innere mitochondriale Membran [70–72]. Die Protonen-Leckage nach Cisplatin-Inkubation wurde durch den MitoStress-Test im Seahorse Extracellular Flux Analyzer untersucht.

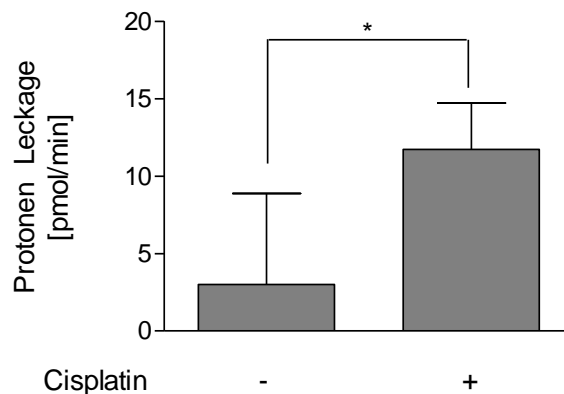


Abbildung 45: Cisplatin erhöht die Protonen-Leckage der Mitochondrien. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert. Anschließend wurden die noch adhärenen Zellen geerntet und 35.000 Zellen für die Messung in die Seahorse Cell Culture Platte überführt. Die Zellen wurden mit einem MitoStress-Test im Seahorse Extracellular Flux Analyzer auf ihre mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) untersucht. Der Protonen Leakage ist die Differenz der OCR nach der ATP-Synthase Inhibition (Werte 4-6; siehe Abbildung 21) und der OCR der nicht-mitochondriale Respiration (Werte 10-12; siehe Abbildung 21). Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Eine signifikant erhöhte Protonen Leakage nach Cisplatin-Inkubation ist in den Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen nachweisbar (Abbildung 45). Dies könnte ein Hinweis auf aktive UCPs nach Cisplatin-Inkubation sein. Um dies auszunutzen, wurden die Zellen mit Genipin, einem UCP2-Inhibitor, in Kombination mit Cisplatin inkubiert (Abbildung 46) und das mtROS Level im Durchflusszytometer analysiert. Genipin allein steigert das mtROS Level vergleichbar stark (1,53-fach zur Kontrolle) wie Cisplatin (1,41-fach zur Kontrolle). In der Kombination mit Cisplatin steigert Genipin das von Cisplatin induzierte mtROS signifikant (1,99-fach zur Kontrolle).

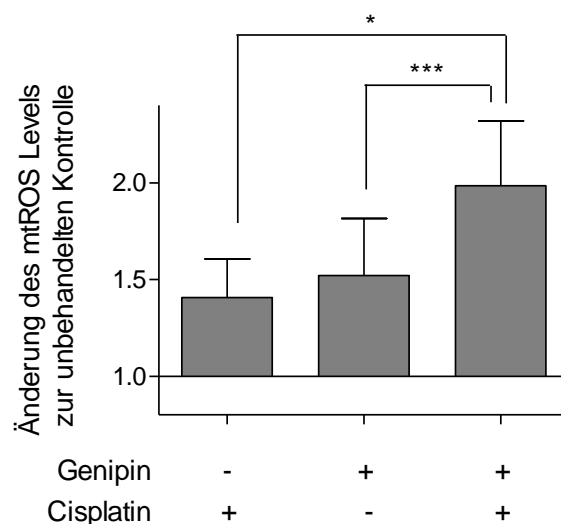


Abbildung 46: UCP2-Inhibitor Genipin steigert das Cisplatin induzierte mtROS. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und dem UCP-2-Inhibitor Genipin (100 μ M) allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit MitoSOX Red zur Bestimmung des mtROS Levels gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Genipin und Cisplatin allein induzieren mtROS. In Kombination erhöht Genipin das Cisplatin induzierte mtROS Level. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Auch nach der Inkubation der Kombination von Genipin und Cisplatin wurde die Viabilität der Zellen im Durchflusszytometer untersucht. Genipin allein verringert die Viabilität nur geringfügig (Kontrolle: 97,0 % Viabilität; Genipin: 89,0 % Viabilität) in der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8 (Abbildung 47). Im Einklang mit dem signifikant gesteigerten mtROS Level reduziert die Kombination von Genipin und Cisplatin die Viabilität signifikant (Cisplatin: 85,6 % Viabilität; Genipin + Cisplatin: 34,6 % Viabilität).

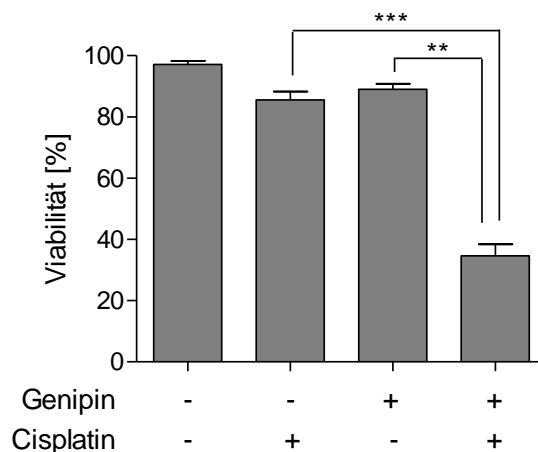


Abbildung 47: Cisplatin in Kombination mit Genipin induziert Apoptose in Cisplatin-resistenten Zellen. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und dem UCP2-Inhibitor Genipin (100 μ M) allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Genipin und Cisplatin allein haben keine Auswirkung auf die Viabilität der Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen. Jedoch steigert die Kombination die induzierte Apoptose signifikant. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zur Überprüfung ob die verminderte Aktivität von UCP2 der Grund für die gesteigerte Apoptose nach Inkubation mit Genipin und Cisplatin ist, wurde UCP2 mit Hilfe von UCP2-siRNA runterreguliert. Die UCP2-*Knock-down*-Zellen wurden mit und ohne Cisplatin-Inkubation für 48 h kultiviert und anschließend für die Western Blot Analyse geerntet oder mit Annexin V/PI gefärbt, um die Viabilität im Durchflusszytometer zu analysieren. Der *Knock-down* von UCP2 führt zu einem reduzierten Protein Level von UCP2 in der Western Blot Analyse (Abbildung 48 A). Cisplatin-Inkubation hat weder in den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen noch in den mit UCP2-siRNA transfizierten Zellen einen Einfluss auf die Expression von UCP2 in den Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen. Die Analyse der Viabilität (Abbildung 48 B) zeigt, dass UCP2-siRNA allein nur einen geringen Einfluss auf die Viabilität hat (UCP2-siRNA: 69,2 % Viabilität; Kontroll-siRNA: 74,6 % Viabilität). Jedoch reduziert der *Knock-down* von UCP2 die Viabilität nach Cisplatin-Inkubation signifikant (UCP2-siRNA + Cisplatin: 29,6 % Viabilität; Kontroll-siRNA + Cisplatin: 45,1 % Viabilität). Die Reduktion der Expression von UCP2 führt zu einer Sensitivierung der Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen für die Cisplatin induzierte Apoptose und bestätigt die gesteigerte Apoptose der Kombination von Genipin und Cisplatin.

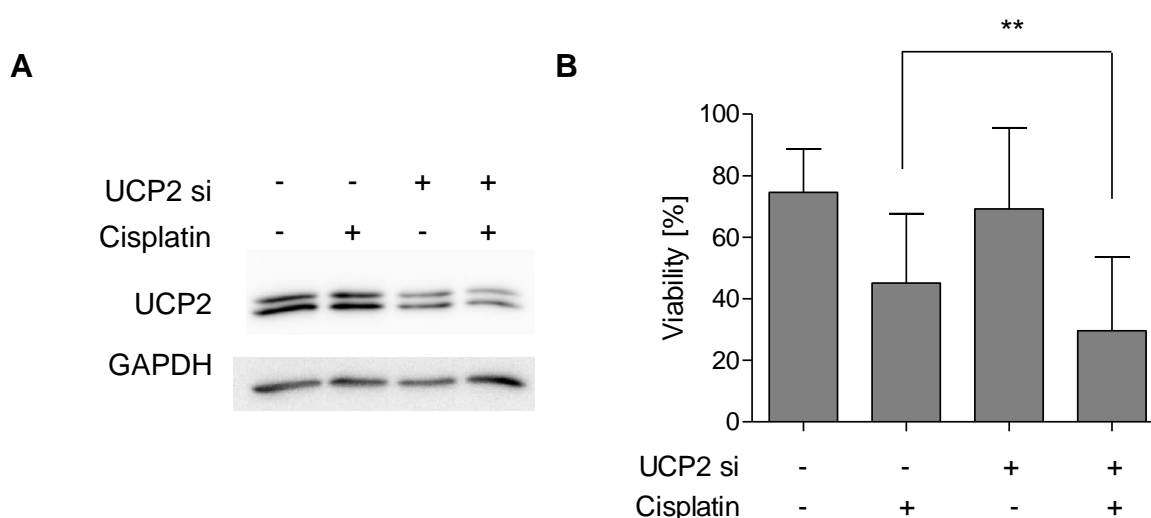


Abbildung 48: Knock-down von UCP2 sensitiviert Cisplatin-resistente OVCAR8 Zellen gegenüber Cisplatin induzierter Apoptose. Die Cisplatin-resistente Ziellinie OVCAR8 wurde transfiziert mit siRNA für UCP2 oder mit Kontroll-siRNA. Nach Inkubation mit 10 μ M Cisplatin für 48 h wurden die Zellen entweder **(A)** geerntet für die Western Blot Analyse oder **(B)** mit Annexin V/PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Der *Knock-down* von UCP2 ist effektiv und sensitiviert die Zellen für die Cisplatin induzierte Apoptose. Gezeigt ist in (A) ein repräsentatives von mindestens drei unabhängigen Experimenten und in (B) der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.6.4. VLX600 sensitiviert Cisplatin-resistente Zellen für die Cisplatin induzierte Apoptose.

VLX600 ist ein Eisenchelator, der mitochondriale Dysfunktionen verursacht und Ende 2018 eine klinische Studie Phase I absolviert wurde. Diese ergab eine gute Verträglichkeit und empfiehlt weitere Studien [96]. VLX600 hat eine antitumorale Wirkung bei Darmkrebszellen [97] und ist eine potentielle neue Substanz für die Kombination mit der herkömmlichen Chemotherapie. Die Blockierung der mitochondrialen Aktivität durch VLX600 wurde in der Cisplatin-resistenten OVCAR8 Ovarialkarzinomlinie im Seahorse Extracellular Flux Analyzer untersucht (Abbildung 49). VLX600 inhibiert nicht direkt die Atmungskette der Mitochondrien, da nach 3 h Inkubation mit 6 μ M VLX600 keine Veränderung in der Sauerstoffverbrauchsrates der OVCAR8 Zelllinie nachweisbar ist. Nach 48 h Inkubation mit VLX600 dagegen ist die mitochondriale Aktivität stark verringert. Die Zugabe der Komplex-Hemmer Rotenone + Antimycin A führt nur zu einer geringen Verminderung der OCR, weshalb mit VLX600 allein die mitochondriale Atmung fast vollständig blockiert wird. In der Kombination

Cisplatin und VLX600 wird die OCR nur minimal gesteigert gegenüber der Inkubation mit VLX600 allein.

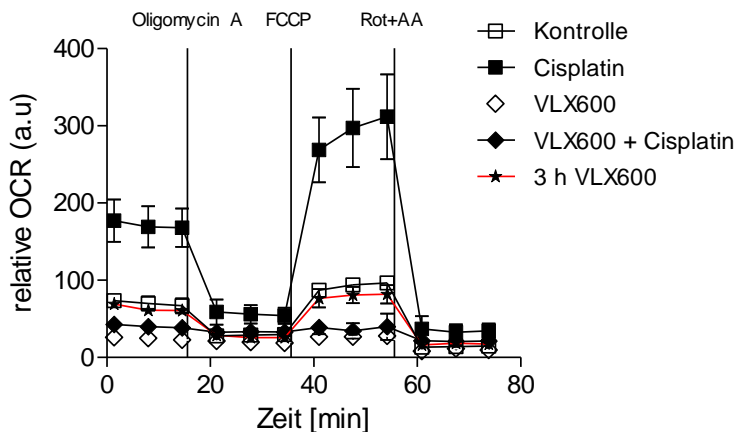


Abbildung 49: VLX600 inhibiert die mitochondriale Aktivität nach 48 h Inkubation. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 μM Cisplatin und 6 μM VLX600 oder für 3 h mit 6 μM VLX600 inkubiert. Anschließend wurden die noch adhärennten Zellen geerntet und 35.000 Zellen für die Messung in die Seahorse Cell Culture Platte überführt. Die Zellen wurden mit einem MitoStress-Test im Seahorse Extracellular Flux Analyzer auf ihre mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) untersucht. Die basale OCR ist durch die Inkubation für 48 h mit VLX600 stark reduziert und wird durch Cisplatin nicht gesteigert. Eine Kurzzeitbehandlung von VLX600 über 3 h hat jedoch keinen Effekt auf die OCR. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die senkrechten Striche zeigen den Zeitpunkt der Injektion der jeweiligen Substanz im MitoStress-Test. Rot+AA: Rotenone + Antimycin A.

Da mtROS eine essenzielle Rolle für die Induktion der Apoptose nach Cisplatin spielt, wurde die mtROS-Induktion nach VLX600-Inkubation untersucht. Daher wurde die Cisplatin-resistenten OVCAR8 mit VLX600 und Cisplatin inkubiert, mit MitoSOX gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 50). Die Werte wurden auf die Kontrolle normalisiert. VLX600 steigert das Level von mtROS (1,43-fach zur Kontrolle) vergleichbar stark wie Cisplatin (1,45-fach zur Kontrolle). In der Kombination von VLX600 und Cisplatin ist ein tendenzieller Anstieg des mtROS Levels gegenüber den Einzelsubstanzen nachweisbar (1,74-fach zur Kontrolle), jedoch ist dieser nicht statistisch signifikant (p -Wert von 0.096).

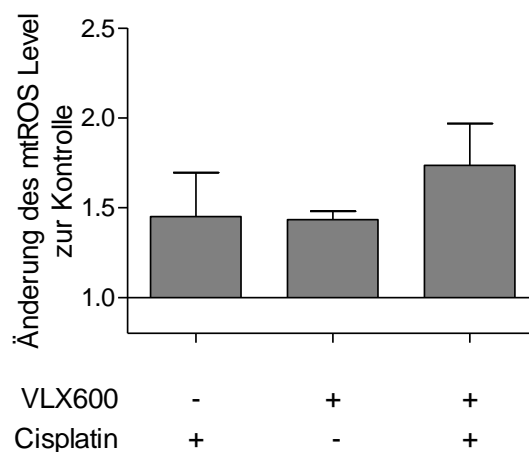


Abbildung 50: VLX600 steigert das Cisplatin induzierte mtROS. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und 2 μ M VLX600 allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit MitoSOX Red zur Bestimmung des mtROS Levels gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. VLX600 und Cisplatin allein induzieren mtROS. In der Kombination von VLX600 und Cisplatin erhöht VLX600 tendenziell das Cisplatin induzierte mtROS Level. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zur Untersuchung der antitumoralen Wirkung und der potenziellen Kombination von VLX600 mit Chemotherapeutika, wurden Cisplatin-resistente OVCAR8 Zellen mit VLX600 und Cisplatin für 48 h inkubiert, mit Annexin V/PI gefärbt und die Viabilität im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 51). 2 μ M VLX600 als Einzelsubstanz verringert die Viabilität nur geringfügig (Kontrolle: 94,6 % Viabilität; VLX600: 80,9 % Viabilität), jedoch reduziert die Kombination von VLX600 mit Cisplatin die Viabilität signifikant (Cisplatin: 92,4 % Viabilität; VLX600 + Cisplatin: 14,6 % Viabilität).

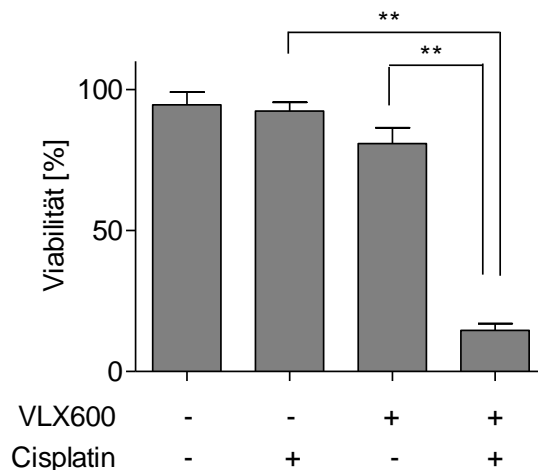


Abbildung 51: VLX600 in Kombination mit Cisplatin induziert Apoptose in Cisplatin-resistenten Zellen. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und 2 μ M VLX600 allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. VLX600 und Cisplatin allein reduzieren die Viabilität der Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen nicht, jedoch steigert die Kombination von VLX600 und Cisplatin die induzierte Apoptose signifikant. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die allgemeine Toxizität der Kombination von VLX600 und Cisplatin wurde in primären Fibroblasten untersucht (Abbildung 52). Es wurden primäre Fibroblasten mit VLX600 und Cisplatin 48h inkubiert, mit Annexin V/PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Weder die Inkubation der Zellen mit VLX600 oder Cisplatin allein (Kontrolle: 84 % Viabilität; VLX600 oder Cisplatin: Viabilität von ca. 80 %) noch die Kombination beider Substanzen reduzieren die Viabilität (75,1 % Viabilität) von primären Fibroblasten.

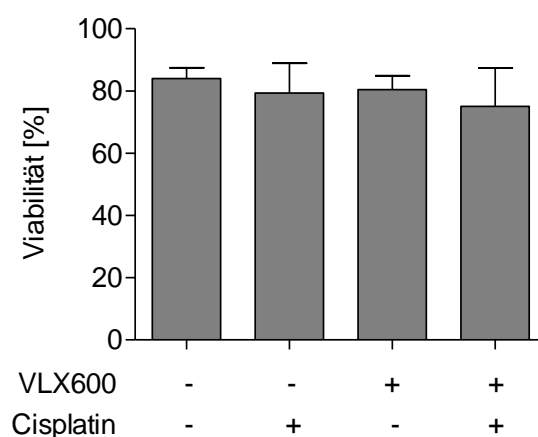


Abbildung 52: VLX600 in Kombination mit Cisplatin induziert keine Apoptose in Fibroblasten. Primäre Fibroblasten wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und 2 μ M VLX600 allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. VLX600 und Cisplatin allein und in der Kombination induzieren keine Apoptose in primären Fibroblasten. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

VLX600 inhibiert nach 48 h die mitochondriale Aktivität, induziert mtROS und reduziert die Viabilität in der Kombination mit Cisplatin in Cisplatin-resistenten Zellen effektiv. Die Toxizität für Fibroblasten ist in der Kombination gering, weshalb die Kombination von VLX600 und Cisplatin eine Therapiemöglichkeit darstellt.

3.6.5. Mitochondriale Komplex-Inhibition durch Rotenone und Antimycin A induziert keine Apoptose in Kombination mit Cisplatin in OVCAR8

Klassische ROS-Induktoren sind mitochondriale Komplex-Hemmer. Komplex-Hemmer verhindern die korrekte Weiterleitung der Elektronen durch die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette, wodurch die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übergehen können [21]. Dabei wird die mitochondriale Aktivität vollständig blockiert. Zur Überprüfung ob VLX600 in der Kombination mit Cisplatin aufgrund der Blockierung der mitochondrialen Aktivität Apoptose induziert, wurden die Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen mit klassischen Komplex-Hemmern in Kombination mit Cisplatin inkubiert. Dazu wurden die Zellen 48 h mit den Komplex-Hemmern Antimycin A und Rotenone mit und ohne Cisplatin inkubiert und anschließend die Viabilität durch eine Annexin V/PI Färbung im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 53). Antimycin A + Rotenone allein verringern die Viabilität der OVCAR8 Zellen nur geringfügig (Kontrolle: 95,9 % Viabilität; Antimycin A + Rotenone: 90,8% Viabilität). Auch die Kombination mit Cisplatin hat keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Zellen (Cisplatin: 92,0 % Viabilität; Antimycin A + Rotenone + Cisplatin: 84,0 % Viabilität). Daher induzieren die Komplex-Hemmer Antimycin A und Rotenone nicht effektiv die Apoptose in den Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen.

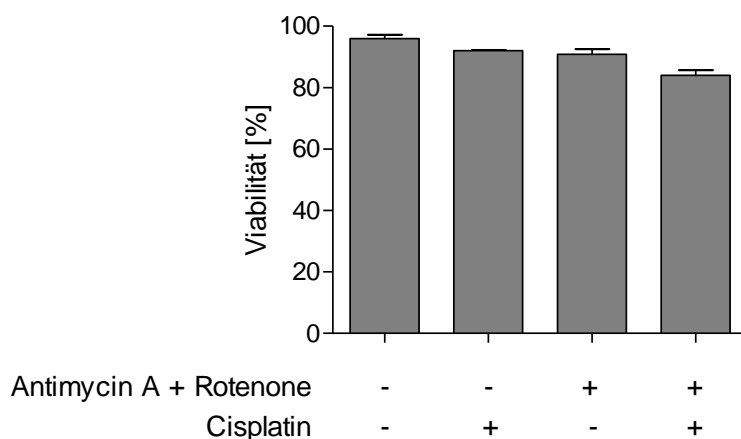


Abbildung 53: Cisplatin in Kombination mit Antimycin A + Rotenone hat keinen Effekt auf die Viabilität in Cisplatin-resistenten Zellen. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und 1,5 μ M Antimycin A + 1,5 μ M Rotenone allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Antimycin A + Rotenone reduzieren allein und in Kombination mit Cisplatin nicht die Viabilität der Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Steigerung des mtROS Levels durch H_2O_2 , hochdosierte Ascorbinsäure und den UCP2-Inhibitor Genipin sensitiviert die Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen für die Cisplatin induzierte Apoptose. Auch die Kombination von VLX600 und Cisplatin induziert signifikant Apoptose in OVCAR8 und inhibiert gleichzeitig die mitochondriale Aktivität. Die Inhibition der mitochondrialen Aktivität durch klassische Komplex-Hemmern in der Kombination mit Cisplatin induziert jedoch keine Apoptose, weshalb für VLX600 in Kombination mit Cisplatin ein anderer Mechanismus vorliegen muss, der zu Induktion der Apoptose führt.

3.7. Steigerung der mitochondrialen Masse in OVCAR8

3.7.1. Reduzierung der Glukose steigert die mitochondriale Masse nicht

Die Cisplatin-sensitiven Ovarialkarzinomzelllinien haben eine höhere mitochondriale Masse als ihre Cisplatin-resistenten Pendanten. Eine Steigerung der mitochondrialen Masse in den Cisplatin-resistenten Zelllinien und eine damit einhergehende Steigerung von mtROS, könnte zu einer Sensitivierung für die Cisplatin induzierte Apoptose führen. Zur Stimulation der mitochondrialen Aktivität wurde die Glukose wöchentlich im Medium der OVCAR8-Zellen reduziert und die mitochondriale Masse mit einer Mitotracker Green-Färbung im Durchflusszytometer gemessen (Abbildung 54). Die Reduktion der Glukose führt jedoch zu einer geringfügigen Reduktion der

mitochondrialen Masse als zu dessen Steigerung. Die Wachstumsrate der Zellen ist durch die Reduktion der Glukose erheblich verringert (nicht gezeigt).

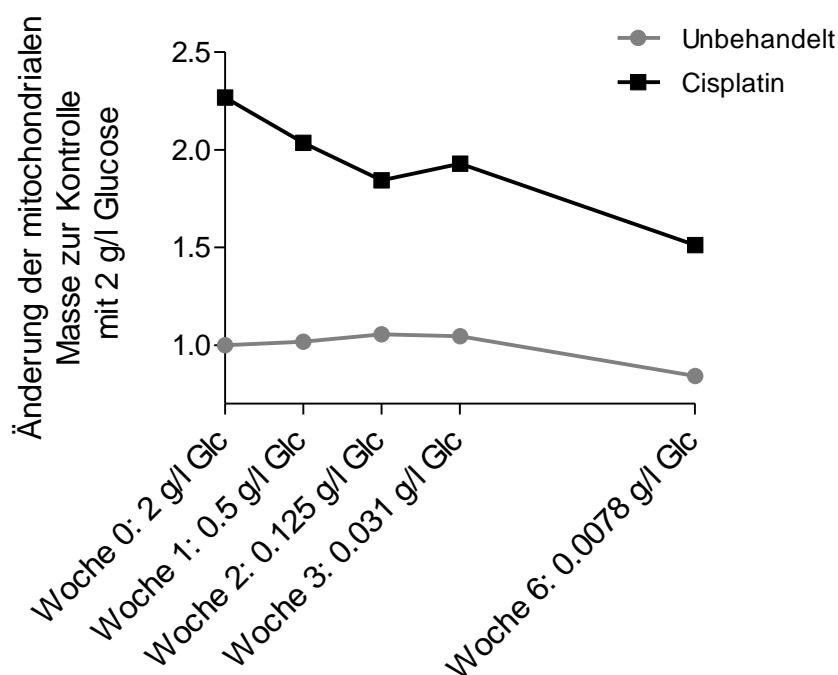


Abbildung 54: Reduzierung von Glukose führt tendenziell zu einer geringeren mitochondrialen Masse. Im Medium der Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde über 6 Wochen die Glukose reduziert und jeweils für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Mitotracker Green zur Bestimmung der mitochondrialen Masse gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden auf die unbehandelte Kontrolle mit 2 g/l Glukose normalisiert. Die mitochondriale Masse ist bis Woche 3 unverändert in den unbehandelten Zellen. In Woche 6 ist in den Zellen, die mit der geringsten Glukose Konzentration kultiviert wurden, eine leichte Abnahme der mitochondrialen Masse nachweisbar. Diese Abnahme der mitochondrialen Masse über die Zeit und der Reduktion von Glukose ist auch in den mit Cisplatin inkubierten Zellen sichtbar. Gezeigt ist jeweils ein Experiment. Glc: Glukose.

3.7.2. Inkubation mit den PGC1 α Aktivatoren Sildenafil und BAY-41-2272 steigern die mitochondriale Masse nicht

Die Aktivierung des „Schlüsselproteins der mitochondrialen Biogenese“ PGC1 α steigert die mitochondriale Biogenese und dadurch die mitochondriale Masse. PGC1 α wird dabei phosphoryliert [98] und acetyliert [99]. Die Langzeit-Inkubation der Zellen mit geringen Mengen Stickoxid (NO) hat eine erhöhte Expression von PGC1 α zur Folge. Durch NO Inkubation werden die Signalwege von zyklischem (engl. *cyclic*) Guanosinmonophosphat (cGMP) und löslicher (engl. *soluble*) Guanylylcyclase (sGC) aktiviert, die wiederum die Expression von PGC1 α erhöhen [73]. BAY 41-2272 aktiviert sGC unabhängig von NO [100] und führt bei Langzeit-Inkubation der Zellen

zu erhöhter Expression von PGC1 α , TFAM und erhöhtem OXPHOS [101]. Sildenafil, ein Inhibitor der Phosphodiesterase-5, erhöht das cGMP Level, die Expression von PGC1 α in der Zelle und steigert somit die mitochondriale Biogenese [102]. Um die PGC1 α Expression in den Cisplatin-resistenten OVCAR8 zu erhöhen wurden die Zellen mit BAY 41-2272 und Sildenafil über zwei Wochen inkubiert und ihre mitochondriale Masse mit Hilfe der Mitotracker Green-Färbung im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 55).

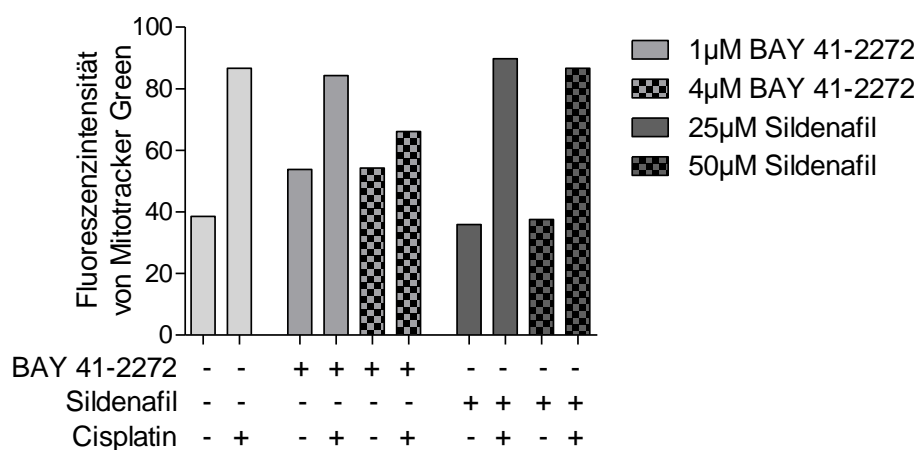


Abbildung 55: BAY 41-2272 und Sildenafil erhöhen nicht die mitochondriale Masse nach Cisplatin-Inkubation. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde über zwei Wochen mit 1 μ M bzw. 4 μ M BAY 41-2272 oder 25 μ M bzw. 50 μ M Sildenafil kultiviert und anschließend für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Mitotracker Green zur Bestimmung der mitochondrialen Masse gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. BAY41-2272 erhöht die mitochondriale Masse ohne Cisplatin-Inkubation leicht, jedoch wird diese durch Cisplatin-Inkubation nicht stärker gesteigert als mit Cisplatin allein. Sildenafil-Inkubation hat keine Auswirkung auf die mitochondriale Masse. Gezeigt ist ein Experiment.

Die Inkubation mit Sildenafil bewirkt keine Änderung der mitochondrialen Masse in OVCAR8 (Sildenafil: mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von Mitotracker Green von 36; Kontrolle: MFI von Mitotracker Green von 39). Die Kultivierung mit BAY 41-2272 über zwei Wochen steigert die mitochondriale Masse leicht in OVCAR8 (1 μ M und 4 μ M BAY 41-2272: MFI von Mitotracker Green von 54). Durch Inkubation mit Cisplatin wird diese aber nicht weiter erhöht als mit Cisplatin allein (1 μ M BAY 41-2272 + Cisplatin: MFI von Mitotracker Green von 85; 4 μ M BAY 41-2272 + Cisplatin: MFI von Mitotracker Green von 66; Cisplatin: MFI von Mitotracker Green von 86). Die Auswirkung auf die Viabilität der OVCAR8 Zellen durch die Kombination von Sildenafil und Cisplatin wurde daraufhin durch Annexin V/PI-Färbung im Durchflusszytometer untersucht (Abbildung 56). Sowohl 1 μ M BAY 41-2272 (93 % Viabilität) als auch 4 μ M BAY 41-2272 (91 % Viabilität) reduzieren die Viabilität der OVCAR8 Zellen nur

geringfügig (98 % Viabilität in der Kontrolle) und haben nur einen geringen Einfluss auf die Cisplatin induzierte Apoptose (Cisplatin: 91 % Viabilität; 1 μ M BAY 41-2272 + Cisplatin: 85 % Viabilität; 4 μ M BAY 41-2272 + Cisplatin: 81% Viabilität).

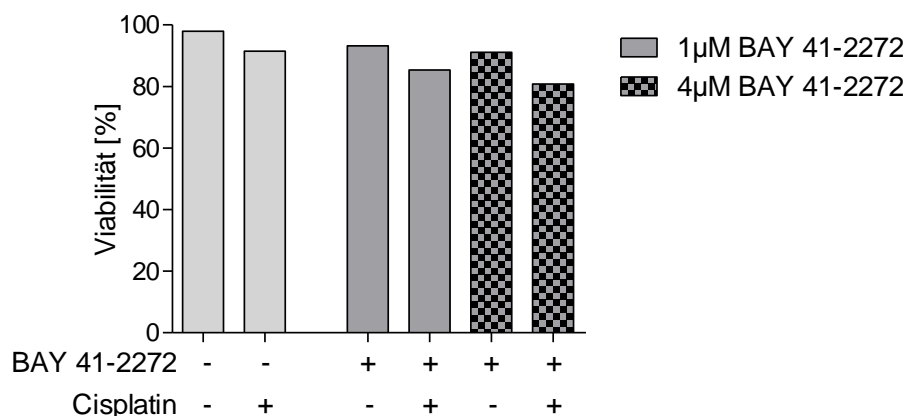


Abbildung 56: BAY 41-2272 hat keine Wirkung auf die Cisplatin induzierte Apoptose in OVCAR8. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde über zwei Wochen mit 1 μ M beziehungsweise 4 μ M BAY 41-2272 kultiviert und anschließend für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. BAY41-2272 induziert allein und in der Kombination mit Cisplatin die Apoptose nicht effektiv in der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8. Gezeigt ist ein Experiment.

Weder die Reduktion der Glucose im Medium noch der die Inkubation mit Sildenafil und BAY 41-2272 führen zu einer erhöhten mitochondrialen Masse in der Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen, weshalb keine Apoptose in Kombination mit Cisplatin induziert wird.

3.8. Mitophagie als potenzieller Resistenzmechanismus für die Cisplatin induzierte Apoptose

Die Blockierung der mitochondrialen Biogenese schützt sensitive Zellen vor der Cisplatin induzierten Apoptose. Auch der Abbau der Mitochondrien durch die Mitophagie spielt eine wichtige Rolle in der Cisplatin Sensitivität. Die Autophagie, die die Mitophagie beinhaltet, ist ein bekannter Chemoresistenz-Mechanismus. Zellen mit erhöhter Autophagie sind resistent gegenüber Cisplatin [103–105]. Zur Untersuchung, ob nach Cisplatin-Inkubation die Autophagie verändert ist, wurden die Zellen nach Cisplatin-Inkubation mit Cytold gefärbt, dass spezifisch die Autophagosom-Vesikel (Prä-Autophagosomen, Autophagosomen und Autophagolysosomen) färbt. Diese wurden anschließend im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 57).

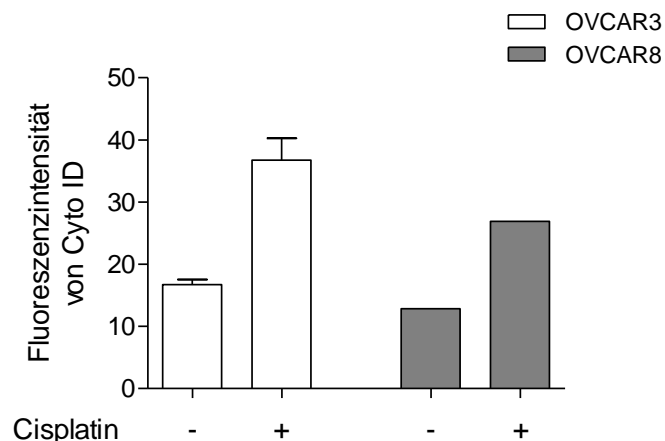


Abbildung 57: Cisplatin verändert den autophagosomalen Umsatz in OVCAR3 und OVCAR8.

Die Cisplatin-sensitive Zelllinie OVCAR3 und die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurden für 48 h mit 10 μ M Cisplatin inkubiert und anschließend mit CytoID gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Cisplatin erhöht die Anzahl an autophagosomalen Vesikeln in beiden Zelllinien. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von zwei (bei OVCAR3), unabhängigen Experimenten oder einem Experiment (OVCAR8).

Die Cisplatin-sensitive Zelllinie OVCAR3 (Kontrolle: MFI von CytoID von 17; Cisplatin MFI von CytoID von 37) und die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 (Kontrolle: MFI von CytoID von 13; Cisplatin: MFI von CytoID von 27) haben eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität von CytoID 48 h nach Cisplatin-Inkubation als die unbehandelten Kontrollzellen. Da CytoID Autophagosom-Vesikel anfärbt, ist die Anzahl oder Größe der Autophagosom-Vesikel durch die Cisplatin-Inkubation stark erhöht. Dies könnte einerseits die Folge gesteigerter Autophagie sein oder auf die Blockierung der Verschmelzung von Lysosom und Autophagosom zum Autophagolysosom zurückzuführen sein. Wird die Verschmelzung des Lysosoms mit dem Autophagosom blockiert, so wird der Abbau der Zellorganellen verhindert und die Autophagosomen akkumulieren in der Zelle. Zentrale Proteine bei der Verschmelzung von Lysosom und Autophagosom sind die SNARE Proteine, die kleine GTPase Rab7 und der PI3K Komplex [43]. Wird die Rekrutierung von Rab7 ans Lysosom durch Inkubation mit spezifischen Inhibitoren wie Liensinine verhindert, wird die Verschmelzung von Lysosom und Autophagosom blockiert und die Mitophagie effektiv inhibiert [74]. Zur Untersuchung, ob Cisplatin-Inkubation die Verschmelzung von Autophagosomen und Lysosomen blockiert, wurden die Zellen mit Liensinine in Kombination mit Cisplatin inkubiert und mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Aufnahmen die Autophagosomen analysiert.

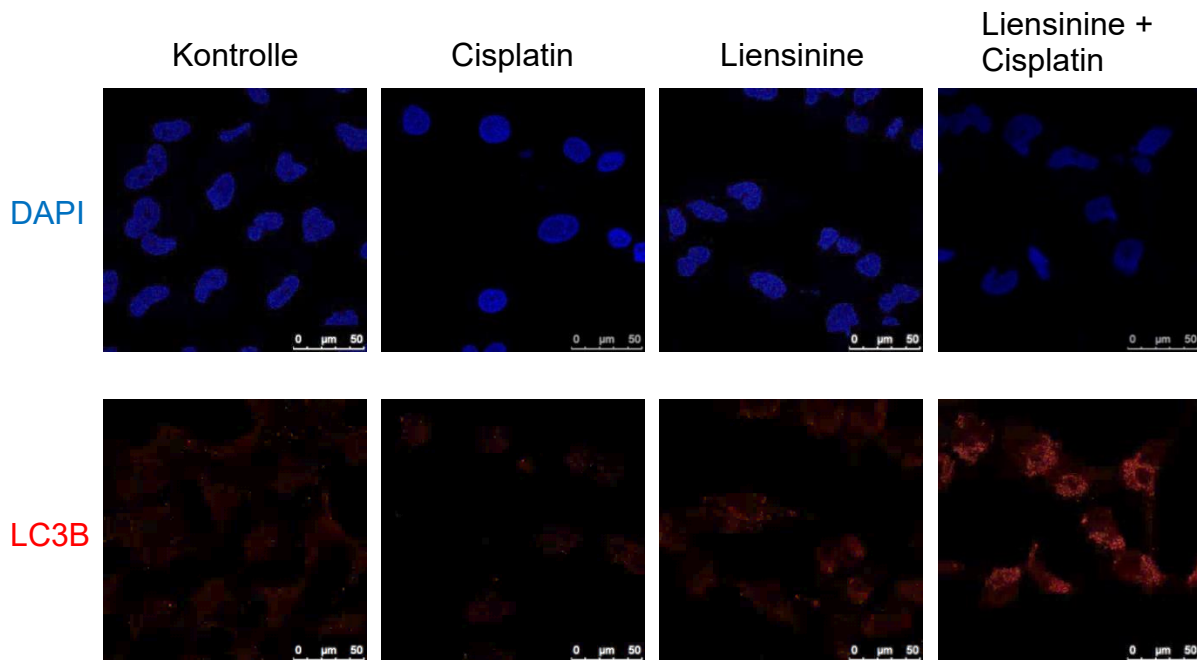


Abbildung 58: Die Kombination von Liensinine und Cisplatin akkumuliert LC3B stark. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 μM Cisplatin und 40 μM Liensinine, einem Inhibitor der Verschmelzung von Autophagosom und Lysosom, allein oder in Kombination inkubiert und anschließend eine Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI (blau) und LC3B (rot) durchgeführt. LC3B akkumuliert nicht durch Cisplatin-Inkubation in der Zelle, jedoch durch Inkubation mit Liensinine. Die Kombination von Cisplatin und Liensinine erhöht das LC3B Level in der Zelle stärker als LC3B allein. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Nach Cisplatin-Inkubation ist keine Akkumulation von LC3B, wichtiger Bestandteil der Autophagosomen, in den Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen nachweisbar (Abbildung 58). Nach Inkubation mit Liensinine akkumulieren die Autophagosomen in der Zelle, da sie nicht abgebaut werden können. Nach Inkubation mit der Kombination von Liensinine und Cisplatin ist die Akkumulation der Autophagosomen effektiv gesteigert. Cisplatin-Inkubation allein verhindert somit nicht den Abbau der Autophagosomen, im Vergleich zur Liensinine-Inkubation. Jedoch zeigt die Steigerung der CytoID Fluoreszenzintensität nach Cisplatin-Inkubation und die erhöhte Autophagosom-Akkumulierung in der Kombination von Cisplatin und Liensinine, dass Cisplatin die Autophagie induziert.

Die Rolle der Autophagie für die Cisplatin induzierte Apoptose wurde untersucht, indem die Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen mit Liensinine und Cisplatin in Kombination inkubiert wurden und nach 48 h ihre Viabilität mit Annexin V/PI-Färbung im Durchflusszytometer gemessen wurde (Abbildung 59). Liensinine allein verringert nur gering die Viabilität der Zellen (Kontrolle: 94,2 % Viabilität; Liensinine: 80,5% Viabilität). In der Kombination von Liensinine und Cisplatin ist die Viabilität jedoch

signifikant reduziert (Cisplatin: 81,5 % Viabilität; Liensinine + Cisplatin: 51,7 % Viabilität). Die Inhibition der Autophagie und der damit verbundene Abbau der Mitochondrien in der Mitophagie führt zur Sensitivierung der Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen.

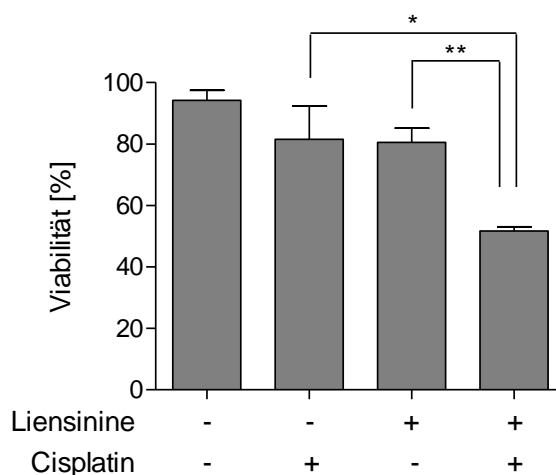


Abbildung 59: Inhibition der Autophagie induziert in Kombination mit Cisplatin Apoptose in Cisplatin-resistenten Zellen. Die Cisplatin-resistente Zelllinie OVCAR8 wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und 40 μ M Liensinine allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Liensinine hat allein keine Auswirkung auf die Viabilität der Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen. In der Kombination mit Cisplatin wird die induzierte Apoptose signifikant gesteigert. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zur Untersuchung der Toxizität der Kombination von Liensinine und Cisplatin, wurden primäre Fibroblasten inkubiert und ihre Viabilität mit der Annexin V/PI-Färbung im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 60). Weder Liensinine allein (Kontrolle: 91,2 % Viabilität; Liensinine: 75,8 % Viabilität), noch die Kombination von Liensinine und Cisplatin (Cisplatin: 79,8 % Viabilität; Liensinine + Cisplatin: 73,2 % Viabilität) verringert die Viabilität der Fibroblasten erheblich. Die Kombination ist somit nicht toxisch für Fibroblasten.

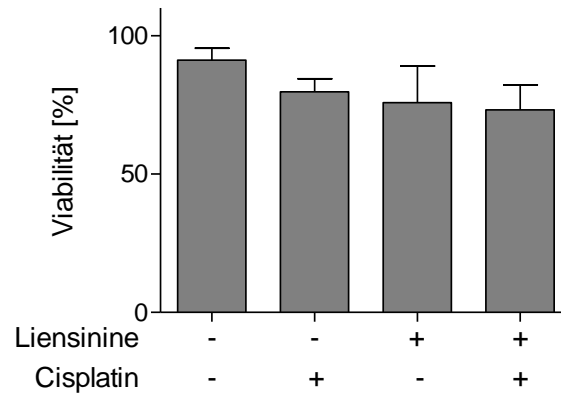


Abbildung 60: Liensinine in der Kombination mit Cisplatin ist nicht toxisch für primäre Fibroblasten. Primäre Fibroblasten wurde für 48 h mit 10 μ M Cisplatin und 40 μ M Liensinine allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit Annexin V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als viable Zellen wurden die Annexin V/PI negativen Zellen gewertet. Liensinine reduziert allein und in der Kombination mit Cisplatin nicht die Viabilität der Fibroblasten. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Cisplatin-Inkubation steigert den autophagosomalen Umsatz der Zelle. Durch das Blockieren der Autophagie können die Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen für Cisplatin sensitiviert werden.

4. Diskussion

Das Ovarialkarzinom war in den USA im Jahr 2018 die zehnt häufigste neu diagnostizierte Krebsentität bei Frauen, jedoch die fünft häufigste Krebsentität, die zum Tode geführt hat [5]. Die hohe Mortalität von Ovarialkarzinomen ist auch eine Folge der späten Diagnose, weshalb eine bessere Früherkennung ein wichtiger Fortschritt für die Patientinnen wäre. Serummarker für Ovarialkarzinome wie CA125 und HE4 haben keine ausreichende Sensitivität und Spezifität, um eine Diagnose frühzeitig zu ermöglichen [106]. Einerseits wird CA125 in 20 % der Ovarialkarzinome nicht exprimiert, andererseits ist die Serumkonzentration von CA125 bei Entzündungskrankheiten wie die rheumatische Arthritis erhöht oder aber auch bei Krankheiten wie die Pankreatitis oder der Leberzirrhose [106–109]. Deshalb wird viel Hoffnung in neue zirkulierende Tumormarker (*Liquid Biopsy*) gesetzt. Diese Tumormarker sind zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) oder zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTC) [110]. Die klinische Relevanz dieser Tumormarker wurde bereits nachgewiesen, jedoch wurden in vielen Studien unterschiedliche Probenvolumen, Zeitpunkte und Assays verwendet. Weitere Studien sind notwendig, um ein standardisiertes Vorgehen zu etablieren und diese Analysen in der klinische Routine einzusetzen [111]. Zusätzlich fehlt der Nachweis, dass mit der *Liquid Biopsy* die Tumorerkrankung früher erkannt wird als mit den bereits etablierten Methoden. Die intensive Forschung in der Früherkennung ist lohnenswert, da bei früh erkannten Ovarialkarzinomen die Überlebensrate der Patientinnen deutlich höher ist als bei spät erkannten Ovarialkarzinomen [3].

Neben der schlechten Früherkennung von Ovarialkarzinomen, ist die hohe Rückfallquote einer der Hauptgründe für die niedrige 5-Jahres Überlebensrate von 47 % der Ovarialkarzinompatientinnen [3]. Obwohl die Primärtherapie häufig zur kompletten Remission führt, überleben einige Tumorzellen und bilden einen neuen Tumor. Die Untersuchung, warum und welche Zellen die Primärtherapie überleben und einen neuen Tumor ausbilden können, ist somit essenziell, um neue zielgerichtete Therapiemöglichkeiten zu etablieren. Die Standardtherapie beim Ovarialkarzinom ist die maximale operative Entfernung des Tumors mit anschließender platinhaltiger Chemotherapie [7]. Die Wirkung von Cisplatin auf die nukleäre DNA und die DNA-Schadensreparatur ist sehr gut erforscht und führte zur Entwicklung, Zulassung und Verwendung der PARP-Inhibitoren Olaparib und Rucaparib in der

Ovarialkarzinomtherapie, die die DNA-Reparatur verhindern sollen [9,10]. Die Überlebensrate der Patientinnen wurde bisher jedoch nur leicht gesteigert. Die Wirkung von Cisplatin auf die Mitochondrien und die mitochondriale DNA wurden bisher nur geringfügig erforscht, obwohl die mitochondriale DNA essenziell für die Cisplatin induzierte Apoptose ist [15]. In dieser Arbeit sollte die Rolle der mitochondrialen Masse für den Cisplatin induzierten Zelltod in Ovarialkarzinomen untersucht und zusätzlich die direkte Wirkung von Cisplatin auf die mitochondriale Aktivität analysiert werden. Dies sollte Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin aufdecken und neue Zielstrukturen für eine bessere Therapiewirkung identifizieren.

4.1. Cisplatin-sensitive Zellen haben eine höhere mitochondriale Masse als Cisplatin-resistente Zellen

Zur Untersuchung der Rolle der Mitochondrien für den Cisplatin induzierten Zelltod in Ovarialkarzinomzellen, wurden sechs Ovarialkarzinomzelllinien mit Cisplatin inkubiert und anschließend die Viabilität im Durchflusszytometer bestimmt. Daraufhin konnten die Zelllinien in Cisplatin-sensitiv (OVCAR3, OVCAR4, IGROV-1) und Cisplatin-resistent (OVCAR5, OVCAR8 und A2780) unterteilt werden (Abbildung 3). In diesen beiden Gruppen wurde die mitochondriale Masse, der mitochondriale Sauerstoffverbrauch, der mit der mitochondrialen Aktivität korreliert, und das mitochondriale ROS Level gemessen. Die Cisplatin-sensitiven-Zelllinien weisen eine höhere mitochondriale Masse auf als die Cisplatin-resistenten Zelllinien. Dies konnte sowohl mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker Green, der Thiol-Gruppen von mitochondrialen Proteinen bindet, als auch mit NAO, das das Mitochondrien-spezifische Lipid Cardiolipin bindet, nachgewiesen werden (Abbildung 4). Die höhere mitochondriale Masse geht einher mit einer höheren maximalen Respiration der Zellen (Abbildung 22). Die Cisplatin-sensitiven Zellen haben jedoch nicht nur eine höhere mitochondriale Masse, sondern auch eine höhere mitochondriale Aktivität. Dies wurde sowohl durch eine höhere basale Sauerstoffverbrauchsrate (Abbildung 5) der Cisplatin-sensitiven Zellen, als auch durch ein höheres mitochondriales Membranpotential (Abbildung 20) und einer erhöhten mitochondrialen ATP-Produktionsrate (Abbildung 22) nachgewiesen. Diese höhere mitochondriale Aktivität führt zu einem höheren basalen mitochondrialem ROS Level in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien (Abbildung 6). Eine höhere mitochondriale Masse ist nicht gleichzusetzen mit einer höheren mitochondrialen Aktivität. Dies wird durch einen

einem Vergleich der beiden Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 deutlich (Tabelle 7). Während OVCAR3 eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität von Mitotracker Green (MTG) als OVCAR4 aufweist, haben die OVCAR4 Zellen einen deutlich höheren basalen Sauerstoffverbrauch, ein höheres mitochondriales Membranpotential und ein höheres mitochondriales ROS Level. Zusätzlich haben die OVCAR4 Zellen geringfügig mehr Cardiolipin als die OVCAR3 Zellen.

Tabelle 7: Vergleich der gemessenen Werte der mitochondrialen Parameter in den Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 normiert auf OVCAR8.

Zelllinie	Gemessene Werte normiert auf OVCAR8				
	mt. Masse (MTG)	Basaler O ₂ -Verbrauch	$\Delta\Psi_m$	mtROS Level	Cardiolipin Gehalt
OVCAR3	1,8-fach	2,0-fach	1,4-fach	1,4-fach	1,3-fach
OVCAR4	1,2-fach	3,2-fach	2,1-fach	1,9-fach	1,5-fach

Anmerkung: Werte entnommen aus Abbildung 3-5. mt. Masse = mitochondriale Masse, gemessen durch Fluoreszenzintensität von Mitotracker Green am Durchflusszytometer; MTG = Mitotracker Green; $\Delta\Psi_m$ = mitochondriales Membranpotential.

Somit weisen OVCAR3 Zellen eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität von Mitotracker Green, aber eine geringe mitochondriale Aktivität als OVCAR4 Zellen auf. Erstaunlicherweise ist die maximale Respiration der OVCAR4 Zellen höher als die von OVCAR3 Zellen. Dies deutet daraufhin, dass OVCAR3 mehr mitochondriale Proteine mit freier Thiol-Gruppe an Cystein-Resten hat, an das Mitotracker Green binden kann. Jedoch besitzen OVCAR3 Zellen weniger Elektronentransportkette-Einheiten, in denen Sauerstoff verbraucht wird. Mitochondrien sind sehr dynamische Zellorganellen, die sich innerhalb einer Zelle stark unterscheiden können. Jedes Mitochondrium kann zwischen 2-10 mtDNA Stränge besitzen [25] und die Cristae (Einstülpungen) in der die Elektronentransportketten-Komplexe lokalisiert sind, können unterschiedliche Membranpotentiale haben [112]. Die Unterschiede zwischen OVCAR3 und OVCAR4 machen deutlich, dass nicht ein einzelner Messparameter (z.B die Sauerstoffverbrauchsrate) ausreicht, um eine genaue Aussage über die mitochondriale Masse und Aktivität zu treffen, jedoch die Kombination aus Mitotracker Green und NAO Färbung, sowie der mitochondriale Sauerstoffverbrauch, das mitochondriale Membranpotential und das basale mtROS Level zusammengenommen zeigen, dass die Cisplatin-sensitiven Zellen eine höher mitochondriale Masse und Aktivität haben als die Cisplatin-resistenten Zellen. Da die Cisplatin-sensitiven und

Cisplatin-resistenten Zelllinien sich in mehr Merkmalen unterscheiden als nur die mitochondriale Masse, wurden aus der Cisplatin-sensitiven Zelllinie OVCAR3 genomisch identische Sub-Klone generiert. Da während der Zellteilung Mitochondrien heterogen auf Tochter und Mutterzelle verteilt werden [80], konnten Sub-Klone mit einer höheren und mit einer niedrigeren mitochondrialen Masse generiert werden (Abbildung 7). Die mittlere mitochondriale Masse aller Sub-Klone zusammen entspricht der mitochondrialen Masse der parentalen OVCAR3. Dies zeigt, dass während der Generierung der Sub-Klone kein Selektionsvorteil für Zellen mit einer höheren oder niedrigeren mitochondrialen Masse bestand. Durch die 3-4 wöchige Kultivierung der klonalen Linien aus einer einzelnen Zelle zu einer ausreichend hohen Zellmasse, sind bei jeder Teilung Zellen mit einer höheren und niedrigeren mitochondrialen Masse entstanden, jedoch entspricht die mitochondriale Masse jedes Sub-Klons wieder einer Gauß-Verteilung. Der Mittelwert der mitochondrialen Masse in der Gesamtpopulation eines Sub-Klons entspricht daher dem Ausgangswert der einzelnen Zelle aus dem die Population hervorgegangen ist. Die signifikant negative Korrelation zwischen der Viabilität der Zellen nach Cisplatin-Inkubation und der mitochondrialen Masse der Zellen (Abbildung 8), bzw. dem basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (Abbildung 9) bestätigt das Ergebnis aus den Zelllinien-Experimenten, dass Zellen mit einer höheren mitochondrialen Masse und Aktivität eine höhere Sensitivität gegenüber Cisplatin induzierter Apoptose haben. Dies ist im Einklang mit früheren Studien, die gezeigt haben, dass Zellen der Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinomzelllinie C13 eine reduzierte mitochondriale Aktivität und eine erhöhte Abhängigkeit von der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg besitzen im Vergleich zu ihrem Cisplatin-sensitiven Pendant, der Zelllinie 2008 [15,113]. Dementsprechend führt die Depletion der mtDNA (p0-Zellen) zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin induziertem Zelltod [13,15]. Ebenfalls führt die Depletion der mtDNA zu einer Reduktion der mitochondrialen Aktivität und zu einer Verringerung der mitochondrialen Masse, jedoch nicht zu einem kompletten Verlust von Mitochondrien [114,115]. Dabei muss beachtet werden, dass die Menge an mtDNA pro Zelle, aufgrund der unterschiedlichen Anzahl von mtDNA pro Mitochondrium, nicht zuverlässig die mitochondriale Masse widerspiegelt [116]. Unter Hypoxie-Bedingungen kultivierte Zellen, unabhängig von der Verringerung der Zellteilungsrate, werden Cisplatin-resistent und können durch Sauerstoffzufuhr wieder für die Cisplatin induzierte Apoptose sensitiviert werden [117]. Durch die Hypoxie wird die Aktivität von HIF-1

(*Hypoxia-inducible factor 1*) erhöht. HIF-1 Aktivität reguliert die Balance zwischen der Glykolyse und OXPHOS und führt sowohl zu einer Verringerung der mitochondrialen Aktivität, als auch der mitochondriale Masse [118]. Dass die Cisplatin-Resistenz der Zellen unabhängig von der verringerten Zellteilungsrate durch die Hypoxie ist, bestätigt Ergebnisse dieser Arbeit, in der gezeigt wurde, dass die untersuchten Cisplatin-resistenten Zelllinien tendenziell schneller als die Cisplatin-sensitiven Zelllinien proliferieren (Abbildung 10). Dies bestätigt die wichtige Rolle der Mitochondrien für den Cisplatin induzierten Zelltod, da schnell wachsende Zellen empfindlicher gegenüber nDNA-schädigende Substanzen sind als langsam wachsende Zellen [81–84,119]. Selbst entkernte Zellen ohne nDNA induzieren den Zelltod nach Inkubation mit Cisplatin [16]. Alles in allem spielt die mitochondriale Masse, die mit dem mtROS Level zusammenhängt, eine entscheidende Rolle für die Cisplatin induzierte Apoptose und korreliert mit der Sensitivität gegenüber Cisplatin induzierter Apoptose.

4.2. Cisplatin induziert die mitochondriale Apoptose in Abhängigkeit der ROS-Induktion

Der Cisplatin induzierte Zelltod ist in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 abhängig von der Caspase-Aktivität (Abbildung 11) und den proapoptotischen BCL-2 Proteinen BAX und BAK (Abbildung 12) weshalb es sich beim induzierten Zelltod um die klassische mitochondriale Apoptose handelt. Studien zeigen dass durch die Inkubation mit Cisplatin das intrazelluläre ROS gesteigert wird [17–19]. Die Cisplatin induzierte Apoptose ist von der ROS-Induktion abhängig, da die Inkubation der Zellen mit dem ROS-Fänger GSH in Kombination mit Cisplatin, die Cisplatin induzierte Apoptose verhindert (Abbildung 13). GSH spielt, durch direkte Bindung der Xenobiotika an die reaktive Thiolgruppe von GSH, zusätzlich eine wichtige Rolle in der Detoxifizierung. Auch Cisplatin reagiert mit GSH unter physiologischen Bedingungen, wodurch die Reaktivität von Cisplatin verringert wird [120]. In dieser Arbeit wurde zwar nicht die Reaktivität von Cisplatin in der Zelle nach Inkubation mit GSH nachgewiesen, jedoch wird die Wirkung auf die Steigerung der mitochondrialen Masse nach Inkubation mit Cisplatin durch GSH nicht beeinflusst (Abbildung 19). Zusätzlich wird in der Kombination von Cisplatin und GSH, im Gegensatz zu GSH allein, der Sauerstoffverbrauch der Cisplatin-sensitiven OVCAR4 stark gesteigert (Abbildung 25). Deshalb kann die verringerte Cisplatin induzierte

Apoptose durch GSH auf die Reduktion der ROS zurückgeführt werden und nicht auf eine Detoxifizierung von Cisplatin.

Die wichtige Rolle der Mitochondrien und des Metabolismus für den Cisplatin induzierten Zelltod in Ovarialkarzinomzellen wird bestätigt durch die Ergebnisse der Messung der Viabilität nach Inkubation von PARP-Inhibitoren zusammen mit Cisplatin (Abbildung 14). PARP-Inhibitoren werden in der Erhaltungstherapie von Ovarialkarzinompatientinnen eingesetzt und sollen die erfolgreiche DNA-Schadensreparatur verhindern. Weder die beiden in der Ovarialkarzinomtherapie zugelassenen PARP-Inhibitoren Olaparib und Rucaparib noch PJ34 hatten in der verwendeten Konzentration einen Einfluss auf die Cisplatin induzierte Apoptose nach 48 h. Den Einfluss der PARP-Inhibitoren auf das Langzeitüberleben der Zellen und die damit verbundene Effektivität der Therapie wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, jedoch unterstreichen die Ergebnisse, dass für die initiale Apoptose-Induktion die Mitochondrien eine größere Rolle spielen als der nDNA Schaden. Die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen von PJ34 und Rucaparib inhibierten die Aktivität von PARP effizient in OVCAR8 Zellen in einer früheren Studie [121].

4.3. Cisplatin-Inkubation erhöht die mitochondriale Masse, Aktivität und ROS Level

Die Inkubation mit Cisplatin führt zu einem gesteigerten intrazellulären ROS Level [17–19], wovon die Induktion der Apoptose abhängig ist (Abbildung 13). Die Hauptquelle von intrazellulärem ROS sind die Mitochondrien [21]. Daher ist es wenig überraschend, dass Cisplatin-Inkubation auch zu einem gesteigerten mitochondrialen ROS Level führt (Abbildung 15). Diese Steigerung war sowohl in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 und OVCAR4 als auch in der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8 nachweisbar. Das Gesamtlevel von mtROS war jedoch in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien höher als in der Cisplatin-resistenten OVCAR8. Dies ist erklärbar mit der höheren mitochondrialen Masse und dem damit verbundenen höheren mtROS Level ohne Cisplatin-Inkubation. Die Steigerung des mtROS Levels nach Cisplatin-Inkubation konnte bereits in einer früheren Studien gezeigt werden [20], jedoch blieb der zugrundeliegende Mechanismus weitestgehend im Unklaren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cisplatin-Inkubation zu einer gesteigerten mitochondrialen Masse führt (Abbildung 16), die Abhängig von der eingesetzten

Konzentration von Cisplatin ist (Abbildung 17). Wird die Steigerung der mitochondrialen Masse durch den *Knock-down* von Schlüssel-Proteinen der mitochondrialen Biogenese, wie PGC1 α und TFAM, verhindert, so wird ebenfalls die Steigerung des mtROS Levels verringert (Abbildung 36) und die effektive Induktion der Apoptose nach Cisplatin-Inkubation blockiert (Abbildung 37, Abbildung 39). Einhergehend mit der Steigerung der mitochondrialen Masse, wird sowohl das mitochondriale Gesamtpotential (Abbildung 21), als auch der basale mitochondriale Sauerstoffverbrauch, sowie die maximale Respiration und die mitochondriale ATP-Produktion (Abbildung 22) in der Cisplatin-resistenten Zelllinie OVCAR8 und in der Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR3 gesteigert. Dies zeigt, dass Cisplatin-Inkubation zu einer Steigerung von funktionellen Mitochondrien führt und somit zu einer erhöhten mitochondrialen Aktivität. Überraschenderweise ist die erhöhte mitochondriale Aktivität nicht in allen Zelllinien nachweisbar. In den Cisplatin-sensitiven Zelllinien OVCAR4 und IGROV-1 wird zwar die mitochondriale Masse und das mitochondriale ROS Level nach Cisplatin-Inkubation gesteigert, jedoch sinkt die mitochondriale Aktivität. Zusätzliche Inkubation mit dem ROS-Fänger GSH in Kombination mit Cisplatin führt in OVCAR4 Zellen jedoch zu einer Steigerung der mitochondrialen Aktivität (Abbildung 25). Daraus kann geschlossen werden, dass zu hohe ROS Level in OVCAR4 und IGROV-1 zu dysfunktionalen Mitochondrien führen, die weniger mitochondrialen Sauerstoff verbrauchen. Wird das ROS Level durch Inkubation mit GSH reduziert, werden auch in OVCAR4 Zellen funktionelle Mitochondrien durch Cisplatin-Inkubation induziert und der Sauerstoffverbrauch der Zellen steigt.

Wird die mitochondriale Aktivität während der Cisplatin-Inkubation durch die Inhibition der ATP-Synthase blockiert, so kommt es zwar zur Steigerung der mitochondrialen Masse (Abbildung 29), jedoch nicht zur Steigerung des mtROS Levels (Abbildung 31). Dadurch werden die Zellen effektiv vor der Cisplatin induzierten Apoptose geschützt (Abbildung 32). Mitochondrien produzieren in der Atmungskette während der Elektronenweiterleitung Superoxide. Laut Studien werden zwischen 0,15 % – 2 % des aufgenommenen Sauerstoffs in funktionellen Mitochondrien in Superoxide umgewandelt [33,122], weshalb eine höhere mitochondriale Aktivität in der Zelle zu einer erhöhten ROS-Produktion führt. In dieser Arbeit konnte das erste Mal gezeigt werden, dass Cisplatin-Inkubation eine Steigerung der mitochondrialen Masse zur Folge hat, wodurch das mtROS Level der Zellen gesteigert wird, welches essenziell für die

Cisplatin induzierte Apoptose ist. Zwar konnten mit PGC1 α und TFAM zwei Proteine identifiziert werden die verantwortlich für die gesteigerte mitochondriale Masse sind, ein molekularer Mechanismus konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Die Steigerung der mitochondrialen Masse ist keine direkte Reaktion auf die Cisplatin-Inkubation, sondern steigt erst 24 h nach Inkubation (Abbildung 17) und sie ist unabhängig von der Sensitivität gegenüber Cisplatin, da sie in Cisplatin-sensitiven als auch in Cisplatin-resistenten Zelllinien auftritt (Abbildung 16). Die Steigerung der mitochondrialen Masse nach Cisplatin-Inkubation ist ebenfalls nicht Folge eines S-/G2-Zellzyklus-Arrests, da Zellen in allen Zellzyklus-Phasen die mitochondriale Masse nach Cisplatin-Inkubation steigern (Abbildung 27). Des Weiteren ist die Steigerung der mitochondrialen Masse nach Cisplatin-Inkubation unabhängig von der Aktivierung der Caspasen (Abbildung 18), der ROS-Induktion (Abbildung 19) und der mitochondrialen Aktivität (Abbildung 31). Neben der Bindung an die nDNA, bildet Cisplatin auch mtDNA-Cisplatin-Addukte aus, weshalb Inkubation mit Cisplatin zu mitochondrialen DNA Schäden führt [13,14]. Ein möglicher Auslöser, der zur Steigerung der mitochondrialen Masse führt, könnte daher der erzeugte mtDNA Schaden sein. Mutationen in der mtDNA können zu einem Ungleichgewicht der mitochondrialen und nukleären Proteine der Elektronentransportketten(ETC)-Komplexe führen oder zur Störung der Funktionalität der ETC-Komplexe und so oxidativen Stress erzeugen [123,124]. ROS wiederum führt zur Aktivierung von PGC1 α und zur Transkription von TFAM und damit zur mitochondrialen Biogenese [125]. Das gesteigerte ROS Level und die gesteigerte mitochondriale Masse nach Cisplatin-Inkubation könnte daher eine positive Rückkopplungsschleife bilden und sich dabei verstärken. Der Einfluss des mtDNA Schadens auf die ROS-Induktion und die mitochondriale Biogenese nach Cisplatin-Inkubation sind im Einklang mit Ergebnissen die zeigen, dass Zellen ohne mtDNA Cisplatin-resistent werden [13,15]. Jedoch konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Cisplatin-Inkubation zu einer Steigerung von funktionellen Mitochondrien führt, weshalb die Cisplatin-Inkubation nicht zu einer vollständigen Störung der ETC-Komplexe führen kann, die eine generelle Dysfunktionalität der Mitochondrien zur Folge hätte. Nach der Cisplatin-Inkubation sind, aufgrund der induzierten mitochondrialen Biogenese, mehr funktionelle ETC-Komplexe in den Zellen vorhanden als vor der Cisplatin-Inkubation. Es benötigt weitere Untersuchungen, um den mtDNA Schaden durch Cisplatin-Inkubation als Ursache für die gesteigerte mitochondriale Masse und des gesteigerten mtROS Levels zu bestätigen.

4.4. Zusätzliche Induktion von mtROS überwindet Cisplatin-Resistenzen in OVCAR8 Zellen

Das basale mtROS Level korreliert mit der Sensitivität gegenüber Cisplatin induziertem Zelltod. In Ovarialkarzinomzelllinien mit niedrigerem mtROS Level ist die Überlebensrate nach Cisplatin-Inkubation höher als in den Ovarialkarzinomzelllinien mit höherem mtROS Level. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ROS-Fänger wie Glutathion den Cisplatin induzierten Zelltod verhindern. Folgerichtig führt eine Steigerung des mtROS Levels in der Kombination mit Cisplatin zu einer gesteigerten Induktion von Apoptose. Die Kombination von Cisplatin mit H₂O₂ (Abbildung 42), Ascorbinsäure (Abbildung 44) und auch mit dem UCP2-Inhibitor Genipin (Abbildung 47) erhöhten das mtROS Level in den Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen und steigerten signifikant die Apoptose-Induktion gegenüber den Einzelsubstanzen.

Die verwendete Konzentration von 300 µM H₂O₂ wird von OVCAR8 gut toleriert. Interessanterweise variiert die Toleranz gegen H₂O₂ Inkubation stark Zelllinienabhängig und reicht von 30 µM H₂O₂ in der Melanomzelllinie A375 über 200 µM H₂O₂ in Lungenkarzinomzelllinie H460 bis zu 500 µM H₂O₂ in dermalen Fibroblasten [126–128]. Dies ist ein Indiz für eine hohe ROS-Resistenz und eine gesteigerte Expression von antioxidativen Proteinen in der verwendeten Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR8. Da die hohe Toleranz gegenüber H₂O₂ jedoch nicht auf die Cisplatin-resistente OVCAR8 beschränkt ist, sondern auch in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien auftritt (Daten nicht gezeigt), ist dies kein Cisplatin-Resistenzmechanismus.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Ascorbinsäure, die in niedriger Konzentration als Antioxidationsmittel wirkt, in hohen Konzentrationen (2 mM) mtROS erzeugt [95]. Dies ist im Einklang mit früheren Studien, jedoch ist der zugrunde liegende Mechanismus nicht vollständig aufgeklärt [68,69]. Yun *et al.* [69] konnten zeigen, dass die im Kulturmedium zu Dehydroascorbinsäure (DHA) oxidierte Ascorbinsäure von den Zellen bevorzugt durch den GLUT-1 Transporter aufgenommen wird. Intrazellulär wird daraufhin DHA durch GSH wieder zu Ascorbinsäure reduziert, wodurch die Kapazität des Antioxidationsystems reduziert wird. Damit kann weniger im Metabolismus erzeugtes ROS detoxifiziert werden und es kommt zur Steigerung des ROS Levels. Dies würde die konzentrationsabhängige Wirkung von Vitamin C erklären, da nur hohe Konzentrationen von DHA genügend

GSH depletieren würde, damit das ROS Level effektiv gesteigert wird. Gleichzeitig würde die Depletion von GSH synergistisch auf den Cisplatin induzierten Zelltod wirken (Abbildung 44), da die Detoxifizierung des Cisplatin induzierten ROS essenziell für das Überleben der Zellen ist. Ascorbinsäure induziert jedoch Superoxide in den Mitochondrien (mtROS), die durch die MitoSOX Red Färbung detektiert wurden (Abbildung 43). Diese Superoxide werden von Superoxid-Dismutasen zu H_2O_2 umgewandelt und erst H_2O_2 wird mit Hilfe von GSH detoxifiziert [21]. Zusätzlich wirkt die Inkubation mit Ascorbinsäure synergistisch mit Cisplatin auf die Induktion von mtROS, weshalb ein anderer Mechanismus als die Depletion von GSH eine Rolle in der Induktion von mtROS spielen muss. Yun *et al.* [69] konnten zusätzlich zeigen, dass die Inkubation mit hohen Konzentrationen von Ascorbinsäure die in der Glykolyse beteiligte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase inhibiert. Diese Inhibition der Glykolyse führte zur ATP Depletion und einer Energiekrise in den Zellen, die durch Zugabe von Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse und essenziell für die ATP-Produktion über OXPHOS, verhindert werden kann. Da sich Pyruvat im Kulturmedium der OVCAR8 befindet, würde die Inhibition der Glykolyse durch Ascorbinsäure Inkubation die mitochondriale Aktivität steigern, um den Energiehaushalt im Gleichgewicht zu halten. Durch die gesteigerte mitochondriale Aktivität würde es zu einem Anstieg der mtROS Level kommen. Diese Steigerung der mitochondrialen Aktivität durch Ascorbinsäure-Inkubation und die Steigerung der mitochondrialen Masse durch Cisplatin-Inkubation könnte daher die synergistische Steigerung der mtROS Level in der Kombination zur Folge haben. In weiterführenden Untersuchungen sollte die mitochondriale Aktivität, der mit Ascorbinsäure inkubierten Zellen im Seahorse Extracellular Flux Analyzer gemessen werden, um diese Hypothese zu bestätigen und damit den molekularen Mechanismus der ROS-Induktion durch hohe Konzentrationen von Ascorbinsäure aufzuklären. Eine Phase I Studie hat gezeigt, dass durch intravenöse Verabreichung hoher Konzentrationen von Ascorbinsäure im Serum der Patienten (bis 49 mM) möglich sind und gut toleriert werden [129]. Der potenzielle Einsatz von Ascorbinsäure in der Krebstherapie ist umstritten, jedoch enthalten viele Meta-Studien die Phase-I und Phase-II Studien analysiert haben, Studien mit Oral verabreichter Ascorbinsäure [130]. Oral verabreichte Ascorbinsäure führt aber nicht zu den für die ROS-Induktion benötigten hohen Serumkonzentrationen und sollten daher nicht in die Analyse aufgenommen werden [131]. Mausstudien bestätigen den positiven Effekt der Kombination von

Ascorbinsäure + Carboplatin + Paclitaxel, die die Tumormasse signifikant gegenüber der Kombination von Carboplatin + Paclitaxel allein verringert [132]. Klinische Studien, mit hoher Patientenzahl, zur zusätzlichen intravenösen Verabreichung von hohen Dosen Ascorbinsäure in Kombination mit der herkömmlichen Chemotherapie bei Ovarialkarzinompatientinnen fehlen bisher und somit kann über die Wirksamkeit nur spekuliert werden. Studien mit geringer Patientenzahl zeigen jedoch einen Trend zu einer längeren Überlebensdauer bei Addition von Ascorbinsäure zur Standardtherapie und geringeren Nebenwirkungen für die Patientinnen [132]. Die Wirksamkeit von hohen Konzentrationen von Ascorbinsäure in der Kombination mit der Chemotherapie sollte deshalb weiterhin erforscht werden und in einer großen klinischen Studie überprüft werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Wirksamkeit der Chemotherapie bei Ovarialkarzinompatientinnen zu erhöhen und Cisplatin-resistente Zellen zu eliminieren, ist die Inhibition von UCP2. Die Inkubation von Zellen mit Genipin, einem UCP2-Inhibitor, führt zu einer signifikant stärkeren ROS-Induktion in der Kombination mit Cisplatin als mit den Substanzen allein (Abbildung 46). Sowohl Genipin als auch der *Knock-down* von UCP2 mit Hilfe von siRNA, führten zu einer signifikanten Induktion der Apoptose in Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen. Dies bestätigt Studien die zeigen, dass Genipin in Kombination mit Menadione, Doxorubicin und Epirubicin in resistenten Zellen über die ROS-Induktion die Apoptose induzieren [133]. Interessanterweise wurde in einer Studie mit 54 Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom nachgewiesen, dass Patientinnen mit niedriger UCP2 Expression im Tumor eine höhere Sensitivität gegenüber platinbasierten Chemotherapeutika aufwiesen, als Patientinnen mit einer höheren Expression von UCP2 im Tumorgewebe [134]. Dieses Ergebnis bestätigt eine frühere Studie mit Gebärmutterhalskrebspatientinnen und trifft daher auf mehrere Tumorentitäten zu [135]. Neben der mitochondrialen Masse könnte somit auch die Expression von UCP2 als Biomarker für das Ansprechen der Chemotherapie dienen und bei hoher Expression als Zielprotein für die Therapie dienen. Die Verträglichkeit von Genipin und die antitumorale Wirkung konnte zwar bereits in Mäusen nachgewiesen werden [136], *in vivo* Studien zur Kombination von Genipin mit platinhaltiger Chemotherapie fehlen jedoch. Ebenfalls fehlen klinische Studien über die Verträglichkeit der Behandlung mit Genipin, jedoch könnten diese in Zukunft zeigen, ob UCP2 ein mögliches Zielprotein für die Kombinationstherapie bei Ovarialkarzinompatientinnen darstellt.

Der Eisenchelator VLX600 induziert ebenfalls mtROS und steigert in der Kombination mit Cisplatin tendenziell, aber nicht signifikant das mtROS Level im Vergleich zu der Inkubation mit VLX600 oder Cisplatin allein (Abbildung 50). In der Cisplatin-resistenten OVCAR8 führt die Inkubation mit VLX600 und Cisplatin zu einer starken Induktion der Apoptose, wohingegen VLX600 Inkubation allein keine Auswirkung auf die Viabilität hat (Abbildung 51). 48 h Inkubation mit VLX600 führt zu einer kompletten Inhibierung der mitochondrialen Aktivität. Durch zusätzliche Inhibition der mitochondrialen ETC-Komplexe I und III durch Rotenone und Antimycin A, wird die mitochondriale Aktivität nicht stärker reduziert (Abbildung 49). VLX600 inhibiert jedoch nicht „direkt“ die mitochondriale Aktivität, da die Inkubation für 3 h keine Auswirkung auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch hat. Deshalb muss VLX600 entweder in der Zelle enzymatisch verändert werden, sodass es die ETC-Komplexe inhibieren kann, oder durch eine Nebenwirkung die Blockierung der mitochondrialen Aktivität auslösen. VLX600 bindet intrazelluläres Eisen [137]. Eisen ist ein wichtiger Co-Faktor in der Aktivität der Aconitase, ein Enzym das im Citratzyklus involviert ist [138]. Ebenfalls hat Eisen-Depletion einen negativen Einfluss auf die Aktivität der Citratzyklus-Proteine Citrat-Synthase, der Isocitrat-Dehydrogenase und der Succinat-Dehydrogenase [138]. Fryknäs *et al* [137] zeigen, dass Zellen der HCT116 Darmkrebs-Zelllinie nach 5 h VLX600-Inkubation eine verringerte maximale Respiration nach Entkopplung aufweisen, wodurch die Hypothese der verringerten Menge an NADH und FADH₂ durch geringere Citratzyklus-Aktivität unterstützt wird. Zusätzlich konnte die maximale Respiration nach Inkubation mit VLX600 durch die Zugabe von Eisen wieder gesteigert werden. In dieser Arbeit konnte jedoch nur eine marginal verringerte maximale Respiration in den verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Diese Unterschiede in den Studien können aufgrund der kürzeren Inkubationszeit oder einer höheren Konzentration an intrazellulärem Eisen in den verwendeten Zellen auftreten. Welche Rolle die Eisendepletion für die mitochondrialen Aktivität in den hier verwendeten Zelllinien spielt sollte überprüft werden, um zu untersuchen ob die Eisendepletion als Mechanismus für die verringerte mitochondriale Aktivität nach VLX600-Inkubation in Frage kommt.

Im Gegensatz zur Inkubation mit VLX600 konnte durch die Inkubation mit dem ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin A gezeigt werden (Abbildung 32), dass die Reduzierung der mitochondrialen Aktivität zu einer Reduzierung der Cisplatin induzierten Apoptose führt. Um diese konträren Ergebnisse zu überprüfen, wurden die OVCAR8 Zellen mit

den klassischen mitochondrialen ETC-Komplex-Hemmern Rotenone und Antimycin A inkubiert. Die Ergebnisse aus den Messungen mit dem Seahorse Extracellular Flux Analyzer zeigen, dass die verwendete Konzentration von 1,5 μM Rotenone und 1,5 μM Antimycin A zu einer Blockierung der mitochondrialen Aktivität führt. Durch die Inhibition von Komplex I und Komplex III kommt es zu einem gesteigerten mtROS Level. Die Kombination von Rotenone und Antimycin A mit Cisplatin führt jedoch nicht zu einer gesteigerten Induktion der Apoptose in den Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen. Aus diesem Grund ist die Steigerung der Cisplatin induzierten Apoptose durch VLX600-Inkubation nicht auf die Blockierung der mitochondrialen Aktivität zurückzuführen. Der noch unbekannte Wirkmechanismus, der zur Apoptose in der Kombination von VLX600 mit Cisplatin führt, führt entweder zusätzlich zur Blockierung der mitochondrialen Aktivität oder die Blockierung der mitochondrialen Aktivität, eventuell durch die Eisen-Depletion, hat keinen Einfluss auf die Induktion der Apoptose durch VLX600 in der Kombination mit Cisplatin. Bekannt ist, dass VLX600 eine Rolle in der Induktion der Autophagie spielt. Inkubation von HCT116 Zellen mit VLX600 führt zur Akkumulation des Autophagosom-Strukturproteins LC3 und leicht erhöhter Degradation von p62, einem Markerprotein für den autophagosomalen Abbau [139]. Dies deutet auf eine gesteigerte Autophagie nach Inkubation mit VLX600 hin. Die Rolle der Autophagie in der Induktion des Zelltodes nach der Inkubation von Cisplatin und VLX600 sollte in weiterführenden Studien geklärt werden. Da jedoch die Steigerung der Cisplatin induzierten Apoptose durch die Inkubation mit VLX600 signifikant ist und gleichzeitig die Kombination keine Toxizität auf humane Fibroblasten aufweist (Abbildung 52), kann VLX600 ein potenzielles neues Medikament in der Chemotherapie für Ovarialkarzinompatientinnen sein. Eine Phase-I Studie kam zum Ergebnis, dass VLX600 gut verträglich ist und empfiehlt weitere Studien in Kombination mit anderen Medikamenten oder einer Strahlentherapie [96].

4.5. Die mitochondriale Masse konnte in OVCAR8 nicht gesteigert werden

Da die mitochondriale Masse eine entscheidende Rolle in der Induktion der Apoptose nach Inkubation mit Cisplatin spielt, sollte in den Cisplatin-resistenten Zellen die mitochondriale Masse gesteigert werden, um die Zellen für die Induktion der Apoptose zu sensibilisieren. Jedoch konnte weder durch Reduktion der Glukose im Medium (Abbildung 54), noch durch pharmakologische Erhöhung der Expression von PGC1 α

(Abbildung 55, Abbildung 56), die mitochondriale Masse in den Zellen gesteigert werden. Die Reduktion der Glukosekonzentration im Medium der OVCAR8 Zellen sollte zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von Glykolyse und OXPHOS in Richtung der mitochondrialen ATP-Produktion führen. Jedoch führt die Reduktion der Glukosekonzentration im Medium zu einer starken Verringerung der Wachstumsrate. Einhergehend mit der Wachstumsrate wurde auch die mitochondriale Masse tendenziell verringert, anstatt diese zu erhöhen und somit die metabolische Aktivität gesenkt. Da genügend Pyruvat im Medium vorhanden war, sollte zwar die Reduktion der Glukose keinen Einfluss auf den Citratzyklus und OXPHOS haben, jedoch wechselten die Cisplatin-resistenten Zellen unter diesen Bedingungen nicht von der reduzierten Glykolyse zu gesteigertem OXPHOS. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Hypothese, dass Cisplatin-resistente Zellen abhängiger von der Glykolyse sind als Cisplatin-sensitive Zellen [15]. Ebenfalls konnte die indirekte Induktion der Expression von PGC1 α durch BAY 41-2272 und Sildenafil nicht die mitochondriale Masse und somit die Sensitivität gegenüber Cisplatin verändern. BAY 41-2272 aktiviert die sGC und führt zu einer höheren Expression von PGC1 α in humanen Monozyten und in Myoblasten und Phäochromozytom-Zellen aus der Ratte [101]. Sildenafil inhibiert die Phosphodiesterase-5, wodurch die cAMP Konzentration in der Zelle gesteigert, die Expression von PGC1 α erhöht und die mitochondriale Masse gesteigert wird in primären proximalen Tubuluszellen aus Kaninchen [102]. Entweder ist die Steigerung der Expression von PGC1 α über diese beiden Signalwege nicht möglich in den verwendeten humanen Ovarialkarzinomzelllinien oder die hohe Verfügbarkeit von Glukose im Medium führt dazu, dass die Zellen keinen Bedarf an einer erhöhten mitochondrialen Masse haben und daher andere Signalwege, über die ebenfalls die mitochondriale Biogenese reguliert wird, die erhöhte PGC1 α Expression ausgleichen und keine erhöhte mitochondriale Biogenese induziert wird. Eine Kombination von Glukose-Reduzierung und PGC1 α Aktivierung könnte eventuell zu der gewünschten Steigerung der mitochondrialen Masse führen und damit zur erhöhten Apoptose Induktion nach Cisplatin-Inkubation und sollte in weiterführenden Untersuchungen getestet werden.

4.6. Inhibition der Mitophagie als potenzieller Angriffspunkt zur Überwindung der Chemoresistenz

Die mitochondriale Masse spielt eine große Rolle in der Sensitivität gegenüber der Cisplatin induzierten Apoptose. Durch Blockierung der mitochondrialen Biogenese wird die Viabilität nach Cisplatin-Inkubation signifikant gesteigert. Eine weitere wichtige Rolle in der Cisplatin induzierten Apoptose spielt neben der mitochondrialen Biogenese auch die Degradation der Mitochondrien, die Mitophagie. Cisplatin-Inkubation führt zu einer Steigerung der Anzahl an Autophagosom-Vesikeln in den Zellen (Abbildung 57). Dies ist jedoch kein ausreichender Hinweis auf eine gesteigerte Autophagie, da eine Verhinderung des Abbaus der Autophagosomen und damit die Inhibition der Autophagie ebenfalls zu einer gesteigerten Anzahl an Autophagosomen führt [140]. Die Blockierung der Verschmelzung der Autophagosomen und der Lysosomen, durch Inkubation mit Liensinine in der Kombination mit Cisplatin, führt zu einer gesteigerten Autophagosomen-Anzahl im Vergleich zur Liensinine-Inkubation allein. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine gesteigerte Autophagie nach Inkubation der Zellen mit Cisplatin. Eine weiterführende Untersuchung der Degradation von p62 nach Cisplatin-Inkubation in den verwendeten OVCAR8 Zellen würde diese Hypothese bestätigen [141]. Mehrere Studien zeigen, dass Cisplatin die Autophagie in unterschiedlichen Zellentitäten erhöht, beispielweise auch in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780, wodurch die Zellen vor der Cisplatin induzierten Apoptose geschützt werden [103–105,142–144]. Interessanterweise haben Cisplatin-resistente A2780 Zellen (Erworbene Resistenz durch dauerhafte Inkubation mit geringen Mengen an Cisplatin) eine signifikant erhöhte Autophagie im Vergleich zur Wildtyp Zelllinie [143]. Die Blockierung der Autophagie durch Inkubation der Zellen mit Liensinine in der Kombination mit Cisplatin führt zu gesteigerter Induktion der Apoptose in Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen (Abbildung 59). Inhibition der Autophagie durch Chloroquin oder der *Knock-down* von Proteinen, die essenziell für die Autophagie sind, führen ebenfalls zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Cisplatin-Inkubation in Cisplatin-resistenten Zellen [145,146]. Da mtDNA-Schaden zu einer gesteigerter Autophagie führt [147], könnte dies der Grund für die gesteigerte Autophagie nach Cisplatin-Inkubation sein, wodurch geschädigte Mitochondrien durch die Mitophagie abgebaut werden. Die Blockierung der Autophagie führt daher zur Akkumulation von geschädigten Mitochondrien in der Zelle und erhöht in Folge die

Apoptose-Rate [148]. Somit spielt, neben der mitochondrialen Biogenese, auch der Abbau der Mitochondrien eine wichtige Rolle in der Resistenz gegenüber Cisplatin induzierter Apoptose und kann als potenzieller Angriffspunkt zur Verbesserung der Chemotherapie bei Ovarialkarzinompatientinnen dienen. Die Kombination von Liensinine und Cisplatin war nicht toxisch für primäre Fibroblasten (Abbildung 60) und sollte als Kombination, neben der Kombination von Chloroquin und Cisplatin, in weiterführenden Mausexperimenten untersucht werden.

4.7. Die verwendeten Zelllinien können als Model für primäre Ovarialkarzinome dienen

Die Cisplatin-Inkubation führt zu einer signifikanten Steigerung der mitochondrialen Masse in Ovarialkarzinomzelllinien. Einhergehend mit der Steigerung der mitochondrialen Masse wurde auch die Expression des mitochondrialen Transkriptionsfaktors TFAM gesteigert (Abbildung 34). Einen Hinweis auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf primäre Tumore von Patientinnen lieferte die Untersuchung der TFAM Expression in primären Ovarialkarzinomen (Abbildung 40). In 4 von 5 primären Ovarialkarzinomen war eine Steigerung der TFAM Expression nach Cisplatin-Inkubation nachweisbar. In dem Tumor mit der basal stärksten TFAM Expression, konnte hingegen keine weitere Steigerung nachgewiesen werden. Da TFAM eine essenzielle Rolle in der mitochondrialen Biogenese und der mtDNA Replikation spielt [39], könnte die mitochondriale Masse in den primären Ovarialkarzinomzellen durch Cisplatin-Inkubation gesteigert sein. Weitere Untersuchungen von mitochondrialen Proteinen oder Markern sind jedoch notwendig, um die Steigerung der mitochondrialen Biogenese in primären Ovarialkarzinomzellen zu bestätigen. Jedoch zeigt dieses erste Ergebnis mit primären Zellen, dass die Steigerung der mitochondrialen Biogenese nach Cisplatin-Inkubation kein reines Zelllinien-Phänomen ist, sondern sich auf primäre Tumore übertragen lässt.

Da die mitochondriale Masse eine entscheidende Rolle in der Sensitivität gegenüber der Induktion der Apoptose nach Cisplatin-Inkubation spielt, könnten mitochondriale Proteine als Biomarker für die Wirksamkeit der Chemotherapie bei Ovarialkarzinompatientinnen dienen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit einem erhöhtem Expressionslevel (mRNA-Expression) der mitochondrialen Proteine TFAM oder TIMM23, eine signifikant höhere 5-Jahres

Überlebensrate aufweisen als Patientinnen mit einer niedrigen Expression (Abbildung 41). Dies bestätigt die wichtige Rolle der mitochondrialen Masse auch in der Therapie der Ovarialkarzinompatientinnen. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten tiefergehende Untersuchungen schon existierender Daten und neue Studien durchgeführt werden, ob TFAM und TIMM23 oder andere mitochondriale Proteine in Patientinnen signifikant niedriger exprimiert werden, die innerhalb von 6 Monaten nach Beendigung der Chemotherapie einen Rückfall erleiden und der Tumor daher als Platin-resistent eingestuft wird [6]. So könnte geklärt werden, ob TFAM und/oder TIMM23 als zuverlässige Prädiktoren für die Cisplatin-Sensitivität des Tumors dienen.

4.8. Fazit und Ausblick

Zur Verbesserung der Überlebensrate von Ovarialkarzinompatientinnen muss einerseits der Tumor früher als bisher erkannt werden und andererseits die hohe Rückfallquote reduziert werden. Ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von platinhaltigen Chemotherapeutika kann zu einer Reduzierung der Rückfallquote von Patientinnen durch die Identifikation von neuen Kombinationsbehandlungen führen. Zusätzliche Erkenntnisse, warum und wie Zellen die Therapie überleben und daraufhin einen Sekundärtumor ausbilden können ist bei der Identifikation der Kombinationsbehandlungen essenziell. In dieser Arbeit wurde die Rolle der Mitochondrien für den Cisplatin induzierten Zelltod untersucht und überprüft welche metabolischen Veränderungen durch die Cisplatin-Inkubation auftreten.

Es konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Masse mit der Sensitivität gegenüber der Cisplatin induzierten Apoptose korreliert. Sowohl Zelllinien als auch genomisch identische Sub-Klone, die eine geringere mitochondriale Masse aufweisen haben eine verringerte Induktion der Apoptose nach Cisplatin-Inkubation. Zusätzlich ist die 5-Jahres Überlebensrate von Ovarialkarzinompatientinnen signifikant höher, wenn die mitochondrialen Proteine TFAM oder TIMM23 stärker exprimiert werden. Zukünftig könnten mitochondriale Proteine als Biomarker für die Wirksamkeit der Chemotherapie bei Ovarialkarzinompatientinnen dienen, um früher Platin-resistente Tumore zu erkennen und geeignete Therapien durchzuführen.

Die mitochondriale Masse spielt eine wichtige Rolle in der Cisplatin induzierten Apoptose durch die korrelierenden mtROS Level. Cisplatin induziert die intrinsische mitochondriale Apoptose, welche abhängig von der ROS-Induktion ist. Wird die ROS-

Induktion durch ROS-Fänger blockiert, steigt die Viabilität der Zellen nach Cisplatin-Inkubation signifikant. Cisplatin-Inkubation führt zu einer Steigerung der mitochondrialen Masse nach 48 h. Diese Steigerung der mitochondrialen Masse geht mit einer gesteigerten mitochondrialen Aktivität und daraufhin einem gesteigerten mtROS Level einher (Abbildung 61). Wird entweder die mitochondriale Aktivität oder die mitochondriale Biogenese blockiert, wird die mtROS-Induktion nach Cisplatin-Inkubation verringert und die Cisplatin induzierte Apoptose reduziert. Dementsprechend führt eine pharmakologische Steigerung des mtROS Levels in Kombination mit Cisplatin-Inkubation zu einer signifikant gesteigerten Induktion der Apoptose in Cisplatin-resistenten Zellen. Eine Kombinationstherapie von Cisplatin mit Substanzen die gezielt die Mitochondrien angreifen und das mtROS Level erhöhen, wie zum Beispiel UCP2-Inhibitoren oder Ascorbinsäure, erscheinen somit eine vielversprechende Therapiemöglichkeit für Platin-resistente Tumore und könnte verhindern dass Zellen, die eine geringe mitochondriale Masse haben, eine Chemotherapie überleben und letztlich kein Rezidiv entsteht.

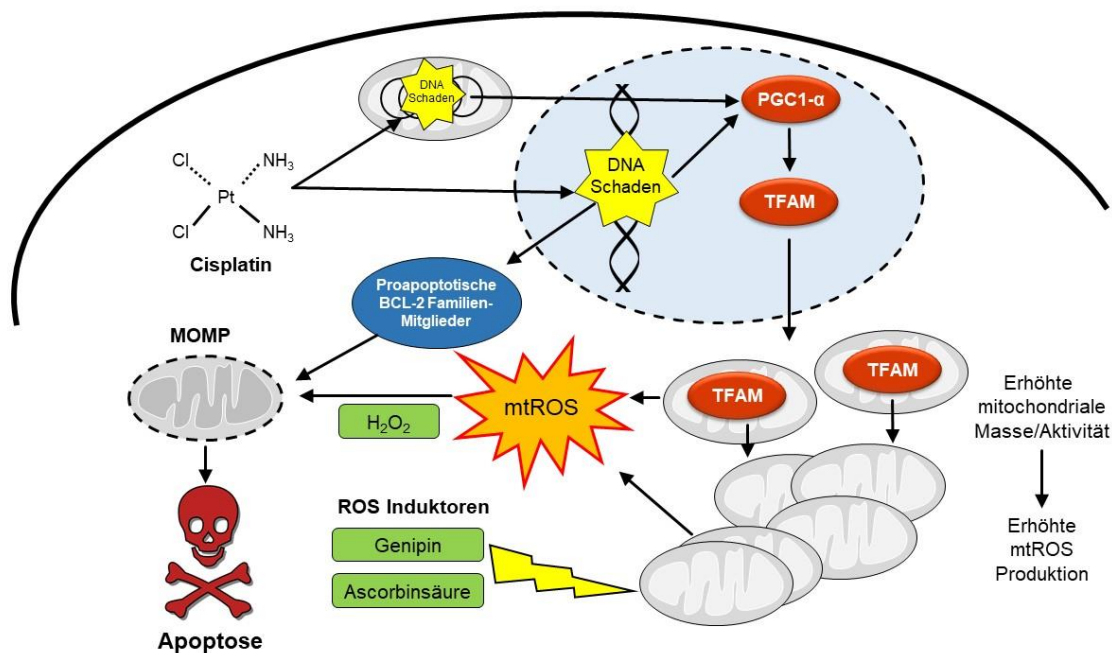


Abbildung 61: Modell der Cisplatin induzierten Apoptose in Ovarialkarzinomzellen. Cisplatin verursacht sowohl mtDNA-Schaden als auch nDNA-Schaden. Daraus resultiert die Aktivierung von PGC1 α . Durch die Aktivierung von PGC1 α wird die Expression von TFAM erhöht. TFAM transloziert in die Mitochondrien und führt zu einer gesteigerten mitochondrialen Biogenese. Die gesteigerte mitochondriale Aktivität in den Zellen führt zu einem erhöhten mtROS Level, dass schlussendlich zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran führt und in Cisplatin-sensitiven Zellen in der Apoptose endet. Die zusätzliche Steigerung des ROS Levels durch Inkubation mit Genipin, Ascorbinsäure oder H₂O₂ sensitiviert Cisplatin-resistente Zellen für die Apoptose. Verändert aus: Kleih *et al.* [149].

VLX600 induziert signifikant die Apoptose in der Kombination mit Cisplatin in Cisplatin-resistenten Zellen, wohingegen die Inkubation mit der Einzelsubstanz keinen Einfluss auf die Viabilität zeigt. Die Kombination von VLX600 und Cisplatin ist nicht toxisch für Fibroblasten und eine Phase-I Studie hat eine gute Verträglichkeit für den Menschen festgestellt [96]. Damit ist VLX600 eine sehr interessante Substanz für eine Kombinationstherapie mit Cisplatin bei Cisplatin-resistente Tumoren, aber eventuell auch für Cisplatin-sensitive Tumore, um die Rückfallquote zu reduzieren. Der genaue Wirkungsmechanismus von VLX600, der für die Induktion der Apoptose in der Kombination mit Cisplatin verantwortlich ist, konnte bisher nicht identifiziert werden, da die Blockierung der mitochondrialen Aktivität ein Nebeneffekt von VLX600 ist, als der Hauptgrund für die hohe tumorspezifische Toxizität in der Kombination mit Cisplatin. Der zugrundeliegende Wirkungsmechanismus könnte eine neue Achillesferse von Ovarialkarzinomen aufdecken und sollte daher intensiv erforscht werden.

Neben der Steigerung der mitochondrialen Biogenese oder des mtROS Levels der Zellen, ist auch die Blockierung der Degradation dysfunktionaler Mitochondrien über

die Mitophagie ein vielsprechender Mechanismus zur Überwindung der Cisplatin-Resistenz. Die Kombination des Mitophagie-Inhibitors Liensinine und Cisplatin führt zu einer signifikant gesteigerten Induktion der Apoptose bei Cisplatin-resistenten Zellen. Liensinine Inkubation allein ist hingegen für die Cisplatin-resistenten OVCAR8 Zellen nicht toxisch. Ebenfalls nicht toxisch ist die Kombination von Liensinine mit Cisplatin für Fibroblasten. Somit stellt auch die Mitophagie/Autophagie einen potenziellen Angriffspunkt zur Überwindung der Platin-Resistenz dar und unterstreicht nochmal die wichtige Rolle der Mitochondrien für die Cisplatin induzierte Apoptose. In zukünftigen Studien sollte daher das Hauptaugenmerk nicht nur auf den Cisplatin induzierten nukleären DNA-Schaden und die damit verbundenen Schadensreparatur gerichtet werden, sondern die Mitochondrien als wichtiges Zellorganell für die Cisplatin induzierte Apoptose beachtet und berücksichtigt werden.

Literaturverzeichnis

- 1 *Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018; 68(6): 394–424
- 2 *Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.* Krebs in Deutschland für 2013/2014 2017(11)
- 3 *Torre LA, Trabert B, DeSantis CE et al.* Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018; 68(4): 284–296
- 4 *Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European journal of cancer (Oxford, England 1990)* 2018; 103: 356–387
- 5 *Siegel RL, Miller KD, Jemal A.* Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018; 68(1): 7–30
- 6 *Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, Lisowska KM.* Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2018; 81(1): 17–38
- 7 *Morgan RJ, Armstrong DK, Alvarez RD et al.* Ovarian Cancer, Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *JNCCN* 2016; 14(9): 1134–1163
- 8 *European Medicines Agency.* Avastin epar product information
- 9 *European Medicines Agency.* Lynparza epar product information
- 10 *European Medicines Agency.* Rubraca epar product information
- 11 *Manohar S, Leung N.* Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Journal of nephrology* 2018; 31(1): 15–25
- 12 *Roberts JJ, Thomson AJ.* The mechanism of action of antitumor platinum compounds. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 1979; 22: 71–133
- 13 *Yang Z, Schumaker LM, Egorin MJ et al.* Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the

- mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: Possible role in apoptosis. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006; 12(19): 5817–5825
- 14 *Podratz JL, Knight AM, Ta LE et al.* Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiology of disease* 2011; 41(3): 661–668
- 15 *Montopoli M, Bellanda M, Lonardoni F et al.* “Metabolic Reprogramming” in Ovarian Cancer Cells Resistant to Cisplatin. *CCDT* 2011; 11(2): 226–235
- 16 *Berndtsson M, Hägg M, Panaretakis T et al.* Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *International journal of cancer* 2007; 120(1): 175–180
- 17 *Jin J, Li M, Zhao Z et al.* Protective effect of Wuzhi tablet (Schisandra sphenanthera extract) against cisplatin-induced nephrotoxicity via Nrf2-mediated defense response. *Phytomedicine international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2015; 22(5): 528–535
- 18 *Marzano C, Gandin V, Folda A et al.* Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free radical biology & medicine* 2007; 42(6): 872–881
- 19 *Rybak L.* Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: Antioxidant defense system. *Toxicological Sciences* 1999; 47(2): 195–202
- 20 *Marullo R, Werner E, Degtyareva N et al.* Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PloS one* 2013; 8(11): e81162
- 21 *Murphy MP.* How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 2009; 417(1): 1–13
- 22 *Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290(5806): 457–465
- 23 *Taanman JW.* The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et biophysica acta* 1999; 1410(2): 103–123

- 24 *Meisinger C, Sickmann A, Pfanner N.* The mitochondrial proteome: from inventory to function. *Cell* 2008; 134(1): 22–24
- 25 *Robin ED, Wong R.* Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of cellular physiology* 1988; 136(3): 507–513
- 26 *Fazzini F, Schöpf B, Blatzer M et al.* Plasmid-normalized quantification of relative mitochondrial DNA copy number. *Scientific reports* 2018; 8(1): 15347
- 27 *Green DR, Galluzzi L, Kroemer G.* Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science (New York, N.Y.)* 2014; 345(6203): 1250256
- 28 *Perciavalle RM, Stewart DP, Koss B et al.* Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nature cell biology* 2012; 14(6): 575–583
- 29 *Matoba S, Kang J-G, Patino WD et al.* p53 regulates mitochondrial respiration. *Science (New York, N.Y.)* 2006; 312(5780): 1650–1653
- 30 *Warburg O.* On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956; 123(3191): 309–314
- 31 *Danhier P, Bański P, Payen VL et al.* Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochimica et biophysica acta* 2017; 1858(8): 556–572
- 32 *Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L.* Biochemie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010
- 33 *Cadenas E, Davies KJ.* Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine* 2000; 29(3-4): 222–230
- 34 *Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Berenbaum MR.* Purves Biologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011
- 35 *Diaz F, Moraes CT.* Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell calcium* 2008; 44(1): 24–35
- 36 *Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J.* Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American journal of clinical nutrition* 2011; 93(4): 884S-90

- 37 *Lee H-C, Wei Y-H.* Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2005; 37(4): 822–834
- 38 *Wenz T.* Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1 α under cellular stress. *Mitochondrion* 2013; 13(2): 134–142
- 39 *Picca A, Lezza AMS.* Regulation of mitochondrial biogenesis through TFAM-mitochondrial DNA interactions: Useful insights from aging and calorie restriction studies. *Mitochondrion* 2015; 25: 67–75
- 40 *Ploumi C, Daskalaki I, Tavernarakis N.* Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *The FEBS journal* 2017; 284(2): 183–195
- 41 *Dolman NJ, Chambers KM, Mandavilli B et al.* Tools and techniques to measure mitophagy using fluorescence microscopy. *Autophagy* 2013; 9(11): 1653–1662
- 42 *Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A et al.* Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PloS one* 2015; 10(9): e0137675
- 43 *Hikita H, Sakane S, Takehara T.* Mechanisms of the autophagosome-lysosome fusion step and its relation to non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Research* 2018; 2(3): 120–124
- 44 *Khandia R, Dadar M, Munjal A et al.* A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. *Cells* 2019; 8(7)
- 45 *McKenna SL, McGowan AJ, Cotter TG.* Molecular mechanisms of programmed cell death. In: *Al-Rubeai M (Hrsg.): Apoptosis*, 62. Berlin: Springer; 1998: 1–31
- 46 *Gregory CD, Devitt A.* The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology* 2004; 113(1): 1–14
- 47 *Rock KL, Kono H.* The inflammatory response to cell death. *Annual review of pathology* 2008; 3: 99–126
- 48 *Ashkenazi A, Dixit VM.* Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)* 1998; 281(5381): 1305–1308

- 49 *Wajant H.* Death receptors. *Essays Biochem.* 2003; 39: 53–71
- 50 *Walczak H, Krammer PH.* The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Experimental cell research* 2000; 256(1): 58–66
- 51 *Fulda S, Debatin K-M.* Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25(34): 4798
- 52 *Kurokawa M, Kornbluth S.* Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 2009; 138(5): 838–854
- 53 *Tait SWG, Green DR.* Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2010; 11(9): 621–632
- 54 *Kalkavan H, Green DR.* MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell death and differentiation* 2018; 25(1): 46–55
- 55 *Antonsson B.* Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Molecular and cellular biochemistry* 2004; 256-257(1-2): 141–155
- 56 *Li H, Zhu H, Xu C-j, Yuan J.* Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 1998; 94(4): 491–501
- 57 *Song I-S, Savaraj N, Siddik ZH et al.* Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Molecular cancer therapeutics* 2004; 3(12): 1543–1549
- 58 *Holzer AK, Manorek GH, Howell SB.* Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Molecular pharmacology* 2006; 70(4): 1390–1394
- 59 *Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012; 31(15): 1869–1883
- 60 *Amable L.* Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological research* 2016; 106: 27–36
- 61 *Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM.* Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular pharmacology* 2001; 59(4): 657–663

- 62 *Cho J-M, Manandhar S, Lee H-R et al.* Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. *Cancer letters* 2008; 260(1-2): 96–108
- 63 *Mani M, Khaghani S, Gol Mohammadi T et al.* Activation of Nrf2-Antioxidant Response Element Mediated Glutamate Cysteine Ligase Expression in Hepatoma Cell line by Homocysteine. *Hepatitis monthly* 2013; 13(5): e8394
- 64 *Li W, Kong A-N.* Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Molecular carcinogenesis* 2009; 48(2): 91–104
- 65 *Bao L-J, Jaramillo MC, Zhang Z-B et al.* Nrf2 induces cisplatin resistance through activation of autophagy in ovarian carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2014; 7(4): 1502–1513
- 66 *Pak JH, Choi WH, Lee HM et al.* Peroxiredoxin 6 overexpression attenuates cisplatin-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *Cancer investigation* 2011; 29(1): 21–28
- 67 *Yao Z, Jones AWE, Fassone E et al.* PGC-1 β mediates adaptive chemoresistance associated with mitochondrial DNA mutations. *Oncogene* 2013; 32(20): 2592–2600
- 68 *Takemura Y, Satoh M, Satoh K et al.* High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2010; 394(2): 249–253
- 69 *Yun J, Mullarky E, Lu C et al.* Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science* 2015; 350(6266): 1391–1396
- 70 *Echtay KS, Murphy MP, Smith RAJ et al.* Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277(49): 47129–47135
- 71 *Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J et al.* Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002; 415(6867): 96–99
- 72 *Krauss S, Zhang Y, Lowell BB.* The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 248–261

- 73 *Nisoli E, Clementi E, Paolucci C et al.* Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science (New York, N.Y.)* 2003; 299(5608): 896–899
- 74 *Zhou J, Li G, Zheng Y et al.* A novel autophagy/mitophagy inhibitor liensinine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy through DNM1L-mediated mitochondrial fission. *Autophagy* 2015; 11(8): 1259–1279
- 75 *Presley AD, Fuller KM, Arriaga EA.* MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 2003; 793(1): 141–150
- 76 10N-Nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria
- 77 *Demaria M.* Cellular Senescence. New York, NY: Springer New York; 2019
- 78 *Agilent Technologies I.* Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide
- 79 *Uhlen M, Zhang C, Lee S et al.* A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science (New York, N.Y.)* 2017; 357(6352)
- 80 *Márquez-Jurado S, Díaz-Colunga J, das Neves RP et al.* Mitochondrial levels determine variability in cell death by modulating apoptotic gene expression. *Nature communications* 2018; 9(1): 389
- 81 *Ahn A, Chatterjee A, Eccles MR.* The Slow Cycling Phenotype: A Growing Problem for Treatment Resistance in Melanoma. *Molecular cancer therapeutics* 2017; 16(6): 1002–1009
- 82 *Angelis ML de, Francescangeli F, La Torre F, Zeuner A.* Stem Cell Plasticity and Dormancy in the Development of Cancer Therapy Resistance. *Frontiers in oncology* 2019; 9: 626
- 83 *Brown JA, Yonekubo Y, Hanson N et al.* TGF- β -Induced Quiescence Mediates Chemoresistance of Tumor-Propagating Cells in Squamous Cell Carcinoma. *Cell stem cell* 2017; 21(5): 650-664.e8
- 84 *Moore N, Houghton J, Lyle S.* Slow-cycling therapy-resistant cancer cells. *Stem cells and development* 2012; 21(10): 1822–1830

- 85 Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation* 2018; 25(3): 486–541
- 86 Dewson G, Kluck RM. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Science* 2009; 122(16): 2801–2808
- 87 Morgan MA, Lawrence TS. Molecular Pathways: Overcoming Radiation Resistance by Targeting DNA Damage Response Pathways. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015; 21(13): 2898–2904
- 88 Schaaf L, Schwab M, Ulmer C *et al.* Hyperthermia Synergizes with Chemotherapy by Inhibiting PARP1-Dependent DNA Replication Arrest. *Cancer research* 2016; 76(10): 2868–2875
- 89 Choi Y-M, Kim H-K, Shim W *et al.* Mechanism of Cisplatin-Induced Cytotoxicity Is Correlated to Impaired Metabolism Due to Mitochondrial ROS Generation. *PloS one* 2015; 10(8): e0135083
- 90 Idelchik MDPS, Begley U, Begley TJ, Melendez JA. Mitochondrial ROS control of cancer. *Seminars in cancer biology* 2017; 47: 57–66
- 91 Capaldi RA, Aggeler R, Turina P, Wilkens S. Coupling between catalytic sites and the proton channel in F1F0-type ATPases. *Trends in biochemical sciences* 1994; 19(7): 284–289
- 92 Chu G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269(2): 787–790
- 93 Foley OW, Rauh-Hain JA, del Carmen MG. Recurrent epithelial ovarian cancer: an update on treatment. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 2013; 27(4): 288-94, 298
- 94 Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in biochemistry* 2010; 47: 69–84
- 95 Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86(16): 6377–6381

- 96 *Mody K, Mansfield AS, Vemireddy L et al.* A phase I study of the safety and tolerability of VLX600, an Iron Chelator, in patients with refractory advanced solid tumors. *Investigational new drugs* 2018
- 97 *Zhang X, Fryknäs M, Hernlund E et al.* Induction of mitochondrial dysfunction as a strategy for targeting tumour cells in metabolically compromised microenvironments. *Nature communications* 2014; 5: 3295
- 98 *Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM.* AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104(29): 12017–12022
- 99 *Zhou Y, Wang S, Li Y et al.* SIRT1/PGC-1 α Signaling Promotes Mitochondrial Functional Recovery and Reduces Apoptosis after Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2018; 10
- 100 *Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C et al.* NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 2001; 410(6825): 212–215
- 101 *Nisoli E, Falcone S, Tonello C et al.* Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101(47): 16507–16512
- 102 *Whitaker RM, Wills LP, Stallons LJ, Schnellmann RG.* cGMP-selective phosphodiesterase inhibitors stimulate mitochondrial biogenesis and promote recovery from acute kidney injury. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2013; 347(3): 626–634
- 103 *Harhaji-Trajkovic L, Vilimanovich U, Kravic-Stevovic T et al.* AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 2009; 13(9B): 3644–3654
- 104 *Wang J, Wu GS.* Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 2014; 289(24): 17163–17173
- 105 *Xu Y, Yu H, Qin H et al.* Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells. *Cancer letters* 2012; 314(2): 232–243

- 106 *Montagnana M, Benati M, Danese E.* Circulating biomarkers in epithelial ovarian cancer diagnosis: from present to future perspective. *Annals of translational medicine* 2017; 5(13): 276
- 107 *Sevinc A, Adli M, Kalender ME, Camci C.* Benign causes of increased serum CA-125 concentration. *The Lancet Oncology* 2007; 8(12): 1054–1055
- 108 *Szekanecz E, Sándor Z, Antal-Szalmás P et al.* Increased production of the soluble tumor-associated antigens CA19-9, CA125, and CA15-3 in rheumatoid arthritis: potential adhesion molecules in synovial inflammation? *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1108: 359–371
- 109 *Bast RC, Badgwell D, Lu Z et al.* New tumor markers: CA125 and beyond. *International journal of gynecological cancer official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2005; 15 Suppl 3: 274–281
- 110 *Mari R, Mamessier E, Lambaudie E et al.* Liquid Biopsies for Ovarian Carcinoma: How Blood Tests May Improve the Clinical Management of a Deadly Disease. *Cancers* 2019; 11(6)
- 111 *Giannopoulou L, Kasimir-Bauer S, Lianidou ES.* Liquid biopsy in ovarian cancer: recent advances on circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2018; 56(2): 186–197
- 112 *Wolf DM, Segawa M, Kondadi AK et al.* Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent. *The EMBO journal* 2019: e101056
- 113 *Catanzaro D, Gaude E, Orso G et al.* Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase sensitizes cisplatin-resistant cells to death. *Oncotarget* 2015; 6(30): 30102–30114
- 114 *Wochna A, Niemczyk E, Kurono C et al.* Role of mitochondria in the switch mechanism of the cell death mode from apoptosis to necrosis--studies on rho0 cells. *Journal of electron microscopy* 2005; 54(2): 127–138
- 115 *Chandel NS, Schumacker PT.* Cells depleted of mitochondrial DNA (p 0) yield insight into physiological mechanisms. *FEBS Letters* 1999; 454(3): 173–176

- 116 *Larsen S, Nielsen J, Hansen CN et al.* Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *The Journal of physiology* 2012; 590(14): 3349–3360
- 117 *Wohlkoenig C, Leithner K, Deutsch A et al.* Hypoxia-induced cisplatin resistance is reversible and growth rate independent in lung cancer cells. *Cancer letters* 2011; 308(2): 134–143
- 118 *Semenza GL.* Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica et biophysica acta* 2011; 1813(7): 1263–1268
- 119 *Wen W, Ding J, Sun W et al.* Suppression of cyclin D1 by hypoxia-inducible factor-1 via direct mechanism inhibits the proliferation and 5-fluorouracil-induced apoptosis of A549 cells. *Cancer research* 2010; 70(5): 2010–2019
- 120 *Berners-Price SJ, Kuchel PW.* Reaction of cis- and trans-[PtCl₂(NH₃)₂] with reduced glutathione inside human red blood cells, studied by ¹H and ¹⁵N-¹H DEPT NMR. *Journal of Inorganic Biochemistry* 1990; 38(4): 327–345
- 121 *Lea Schaaf.* Hyperthermie steigert die Zytotoxizität von Cisplatin und Doxorubicin durch Hemmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung und der damit einhergehenden Verhinderung der Replikationsblockade. Dissertation. Stuttgart; 2016
- 122 *St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD.* Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277(47): 44784–44790
- 123 *Kowaltowski AJ, Souza-Pinto NC de, Castilho RF, Vercesi AE.* Mitochondria and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* 2009; 47(4): 333–343
- 124 *Li J, Zhou K, Meng X et al.* Increased ROS generation and SOD activity in heteroplasmic tissues of transmitochondrial mice with A3243G mitochondrial DNA mutation. *Genetics and molecular research GMR* 2008; 7(4): 1054–1062
- 125 *Lee H-C, Yin P-H, Chi C-W, Wei Y-H.* Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *Journal of biomedical science* 2002; 9(6 Pt 1): 517–526

- 126 *Kim O-Y, Cha HJ, Ahn KJ et al.* Identification of microRNAs involved in growth arrest and cell death in hydrogen peroxide-treated human dermal papilla cells. *Molecular medicine reports* 2014; 10(1): 145–154
- 127 *Luanpitpong S, Chanvorachote P, Stehlik C et al.* Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells. *Molecular biology of the cell* 2013; 24(6): 858–869
- 128 *Tochigi M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M et al.* Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation. *International journal of oncology* 2013; 42(3): 863–872
- 129 *Stephenson CM, Levin RD, Spector T, Lis CG.* Phase I clinical trial to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose intravenous ascorbic acid in patients with advanced cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2013; 72(1): 139–146
- 130 *Jacobs C, Hutton B, Ng T et al.* Is there a role for oral or intravenous ascorbate (vitamin C) in treating patients with cancer? A systematic review. *The oncologist* 2015; 20(2): 210–223
- 131 *Padayatty SJ, Sun H, Wang Y et al.* Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Annals of internal medicine* 2004; 140(7): 533–537
- 132 *Ma Y, Chapman J, Levine M et al.* High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. *Science translational medicine* 2014; 6(222): 222ra18
- 133 *Mailloux RJ, Adjeitey CN-K, Harper M-E.* Genipin-induced inhibition of uncoupling protein-2 sensitizes drug-resistant cancer cells to cytotoxic agents. *PloS one* 2010; 5(10): e13289
- 134 *Kawanishi M, Fukuda T, Shimomura M et al.* Expression of UCP2 is associated with sensitivity to platinum-based chemotherapy for ovarian serous carcinoma. *Oncology letters* 2018; 15(6): 9923–9928
- 135 *Imai K, Fukuda T, Wada T et al.* UCP2 expression may represent a predictive marker of neoadjuvant chemotherapy effectiveness for locally advanced uterine cervical cancer. *Oncology letters* 2017; 14(1): 951–957

- 136 *Shanmugam MK, Shen H, Tang FR et al.* Potential role of genipin in cancer therapy. *Pharmacological research* 2018; 133: 195–200
- 137 *Fryknäs M, Zhang X, Bremberg U et al.* Iron chelators target both proliferating and quiescent cancer cells. *Scientific reports* 2016; 6: 38343
- 138 *Oexle H, Gnaiger E, Weiss G.* Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1999; 1413(3): 99–107
- 139 *Zhang X, Fryknäs M, Hernlund E et al.* Induction of mitochondrial dysfunction as a strategy for targeting tumour cells in metabolically compromised microenvironments. *Nature communications* 2014; 5: 3295
- 140 *Mizushima N, Yoshimori T.* How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007; 3(6): 542–545
- 141 *Jiang P, Mizushima N.* LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods (San Diego, Calif.)* 2015; 75: 13–18
- 142 *Xu N, Zhang J, Shen C et al.* Cisplatin-induced downregulation of miR-199a-5p increases drug resistance by activating autophagy in HCC cell. *Biochemical and biophysical research communications* 2012; 423(4): 826–831
- 143 *Bao L, Jaramillo MC, Zhang Z et al.* Induction of autophagy contributes to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Molecular medicine reports* 2015; 11(1): 91–98
- 144 *Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Wei Q et al.* Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells. *Kidney international* 2008; 74(5): 631–640
- 145 *Fukuda T, Oda K, Wada-Hiraike O et al.* The anti-malarial chloroquine suppresses proliferation and overcomes cisplatin resistance of endometrial cancer cells via autophagy inhibition. *Gynecologic oncology* 2015; 137(3): 538–545
- 146 *Zhao X-g, Sun R-j, Yang X-y et al.* Chloroquine-enhanced efficacy of cisplatin in the treatment of hypopharyngeal carcinoma in xenograft mice. *PloS one* 2015; 10(4): e0126147

- 147 Bess AS, Ryde IT, Hinton DE, Meyer JN. UVC-induced mitochondrial degradation via autophagy correlates with mtDNA damage removal in primary human fibroblasts. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 2013; 27(1): 28–41
- 148 Czarny P, Pawlowska E, Bialkowska-Warzecha J et al. Autophagy in DNA damage response. *International journal of molecular sciences* 2015; 16(2): 2641–2662
- 149 Kleih M, Böpple K, Dong M et al. Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells. *Cell death & disease* 2019; 10(11): 851

Publikationen

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Originalarbeiten

Kleih *et al.*: Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells. *Cell Death and Disease*, 10, 851

Abstracts

Kleih *et al.*: Targeting mitochondria overcomes resistance to cisplatin-induced apoptosis of high grade serous ovarian cancer. Meeting: 4th German Pharm-Tox Summit, 25-28. Februar 2019; Stuttgart

Kleih *et al.*: Mitochondrial mass is a critical determinant of cisPt-induced cell death in ovarian cancer. Meeting: AACR Annual Meeting, 29. März - 3. April 2019; Atlanta, GA

Kleih *et al.*: Both mitochondrial function and composition of BCL2 family proteins determines sensitivity to Cisplatin in ovarian cancer cells and are promising targets to overcome Cisplatin resistance in ovarian cancer. Meeting: AACR Annual Meeting, 14-18. April 2018; Chicago, IL

Kleih *et al.*: Targeting Mitochondria Overcomes Resistance to cisPt-induced Apoptosis of High Grade Serous Ovarian Cancer. Meeting: 9th World Congress on Targeting Mitochondria, 23-25. Oktober 2018; Berlin

Kleih *et al.*: Targeting mitochondrial function to re-sensitize resistant ovarian carcinoma cells to Cisplatin. Meeting: Jahrestagung der DGHO, 29. September – 3. Oktober; Stuttgart

Kleih *et al.*: Mitochondrial function determines sensitivity to cisplatin in ovarian cancer – a potential avenue to resensitize cisplatin resistant cells. Meeting: 8th World Congress on Targeting Mitochondria, 23-24. Oktober 2017; Berlin

Weitere Publikationen

Heine *et al.*: Cyclin D1-CDK4 activity drives sensitivity to bortezomib in mantle cell lymphoma by blocking autophagy-mediated proteolysis of NOXA. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1):112.

Höring *et al.*: Dual targeting of MCL1 and NOXA as effective strategy for treatment of mantle cell lymphoma. *British Journal of Haematology*. 177(4):557-561